

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*

2022年2月

戸谷 勇輝

Yuki TOTANI

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*

2022年2月

早稲田大学 大学院先進理工学研究科
生命理工学専攻 物理生物学研究

戸谷 勇輝

Yuki TOTANI

概 要

栄養状態は多くの動物種の認知機能に影響を与える。カロリー制限や短期間の絶食は、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知られている。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、神経伝達物質の一種であるセロトニン (5-HT) のシグナル変化が関与していると考えられている。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・5-HT 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の2点が挙げられる。マウスなどの脊椎動物では、血液脳関門が存在するため、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ので、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。

本論文は、以下に示す5章から構成されている。各章の要約を示す。

第1章では、研究背景を整理し、絶食・学習能力・5-HT の3者の関係を明らかにすることで、絶食による学習能力の調節機序を明らかにすることを目的とすることを述べた。

第2章では、ヨーロッパモノアラガイの学習訓練とその評価とを自動化する装置を作製した。本装置は、動物への刺激提示を機械制御とすることで、実験者

に依らない均一でバイアスのない訓練を可能にした。また、機械学習により動物の口の動きを解析することで、従来の目視観察による評価であった、複数項目の同時評価を可能とした。

第3章では、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について研究を行った。その結果、短期間の絶食は学習能力を向上させる一方、長期間の絶食では学習能力の向上が認められなくなることを示した。また、この学習能力の変化には、CNS 内の 5-HT 含量の変化が重要な役割を果たしていることも明らかにした。

第4章では、第3章で明らかになった絶食による CNS 内 5-HT 含量の変化を誘導する機序の解明を行った。5-HT 合成経路に着目して研究を行った結果、CNS 内 5-HT 含量は、食料依存的な経路と、CNS 内オートファジー依存的な経路の、少なくとも2つの経路によって調節されていることが示された。CNS 内のオートファジーに依存的な経路は、食料が十分に存在する条件や、短期間の絶食を受けた条件では活性化しないが、長期間の絶食条件では継続的な栄養不足を補うために活性化し、その結果、CNS 内 5-HT 含量を回復させることを明らかにした。

第5章では、総括として各章の成果を統合し、絶食による学習能力の調節機序について、新たなモデルを提唱した。

以上、本論文では、絶食による学習能力の調節機序を解明することを目的に、絶食・学習能力・5-HT の3者の関係を調べた。その成果として、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 5-HT 含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。

目次

概要	i
略語一覧	vi
第1章 本研究の背景と目的	1
1.1. 本研究の背景	2
1.1.1. 栄養状態と認知機能	2
1.1.2. ヨーロッパモノアラガイ	3
1.1.3. 味覚嫌悪学習	4
1.1.4. 味覚嫌悪学習とモノアミン	5
1.2. 本研究の目的	6
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	8
2.1. 序論	9
2.2. 実験動物および統計解析	9
2.2.1. 実験動物	9
2.2.2. 統計解析	10
2.3. 自動学習装置の作製	10
2.3.1. 自動学習装置	10
2.3.2. 画像取得	13
2.3.3. 味覚嫌悪学習の手順	13
2.4. 機械学習によるヨーロッパモノアラガイの口検出器の作製	14
2.4.1. 局所的特徴量	15

2.4.2. 教師付き強化学習	16
2.5. 味覚嫌悪学習成績の自動判定	20
2.5.1. 口座標検出	20
2.5.2. 口面積変化量の解析	25
2.6. 自動学習装置の評価	26
2.6.1. 自動訓練の評価	26
2.6.2. 自動学習成績判定の評価	29
2.7. 考察	32
第3章 絶食による学習能力と中枢神経系内セロトニン含量の調節	37
3.1. 序論	38
3.2. 材料と方法	38
3.2.1. 実験動物	38
3.2.2. 絶食条件の定義	38
3.2.3. 中枢神経系内セロトニン含量の測定	39
3.2.4. 味覚嫌悪学習	40
3.2.5. 中枢神経系内セロトニン含量の調節	40
3.2.6. 統計解析	41
3.3. 結果	41
3.3.1. 絶食が学習能力に与える影響	41
3.3.2. 絶食が中枢神経系内セロトニン含量に与える影響	42
3.3.3. 中枢神経系内セロトニン含量が学習能力に与える影響	44

3.4. 考察	46
第4章 絶食による中枢神経系内セロトニン含量の調節機序	49
4.1. 序論	50
4.2. 材料と方法	50
4.2.1. 実験動物	50
4.2.2. 絶食条件の定義	51
4.2.3. トリプトファンとセロトニンの定量	51
4.2.4. オートファジーフラックスの解析	51
4.2.5. mRNA の定量	53
4.2.6. オートファジーフラックスの調節	55
4.2.7. 統計解析	55
4.3. 結果	56
4.3.1. 絶食が血リンパと中枢神経系内のトリプトファン濃度に与える影響	56
4.3.2. 絶食が中枢神経系内オートファジーに与える影響	58
4.3.3. オートファジーの活性化が中枢神経系内セロトニン含量に与える影響	62
4.4. 考察	63
第5章 総括	68
謝辞	73
参考文献	74
研究業績	83

略語一覽

- 5-HIAA : 5-Hydroxyindoleacetic acid
- 5-HT : 5-hydroxytryptamine
- 5-HTP : 5-hydroxytryptophan
- ANOVA : analysis of variance
- ATG : autophagy-related
- BafA1 : bafilomycin A1
- CCL : connected component labeling
- CGC : cerebral giant cell
- CNS : central nervous system
- CPG : central pattern generator
- CQ : chlorquine
- CRNF : cysteine-rich neurotrophic factor
- CS : conditioned stimulus
- CTA : conditioned taste aversion
- Ctrl : control
- CV1 : cerebral ventral 1 cell
- DAA : decarboxylase of aromatic amino acids
- DET : detection error tradeoff
- DMSO : dimethyl sulfoxide
- DW : distilled water
- ECD : electrochemical detection
- EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid
- ELISA : enzyme-linked immuno sorbent assay
- fps : frame per second
- HEPES : *N*-2 Hydroxyethylpiperazine-*N'*-2 ethanesulfonic acid

- HPLC : high performance liquid chromatography
- HSP40 : heat shock protein 40
- IN : inter neuron
- LBP : local binary pattern
- MAP1LC3/LC3 : microtubule associated protein 1 light chain 3
- MN : motor neuron
- mRNA : messenger ribonucleic acid
- MTORC1 : mechanistic target of rapamycin complex 1
- N1M : neuron 1 medial cell
- NMET : *N*- ω -methyl-5-hydroxytryptamine oxalate
- PCR : polymerase chain reaction
- SN : sensory neuron
- SQSTM1 : sequestosome 1
- Tat-D11 : Tat-beclin-1 D11
- Tat-L11S : Tat-beclin 1 L11 Peptide - Scrambled
- TH : tryptophan hydroxylase
- Trk : tropomyosin receptor kinase
- Trp : tryptophan
- TTL : transistor-transistor logic
- ULK1 : unc-51 like autophagy activating kinase 1
- ULK4 : unc-51 like autophagy activating kinase 4
- US : unconditioned stimulus

第 1 章

本研究の背景と目的

1.1. 本研究の背景

1.1.1. 栄養状態と認知機能

空腹時の食料確保能力は、肉食動物・草食動物を問わず、生物の生存に重要な要素である。肉食動物では空腹時の狩りの能力が必要となり、草食動物では気候変化に伴う餌の種類や場所の変化に適応する能力が必要となる。そのため、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認知機能との関係が調べられてきた。特に、食事や栄養素 (カロリー・ビタミン・ミネラルなど) が神経の発達に与える影響については、そのメカニズムも含めて多くのデータが蓄積されている (Black et al., 2013; Prado and Dewey, 2014)。一方、栄養状態の変化が成体の認知機能に与える影響については、明らかになっていないことが多い。近年の研究で、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機能を向上させることが報告されている (Teng et al., 2019; Br nner et al., 2020) が、そのメカニズムについては、明らかになっていないことが多い。このような、食事制限による認知機能の向上をもたらす要因として、以下の3説が提唱されている。

- 1) グルコースからケトン体への細胞内エネルギー源の切替 (Mattson et al., 2018)
- 2) 体内時計の変化 (Jamshed et al., 2019; Haupt et al., 2021)
- 3) 腸内細菌叢の変化 (Zarrinpar et al., 2014; Liu et al., 2020)

上記のような変化を始点として、細胞内シグナル経路が修飾され、最終的にはセロトニン (5-HT) という神経伝達物質のシグナル変化が、食事制限による認知機能の向上に重要な役割を果たしていると哺乳類では予想されている (Kondo et al., 2014; Teng et al., 2019)。しかし、5-HT のシグナルが変化する仕組みについては、有力な説は未だ提唱されていない。

1.1.2. ヨーロッパモノアラガイ

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*) (Fig. 1.1) 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) 絶食条件によって特定の学習の習得能力が変化すること、3) 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、血液脳関門が存在するため、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。



Fig. 1.1 ヨーロッパモノアラガイ (*Lymnaea stagnalis*)

1.1.3. 味覚嫌悪学習

味覚嫌悪学習 (conditioned taste aversion: CTA) は古典的条件づけの一種であり、動物が特定の食物の味を有害物質と関連付けることで形成される。これは、有害物質が害を及ぼす前にそれを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では、嗜好性刺激 (例: ショ糖溶液) と忌避性刺激 (例: KCl 溶液や電気ショック) を関連付けることで CTA が成立する。嗜好性刺激を条件刺激 (conditioned stimulus: CS)、忌避性刺激を無条件刺激 (unconditioned stimulus: US) とする。CS の後に US を提示することを繰り返すと、CTA 記憶が形成され、CS による咀嚼行動が抑制される (Fig. 1.2) (Kojima et al., 1996)。

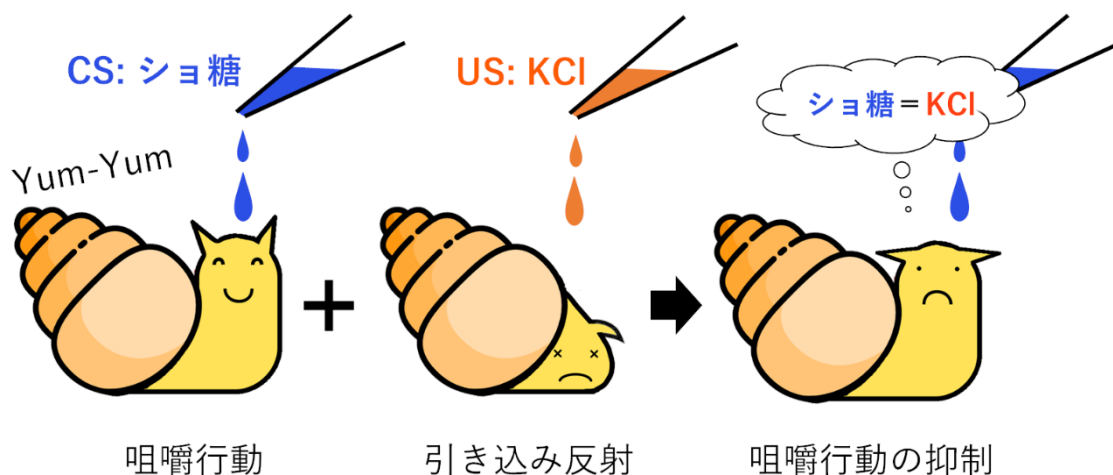


Fig. 1.2 味覚嫌悪学習

Totani et al., 2022 より一部改変。

CTA の形成過程では、5-HT 作動性の介在ニューロンである cerebral giant cell (CGC) から、咀嚼行動のリズムを作る central pattern generator (CPG) の介在ニューロンである neuron 1 medial (N1M) への抑制性入力が増強される (Kojima et al., 1997)。N1M 細胞は咀嚼行動を制御する B1 運動ニューロンとの間に興奮性シナプスを形成しており (Kemenes and Elliott, 1994)、CGC

による N1M 細胞の抑制増強が、咀嚼行動の抑制として表れる味覚嫌悪学習の主な細胞機構と考えられる。また、CS と US との刺激の統合は CGC で行われることも明らかになっている (Kojima et al., 1997) (Fig. 1.3)。

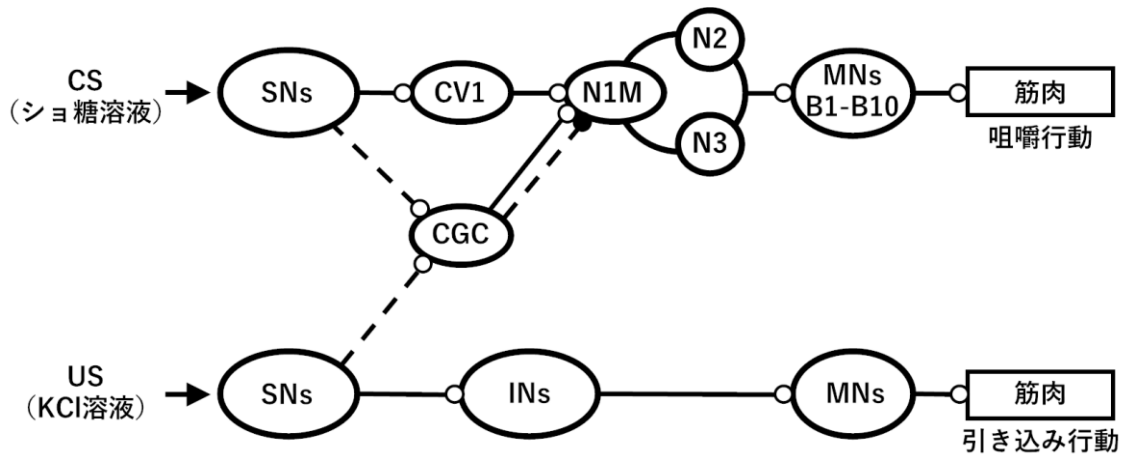


Fig. 1.3 味覚嫌悪学習の神経機構

白丸と黒丸はそれぞれ興奮性シナプスと抑制性シナプスを、実線と破線はそれぞれ単シナプス投射と多シナプス投射を示す。CGC: cerebral giant cell、CV1: cerebral ventral 1 cell、N1M: neuron 1 medial cell、SN: 感覚ニューロン、IN: 介在ニューロン、MN: 運動ニューロン。

Kojima et al., 1997 より一部改変。

1.1.4. 味覚嫌悪学習とモノアミン

ドーパミン、ノルアドレナリン、アドレナリン、5-HT、ヒスタミンなどの神経伝達物質を総称してモノアミンと呼ぶ。いずれも 1 つのアミノ基が 2 つの炭素鎖により芳香環につながる化学構造を有することが特徴である。シナプス間隙におけるモノアミン濃度の調節にはモノアミン酸化酵素と各モノアミンに対応したトランスポーターによる再取り込みの 2 つが関与しているが、各トランスポーターによる再取り込みの方が寄与が大きいと考えられている (Xu et al.,

2000)。モノアミンは無脊椎動物・脊椎動物の両者において、学習・記憶を含む、生存に重要な種々の行動の制御に関与している。

ヨーロッパモノアラガイの味覚嫌悪学習においては、Aonuma らによって、オクトパミンとドーパミンとの関係が調べられている。オクトパミン・ドーパミンともに、24 時間の絶食を受けた条件で CNS 内含量が低下する。しかし、オクトパミンについてはアゴニストとアンタゴニストを用いた実験から、味覚嫌悪学習への寄与は弱いことが報告されている (Aonuma et al., 2017)。一方、ドーパミンについてはアゴニスト等を使用した実験が行われていないが、ドーパミンは報酬系に作用することから、無脊椎動物の味覚を介した学習に重要であり、ヨーロッパモノアラガイの味覚嫌悪学習にも影響することが考えられる (Aonuma et al., 2016)。前述のとおり、味覚嫌悪学習の成立には 5-HT 作動性ニューロンである CGC から N1M 細胞への抑制性シナプス後電位の増強が必要である。この CGC の活性は絶食期間によって変化し、24 時間の絶食で自発的発火頻度が最も高くなる (Dyakonova et al., 2015a, 2015b)。またこのとき、移動を制御する 5-HT 作動性運動ニューロンの自発的発火頻度も向上する (Dyakonova et al., 2015a, 2015b; Aonuma et al., 2020)。これらの先行研究は、24 時間の絶食状態において、ヨーロッパモノアラガイの認知機能と運動機能が向上することと、その向上に、5-HT が重要な役割を果たしていることを示唆している。しかし、絶食・CNS 内 5-HT 含量・学習能力の 3 者の関係を調べた研究は未だない。

1.2. 本研究の目的

これらの背景から、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・5-HT 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、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 (CNS) 内 5-HT 含量の変化について研究を行った。次いで第 4 章で、第

3章で明らかになった 5-HT 含量の変化が、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

2.1. 序論

ヨーロッパモノアラガイの味覚嫌悪条件づけはこれまで、実験者の手作業で行われ、条件づけ後の行動解析も、目視での観察によって行われてきた。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試みとして、Takigami らによって、自動で味覚嫌悪学習の訓練を行う装置が開発された (Takigami et al., 2016)。しかし Takigami らの装置には、短期記憶までしか形成されず、条件づけ後の学習成績の解析までは自動化されていないという欠点があった。

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) 味覚嫌悪学習の自動判定を可能とする、自動学習装置の作製を目的とした (Totani et al., 2020a)。味覚嫌悪学習の長期記憶を保持させるため、本研究では、嫌悪刺激の種類を、Takigami らの研究で用いられた電気刺激から、味覚刺激である KCl 溶液へ変更した。これは、味覚嫌悪学習においては、心理学一般で用いられる電気刺激は、嫌悪刺激として不十分である (Garcia et al., 1968) ためである。また、学習成否の自動判定は、機械学習による画像認識を利用することで実装した。

2.2. 実験動物および統計解析

2.2.1. 実験動物

本研究では、実験室で飼育された、殻の長さが 20 mm – 25 mm の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の原種はオランダ、アムステルダム自由大学より入手した。小松菜 (*Brassica*

rapa var. peruviridis) を常時給餌し、脱塩素フィルタを通した水道水を用いて、21.0°C–22.5°C、12時間の明暗サイクル下で集団飼育した。行動実験やサンプルの採取はすべて午前中に行った。

2.2.2. 統計解析

データは箱ひげ図（箱中央の横棒＝中央値、箱の範囲＝四分位範囲、ひげの長さ＝箱の上端もしくは下端から四分位範囲の1.5倍以内に存在する最大値もしくは最小値）で示し、有意水準は $\alpha = 0.05$ とした。two-way repeated measures analysis of variance (ANOVA) と Holm 法による補正を行った Welch's *t* test を用いて、ヨーロッパモノアラガイの味覚嫌悪学習が成立したかを評価した。手動訓練と自動訓練の学習成績の比較は one-way repeated measures ANOVA と Holm 法による補正を行った Welch's paired *t* test を用いて行った。実験者による目視観察とコンピュータによる自動計測での咀嚼回数の比較は Welch's paired *t* test を用いて行った。より詳しく自動計測の性能を評価するために、Fisher's exact probability test を用いて、good learner と poor learner の比率を比較した。条件づけ後、CS に対して 0–1 bites/min の咀嚼行動を示した個体を good learner と定義した。自動計測が、目視観察と同様に味覚嫌悪学習の習得を検出できているか調べるため、Welch's independent *t* test を用いて両者を比較した。咀嚼回数以外の要素の学習前後での変化を Welch's independent *t* test を用いて比較した。統計解析ソフトは、R (version 4.1.0; <https://www.r-project.org/>) を使用した。

