

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

博士論文概要

論文題目

淡水産巻貝における

絶食による学習能力の調節とその機序

Regulation of learning ability by food deprivation
in the pond snail *Lymnaea stagnalis*

申請者

戸谷 勇輝
Yuki TOTANI

生命理工学専攻 物理生物学研究

2021年12月

第1章 研究背景

進化的観点から、生物には空腹時の食料確保能力に長けた個体・種が生存するというバイアスが掛かっていると考えられる。肉食動物では空腹時の狩りの能力が、草食動物では気候変化による餌の種類の変化に適応する能力が必要となる。その結果、生物には元々、空腹時に最適な認知機能と身体機能とを発揮する仕組みが存在すると考えられている (Mattson, 2015)。また、実験室レベルでも栄養状態と脳機能との関係は調べられており、カロリー制限や短期間の絶食が、無脊椎動物から脊椎動物まで幅広い動物種で認知能力を向上させることがわかっている (Brünner et al., 2020; Teng et al., 2019)。このような食事制限による記憶能力の向上を制御するメカニズムは明らかになっていないが、セロトニンという神経伝達物質が関与していると考えられている (Teng et al., 2019)。このような背景から、本研究では、絶食による学習能力の調節機序を解明するために、絶食・学習能力・セロトニンの3者の関係を明らかにすることを目的とした。

本研究では、実験動物として淡水産巻貝ヨーロッパモノアラガイ (*Lymnaea stagnalis*) を使用した。ヨーロッパモノアラガイは、古典的条件づけからオペラント条件づけまで多様な条件づけを習得し、長期記憶を形成できる。ヨーロッパモノアラガイの実験動物としての特徴は、1) セロトニンが行動制御に重要であること、2) 中枢と末梢とを隔離する仕組みである血液脳関門が存在しないことが挙げられる。マウスなどの脊椎動物では、この仕組みが存在するため、栄養状態という末梢での現象と、学習という中枢での現象とを関連づけることが困難である。しかし、ヨーロッパモノアラガイではこの仕組みが無いため、中枢と末梢とを一つの系として捉えることが容易である。このような特徴から、ヨーロッパモノアラガイは、栄養状態と認知機能との関係を調べる上で適した実験動物であると言える。

本研究では、第2章でヨーロッパモノアラガイの味覚嫌悪学習の条件づけと行動解析とを自動化するシステムを作製し、第3章で絶食による学習能力と中枢神経系内セロトニン量の変化について研究を行った。次いで第4章で、そのセロトニン量の変化がどのような機序によってもたらされるのか、より詳細な研究を行った。最後に第5章で、これらの研究成果を総括した。

第2章 淡水産巻貝の味覚嫌悪学習と自動学習装置の作製

本研究では古典的条件づけの一種である味覚嫌悪学習 (conditioned taste aversion: CTA) (Kojima et al., 1996) を用いた。CTA は、動物が特定の食物の味を有害物質と関連づけることで形成され、有害物質が害を及ぼす前に回避するための適応的な生存メカニズムであると考えられている (Bernstein, 1999)。ヨーロッパモノアラガイにおいては、CTA は、嗜好性刺激 (例: ショ糖溶液) と忌避性刺激 (例: KCl 溶液) とを関連づけさせることで成立する。嗜好性刺激と忌避性刺激の組刺激が提示されることで、嗜好性刺激による摂食行動が抑制される (Kojima et al., 1996)。

先行研究では、CTA の条件づけや行動解析は実験者の手作業で行われてきた。手作業による条件づけは、熟練した実験者であれば優れた精度で実施できる一方、刺激の強度や間隔に個人差が生まれるという問題があった。また、行動実験に多大な時間と労力を必要とするという問題もあった。これらの問題を解決する装置として、本研究では、1) 条件づけ後、味覚嫌悪学習の長期記憶を保持させられるシステムを用意し、かつ2) 味覚嫌悪学習成績の自動判定を可能とする、自動学