2.3. 自動学習装置の作製

2.3.1. 自動学習装置

自動学習装置は、動物を格納するチャンバーと、それらにシヨ糖溶液や KCl 溶液を送り込むポンプ、動物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つから構成される (Fig. 2.1)。それぞれのチャンバーには飼育水が 3.3 mL/s の流速で常に流れるように設定した。本装置では CS として 100 mM シヨ糖溶液を使用し、US として 200 mM の KCl 溶液を使用した。Takigami らの装置では US として電気刺激が用いられたが、味覚嫌悪学習においては電気刺激よりも味覚刺激の方が優れた学習成績を示すため、本研究では KCl 溶液を US として使用した。ポンプの制御にはトランジスタによる transistor-transistor logic (TTL) 回路を使用した (Fig. 2.2)。TTL 信号は、マイクロコンピュータである Arduino-Uno REV 3 を用いて発生させた。CS と US の流入口には逆止弁を設置することで、ポンプとチューブの間を常に溶液で満たし、ポンプの起動とチャンバーへの溶液流入の時間差を小さくした。動物の行動記録には、Raspberry Pi Camera Module V2 (Raspberry Pi Foundation) と Raspberry Pi 3 を使用した。

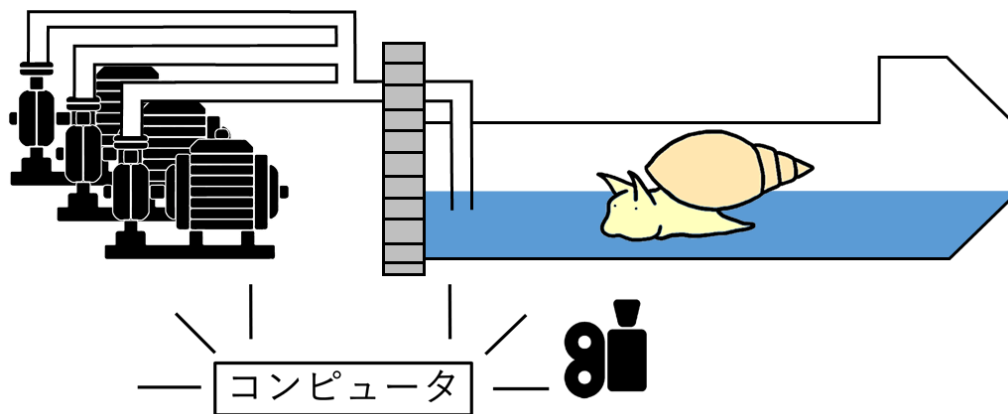


Fig. 2.1 自動学習装置の概観

2.3.2. 画像取得

ヨーロッパモノアラガイの摂食行動の画像は、自動学習装置のチャンバー下部に設置したビデオ撮影装置で、32ビットの640×480ピクセルのカラー画像を6フレーム/秒 (fps) のビデオレートで撮影した。ヨーロッパモノアラガイのショ糖溶液に対する摂食行動の反応は最大で1分間に15回 - 20回であり、これは0.3 Hz程度に相当する (Kojima et al., 1996; Aonuma et al., 2018)。よって、6 fps (6 Hz) のフレームレートは咀嚼行動の解析に十分な時間解像度である。ショ糖溶液に対するヨーロッパモノアラガイの反応は、刺激提示終了信号の直後から1分間記録した。

2.3.3. 味覚嫌悪学習の手順

自動学習装置内のヨーロッパモノアラガイには、移動を制限するため、手製のクリップによる殻の前部と後部の物理的固定が施された。10分間の馴化の後、条件づけ前のCSに対する咀嚼行動を調べるため、プレテストを行った。プレテストではCS提示後、1分間に口を開ける回数をカウントすることで、CSに対する咀嚼行動を計測した。

プレテストの後、10分間の休憩を挟み、forward 条件づけ (CS-US 組刺激) を、組刺激間の間隔を1分として10回行った。CSを2 mL/sで5秒間提示した後、USを2 mL/sで5秒間提示した。条件づけ後のショ糖への咀嚼行動は、CSとUSのペアを最後に提示してから10分後に観察した。条件づけ後の咀嚼行動の抑制が組刺激の提示順序特異的であることを示すために、Backward 条件づけ (US-CS 組刺激) をコントロール実験として行った。CSもUSも提示しない naive 群も用意した (Fig. 2.3)。

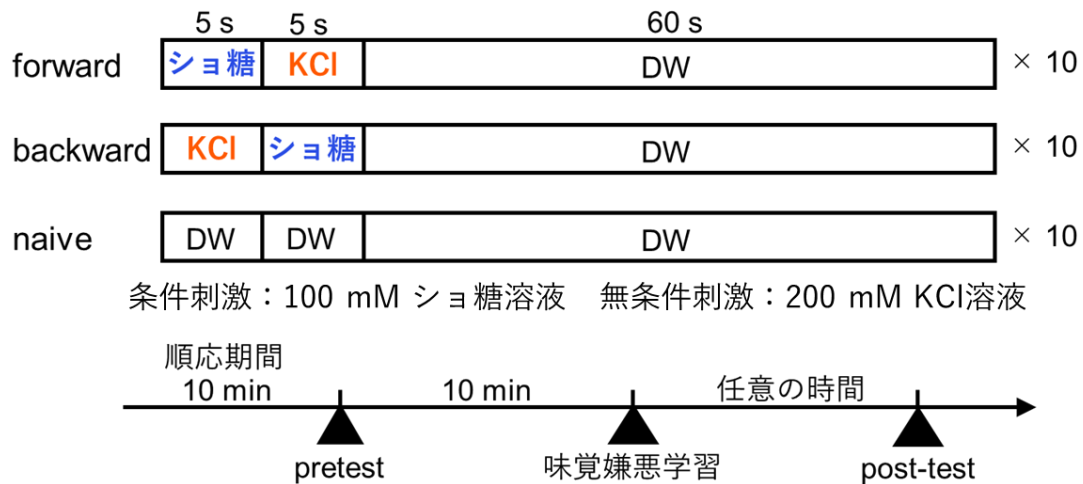


Fig. 2.3 味覚嫌悪学習の手順

条件づけが成功したかどうかを判断するために、CS-US/US-CS のペアを最後に提示してから 10 分後に、CS のみを 5 秒間提示したときに誘発された咀嚼行動を観察した。ポストテストの後、ヨーロッパモノアラガイを飼育槽に戻した。

2.4. 機械学習によるヨーロッパモノアラガイの口検出器の作製

画像処理と機械学習は、OpenCV 3.1 (<https://opencv.org/>) のシェアウェアプログラムを用いて行った。OpenCV には様々なインターフェース (C、C++、Python など) が用意されており、本研究では、開発プラットフォームとして Python 2.7 (<https://www.python.org/>) を使用した。

動画中の口の座標をリアルタイムで取得するために、機械学習アルゴリズムを適用し、ヨーロッパモノアラガイの口の検出器を作製した。検出器の作製は、4491 枚の口の正のサンプル画像と、6583 枚の口以外の負のサンプル画像を元に、後述の local binary pattern (LBP) 特徴検出演算子 (Ojala et al.,

1996; Chang-Yeon, 2008) と Real AdaBoost (Freund and Schapire, 1997) アルゴリズムを用いた機械学習によって行った。

2.4.1. 局所的特徴量

LBP は、輝度変化に強いグレースケールのテクスチャ演算子である。近傍集合 P を用いて、中心となる画素 " g_c " とその近傍 $\{g_0, \dots, g_{P-1}\}$ との差を計算することで、LBP 値を得られる (Function (1) および Fig. 2.4)。

$$LBP = \sum_{i=0}^{P-1} s(g_i - g_c) 2^i \quad (1)$$

$$s(x) = \begin{cases} 1, & x > 0 \\ 0, & x \leq 0 \end{cases}$$

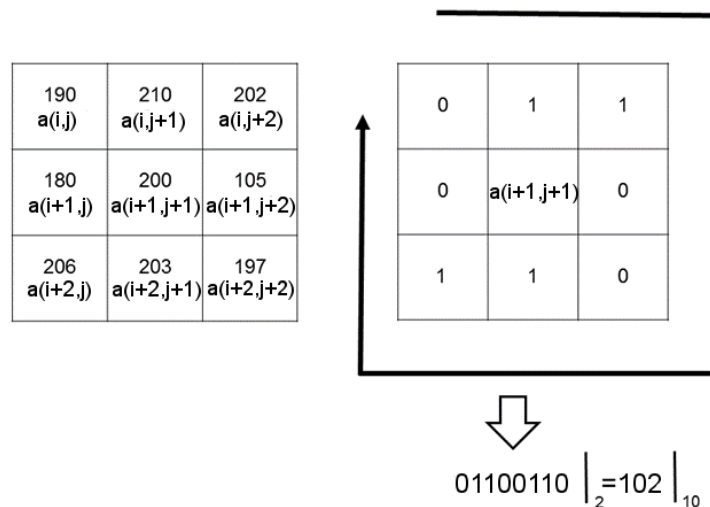


Fig. 2.4 LBP 値の算出方法

Totani et al., 2020a より一部改変。

Fig. 2.5 に画像から LBP 特徴量を得るためのフローを示す。様々なサイズのグレースケール画像を、各画素の強度が 0 から 255 の範囲である 40 px × 40 px の画像に変換する。各ピクセルの輝度は、Function (1) によって、周囲の 8 ピクセル ($P=9$) の強度と比較され、LBP 値に変換される。各値の出現頻度をヒストグラムとすることで、LBP 特徴量を得られる。

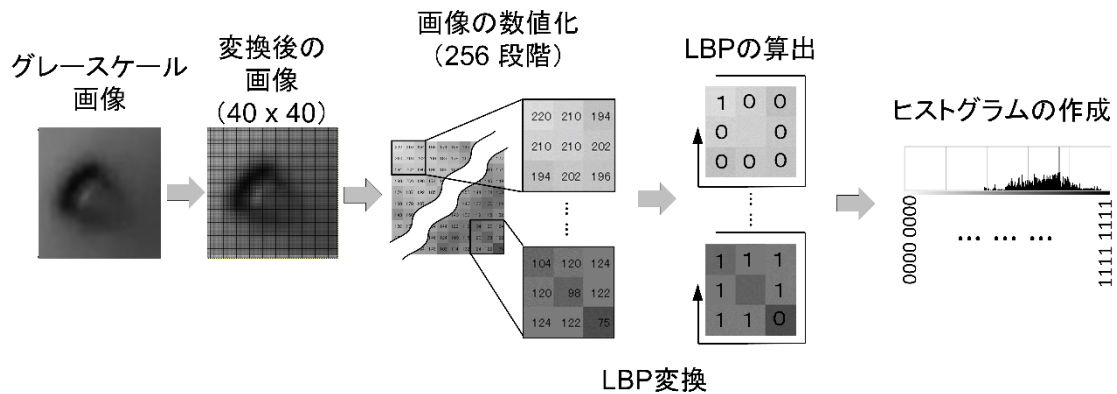


Fig. 2.5 LBP 特徴量の算出方法

Totani et al., 2020a より一部改変。

2.4.2. 教師付き強化学習

強化学習の手法について説明する前に、基本的な用語に関して説明を行う。「強化学習」とは、統計的手法により、与えられた課題に対して最も高い評価の解を出力する、機械学習の1形態である。「教師付き」とは、正解・不正解を定義する教師役が存在することを指す。よって「教師付き強化学習」では、与えられた正解データと不正解データから、正解データに多く出現する特徴を統計的に組み合わせ、正解データのみを精度良く選択することが目的となる。本研究で使用した Real AdaBoost アルゴリズムは、Boosting アルゴリズムの一種であり、少数の弱検出器を統合して強検出器とすることを反復することで、弱検出器の性能を向上させるアルゴリズムである。弱検出器とは、認識対象物の特徴的な部位のことを指す。例えば人の顔を検出する課題であれば、「黒い領域（目）が2つあること」や「2つの黒い領域の中央下付近に白い領域（鼻）があること」などが弱検出器となる。これらを統計学的に最も評価値が高くなる順序で組み合わせたものが、強検出器と呼ばれ、対象物を認識するためのフィルタとして使われる。Real AdaBoost はこの弱検出器の評価を実数（real number）で行うことで、弱検出器の評価精度を高めた手法である。

以下に、Real AdaBoost の概要を説明する。教師画像セット S を $(x_1, y_1), \dots, (x_m, y_m)$ とする。 $x_i \in X$ をサンプル画像データとし、 $y_i \in \{-1, +1\}$ とする（正解データ=1、不正解データ=-1）。

1. 各サンプルの重み $D_1(i) = 1/M$ を均等にする。
2. 各サンプル x_i に対して乱数 j でラベリングする。
3. t (1, 2, ..., T) 回の反復学習により、 m (1, 2, ..., M) 個の弱い検出器を得る。

- I. 各サンプルの重みと特徴量を足し合わせ、ヒストグラムを作製する。

$$W_t^j = \sum_{\substack{i: x_i \in X_i \wedge y_i = l \\ l = \pm 1}} D_t(i) \quad (2)$$

W_t^j は j 個のサンプルの中での正解データの特徴量の出現頻度を表す。

- II. 各 X_j に対する弱検出器の出力 h を次のように設定する。

$$\forall x \in X_j, h(x) = \frac{1}{2} \ln \frac{W_{+1}^j + \varepsilon}{W_{-1}^j + \varepsilon} \quad (3)$$

ここで ε は、0 による除算を避けるための小さな正の定数である。

- III. 弱検出器の評価値を算出する。

$$Z = \sum_j \sqrt{W_{+1}^j W_{-1}^j} \quad (4)$$

4. Z が最小となる h_t を選択する。
5. 各サンプルの重み付けを更新する。

$$D_{t+1}(i) = D_t(i) \exp[-y_i h_t(x_i)] \quad (5)$$

とし、 $D_{t+1}(i)$ の合計が +1 になるように正規化する。

6. 強検出器 H を出力する。

$$H(x) = \text{sign} \left[\sum_{t=1}^T h_t(x) - b \right] \quad (6)$$

ここで、 b は初期値が 0 と置かれる検出の閾値である。

H が閾値 b よりも高ければ検出し、低ければ検出しない。

学習回数 (T) は 20 回とした。

Fig. 2.6 に、Real AdaBoost による LBP 特徴検出でのヨーロッパモノアラガイの口検出率を示す。OpenCv のカスケード分類関数 `cv2.CascadeClassifier.detectMultiScale` を用いて、画像中の様々なサイズの口を検出した。咀嚼行動の様々なタイミングを記録した合計 24,101 枚の画像のうち、平均成功率 55% で口の座標が得られた。誤検出率（別のものを口として検出した割合）は 7% で、未検出率（口が存在するにも関わらず、口を検出できなかった割合）は 38% だった。検出の失敗は、胴体が殻の中でねじれることや、閉じた口の大きさがあまりにも小さくなること、口に似た別の器官が存在すること、口がカメラに映らない位置に移動することが原因で発生した（「2.7 本研究の課題」参照）。口の画像が 1 分以上にわたって検出されなかった場合、プログラムは最終的な判定を行わず、データを破棄するよう設定した。

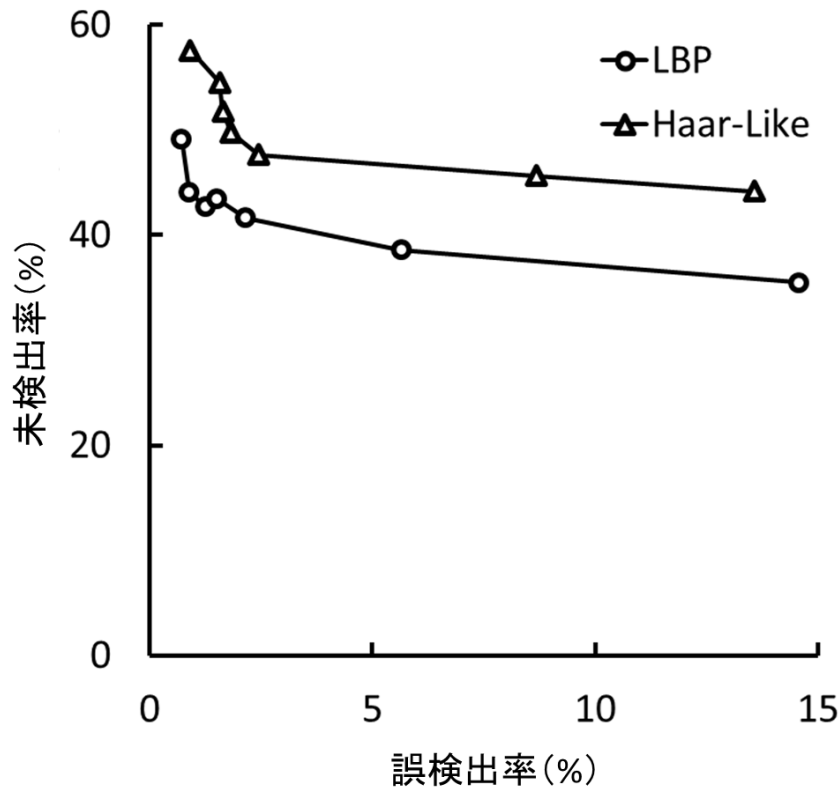


Fig. 2.6 DET 曲線

Totani et al., 2020a より一部改変。

LBP 特徴量がヨーロッパモノアラガイの口の検出に適切な特徴量であったか調べるため、LBP 特徴量と Haar-like 特徴量による検出誤差トレードオフ曲線 (DET 曲線) を作成した。Haar-like 特徴量は、人間の顔検出に用いられる特徴量である。Viola と Jones は、Haar ウェーブレットという特徴量を応用し、Haar-like 特徴量を開発した (Viola and Jones, 2001)。Haar-like 特徴量は、検出枠の特定の位置にある隣接する矩形領域を設定し、各矩形領域の画素の強度の合計値の差を計算することで得られる。2つの特徴量の DET 曲線を比較した結果、LBP 特徴量を用いたアルゴリズムの結果が、Haar-like 特徴量の検出率よりも優れていることがわかった (Fig. 2.6)。

2.5. 味覚嫌悪学習成績の自動判定

味覚嫌悪学習成績の自動判定のための信号処理シーケンスを Fig. 2.7 に示す。ヨーロッパモノアラガイが連想記憶を獲得・保持しているかどうかの解析は、動画記録から口領域を検出し、口面積の経時的な変化を測定し、1分間の口の開閉回数を計測することで味覚嫌悪学習を習得したか否かを判断する、という3つのステップを用いて行った。