習装置を作製した。自動学習装置は、モノアラガイを格納するチャンバー、それらにショ糖溶液や KCl 溶液を送り込むポンプ、モノアラガイの行動を記録するカメラ、それらを制御するマイクロコンピュータの4つから成り立っている。この装置を用いて自動条件づけを行った結果、コントロールグループと比較して、自動条件づけを施されたグループではショ糖溶液への咀嚼回数が有意に抑制され、味覚嫌悪学習が成立したことがわかった。また、先行研究による手作業の条件づけ (Kojima et al., 1996) と比較しても有意な違いは認められず、自動条件づけは手作業での条件づけに近い精度の訓練効果があることが明らかになった。

続いて、条件づけ後の学習成績の自動判定を行った。ヨーロッパモノアラガイの口を動画中から検出するため、局所的特徴量である LBP (local binary pattern) と機械学習アルゴリズムである AdaBoost (adapting boost) とを組み合わせて、検出器を作成した。その後、口の面積変化量を測定することでヨーロッパモノアラガイの咀嚼回数の自動計測に成功した。対応のある t 検定の結果、目視と自動計測との間に有意な違いは認められず、目視と同等の精度の計測を自動で行うことができた。

第3章 絶食による学習能力と中枢神経系 (CNS) 内セロトニン量の変化

第2章で作製した自動学習装置を用いて、絶食による学習能力変化と、CNS 内セロトニン量の変化を測定した。絶食条件は以下の3条件を用意した。1) 絶食なし：絶食させられていないコントロールグループ。2) 1日絶食：24時間の絶食を受けたグループ。3) 5日絶食：5日間の絶食を受けたグループ。これらの3条件で学習成績を測定した結果、1日絶食グループは他のグループと比較して有意に優れた学習成績を示すことが明らかになった。また、この時の CNS 内セロトニン量を測定した結果、学習成績の優れた1日絶食グループでは CNS 内セロトニン量が有意に減少することも明らかになった。続いて、CNS 内セロトニン量の増減が学習成績を調節するのかを確かめるため、人為的に CNS 内セロトニン量を増加させた際の学習成績の変化を観察した。300 μ M のセロトニン溶液を含む水槽中で24時間絶食させることで、同一の絶食条件であるコントロールグループと比較して、CNS 内セロトニン量は有意に増加し、かつ、学習成績は有意に低下した。以上の結果から、1日絶食は CNS 内セロトニン量を低下させることで、モノアラガイの学習能力を向上させることが明らかになった。

第4章 絶食による CNS 内セロトニン量の調節機序

第4章では、第3章で明らかになった絶食による CNS 内セロトニン量の変化を誘導する機序の解明を行った。まず、絶食がセロトニンの代謝系にどのような影響を与えるかについて検討した。セロトニンはアミノ酸の1つであるトリプトファンから合成され、その後、主に5-ヒドロキシインドール酢酸 (5-hydroxyindole acetic acid : 5-HIAA) へと分解される (Keszthelyi et al., 2009)。CNS 内セロトニン量の変化は、セロトニンの分解速度の変化で説明されることが多く、それは、セロトニンとその主要代謝産物である 5-HIAA との比によって求めることができる (Höglund et al., 2019)。絶食条件の異なるヨーロッパモノアラガイの CNS において 5-HIAA/セロトニン比を測定した結果、5-HIAA/セロトニン比は絶食によって有意な変化を示さなかった。よって、絶食によ