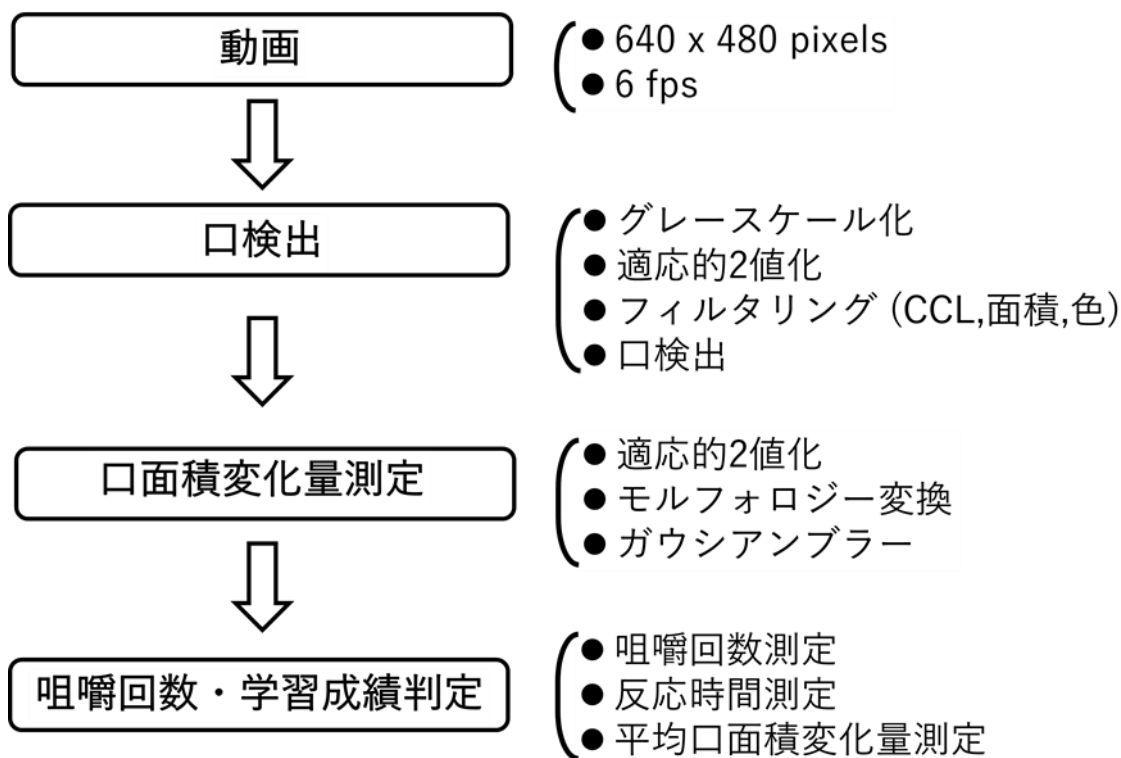


Fig. 2.7 咀嚼行動解析の手順

Totani et al., 2020a より一部改変。

2.5.1. 口座標検出

咀嚼行動のリアルタイム解析のボトルネックは、口座標の抽出処理である。口座標抽出の精度を落とさず計算量を減らすため、非口領域を連結成分ラベリ

ング法（connected component labeling : CCL）と色・サイズフィルタによって除外し、平均して画像の 99.5%を計算から除外するすることに成功した（Fig. 2.10）。CCL は、2 値化された画像の境界を検出し、連結成分ごとにグループ分けする技術である（Fig. 2.8）。

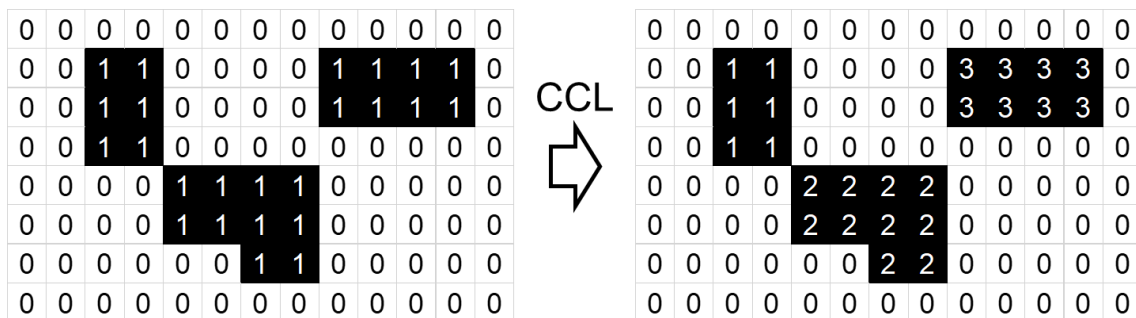


Fig. 2.8 CCL 処理の模式図

Fig. 2.9 は、CCL の前処理手順を示したものである。6 fps で記録された元のカラー画像（Fig. 2.9-A）をグレースケール画像に変換し（Fig. 2.9-B）、いくつかのフィルタリング処理を経て、エッジを検出するための「適応的閾値設定」（cv2.adaptiveThreshold）（Fig. 2.9-C）、小さな白いドットを除去するための「モルフォロジカル変換」（Fig. 2.9-D）、「移動平均フィルタ」（Fig. 2.9-E）、「2 値化」（Fig. 2.9-F）を行った。2 値化後に OpenCV の連結成分ラベリング法（cv2.connectedComponentsWithStats）を適用した。これらのフィルタを用いて、Fig. 2.10-D に示すように、口の候補領域を 22%にまで削減することができた。さらに、予測される口の大きさから外れる候補領域や、平均的な色が口の色と異なっている候補領域を除外した。その結果、口の候補領域を 0.5%にまで減少させることができた。これらの処理により、性能の低いコンピュータでもリアルタイムに口を識別することができた。

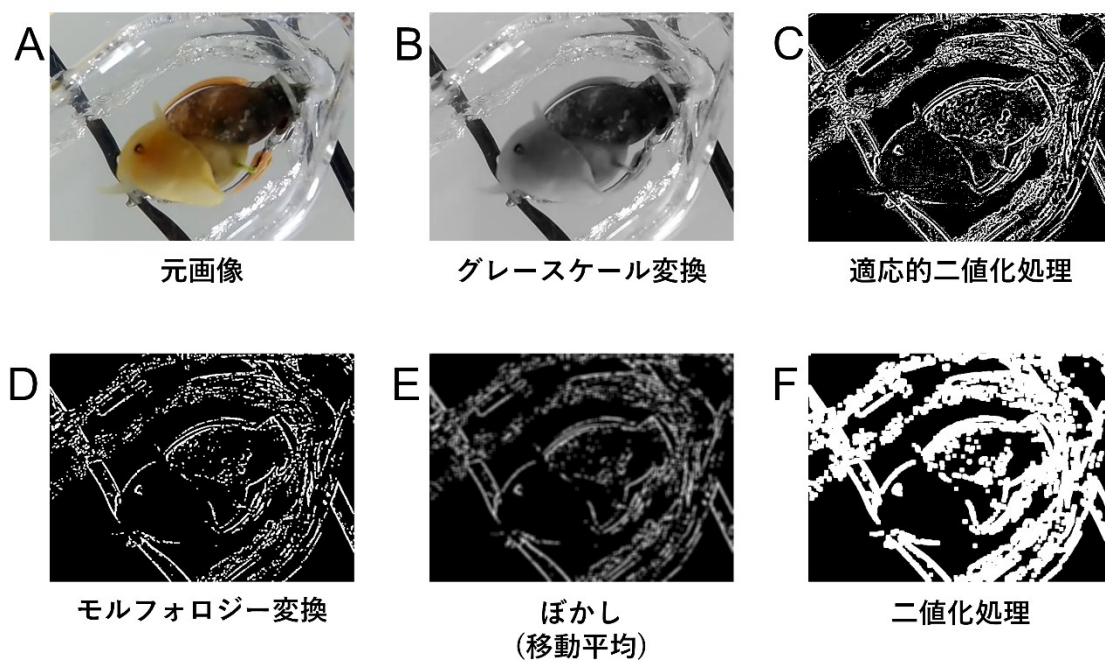


Fig. 2.9 CCL 処理のための前処理

Totani et al., 2020a より一部改変。

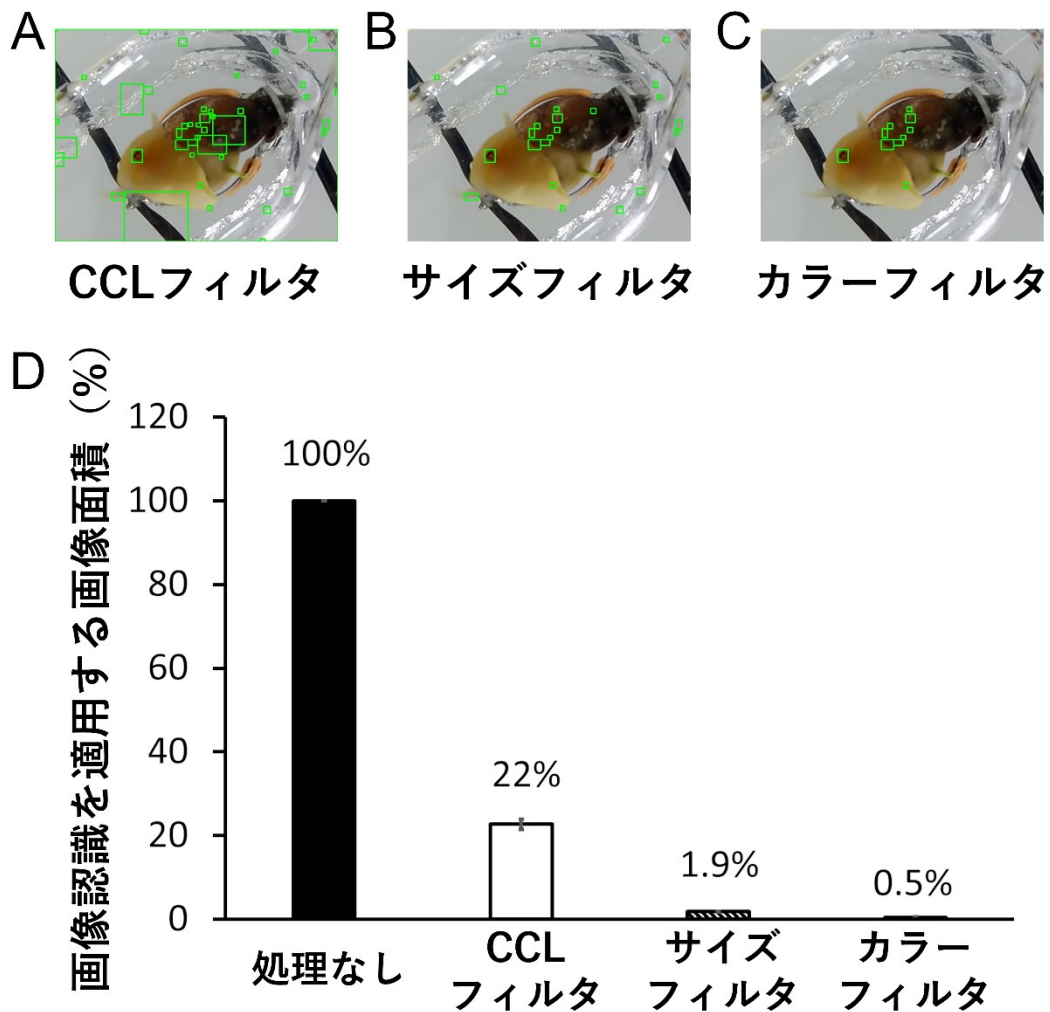


Fig. 2.10 CCL とサイズ・色でフィルタすることで、注目画素を 99.5%削減できた。

Totani et al., 2020a より一部改変。

OpenCv のカスケード分類器 `cv2.CascadeClassifier.detectMultiScale` を用いて、画像中のヨーロッパモノアラガイの口を検出した (Fig. 2.11)。1つのフレームから複数の口の候補が検出された場合、隣接している候補領域が最も多い候補を口と定義した。

入力画像

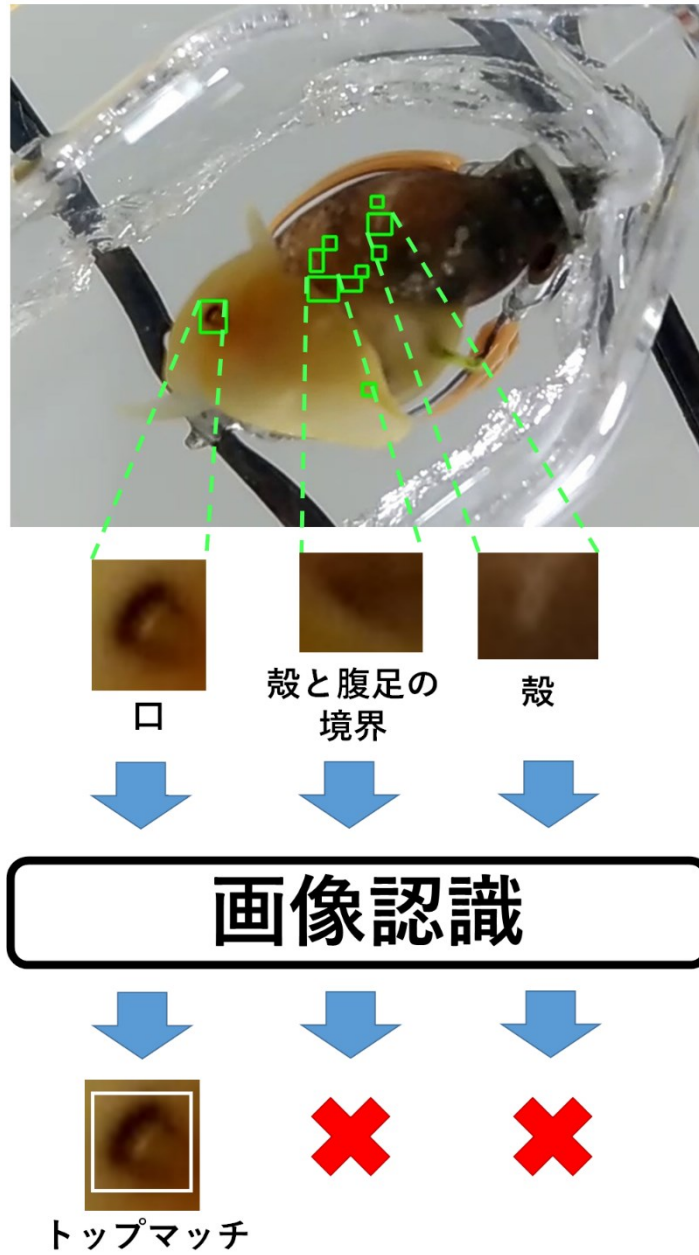


Fig. 2.11 フィルタリングにより高速で高精度の口検出が可能となった。

Totani et al., 2020a より一部改変。

2.5.2. 口面積変化量の解析

口の開閉回数を解析するため、口の面積変化量を測定した。背景の明るさの違いによる影響を防ぐため、画像の画素 $I(x,y)$ は、Function (7) と Function (8) に従って、閾値 $t(x,y)$ を用いて2値化された。

$$t(x,y) = \frac{1}{N} \sum_{x,y} \sum_{c \in D} I(x,y) \quad (7)$$

8近傍で考えると、 $N=9$ となる。

$$I(x,y) \begin{cases} = 0 & \text{if } I(x,y) > t(x,y) \\ = 1 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (8)$$

そして、画像認識によって得られた口の画像は、Fig. 2-12A に示すように、グレースケール変換、ガウスフィルタリング、適応的閾値設定、モルフォロジカル変換などの処理が施された。

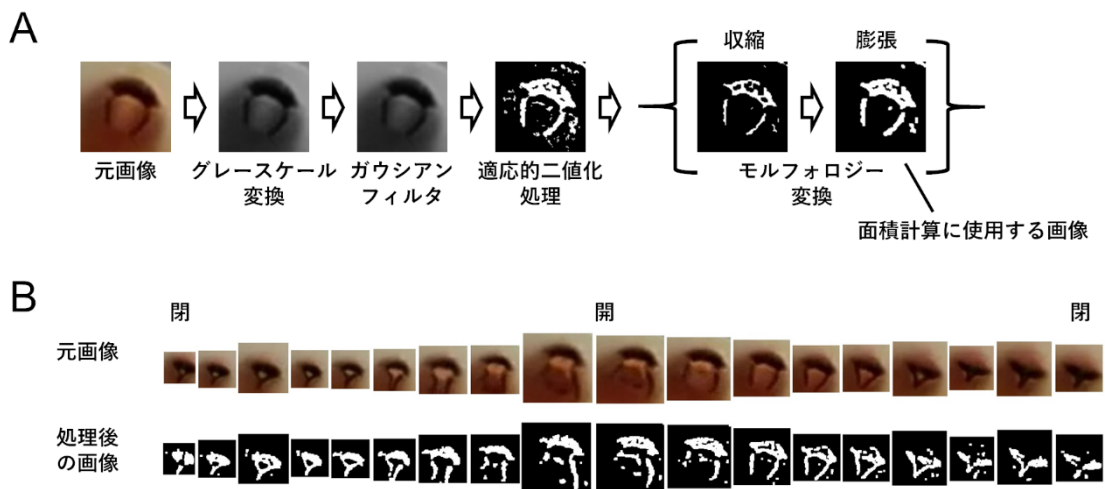


Fig. 2.12 モノアラガイの咀嚼行動の一連の流れ

Totani et al., 2020a より一部改変。

モルフォロジカル・グラデーション・フィルタでノイズを除去した後、処理後の画像 (Fig. 2.12-A 膨張) に含まれる白いピクセルの数を算出した。連続

する 3 つの画像の時間移動平均は、SciPy.org で `numpy.convolve (a,v,mode = 'valid')` として線形畳み込みを行い、以下の式に適用した。

$$(a \times v)[n] = \sum_{m=0}^{359} a[m]v[n - m] \quad (9)$$

a : 口の面積を表す第一の次元入力配列、 v : 時間を表す第二の次元入力配列。

先行研究から、口の開閉の 1 サイクルを検出するためには、2 秒 - 4 秒の撮影が必要であることがわかっている (Totani et al., 2019)。これは、6 fps の映像では、1 回の口の開閉に 12 frames - 24 frames が必要であることを意味している。経験的に、口が開いている状態から閉じている状態への最小の面変化は、全シーケンスで合計 200 px であることがわかったので、口の動きを検出するための最大の閾値を、16.7 (200/12) pixels/frame と推定した。この推定値をもとに、口元の変化の絶対的な閾値を、最も正解率の高かった 5 pixels/frame に設定した。口の開度は、SciPy.org の `numpy.gradient` で算出した時間的な口の面積変化で定義した (<https://www.scipy.org/>)。3 つの連続したフレームで面積変化量がしきい値を超えたとき、口の開閉状態を示す指標として、フラグをそれぞれ+1 または-1 に設定した。フラグの符号変化の回数は、口の開閉の回数を示す。そのため、咀嚼回数は符号の変化数の半分として表した。