る CNS 内セロトニン量の変化は、セロトニン合成速度の変化によって引き起こされていることが示唆された。

絶食がセロトニン合成に与える影響を調べるため、絶食条件による血リンパ（体液）中と CNS 内に含まれるトリプトファン量の変化を測定した。結果、血リンパ中のトリプトファン濃度は、絶食なしと比較して1日絶食のグループで有意に低下した。また、絶食期間が5日に延長されても1日絶食と5日絶食とで有意な変化が観察されなかったことから、1日絶食の時点で血リンパ中のトリプトファンはほとんど枯渇していることがわかった。このような動態は、食料の有無と強く連動していることから、血リンパ中のトリプトファン濃度は食料依存的であることが示された。一方、CNS 内トリプトファン濃度については、血リンパのそれとは異なる動態を示した。絶食なしと比較して1日絶食でやや減少する傾向が認められたのに対して、絶食期間が5日間に延長されると一転して CNS 内トリプトファン濃度は増加した。このような動態は明らかに食料の有無とは連動しておらず、CNS 内には、食料に依存しないトリプトファン供給源が存在することが示唆された。

続いて、その供給源を調べるため、CNS 内のオートファジー活性を測定した。オートファジーは細胞内のタンパク質や小器官をアミノ酸レベルに分解し、再利用する機構であり、主に絶食や種々のストレスによって誘導されることが知られている (Mizushima and Komatsu, 2011)。絶食による CNS 内オートファジー活性の変化を観察した結果、5日絶食においてのみ、有意にオートファジー活性が増加していることが明らかになった。また、オートファジーを抑制することが知られている神経栄養因子 (Du et al., 2020) の受容体の mRNA 発現量を測定したところ、5日絶食でのみ有意に低下しており、5日絶食ではオートファジーの抑制が弱まっていることが明らかになった。さらに、オートファジーに直接関与する遺伝子群の mRNA 発現量も測定した。結果、長期的なオートファジー亢進によって発現誘導される SQSTM1 (Sahani et al., 2014) という遺伝子の発現量が増加しており、5日絶食におけるオートファジーの活性化を支持する結果が得られた。

最後に、5日絶食におけるオートファジーの活性化が、CNS 内セロトニン量に影響を与えるかを調べるため、人為的にオートファジーを促進もしくは抑制した際の CNS 内セロトニン量の変化を測定した。オートファジー活性の低い1日絶食のグループにオートファジー促進剤を投与し、その24時間後に CNS 内セロトニン量を測定したところ、コントロールと比較して有意に CNS 内セロトニン量が増加していた。また、オートファジー活性の高い5日絶食のグループにオートファジー抑制剤を投与し、その24時間後に CNS 内セロトニン量を測定したところ、コントロールと比較して有意に CNS 内セロトニン量が減少していた。これらの結果から、オートファジーには、CNS 内セロトニン量を調節する機能が存在することが明らかになった。

第5章 総括

本研究において、ヨーロッパモノアラガイでは食料依存的な経路とオートファジー依存的な経路の2つの経路によって、CNS 内セロトニン量と学習能力の調節が行われていることが明らかになった。CNS 内オートファジーが CNS 内セロトニン量に影響を与えることを示したのは本研究が初めてであり、本研究の成果は、これまで神経生物学における長年の問題とされていた「絶食と学習能力」に関する1つの機序を与えた。

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名：戸谷 勇輝 印

(2022年 2月 現在)