2.6. 自動学習装置の評価

2.6.1. 自動訓練の評価

自動学習装置による自動訓練の評価を行うため、先行研究による手動訓練の結果と比較を行った (Fig. 2.13, 2.14)。

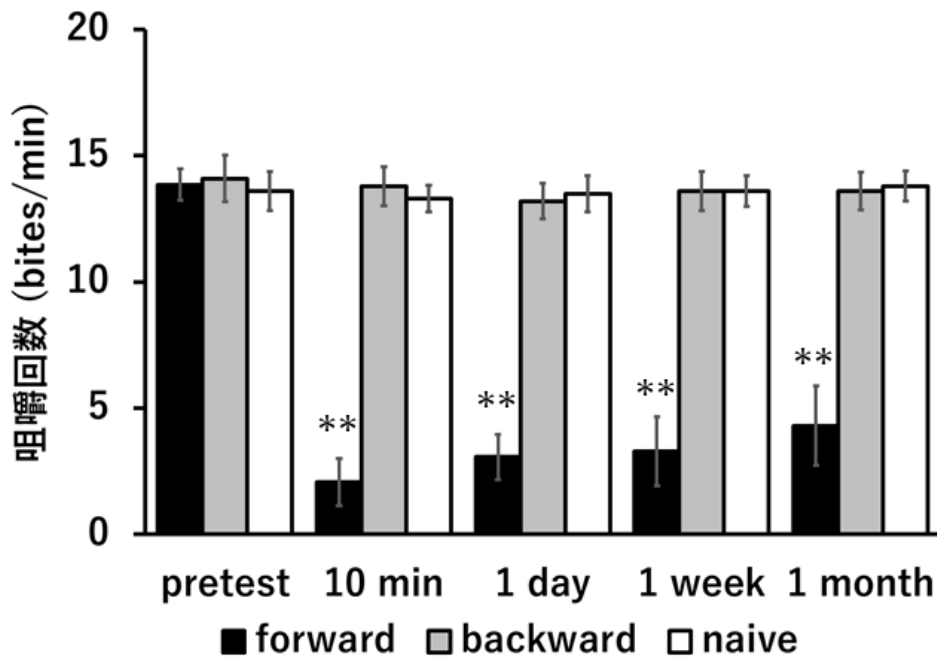


Fig. 2.13 先行研究による手動訓練の結果

** $p < 0.01$ 。Kojima et al., 1996 より一部改変。

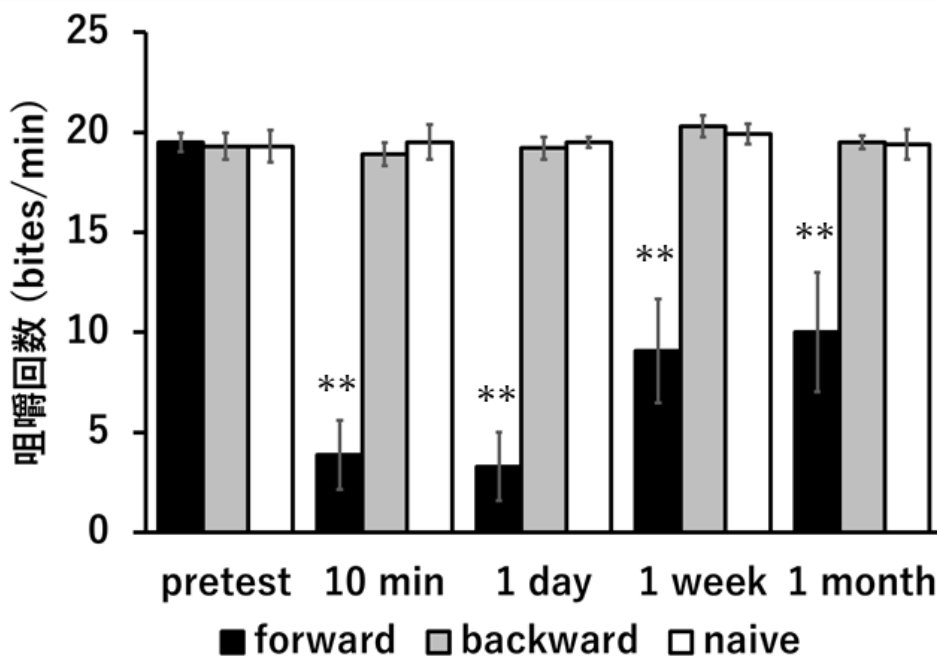


Fig. 2.14 自動学習装置による自動訓練の結果

** $p < 0.01$ 。

手動・自動いずれの訓練方法においても backward、naive 両コントロール群に比べて forward 群の CS に対する咀嚼行動は有意に抑制されており、自動訓練においても味覚嫌悪学習が成立することがわかった。より詳細に手動訓練と自動訓練との比較を行うため、学習成績という概念を導入した。学習成績は、訓練前後で CS に対する咀嚼行動がどの程度抑制されたかを百分率で表したものであり、Function (10) で計算することができる。

$$\text{学習成績} = \left(1 - \frac{\text{訓練後の咀嚼回数}}{\text{訓練前の咀嚼回数}} \right) \times 100 \quad (10)$$

ただし、学習成績が負の値となる場合は「学習成績 = 0」とした。

手動・自動訓練の結果を学習成績に換算した結果、Fig. 2.15 のようになった。

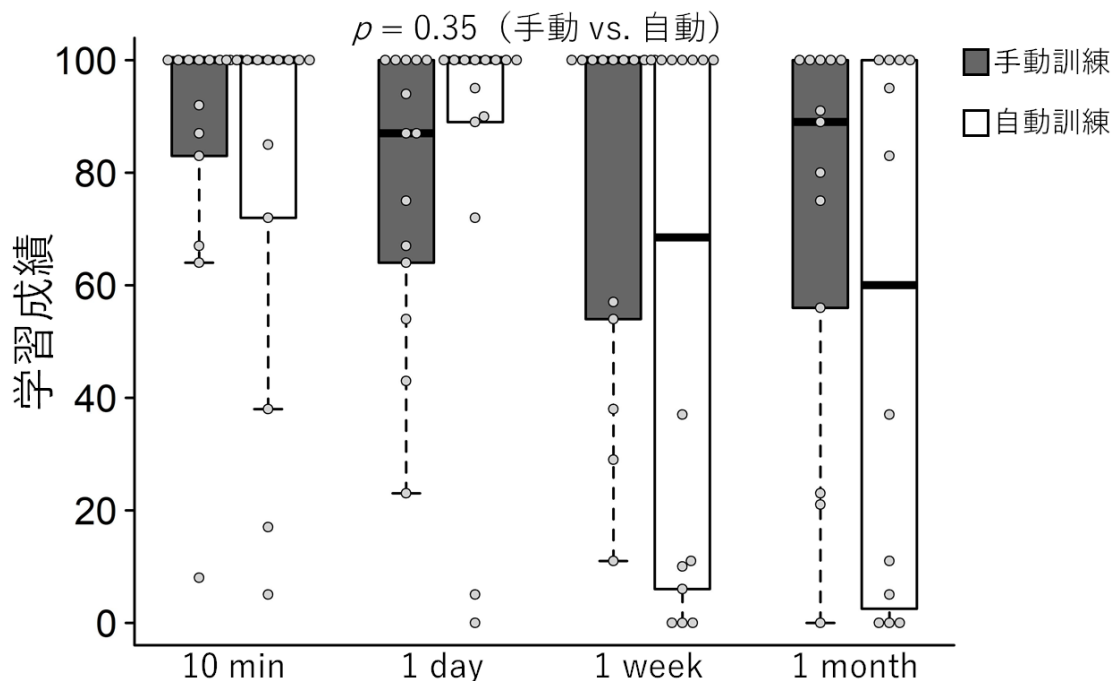


Fig. 2.15 手動訓練と自動訓練の比較

全体を two-way repeated measures ANOVA で検定した結果、 $p = 0.35$ で有意な違いは認められず、自動訓練は手動訓練に近い精度の訓練を施せているこ

とがわかった。しかし、統計的に有意差は認められなかったものの、訓練7日後以降では、自動訓練の学習成績は手動訓練より30%程度低下する傾向があった。

2.6.2. 自動学習成績判定の評価

作製したアルゴリズムが、口を開ける回数を正確にカウントし、ヨーロッパモノアラガイの学習・記憶状態を適切に判断できるかどうかを調べるために、66個体のヨーロッパモノアラガイ（学習個体・未学習個体共に33個体ずつ）の行動を記録した映像を分析した。学習前後での口の面積（pixels）のトレースの例を Fig. 2.16 に示す。味覚嫌悪学習を学習した個体は、CS に対して咀嚼行動を示さなくなった（Fig. 2.16-B,D）のに対し、学習していない個体は、CS に対して口を動かして反応した（Fig. 2.16-A,C）。

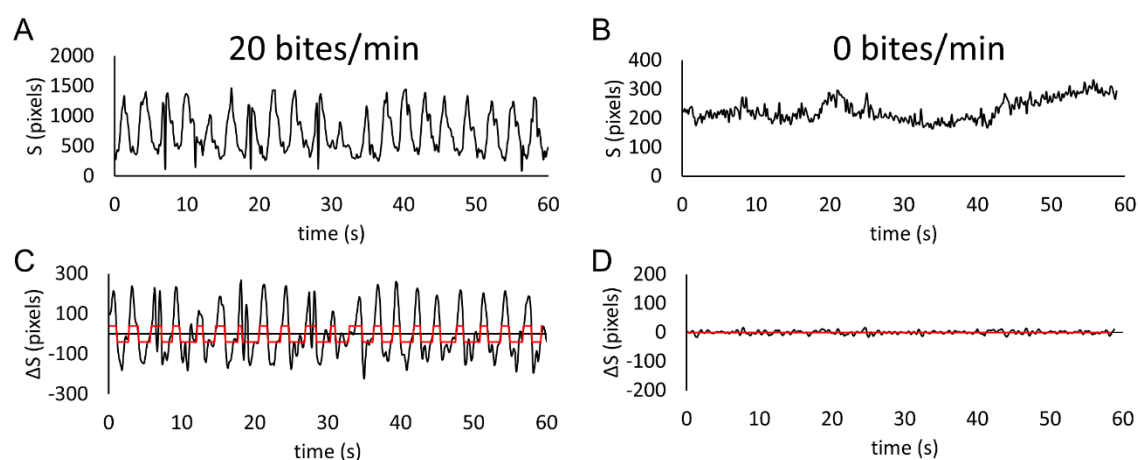


Fig. 2.16 モノアラガイの口面積変化量

Totani et al., 2020a より一部改変。

咀嚼回数（bites/min）は、本研究で開発した分析方法と人間が観察する方法の2つのカウント方法間で有意な違いは認められなかった（Fig. 2.17）。自動計測の平均計数誤差は1分間に±1.1回であった。また、自動計数法が学習・記憶状態を適切に判定できることを確認するため、学習済みグループの good

learner と poor learner の比率を調べた。我々の先行研究 (Sugai et al., 2007) によれば、学習したヨーロッパモノアラガイは、CS の提示に反応して口を開けることはほとんどないことがわかっている。しかし、中には、刺激を与えなくても偶然に咀嚼行動をとる個体がいる (Kojima et al., 1996)。このような自発的な咀嚼行動は 1 分間に 1 回程度の割合で起こるため、0–1 bites/min の咀嚼行動であれば学習能力の高い者、2 回/分以上の口開けであれば学習能力の低い者と定義した。

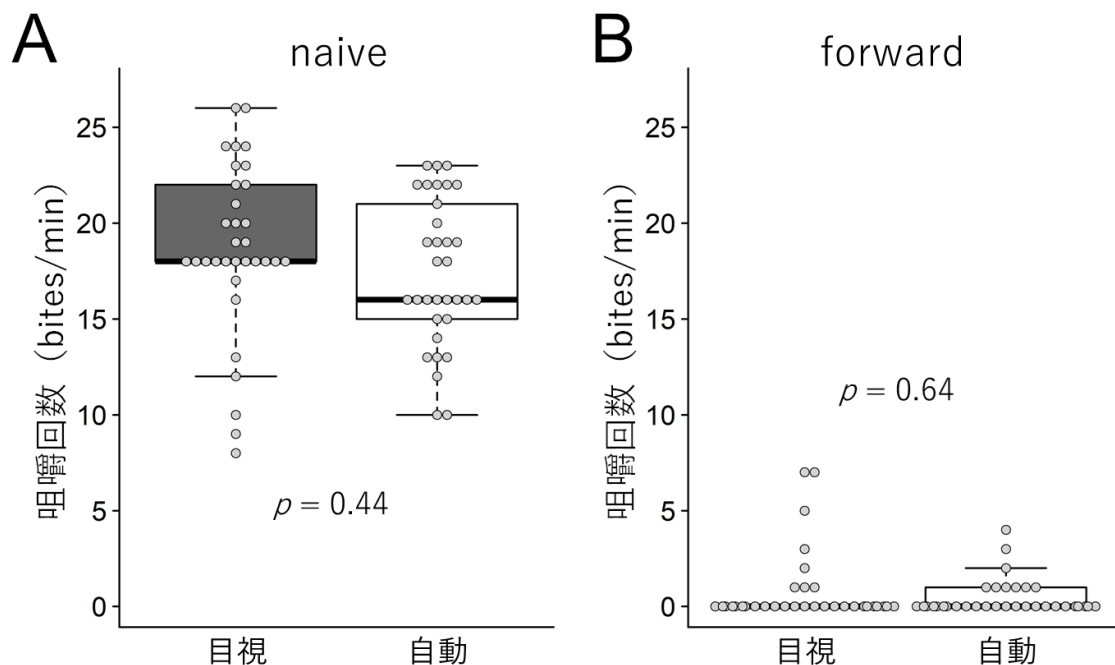


Fig. 2.17 コンピュータと目視観察による咀嚼回数の計測の比較

Totani et al., 2020a より一部改変。

Fig. 2.18 は、目視観察と自動計測の両方で、good learner と poor learner の比率を比較したものである。Fisher's exact probability test で比率を比較したところ、目視観察と自動計測の間に有意な違いは認められなかった (Fig. 2.18)。目視観察では、90%の個体が CTA を学習し、記憶を形成した。自動計測で

は、94%のカタツムリが CTA を学習し、記憶を形成した。自動計測では、6%の偽陽性と 2%の偽陰性が生じた。

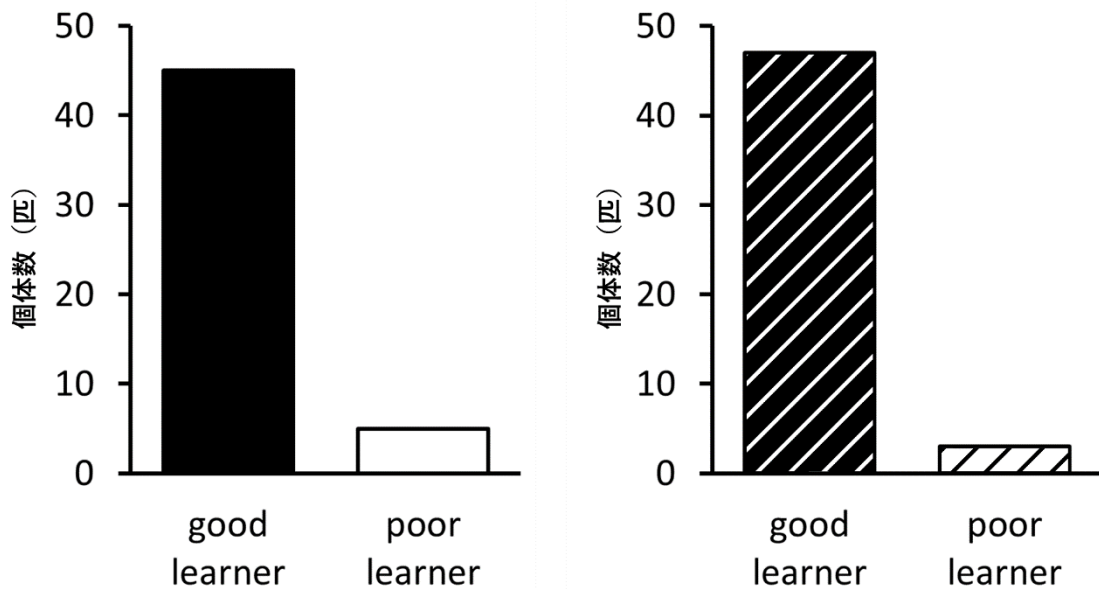


Fig. 2.18 解析手法による味覚嫌悪学習検出能力の比較

Totani et al., 2020a より一部改変。

コンピュータ解析を行うことの利点として、複数の要素を同時に解析できる点が挙げられる。Fig. 2.19 は、CS を提示してから反応するまでの時間と、口の開く大きさを、未学習個体と学習個体とで比較したものである。学習個体は、ショ糖に反応するまでの時間が有意に長く (Fig. 2.19A)、口の開く大きさは未学習個体よりも有意に小さかった (Fig. 2-19B)。これら 2 つの新しい解析により、記憶力をさまざまな観点から評価することができた。前述のように、咀嚼回数で評価する記憶スコアは自発的な咀嚼行動の発生に影響されるが、CS に反応するまでの時間と口の開く大きさの両方を用いることで、自発的な咀嚼行動の影響を避けることができる。咀嚼回数や CS への反応時間は、運動ニューロンが生成する信号量に依存する (Staras et al., 1999; Kemenes et al., 2001)。一方、Haque らは、吸気口の開口サイズは、運動ニューロンのバースト時間に依存することを示した (Haque et al., 2006)。したがって、口の開く

大きさも、運動ニューロンのバースト時間に依存する可能性がある。本研究の分析システムは、運動ニューロンの活動の頻度だけでなく、それらのニューロンのバースト時間をも推定することを可能にした。

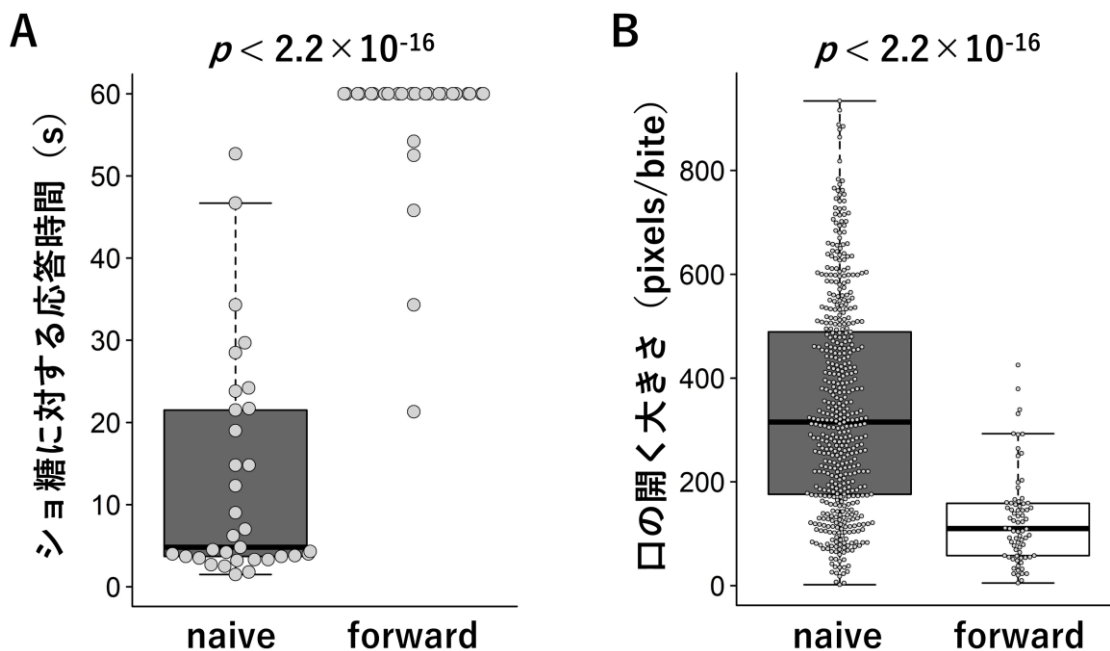


Fig. 2.19 咀嚼回数以外の要素の解析

Totani et al., 2020a より一部改変。

2.7. 考察

US として 200 mM KCl 溶液を用いることで、手動での条件づけに近い精度の条件づけを行える自動学習装置を開発できた。本装置は Takigami らの装置と比較して、味覚嫌悪学習の長期記憶を保持させられる点が優れている。手動での条件づけと自動条件づけとを比較すると、訓練 7 日後以降で、学習成績が 30% 程度低下する傾向が見られた。これには、刺激提示のタイミングが関係しているものと考えられる。手動条件づけにおいては、熟練した実験者であるほど、無意識下で、刺激の提示タイミングを最適化してしまう可能性がある。ヨーロッパモノアラガイに効果的な味覚嫌悪条件づけを施すには、動物が、刺激

を感知できる状態にあることが求められる。動物が体を捻って口を上方に向けている場合などは、刺激を提示しても動物に感知されないことがある。このような場合、自動条件づけでは決められたスケジュールに従って正確に刺激を提示するが、手動条件づけでは、数秒程度待ち、動物が刺激を感知できる状態を待つことが可能となる。その結果、自動条件づけでは、手動条件づけでと比較して長期記憶の学習成績が30%程低下したと考えられる。一方で、このような学習成績の低下は、手動条件づけで見られた、実験者によって刺激強度や刺激間隔に個人差が生まれる問題を解決した結果である。本装置は、実験者によるバイアスを排した、本来の学習成績の測定を可能にしたと言えるだろう。