種類別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
原著論文	
○ [1]	Totani Y , Nakai J, Hatakeyama D, Dyakonova VE, Lukowiak K, Ito E, CNS serotonin content mediating food deprivation-enhanced learning is regulated by hemolymph tryptophan concentration and autophagic flux in the pond snail. <i>Nutr. Neurosci.</i> in press.
[2]	Kogo Y, Seto C, Totani Y , Mochizuki M, Nakahara T, Oka K, Yoshioka T, Ito E. Rapid differentiation of human dental pulp stem cells to neuron-like cells by high K ⁺ stimulation. <i>Biophys. Physicobiol.</i> 2020 Sep 26;17:132-139.
[3]	Nakai J, Totani Y , Kojima S, Sakakibara M, Ito E. Features of behavioral changes underlying conditioned taste aversion in the pond snail <i>Lymnaea stagnalis</i> . <i>Invert. Neurosci.</i> 2020 May 8;20(2):8.
○ [4]	Totani Y , Nakai J, Dyakonova VE, Lukowiak K, Sakakibara M, Ito E. Induction of LTM following an insulin injection. <i>eNeuro</i> . 2020 Apr 27;7(2):ENEURO.0088-20.2020.
○ [5]	Totani Y , Kotani S, Odai K, Ito E, Sakakibara M. Real-time analysis of animal feeding behavior with a low-calculation-power CPU. <i>IEEE Trans. Biomed. Eng.</i> 2020 Apr;67(4):1197-1205.
[6]	Aonuma H, Mezheritskiy M, Boldyshev B, Totani Y , Vorontsov D, Zakharov I, Ito E, Dyakonova VE. The role of serotonin in the influence of intense locomotion on the behavior under uncertainty in the mollusk <i>Lymnaea stagnalis</i> . <i>Front. Physiol.</i> 2020 Mar 17;11:221.
[7]	*Aonuma H, * Totani Y , Sakakibara M, Lukowiak K, Ito E. Comparison of brain monoamine content in three populations of <i>Lymnaea</i> that correlates with taste-aversive learning ability. <i>Biophys. Physicobiol.</i> 2018 May 16;15:129-135. (*共同筆頭著者)
○ [8]	*Aonuma H, * Totani Y , Kaneda M, Nakamura R, Watanabe T, Hatakeyama D, Dyakonova VE, Lukowiak K, Ito E. Effects of 5-HT and insulin on learning and memory formation in fooddeprived snails. <i>Neurobiol. Learn. Mem.</i> 2018 Feb;148:20-29. (*共同筆頭著者)
[9]	*Sunada H, * Totani Y , Nakamura R, Sakakibara M, Lukowiak K, Ito E. Two strains of <i>Lymnaea stagnalis</i> and the progeny from their mating display differential memory-forming ability on associative learning tasks. <i>Front. Behav. Neurosci.</i> 2017 Sep 11;11:161. (*共同筆頭著者)

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名：戸谷 勇輝 印

(2022 年 2 月 現在)

種類別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
総説論文	<p>[1] Nakai J, Totani Y, Hatakeyama D, Dyakonova VE, Ito E. Another example of conditioned taste aversion: case of snails. <i>Biology</i>. 2020 Nov 26;9(12):422.</p> <p>[2] Totani Y, Nakai J, Hatakeyama D, Ito E. Memory-enhancing effects of short-term fasting. <i>Eur. Zool. J.</i> 2020 Oct 8;87(1):597-602</p> <p>[3] Totani Y, Aonuma H, Oike A, Watanabe T, Hatakeyama D, Sakakibara M, Lukowiak K, Ito E. Monoamines, insulin and the roles they play in associative learning in pond snails. <i>Front .Behav. Neurosci.</i> 2019 Apr 2;13:65.</p> <p>[4] Ito E, Totani Y, Oike A. Necessity knows no law in a snail. <i>Eur. Zool. J.</i> 2017 Aug 23;84(1):457-464</p>
学会発表	<p>[1] Yuki Totani, Junko Nakai, Nozomi Chikamoto, Kanta Fujimoto, Etsuro Ito. The increase in CNS serotonin contents and the reversal of learning enhancement by long-term food deprivation are due to the activation of CNS autophagy in the pond snail <i>Lymnaea stagnalis</i>. 日本比較生理生化学会 2021 年度大会. (2021 年 12 月 4 日～5 日)</p> <p>[2] 戸谷 勇輝, 伊藤 悦朗. 巻貝の味覚嫌悪学習におけるオートファジーとセロトニンの役割. 第 92 回 日本動物学会 オンライン米子大会. (2021 年 9 月 1 日～4 日)</p> <p>[3] Yuki Totani, Etsuro Ito. Involvement of autophagy in the alternation of serotonin content in the central nervous system by food deprivation. The 44th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society & The 1st CJK International Meeting. (2021 年 7 月 28 日～31 日)</p> <p>[4] 戸谷勇輝, 伊藤悦朗. 絶食による中枢神経系セロトニン含有量調節機構の検討. 日本動物学会関東支部 第 73 回大会. (2021 年 3 月 20 日)</p> <p>[5] Yuki Totani, Junko Nakai, Etsuro Ito. Increased expression of insulin-related peptides in the CNS induces memory recall by creating the optimal environment. 日本比較生理生化学会 2020 年度大会. (2020 年 11 月 22 日～23 日)</p> <p>[6] 戸谷勇輝, 中居詢子, 伊藤悦朗. インスリンによる記憶想起の誘導. 日本動物学会 第 91 回大会. (2020 年 9 月 4 日～5 日)</p> <p>[7] Yuki Totani, Junko Nakai, Etsuro Ito. Expression of inflammatory factors in the CNS of food-deprived snails. 第 43 回日本神経科学大会. (2020 年 7 月 29 日～8 月 1 日)</p>