Fig. 2.20 は、自動計測システムの3つの主要な検出失敗例を示している。最初の例（上）では、形状が類似しているため、吸気口が、閉じた口と誤って検出された。2番目の例（中）では、口がほとんど一つの黒い点にしか見えず、形態的にも特徴がないため、良い候補領域を選出できなかった。3番目の例（下）では、ヨーロッパモノアラガイが体をひねってしまい、口がフレームから外れてしまったため、画像から口を検出することができなかった。

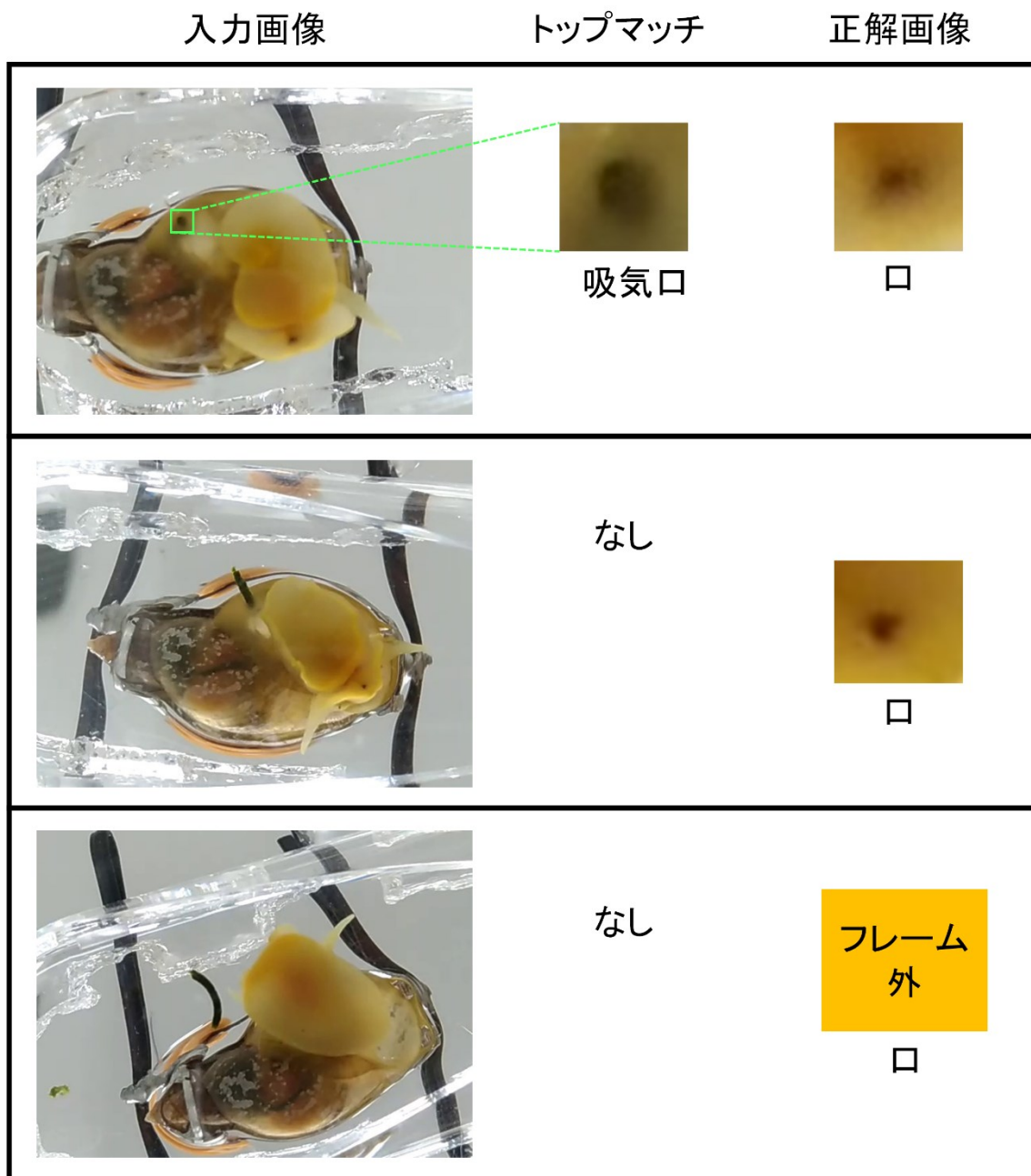


Fig. 2.20 検出失敗例

Totani et al., 2020a より一部改変。

Fig. 2.6 に示すように、LBP アルゴリズムを用いて口の正しい座標を検出した際の最大検出率は 55%であった。ただし、55%という検出率は、決して高い値ではないが、学習が成立したかどうかの判断には影響しなかった。このよう

に検出率が低い理由は、機械学習のサンプル数が 4491 枚と少ないため、学習が十分に行われていない可能性があることと、同じヨーロッパモノアラガイでも口の開閉に形状の違いがあることの 2 つが考えられる。本研究では、1 つの検出器で口を検出しようとしたが、咀嚼行動時には、口の形状はダイナミックに変化する (Fig. 2.12) ため、1 つの検出器だけで口を検出するのは適切でない可能性がある。そのため、1 つの検出器では、口が開いている状態は高い比率で検出できるが、口が閉じている状態はあまり検出できなかった。咀嚼行動の半分に相当する閉じた口を検出できなかったため、検出率が 55% となったと考えられる。しかし、閉じた口を検出できずとも、開いた口だけを解析することで、口の動的変化を十分に検出することができた。したがって、検出率が 55% であっても、学習が成立したかどうかを判断することが可能であった。

本章では、画像認識の処理速度を向上させるための簡単で効率的な方法を開発した。本手法は、対象物と背景のコントラストが大きく、対象物を囲む領域の色が比較的均一である場合に特に有効である。生物学における多くの行動実験がこの条件を満たしていることから、本手法は幅広い生物学の分野で応用できる可能性がある。例えば、無脊椎動物の条件づけ研究の分野では、レタス等の実際の餌を食べるヨーロッパモノアラガイの咀嚼行動 (Staras et al., 1999)、アメフラシの水管-鰓の引き出し反射 (Kandel, 2001)、ショウジョウバエやミツバチの味覚学習 (Menzel and Giurfa, 2001; Gordesky-Gold et al., 2008; French et al., 2015)、ショウジョウバエの幼虫や線虫の運動行動 (Luo et al., 2010; Bendesky et al., 2011; Gomez-Marin et al., 2011) などの評価に適用できる可能性がある。また、オープンフィールドテスト、バーンズ迷路、水迷路、高架式プラス迷路などのげっ歯類の行動実験 (Holly et al., 2016) にも適用できる可能性がある。いずれの場合も、背景の色は比較的均一で、動物と背景のコントラストは大きい。また、本手法は、ダッシュボードカメラを用いた瞬き遅延の評価による運転者のパフォーマンスの評価 (Schmidt et al., 2018) や、

自動製造における不良品の検出 (Vogel et al., 2017) など、生物学研究以外の分野にも応用可能性がある。

本章では、ヨーロッパモノアラガイの咀嚼行動を、計算能力の低い CPU を用いてリアルタイムに評価するシステムの開発に成功した。訓練された個体は、訓練されていない個体とは対照的に、咀嚼行動が抑制されるという特徴があった。この行動は、CS 提示に対する咀嚼回数の減少として観察されるため、口を検出し、口領域の時間的变化をカウントし、口の開閉回数をカウントする解析システムを開発した。機械を使って得られた結果は、人間が観察して得られた結果と統計的には変わらなかった。さらに、本システムでは、咀嚼回数だけでなく、人間のリアルタイム観察では不可能な、CS 提示に対する反応の待ち時間や口の開く大きさも評価することができた。これらの新しい評価指標により、動物の神経活動指標行動の新たな側面を明らかにすることができ、また、このシンプルで効率的な手法は、画像認識の処理速度を向上させることができる。この方法は、他の方法に比べて、より広い汎用性を持ち、必要な計算能力も大幅に低い。この方法により、より多くの研究者が、より少ない計算能力で、必要な分析を容易に行うことが可能となった。

第3章

絶食による学習能力と 中枢神経系内セロトニン含量の調節

3.1. 序論

味覚嫌悪学習において、短い期間絶食したモノアラガイは、絶食していない、あるいは長い期間絶食させたモノアラガイよりも学習・記憶能力が優れていることがわかっている (Mita et al., 2014)。また、モノアラガイの摂食行動の制御にはモノアミン、特にセロトニン (5-HT) が重要な役割を果たしていることもわかっている (Benjamin, 2012)。さらには、モノアラガイの 5-HT 作動性ニューロンの活性は血リンパのグルコース濃度に敏感であることもわかっている (Dyakonova et al., 2015a, 2015b)。これらの知見から、学習・記憶能力と絶食状態、5-HT 動態の 3 者になんらかの相関があることが予想される。

3.2. 材料と方法

3.2.1. 実験動物

2.2.1 に従った。

3.2.2. 絶食条件の定義

絶食条件を以下のように定義した。(1) 絶食なし：常時給餌を受けている状態、(2) 1日絶食：24 h の絶食を受けた状態、(3) 5日絶食：5日間の絶食を受けた状態 (Fig. 3.1)。



Fig. 3.1 絶食条件の定義

3.2.3. 中枢神経系内セロトニン含量の測定

モノアラガイを液体窒素によって急速に凍結し、氷冷生理食塩水（50 mM NaCl、1.6 mM KCl、2 mM MgCl₂、3.5 mM CaCl₂、10 mM HEPES、pH 7.9）中で CNS を解剖し取り出した。取り出した CNS を、内部標準として 5 ng の N- ω -methyl-5-hydroxytryptamine oxalate (NMET; Sigma-Aldrich) を含有する 0.1 M 過塩素酸 50 μ L 中でホモジナイズした。ホモジネートを 0°C、21,500 \times g、30 min 遠心分離し、40 μ L の上清を回収した。CNS 内セロトニンおよびその代謝物は、電気化学検出（electrochemical detection : ECD）を備えた高速流体クロマトグラフィー（high performance liquid chromatography : HPLC）を用いて測定した。HPLC-ECD は、ポンプ（EP-300; EICOM）、自動試料注入器（M-504; EICOM）、カラムオーブンで 30°C に加熱された C18 逆相カラム（CAPCELL PAK C18MG; 内径 250 mm \times 4.6 mm、平均粒径 5 μ m; Shiseido）から構成された。電気化学的検出にはガラスカーボン電極（WE-GC; EICOM）を使用した。検出器（ECD-100; EICOM）の電位は Ag/AgCl 参照電極に対して 890 mV に設定し、これもカラムオーブンで 30°C に加熱した。0.18 M クロロ酢酸および 16 μ M EDTA を含有する移動相を NaOH で pH 3.6 に調整した。イオ

ン対試薬として 1.85 mM 1-オクタンスルホン酸ナトリウムを、有機修飾剤として 8.40% (v/v) CH₃CN を移動相に添加した。流速は 0.7 mL/min に保った。クロマトグラフは、PowerChrom (eDAQ Pty Ltd) を用いて取得した。試料は HPL カラムに直接注入した。セロトニンとその代謝物の量は内部標準 NMET に対するピーク面積の比率によって計算した。それぞれの条件において以下の化合物を測定した。(1) 5-ヒドロキシトリプトファン: 5-HT (セロトニン)。(2) 5-ヒドロキシインドール酢酸: 5-HIAA。セロトニンの代謝経路を Fig. 3.2 に示す。モノアミンの測定には、行動実験に使用されていない個体を使用した。本測定は神戸大学 (当時、北海道大学) の青沼仁志教授にご協力いただいた。

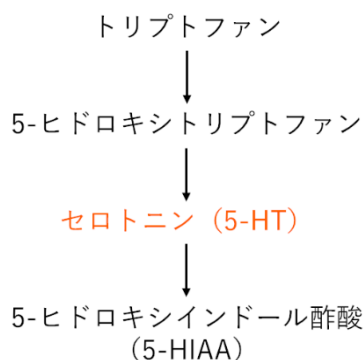


Fig. 3.2 セロトニンの代謝経路

3.2.4. 味覚嫌悪学習

2.3.3 に従った。

3.2.5. 中枢神経系内セロトニン含量の調節

ヨーロッパモノアラガイの CNS 内 5-HT 含量を増やすため、モノアラガイを 300 μ M の 5-HT 溶液に 24 時間に浸した。5-HT は東京化成から購入した。

3.2.6. 統計解析

データは箱ひげ図（箱中央の横棒＝中央値、箱の範囲＝四分位範囲、ひげの長さ＝箱の上端もしくは下端から四分位範囲の 1.5 倍以内に存在する最大値もしくは最小値）で示し、有意水準は $\alpha=0.05$ とした。絶食が学習能力・CNS 内 5-HT 含量・5-HT 代謝活性に与える影響を、one-way repeated measures ANOVA と Holm 法による補正を行った Welch's *t* test を用いて比較解析した。5-HT 浸漬による CNS 内 5-HT 含量と学習能力の変化を、Welch's *t* test を用いて比較した。統計解析には、R (version 4.1.0; <https://www.r-project.org/>) を使用した。

3.3. 結果

3.3.1. 絶食が学習能力に与える影響

先行研究とは味覚嫌悪条件づけのプロトコルが異なるため、本研究においてもヨーロッパモノアラガイの味覚嫌悪学習能力が絶食条件によって変化するか調べた。異なる 3 つの絶食条件において、味覚嫌悪学習の学習成績を測定した (Fig. 3.3)。絶食なしの条件では 50 点程度の学習成績であったが、1 日絶食の条件では、90 点程度に学習成績が向上した。しかし、5 日絶食の条件では絶食なしと同等もしくはやや低い学習成績を示した。したがって、本研究の条件づけプロトコルにおいても、1 日絶食の条件では最も優れた味覚嫌悪学習成績を示すのに対し、より深刻な食料不足に陥った 5 日絶食の条件では、味覚嫌悪学習成績は絶食なしと同等かそれ以下に低下することが確認された。

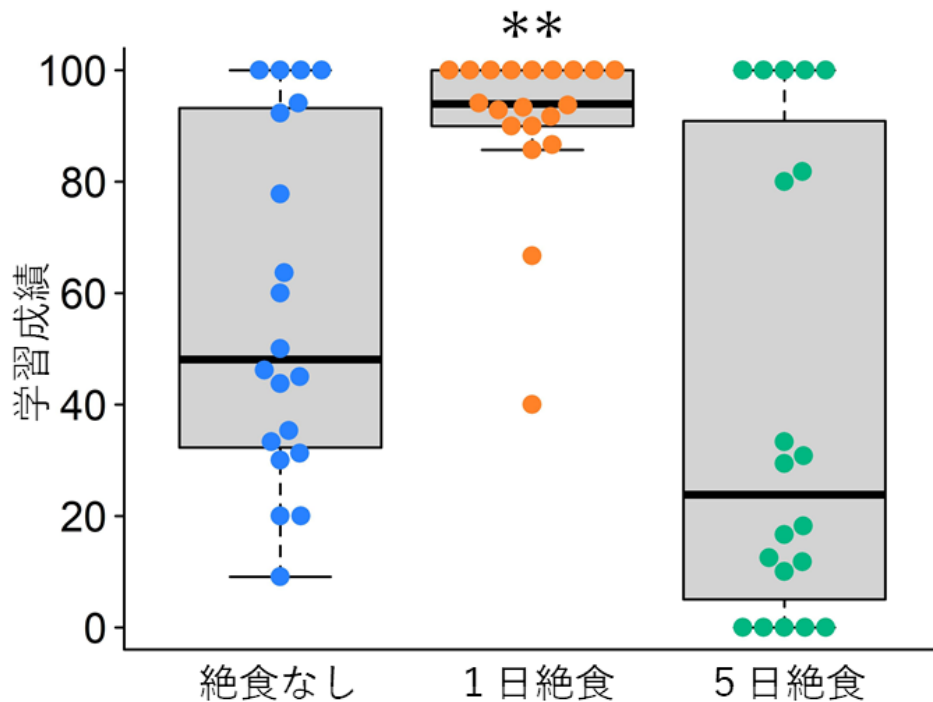


Fig. 3.3 絶食による学習能力の変化

** $p < 0.01$. Aonuma, Totani et al., 2018 より一部改変。

3.3.2. 絶食が中枢神経系内セロトニン含量に与える影響

絶食による CNS 内 5-HT 含量への影響を調べるため、異なる絶食条件のヨーロッパモノアラガイにおいて、CNS 内 5-HT 含量を測定した (Fig. 3.4)。1日絶食の個体の CNS 内 5-HT 含量は、絶食なしの個体の CNS 内 5-HT 含量と比べて有意に低下した。しかし、絶食期間が 5 日に延長されると、CNS 内 5-HT 含量は、絶食なしとほとんど同じレベルまで回復した。

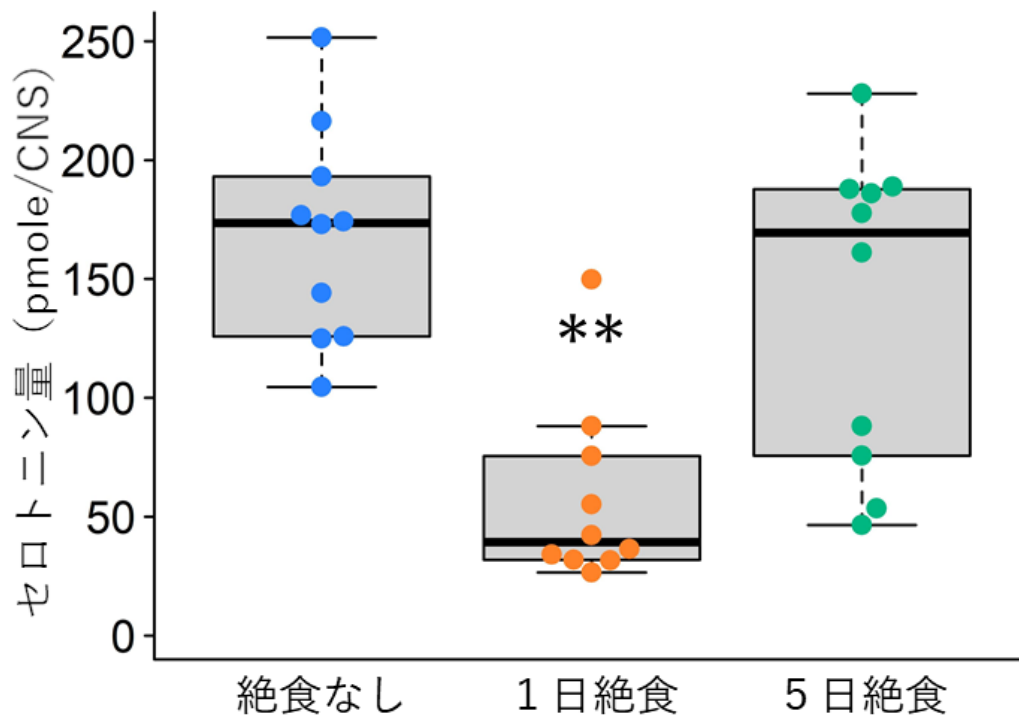


Fig. 3.4 絶食による CNS 内 5-HT 量の変化

** $p < 0.01$. Aonuma, Totani et al., 2018 より一部改変。

5-HT レベルを調節するメカニズムとして、5-HT とその主要代謝物である 5-ヒドロキシインドール酢酸 (5-HIAA) との比率に基づいて評価される 5-HT の代謝活性の変化がよく知られている (Chaouloff et al., 1987; Keszthelyi et al., 2009)。1日絶食における CNS 内 5-HT 含量の減少は、5-HT の代謝が促進されたことによるものであると仮説を立て、各絶食条件における 5-HT 代謝活性の変化を調べた (Fig. 3.5)。結果、絶食条件によって 5-HIAA/5-HT 比に有意な変化は認められず、1日絶食における CNS 内 5-HT 含量の低下は、5-HT の代謝に起因するものではないことが示唆された。CNS 内 5-HT 含量の調節機序については、第 4 章にて、より詳細な研究を行う。

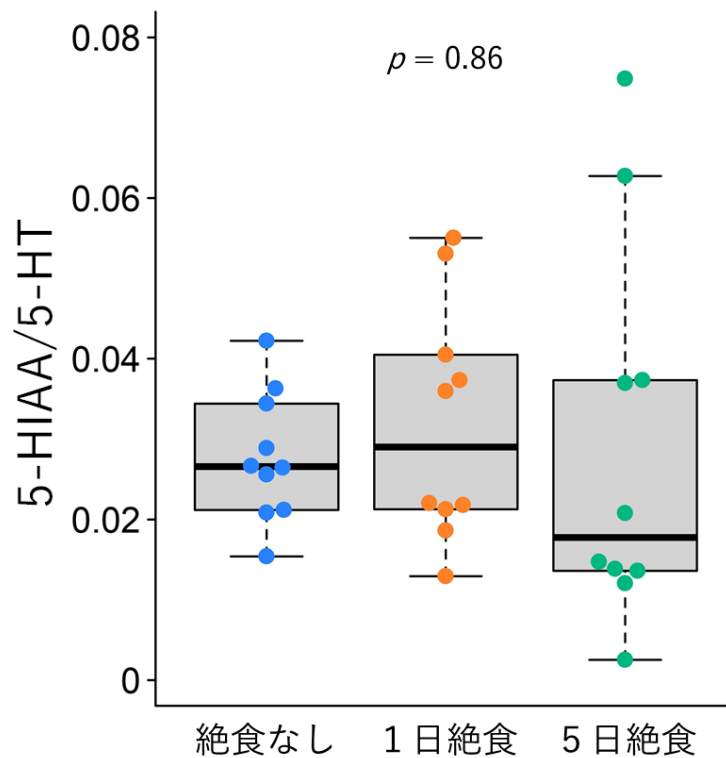


Fig. 3.5 絶食による 5-HT 分解活性の変化

Aonuma, Totani et al., 2018 より一部改変。

3.3.3. 中枢神経系内セロトニン含量が学習能力に与える影響

Fig. 3.3 と Fig. 3.4 より、味覚嫌悪学習成績と CNS 内 5-HT 含量との間には、逆相関の関係があることがわかった。CNS 内 5-HT 含量と学習成績との関係を調べるため、最も優れた学習成績を示す 1 日絶食の個体において、CNS 内 5-HT 量を増加させた際の、学習成績の変化を計測した。1 日絶食の個体を絶食期間中、300 μ M の 5-HT 溶液に浸すことで CNS 内 5-HT 含量を増加させた。まず、300 μ M の 5-HT 溶液に浸した 1 日絶食の個体の CNS 内 5-HT 含量を測定し、CNS 内 5-HT 含量が有意に増加していることを確認した (Fig. 3.6)。CNS 内 5-HT 含量が増加した 1 日絶食の味覚嫌悪学習成績を測定したところ、通常の 1 日絶食と比較して有意に学習成績が低下した (Fig. 3.7)。

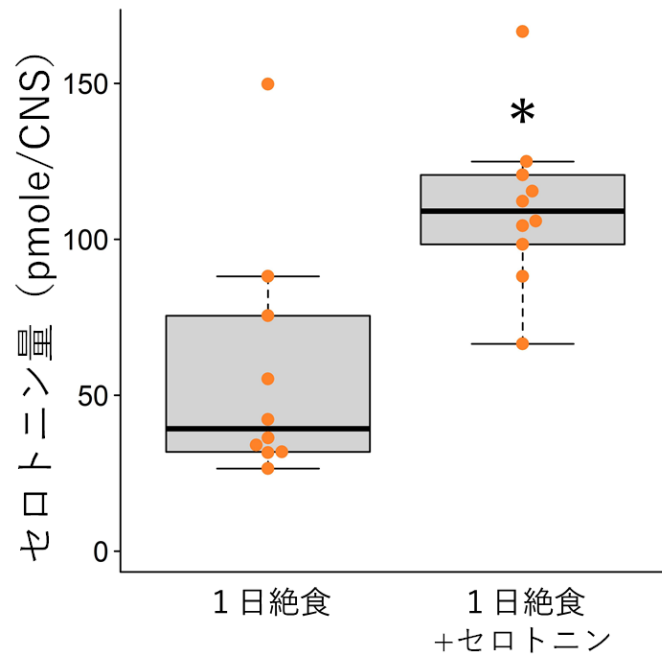


Fig. 3.6 300 μ M 5-HT 溶液による CNS 内 5-HT 濃度の変化

* $p < 0.05$ 。Aonuma, Totani et al., 2018 より一部改変。

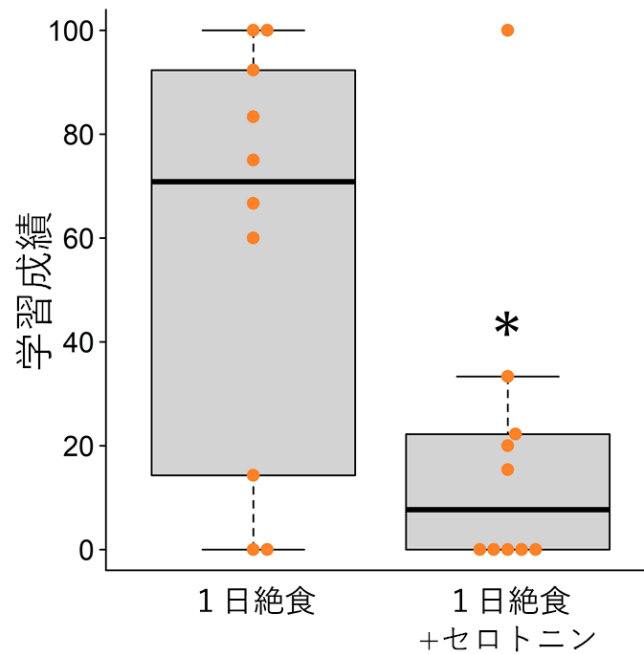


Fig. 3.7 CNS 内 5-HT 濃度の上昇による学習能力の変化

* $p < 0.05$ 。Aonuma, Totani et al., 2018 より一部改変。

3.4. 考察

本章では、絶食による学習成績と CNS 内 5-HT 含量の変化について調べた。絶食なし・1日絶食・5日絶食の3つの絶食条件において学習成績と CNS 内 5-HT 含量とを調べた結果、学習成績に最も優れる1日絶食の条件では、CNS 内 5-HT 含量が最も低くなることがわかった。さらに、1日絶食の条件で CNS 内 5-HT 含量を増加させると、学習成績の向上が阻害されることがわかった。これらの結果は、味覚嫌悪学習の成立には、CNS 内 5-HT 含量が低いことが重要であることを示している。このような、短期絶食で学習能力が向上し長期絶食で低下するという変化は、他の実験動物を用いた先行研究でも多数報告されているが、CNS 内 5-HT 含量そのものの変化は、あまり着目されてこなかった。特に、短期絶食により一度減少した CNS 内 5-HT 含量が長期絶食で回復し、それが、学習能力に影響することを明確に示した研究は本研究が初めてである。

ヨーロッパモノアラガイの味覚嫌悪学習が成立するためには、5-HT 作動性の介在ニューロンである、cerebral giant cell (CGC) から咀嚼行動のリズムを作る central pattern generator (CPG) への入力が増強されることが必要である (Kojima et al., 1997)。また、1日絶食は CGC の自発的発火頻度を向上させることもわかっている (Dyakonova et al., 2015a)。これらの研究は、少なくとも CGC と CPG の間においては、5-HT シグナルが増強されることが、味覚嫌悪学習に重要であることを示唆している。しかし本研究では、CNS 全体の 5-HT 含量が減少することが、1日絶食における味覚嫌悪学習成績の向上に重要であるという、予測とは異なる結果が得られた。本研究では、CNS 全体の 5-HT 含量を測定したため、CGC が作るシナプス周辺の局所的な 5-HT 量は反映できていない。CPG を形成する N1M ニューロンは、CGC を含む多くのニューロンとシナプスを形成している (Benjamin, 2012) ため、CNS 全体としての 5-HT 含量が低下することで、CGC 以外から N1M ニューロンへ伝わる 5-HT シグナルが

減少し、CGC からの 5-HT シグナルを相対的に増大している可能性がある。N1M ニューロンの電気生理学的・形態学的特性を調査することで、この仮説を検証できるだろう。

また、CNS 内 5-HT 含量と味覚嫌悪学習成績について、個体レベルでの相関は調べられていない。これは、CNS 内 5-HT 含量の測定には動物から CNS を摘出する必要があり、CNS 内 5-HT 含量の測定後には行動実験を行えないことに起因する。行動実験後に CNS 内 5-HT 含量を計測することはできるが、この場合、行動実験によって CNS 内 5-HT 含量が変化することが予測され、正確な結果を得ることはできない。血リンパ中のマーカーの測定や、遺伝子組換えによるマーカー遺伝子の体外からの観察などにより、間接的に CNS 内 5-HT 含量を推定することができれば、個体レベルでの相関を調査することが可能になるだろう。個体レベルでの相関を調べることで、CNS 内 5-HT 含量と味覚嫌悪学習能力の関係をより直接的に示すことができ、CNS 内 5-HT 含量が減少することの意義についても、研究の緒となる知見が得られると考えられる。

本研究では、CNS 内 5-HT 含量を増加させるために、5-HT 溶液に浸漬する手法を選択した。本手法では、CNS 内 5-HT 含量の増加に加えて、外来の 5-HT が末梢や中枢に直接作用する可能性を除外できていない。この問題は 5-HT の前駆体であるトリプトファン (Trp) や 5-ヒドロキシトリプトファン (5-HTP) を浸漬に用いることで解決できるだろう。また、CNS 内 5-HT 含量がどのように制御されているかについても検討が必要である。絶食によって 5-HIAA/5-HT に変化が認められなかったことから、絶食は、ヨーロッパモノアラガイの CNS 内 5-HT 代謝活性に影響を与えていないと考えられる。CNS 内での 5-HT 代謝活性が変化することなく、CNS 内 5-HT 含量が変化したという結果は、CNS 内での 5-HT 合成活性が変化している可能性を示唆している。よって、続く第 4 章

では、CNS 内の 5-HT 合成活性に着目し、絶食による CNS 内 5-HT 含量の調節機序について研究を行った。

第4章

絶食による

中枢神経系内セロトニン含量の

調節機序

4.1. 序論

第3章の結果から、1日絶食はヨーロッパモノアラガイの CNS 内 5-HT 含量を低下させる一方、5日絶食では、絶食なしと近いレベルまで CNS 内 5-HT 含量が回復することが明らかになった。また、絶食は CNS 内 5-HT の代謝活性に影響を与えなかったことから、1日絶食による CNS 内 5-HT 含量の減少や、5日絶食における CNS 内 5-HT 含量の回復は、5-HT 合成活性の変化によるものであることが示唆された。

Trp は 5-HT の前駆体である。5-HT の代謝経路では、Trp の水酸化により中間体の 5-HTP が生成され、続いて脱炭酸されることで 5-HT となる (Totani et al., 2019)。このように、5-HT 合成速度と 5-HT 作動性ニューロンの活動性は、Trp の利用可能性に影響される (Bell et al., 2001; Höglund et al., 2019)。したがって、絶食による CNS 内 5-HT 含量の変化には、Trp の利用可能性の変化が寄与していると考えられる。Trp の利用可能性に影響する要因として、食事からの摂取以外に、細胞内タンパク質の分解・再利用が挙げられる。オートファジーは、アミノ酸の枯渇を含む食糧不足によって活性化され、遊離アミノ酸の濃度を制御する機能をもつ (Mizushima et al., 2004; Mizushima and Komatsu, 2011)。本研究では、まず、血リンパと中枢における Trp 濃度を測定した。次に、中枢におけるオートファジーが、Trp の利用可能性と 5-HT 合成活性に関与しているか否か検討した (Totani et al., 2022)。

4.2. 材料と方法

4.2.1. 実験動物

2.2.1 に従った。

4.2.2. 絶食条件の定義

3.2.2 に従った。

4.2.3. トリプトファンとセロトニンの定量

Trp (KA1916; Abnova, Taipei, Taiwan) および 5-HT (KA2518; Abnova) の濃度は、メーカーのプロトコルに従って酵素結合免疫吸着法 (ELISA) キットを用いて測定した。血リンパサンプルは以下のようにして採取した。水槽から取り出したヨーロッパモノアラガイの周辺の水を吸収紙で拭き取った後、腹足を針で突いて殻の中に引き込ませ、血リンパを排出させることでサンプルを採取した。その後、 $2,500 \times g$ 、 4°C で10分間遠心分離し、上清を -20°C で保存した。CNS のサンプルは以下のようにして採取した。解剖して取り出した CNS を、氷冷した *Lymnaea* 生理食塩水 (10 mM HEPES、50 mM NaCl、1.6 mM KCl、2.0 mM MgCl_2 、3.5 mM CaCl_2 、pH 7.9) 中で超音波処理した。5-HT の酸化を防ぐため、超音波処理は、ELISA キットに付属の安定剤を加えた生理食塩水中で行った。Trp の定量においては、CNS における Trp 含量は非常に少ないため、5 個体から採取した CNS サンプルを 1 つのサンプルにまとめて測定した。超音波処理後、 $18,000 \times g$ 、 4°C で10分間遠心分離し、上清を -20°C で保存した。

4.2.4. オートファジーフラックスの解析

CNS におけるオートファジーフラックスは、CYTO-ID Autophagy detection kit 2.0 (ENZ-KIT175-0200; Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) を用いて測定した。10%リステリンで5分間麻酔したヨーロッパモノアラガイを、頭頂部から部分的に脱殻し、オートファゴソーム-リソソーム融合阻害剤 (クロロキン: CQ、*Lymnaea* 体内における推定最終濃度: $70 \mu\text{M}$) と CYTO-ID Green Detection Reagent 2 ($0.4 \mu\text{L}$) を CNS の近傍に静かに注入した (総注入量: 30

μL)。対照実験として、蒸留水と CYTO-ID Green Detection Reagent 2 を同様に注入した。試薬を注入した 2 時間後、CNS を摘出し、4%パラホルムアルデヒド (PFA) で 30 分間、室温で固定した。固定した CNS を直ちに Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan) で包埋し、クライオスタット (CM1850; Leica, Nussloch, Germany) を用いて 20 μm の厚さの凍結切片とし、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV1000; Olympus, Tokyo, Japan) で観察した (Fig. 4.1)。シグナルの劣化を避けるため、観察していないスライドは氷上で遮光保存した。CYTO-ID 陽性シグナルの面積を CNS 全体の面積で割り、オートファゴソムの蓄積量を定量化した。オートファジーフラックスは、CQ 未処理サンプルのシグナル面積を CQ 処理サンプルのシグナル面積から差し引くことで求めた。画像処理には ImageJ (version 1.53f; <https://imagej.nih.gov/ij/>) を用いた。

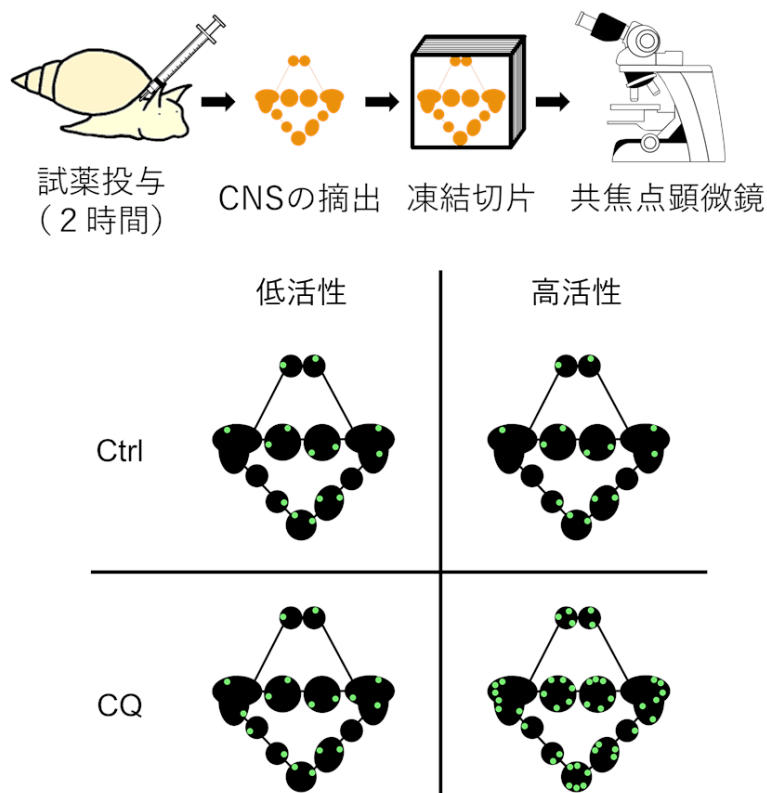


Fig. 4.1 オートファジーフラックス解析の方法

Totani et al., 2022 より一部改変。

4.2.5. mRNA の定量

CNS を摘出した後、液体窒素中で瞬間凍結し、 -80°C で保存した。ISOGEN II (311-07361; NIPPON GENE, Toyama, Japan) を用いて、メーカーのプロトコルに従い total RNA を抽出した。cDNA は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (FSQ-301; Toyobo, Osaka, Japan) を用いて合成した。BrightGreen 5×qPCR MasterMix-ROX (MASTERMIX-5R; Applied Biological Materials, Richmond, Canada) と StepOnePlus Real-Time PCR System (4376598; Applied Biosystems, Bedford, MA, USA) を用いて real-time PCR を行った。相対 mRNA 発現量は、 ΔC_T 法を用いて定量した。各 mRNA の発現量は、heat shock protein 40 (HSP40) および β -tubulin の発現量で標準化した。使用したプライマーの配列を Table 4.1 に示す。全てのプライマーの増幅効率 \% は 90%から 110%の間であった ($R^2 = 0.95 - 0.99$)。

Table 4.1. Real-time PCR に使用したプライマー

Gene name	Accession number		Primer sequence	Product size (bp)
CRNF	U72990.2	Forward	TCAACTGGAGATGGCGTGTC	111
		Reverse	GGTATGCCAAGGTCCCAACA	
Trk	U61728.1	Forward	TGCCTGTAAGATGGATGCCG	279
		Reverse	GGAGCTCCGCGATATCTTTCA	
ULK1	FX180369.1	Forward	ATTCGGCAGGAGGAACAGTG	101
		Reverse	ATCTCAAGGGTGGGGCATTG	
ULK4	FX180718.1	Forward	TCCTGGGATGGAGAGTGGAG	291
		Reverse	GGCACTGGCAGCACTTTAAC	
Beclin 1	FX181738.1	Forward	CCCTGGTTGGGAATTTGGGA	231
		Reverse	CCACATCCACTGAAGGACCC	
ATG12	FX192049.1	Forward	GGCGAAGAAAAGACCCCTGA	172
		Reverse	CATCTCCGGCTGGCTTTAGA	
MAP1LC3/LC3	FX192735.1	Forward	AATCATCAGGCGCAGACTCC	88
		Reverse	AGGTGTTGTGTTGCTGACCA	
ATG7	FX185160.1	Forward	AGATGGCGACTTTTGCCTGA	330
		Reverse	TTCCAACATGGCGTCCGTTA	
SQSTM1	HBQP01004538.1	Forward	GAGAAGCTGCCCCAAGAGAG	
		Reverse	AGGGTGCAGGCATAGGGATA	
HSP40	DQ278442.1	Forward	GGTCTTGAATCCTGATGGACA	104
		Reverse	CTTTGGGGAAGGTTATTTTGG	
β -tubulin	KX387887.1	Forward	CAAGCGCATCTCTGAGCAGTT	108
		Reverse	TTGGATTCCGCCTCTGTGAA	