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名：戸谷 勇輝 印

(2022年 2月 現在)

種類別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
学会発表	<p>[8] <u>戸谷勇輝</u>, 中居詢子, 伊藤悦朗. 軽度の絶食による学習促進と炎症因子発現誘導. 日本動物学会関東支部 第72回大会. (2020年3月14日)</p> <p>[9] <u>Yuki Totani</u>, Hitoshi Aonuma, Junko Nakai, Etsuro Ito. Insulin rescues memory impairment caused by the increased 5-HT content in the central nerves system in <i>Lymnaea</i>. 10th World Congress of Neuroscience (IBRO 2019). (2019年9月21日～25日)</p> <p>[10] <u>戸谷勇輝</u>, 中居詢子, 伊藤悦朗. 淡水産巻貝の食事制限依存的記憶促進におけるインスリンとセロトニンの役割. 日本動物学会第90回大阪大会. (2019年9月12日～14日)</p> <p>[11] <u>Yuki Totani</u>, Hitoshi Aonuma, Junko Nakai, Etsuro Ito. Effect of 5-HT and insulin on learning and memory in <i>Lymnaea</i>. 1st Symposium on Invertebrate Neuroscience. (2019年8月13日～17日) ※ Participation Support for Early Career Researchers, Sponsored by IBRO PERC 受賞</p> <p>[12] <u>戸谷勇輝</u>, 中居詢子, 榎原学, 伊藤悦朗. インスリンによる文脈依存記憶の誘導. 日本動物学会関東支部第71回大会. (2019年3月9日)</p> <p>[13] <u>戸谷勇輝</u>, 中居詢子, 青沼仁志, 伊藤悦朗. 淡水産巻貝における自動学習装置の作製およびセロトニン・インスリンが学習記憶に及ぼす影響. TWIns 第6回研究交流セミナー. (2019年2月22日) ※ ポスター賞受賞</p> <p>[14] <u>戸谷勇輝</u>, 中居詢子, 伊藤悦朗. 淡水産巻貝におけるモノアミン含有量と学習能力差の関係. TWIns 10周年記念ジョイントシンポジウム. (2018年6月2日) ※ ポスター賞受賞</p> <p>[15] <u>戸谷勇輝</u>, 小田井圭, 伊藤悦朗, 榎原学. 淡水産巻貝のための自動学習装置の作製. 2018年電子情報通信学会総合大会. (2018年3月20日～23日)</p>
日本語解説	<p>[1] 比較生理生化学 Vol.37, No.3 (2020), 2020年12月31日発行 (日本比較生理生化学会) “お腹が空くと頭は良くなる?”</p>
獲得研究費	<p>[1] 守谷育英会研究助成金 2020年度～2021年度</p> <p>[2] 早稲田大学 若手研究者育成・支援事業「アーリーバードプログラム」 (BD070Z003200) 2019年度</p>