CRNF: cysteine-rich neurotrophic factor、Trk: tropomyosin receptor kinase、ULK1: unc-51 like autophagy activating kinase 1、ULK4: unc-51 like autophagy activating kinase 4、ATG: autophagy-related、MAP1LC3/LC3: microtubule associated protein 1 light chain 3、SQSTM1: sequestosome 1、HSP40: heat shock protein 40。Totani et al., 2022 より一部改変。

4.2.6. オートファジーフラックスの調節

オートファジー誘導剤である Tat-beclin-1 D11 (Tat-D11) (NBP2-49888SS; Novus Biologicals, Colorado, USA) またはオートファジー阻害剤である bafilomycin A1 (BafA1) (BVT-0252-C100; Adipogen Life Sciences, California, USA) のいずれかを CNS 近傍に静かに注入した。体内の最終濃度はそれぞれ、Tat-D11 : 20 μ M または BafA1 : 1.5 nM と推定される。Tat-D11 のコントロールとしてスクランブルコントロールの Tat-L11S (NBP2-49887SS; Novus Biologicals, Colorado, USA) (推定最終濃度 : 20 μ M) を、BafA1 のコントロールとして溶媒である dimethyl sulfoxide (DMSO) (推定最終濃度 : <0.001%) を用いた。試薬投与の 24 時間後、「4.2.3. トリプトファンとセロトニンの定量」の項に記載した方法で CNS 内 5-HT 含量を定量した。

4.2.7. 統計解析

データは箱ひげ図 (箱中央の横棒 = 中央値、箱の範囲 = 四分位範囲、ひげの長さ = 箱の上端もしくは下端から四分位範囲の 1.5 倍以内に存在する最大値もしくは最小値) で示し、有意水準は $\alpha=0.05$ とした。各絶食条件における血リンパと CNS 内の Trp 含量の比較、オートファジーフラックスの比較、オートファジー関連遺伝子発現量の比較は、one-way repeated measures ANOVA と Holm 法による補正を行った Welch's *t* test を用いて行った。オートファジーを促進/抑制した際の CNS 内 5-HT 含量の変化を、Welch's *t* test によって比較した。統計解析には、R (version 4.1.0; <https://www.r-project.org/>) を使用した。

4.3. 結果

4.3.1. 絶食が血リンパと中枢神経系内のトリプトファン濃度を与える影響

絶食による CNS 内 5-HT 含量の調節機序について調べるため、絶食なし・1 日絶食・5 日絶食のヨーロッパモノアラガイの血リンパと CNS における Trp 濃度の変化を調べた。絶食に伴う Trp 濃度の動態は、CNS と血リンパとで異なっていた。血リンパ中の Trp 濃度は、絶食なしの条件が他の絶食条件と比べて有意に高かったが (Fig. 4.2)、CNS の神経細胞内 Trp 濃度は 5 日絶食の条件で最も高くなった (Fig. 4.3)。血リンパ中の Trp 濃度は、24 時間の絶食で急激に減少し、その絶食期間が 5 日に延長されても大きな変化は見られなかった。これらのデータは、血リンパ中の Trp 濃度が主に餌の有無によって決まることを示唆している。一方、CNS 内 Trp 濃度は 5 日絶食の条件で有意に上昇した。この結果から、CNS の神経細胞には、食料以外にも Trp の供給源が存在することが示唆された。

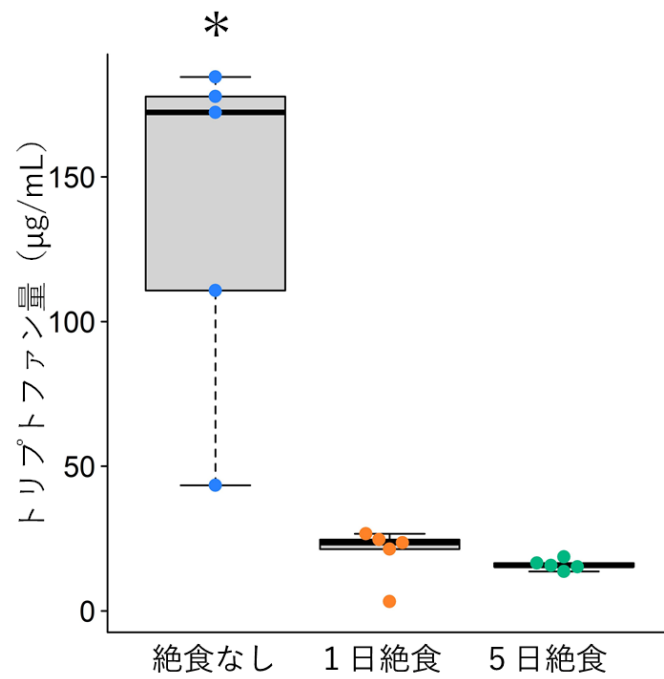


Fig. 4.2 絶食による血リンパ中トリプトファン濃度の変化

* $p < 0.05$ 。Totani et al., 2022 より一部改変。

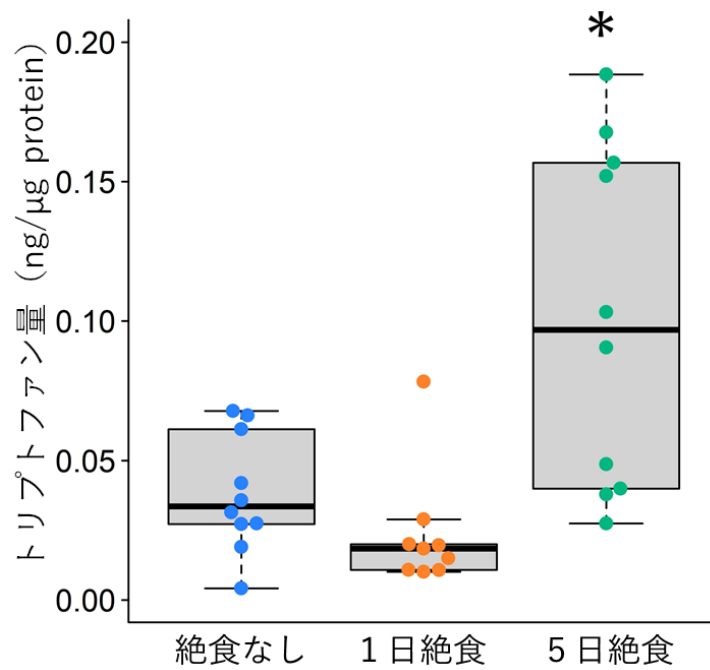


Fig. 4.3 絶食による CNS 内トリプトファン濃度の変化

* $p < 0.05$ 。Totani et al., 2022 より一部改変。

4.3.2. 絶食が中枢神経系内オートファジーに与える影響

細胞内 Trp 濃度を増加させる経路として、食料からの摂取に加えて、細胞内タンパク質を分解・再利用する経路がある。絶食状態では食料から Trp を摂取できないため、5日絶食で観察された CNS 内 Trp 濃度の上昇は、細胞内タンパク質の分解・再利用によるものだと考えられる。オートファジーは、タンパク質を分解してアミノ酸を供給する主要なタンパク質リサイクルシステムであり、絶食によって急速に誘導されることが知られている (Mizushima et al., 2004)。オートファジーは神経細胞内で不要な細胞質成分を分解・清掃する機構として重要であるが、細胞質成分の分解によって得られたアミノ酸が、どのように利用されているかは明らかになっていない。我々は、5日間の絶食によりオートファジーが誘導された結果、5日絶食の CNS 内 Trp が増加し、5-HT 合成が促進されたと仮説を立てた。オートファジーフラックス (オートファジーの開始から内容物の分解までを含む完全なプロセス) を評価するためには、オートファゴソームとリソソームとの融合を阻害する薬剤が必要である。この薬剤によりオートファゴソームの分解が抑制された後に蓄積したオートファゴソームの数は、本来分解されるはずであったオートファゴソームの数と一致するはずであるため、その蓄積量を計測することでオートファジーフラックスを推定することができる。しかし、このような阻害剤は血液脳関門を通過しないため、この方法は、*in vivo*での脊椎動物の CNS におけるオートファジーフラックスの観察には適用できない (Klionsky et al., 2016)。しかし、ヨーロッパモノアラガイには血液脳関門が存在しないため、この方法を CNS におけるオートファジーフラックスの *in vivo* 解析に適用できる。

上記仮説を検証するために、オートファゴソーム染色色素を用いて、異なる絶食条件の CNS におけるオートファジーフラックスを観察した。その結果、5日絶食では、CQ を介したオートファゴソームの蓄積量が有意に増加し、5日絶食

の CNS でオートファジーフラックスが活性化していることが示された (Fig. 4.4)。

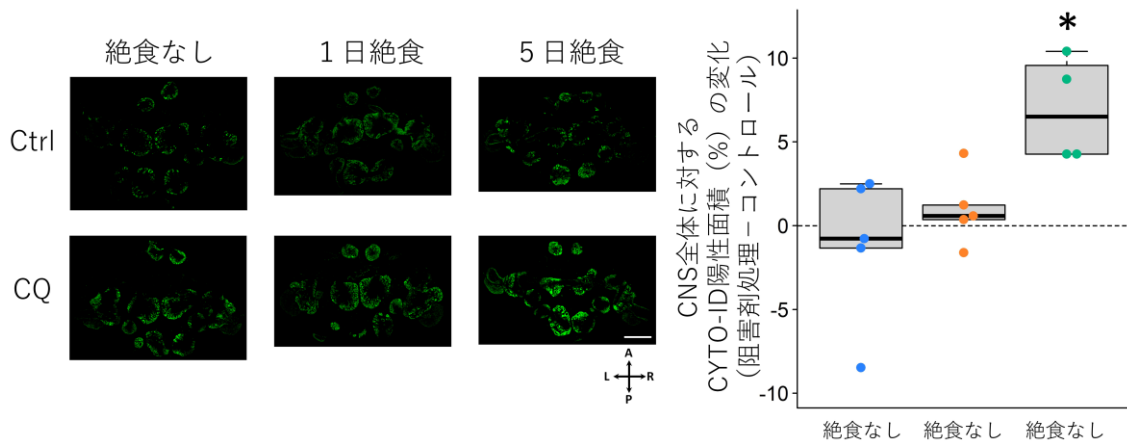


Fig. 4.4 絶食によるオートファジーフラックスの変化

スケールバー = 400 μm 、* $p < 0.05$ 。Totani et al., 2022 より一部改変。

神経栄養因子のシグナルは、mechanistic target of rapamycin complex 1 (MTORC1) を活性化し、オートファジー開始複合体の形成を阻害する (Nikoletopoulou et al., 2017; Zhan et al., 2020)。Fainzilber らによって、ヨーロッパモノアラガイを用いて、p75 ニューロトロフィン受容体と相互作用する新規の軟体動物神経栄養因子、cysteine-rich neurotrophic factor (CRNF) が同定された (Fainzilber et al., 1996)。また、哺乳類の TrkB との相互作用から、ヨーロッパモノアラガイの近縁種であるアメフラシ (*Aplysia*) CRNF の栄養活性も報告された (Pu et al., 2014)。さらに、Trk 受容体ファミリーの栄養活性は、軟体動物と脊椎動物の分岐以前に起源を持つことが示された (Beck et al., 2004)。このような背景から、我々はオートファジーの調節機構に対する絶食効果を調べるために、CNS における CRNF とその受容体チロシンキナーゼ Trk の mRNA レベルのリアルタイム PCR 分析を行った。

解析の結果、5日絶食では、Trk の発現量は減少していたが、CRNF の発現量は増加していなかった (Fig. 4.6)。このことから、5日絶食では、神経栄養因子

シグナルの減少によってMTORC1によるオートファジーの抑制が低下し、CNSで観察されるオートファジーの活性化を誘導していることが示唆された。

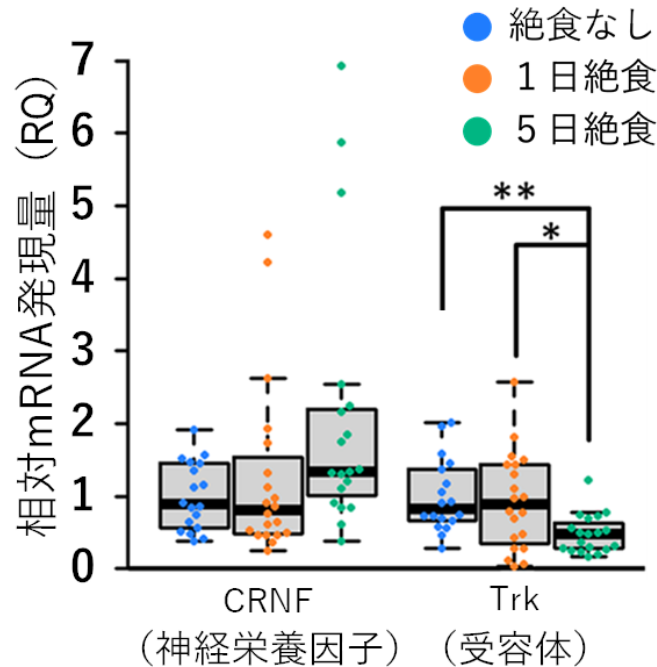


Fig. 4.5 絶食による神経栄養因子シグナルの変化

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Totani et al., 2022 より一部改変。

続いて、CNSにおけるオートファジー関連遺伝子の発現量を調べた。オートファジー関連遺伝子は、オートファジーが誘導されても mRNA レベルに大きな変化を示さないことが多いが (Martinet et al., 2016)、特定の遺伝子に関しては、発現量が上昇することもある (Mitroulis et al., 2010)。オートファジー関連遺伝子は、種を超えて広く保存されており (Song et al., 2020)、我々は、マガキ (*Crassostrea gigas*) の遺伝情報 (Picot et al., 2020) を参考にヨーロッパモノアラガイのオートファジー関連遺伝子を推定した。これらの遺伝情報を元に、ヨーロッパモノアラガイの CNS におけるオートファジー関連遺伝子の転写レベルを解析した。Real-time PCR による定量的結果、5日絶食によって、オートファゴソームの内容物の隔離に関与する sequestome 1 (SQSTM1) の発現量が上昇す

る一方で、ファゴフォア（隔離膜）の誘導、核形成、伸長に關与する遺伝子の発現量は影響を受けないことが示された (Fig. 4.6)。SQSTM1 は、ユビキチン化されたタンパク質をオートファゴソームに結びつけるオートファジー受容体である。先行研究から、長期間の絶食などによってオートファジーが持続的に誘導された場合、オートファジーによる分解で減少した SQSTM1 タンパク質を回復させる目的で SQSTM1 の mRNA 発現量が上昇することが明らかになっている (Sahani et al., 2014)。これらの結果から、5 日絶食はヨーロッパモノアラガイにおいて、オートファジーを転写レベルでは制御していないことが明らかになった。オートファジーの代表的な制御機構はタンパク質のリン酸化である (Klionsky et al., 2016; Menon and Dhamija, 2018)。よって、ヨーロッパモノアラガイでは、5 日絶食によるオートファジーの誘導は、Trk-Akt-MTORC1 経路の抑制を介した、タンパク質のリン酸化レベルでの制御によるものと示唆された。

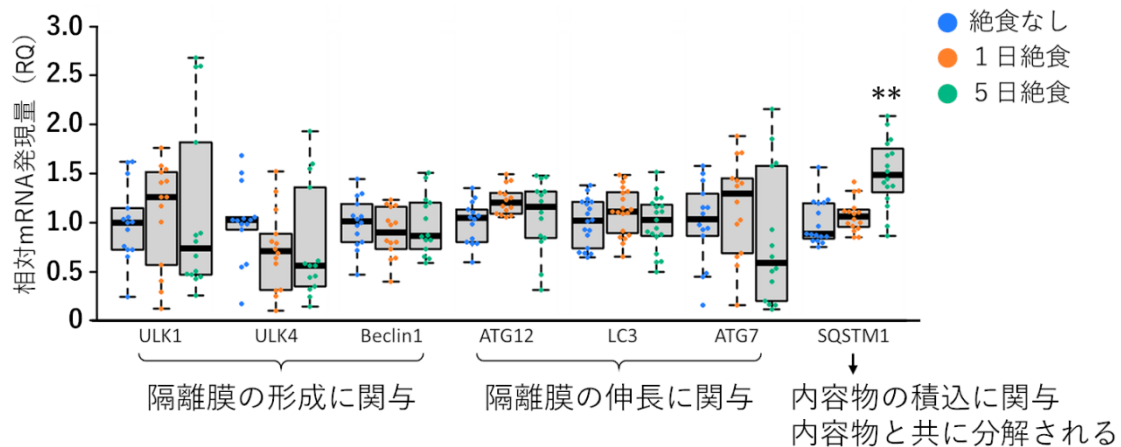


Fig. 4.6 絶食によるオートファジー關連遺伝子の発現量変化

** $p < 0.01$. Totani et al., 2022 より一部改変。

4.3.3. オートファジーの活性化が中枢神経系内セロトニン含量に与える影響

オートファジーが CNS の 5-HT 含量を直接制御しているという仮説を検証するために、オートファジー誘導剤である Tat-D11 とオートファジー阻害剤である BafA1 が CNS 内 5-HT 含量に与える影響を調べた。Tat-D11 で 24 時間処理した 1 日絶食の個体は、Tat-L11S (Tat-D11 のスクランブルペプチド) で処理した個体と比較して、CNS 内 5-HT 含量が有意に増加した (Fig. 4.7)。さらに、5 日絶食の個体に BafA1 を 24 時間処理したところ、DMSO を処理した 5 日絶食の個体と比較して、CNS 内 5-HT 含量が有意に減少した (Fig. 4.8)。これらの結果から、CNS 内 5-HT 含量は、オートファジー活性を介したアミノ酸の供給に影響されることが明らかになった。

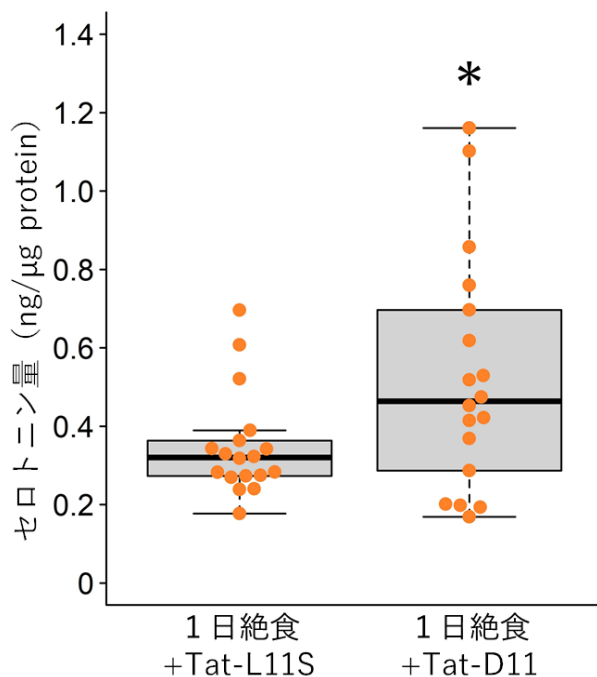


Fig. 4.7 オートファジー促進による CNS 内 5-HT 含量の変化

* $p < 0.05$ 。Totani et al., 2022 より一部改変。

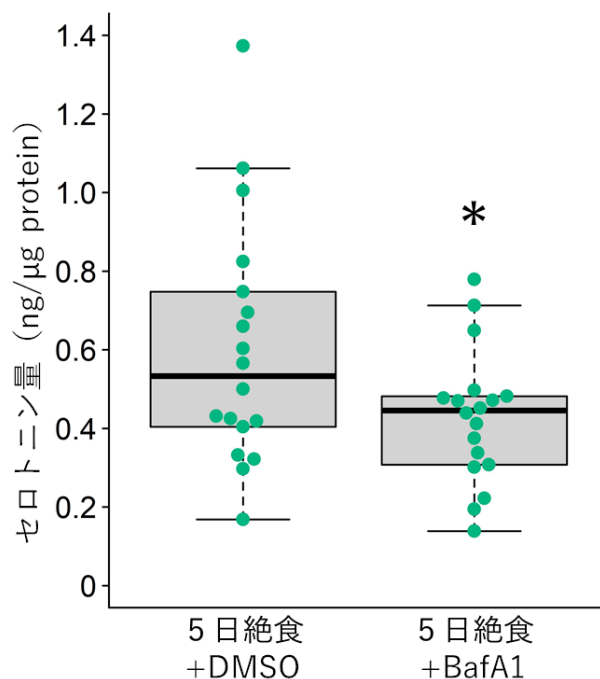


Fig. 4.8 オートファジー抑制による CNS 内 5-HT 含量の変化

* $p < 0.05$ 。Totani et al., 2022 より一部改変。

4.4. 考察

本章では、ヨーロッパモノアラガイの CNS 内 5-HT 含量を制御する新しいメカニズムを示した。CNS 内 5-HT 含量は、絶食による学習能力の調節に重要である。第3章の研究によって、1日絶食の個体は他の絶食条件と比較して学習能力が高く、CNS 内 5-HT 含量が低いのにに対し、5日絶食では学習能力が低下し、CNS 内 5-HT 含量が絶食なしの条件とほとんど同じレベルに回復することが示された。本章の結果は、1日絶食における CNS 内 5-HT 含量の減少は、絶食によるアミノ酸の供給低下に起因することを示した。絶食によって血リンパ中の Trp 濃度が低下すると、CNS での Trp の利用が抑制され、5-HT の合成が阻害される。また、5日絶食において CNS 内 5-HT 含量が回復するのは、オートファジーフラックスの活性化に由来することも発見した。オートファジーフラッ

クスの活性化により、神経細胞内にアミノ酸が供給され、CNS での 5-HT 合成が促進され、結果として CNS 内 5-HT 含量が回復したと考えられる (Fig. 4.9)。

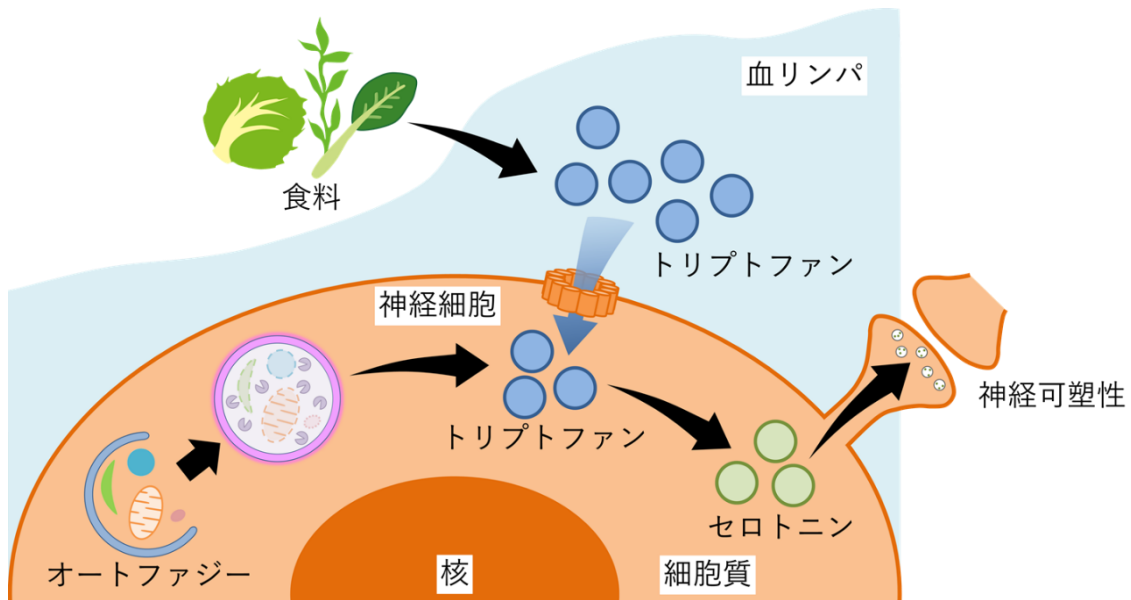


Fig. 4.9 絶食による中枢神経系内 5-HT 含量の調節機序

Totani et al., 2022 より一部改変。

5-HT の合成は、トリプトファン水酸化酵素 (tryptophan hydroxylase : TH) と芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (decarboxylase of aromatic amino acids : DAA) という 2 つの重要な酵素によって制御されている。TH の活性は、5-HT 合成の主要な律速因子と考えられている。最近のデータでは、5-HTP/5-HT 比をコントロールする DAA の活性は、様々な要因によって制御されていることが示唆されている (Aonuma et al., 2020)。しかし、Trp が欠乏した状態では、5-HT の蓄積における両酵素の役割は二次的なものになる可能性がある。実際、食料を摂取していないヨーロッパモノアラガイを用いた本研究では、Trp レベルの変化が CNS 内 5-HT 含量に強い影響を与えることを示した。しかし、本研究では TH と DAA の活性 (あるいはそれぞれの遺伝子の発現レベル) の変化については分析していない。したがって、絶食やオートファジーが酵素活性に影響を与えてい

る可能性も否定できないが、今回の結果は、Trp の利用可能性・オートファジー・5-HT 含量の間に明確な関連性があることを示している。

Trp は一般に必須アミノ酸であり、動物が体内で新規に合成することができないか、合成できても必要量を賄えない程度の少量しか合成できない。ヨーロッパモノアラガイにおいて Trp が必須アミノ酸であるかは明らかになっていないが、アミノ酸の合成は解糖系やクエン酸回路の中間体を使用することから、少なくとも 5 日絶食の時点では、Trp を含むアミノ酸自体の合成活性は低いと考えられる。

本研究は、ヨーロッパモノアラガイの CNS が、他の生物と同様に栄養的に保護されていることも明らかにした。オートファジーは、培養細胞では栄養枯渇後 30 分以内に誘導され、生体内の筋肉や内臓では 12-24 時間以内に誘導される (Mizushima et al., 2004; Mizushima and Yoshimori, 2007; Gomes et al., 2011)。しかし、このような迅速な反応は CNS では観察されない (Mizushima et al., 2004)。条件によっては、CNS のオートファジーが栄養欠乏によって抑制されることさえある (Nikoletopoulou et al., 2017)。ヨーロッパモノアラガイでも、1 日絶食が CNS 内オートファジーを誘導しなかったことから、他の生物と同様に、CNS は栄養的に保護されていると考えられる。一方、オートファジーが CNS のどの部分で誘導されるかについては、より詳細な検討が必要である。マウスでは、絶食によるオートファジー誘導は、脳の部位によって選択的に行われる (Nikoletopoulou et al., 2017) ことが知られているが、本研究ではそのような選択的誘導は観察されなかった。本研究では、低倍率で CNS 全体のオートファジーフラックスを解析したが、個々の細胞に焦点を当てた高倍率の観察を行うことで、より詳細なデータが得られ、部位特異的なオートファジー誘導を観察できる可能性がある。また、蛍光顕微鏡による観察以外に、神経節毎のウェスタンブロットや、電子顕微鏡観察なども有効であると考えられる。

数週間から数ヶ月間、食事制限（1日の総カロリー摂取量の減少または摂食時間の制限）を受けたネズミの脳では、Trp 摂取量の減少により 5-HT 作動性ニューロンの活性が抑制される（Jahng et al., 2007; Cui et al., 2018; Teng et al., 2019）。しかしこれらの動物では、脳内の 5-HT の量は減少しておらず、5-HT 作動性ニューロンの活性の抑制と一致しない（Jahng et al., 2007; Teng et al., 2019）。本章の結果は、長期の食事制限がオートファジーを誘導し、CNS 内の Trp 含量と 5-HT 含量とを増加させることを示唆している。この考えは、月単位の食事制限が神経細胞のオートファジーを誘導するという過去の知見と一致する（Bagherniya et al., 2018）。また、食事制限群と対照群の Trp 摂取量をほとんど等しくした際、食事制限は脳内の Trp と 5-HT の量を増加させることを示した先行研究とも一致する（Kohsaka et al., 1980）。このように、本章の結果は、食事制限が脳内の 5-HT 量に与える影響は、時間に依存することを示しており、食事制限の効果は、短期の食事制限と長期の食事制限とで異なる可能性がある。さらに、ヨーロッパモノアラガイにおいて、短期絶食がオクトパミンとドーパミンの CNS 内含量を低減させる一方で、長期絶食はそれらの含量を回復させることが報告されている（Aonuma et al., 2016, 2017）ことから、本研究で示された CNS 内 5-HT 調節機序は、他のモノアミン系にも拡大できると考えられる。今後、食事制限・脳内オートファジー・脳内モノアミン含量の相互作用をさらに調査することで、栄養状態が神経可塑性へ与える影響についてより理解を深めることができるだろう。

先行研究から、5日絶食のヨーロッパモノアラガイにインスリンを注射すると、CNS における 5-HT の量が減少し、学習能力が向上することが示されている（Aonuma et al., 2018; Totani et al., 2020b）。本章の結果は、このインスリンによる CNS 内 5-HT 含量の減少に、オートファジーも関与している可能性を示唆した。インスリンは、MTORC1 の活性化を介してオートファジーを阻害する

(Lumeng and Saltiel, 2006; Naito et al., 2013; Ribeiro et al., 2016) ため、5 日絶食の個体にインスリンを投与すると、オートファジーを抑制することで Trp の供給低下と 5-HT 合成の阻害が起こり、CNS 内 5-HT 含量が減少することが考えられる。一方、インスリン注射によって誘発された 5-HT の減少は、注射のわずか 1 時間後に観察された (Aonuma et al., 2018)。このことは、5-HT 合成阻害に加えて、インスリン注射によって 5-HT が直接分解される可能性も示唆している。

本研究では、絶食条件・オートファジー・5-HT の 3 者の新たな関連性を明らかにした。オートファジーとリソソームの融合阻害剤を投与することで、脳室内注射などの外科的な処置をすることなく、*in vivo* で CNS 内オートファジーフラックスを直接観察することができた。今後は、オートファジーが絶食条件下の動物の学習にどのような影響を与えるのか、神経細胞の形態学的、電気生理学的変化を調べる必要がある。また、Trk の下流経路についても、リン酸化レベルで調べる必要がある。本研究では、末梢のオートファジーフラックスを測定していないため、それが CNS 内 5-HT 含量に与える影響は考慮できていない。末梢のオートファジーは短期絶食によって速やかに誘導される (Mizushima et al., 2004; Mizushima and Yoshimori, 2007; Gomes et al., 2011) ことと、短期絶食では CNS 内 5-HT 含量が低下していたことから、末梢オートファジーが CNS 内 5-HT 含量に与える影響は小さいと予測されるが、正確な評価には末梢オートファジーの測定が不可欠である。

第 5 章

総括

本研究では、栄養状態による学習能力の調節機構の中で、絶食・学習能力・5-HT の3者の関係に焦点を当て研究を行った。

第1章では、序論として本研究の背景を整理し、絶食・学習能力・5-HT の3者の関係を調べることで、絶食による学習能力の調節機序を明らかにすることを目的とすることを述べた。

第2章では、ヨーロッパモノアラガイの味覚嫌悪学習の訓練と評価を自動化する装置を作製した。この装置は、動物への刺激提示をポンプとマイクロコンピュータで制御することにより、実験者に依らない均一でバイアスのない訓練を可能にした。また、機械学習によりヨーロッパモノアラガイの口を自動識別するシステムを作製したことで、従来の目視観察による評価では困難であった、複数項目の同時評価が可能となった。従来からの評価項目である咀嚼回数に加えて、刺激への反応速度や開口サイズを評価項目に加えることで、刺激とは無関係に発生する自発的な咀嚼行動による影響を除外することができた。

第3章では、絶食が学習能力と CNS 内 5-HT 含量に与える影響について調べた。結果、1日絶食が学習能力を向上させる一方、5日絶食ではそのような向上は認められなくなることを示した。また、優れた学習成績を示す1日絶食の個体では、CNS 内 5-HT 含量が絶食なしの条件と比較して 1/3 程度にまで低下することを示した。1日絶食の動物の CNS 内 5-HT 含量を人為的に増加させると学習成績の向上が認められなくなったことから、絶食による学習能力の変化に、CNS 内 5-HT 含量の変化が関与していることが明らかになった。絶食なしと同レベルの学習成績を示す5日絶食の動物では、CNS 内 5-HT 含量は絶食なしと同等のレベルまで回復しており、CNS 内 5-HT 含量の変化が、絶食による学習能力の調節に重要であることが裏付けられた。CNS 内 5-HT 含量の調節機序として、5-HT の代謝活性の増強を想定し、5-HIAA/5-HT 比を調べたが、絶食に

よって変化は認められなかった。このことから、ヨーロッパモノアラガイにおいては、絶食は CNS 内の 5-HT 代謝活性に影響を与えないと考えられ、5 日絶食で観察された CNS 内 5-HT 含量の回復は、5-HT 合成経路の活性化によるものであると示唆された。

第 4 章では、5 日絶食で観察された CNS 内 5-HT 含量の回復が、5-HT 合成経路の活性化によるものであるという仮説を検証するため、絶食による CNS 内 5-HT 含量の調節機序について研究した。結果、CNS 内 5-HT 含量は、食料依存性な経路と、CNS 内オートファジー依存性な経路の、少なくとも 2 つの経路によって調節されていることが示された。CNS 内オートファジー依存性な経路は、絶食なしや 1 日絶食の条件では活性化していないが、5 日絶食の条件では長期間の栄養不足を補うために活性化し、その結果、CNS 内 5-HT 含量が回復することを明らかにした。第 4 章で明らかになった 5-HT 量調節機序は、CNS のニューロンに供給されるアミノ酸量を調節するものであることから、5-HT に限らず、他のモノアミン系にも拡大できるため、今後の研究の発展に繋がる重要な知見であると考えられる。

本研究の成果を統合することで、絶食による学習能力の調節機序について、ヨーロッパモノアラガイでは以下のように、3 段階の調節がなされていることが明らかになった。

- 1). ヨーロッパモノアラガイでは、絶食なしの状態において、食料由来の Trp が血リンパ中に大量に存在し、これが神経細胞に取り込まれることで、CNS 内 5-HT 含量が増加する。この 5-HT によって、絶食なしの状態において、ヨーロッパモノアラガイの学習能力は、元々、抑制された状態にある (Fig. 5.1 上段)。

- 2). つづいて1日絶食では、食料が存在しないことによって、血リンパ中の Trp が減少する。すると、上記経路が全て阻害され、CNS 内 5-HT 含量が減少する。結果、5-HT による学習の抑制も解除され、1日絶食では学習能力が向上する (Fig. 5.1 中段)。
- 3). 一方、5日絶食においては、血リンパ中の Trp は1日絶食と同様に少なく、神経細胞への供給量も低下しているが、5日間という長期に渡って神経細胞の Trp が不足したことで、これを補填する仕組みとして、オートファジーフラックス活性化が誘導される。すると、オートファジーによって再生産された Trp が神経細胞内で増加し、CNS 内 5-HT 含量が回復する。その結果、5-HT による学習の抑制も回復し、1日絶食で見られたような学習能力の向上は、5日絶食では観察されなくなる (Fig. 5.1 下段)。

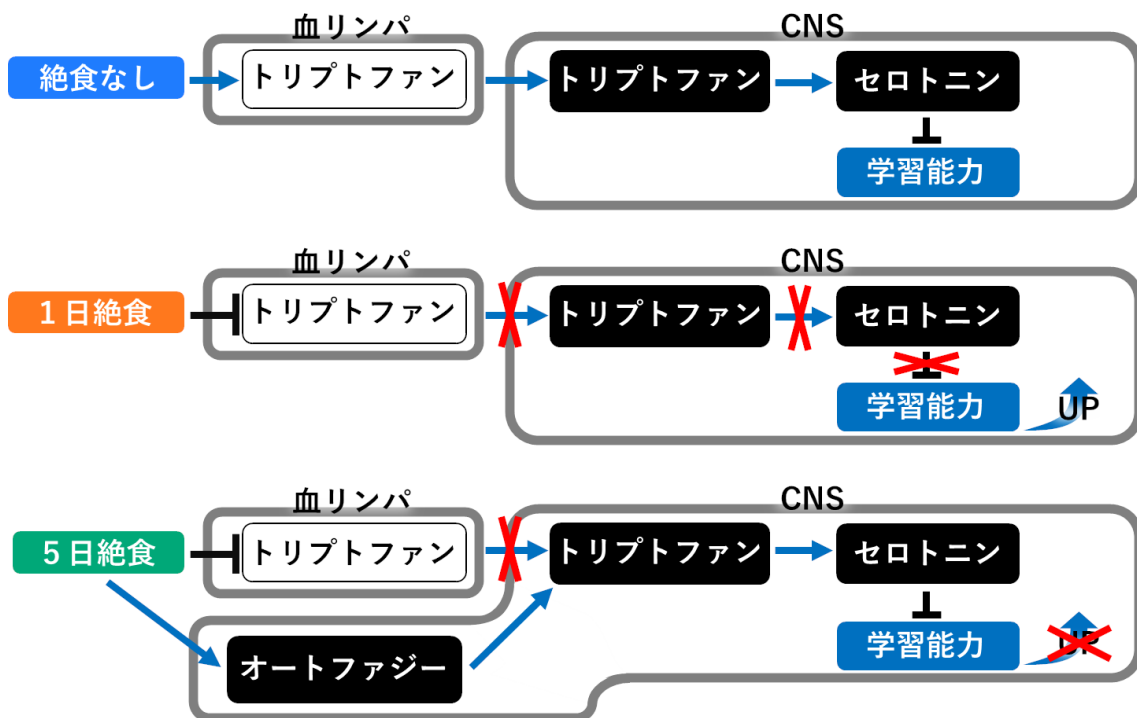


Fig. 5.1 絶食による学習能力の調節機序モデル

Totani et al., 2022 より一部改変。

上記のメカニズムは、ヨーロッパモノアラガイが、栄養状態に応じて最適な生存戦略を選択することに寄与していると考えられる。短期間の絶食により CNS 内 5-HT 含量が減少し、味覚嫌悪学習能力が促進されることで、行動の適応性が高まり、新しい食物を安全・迅速に発見できるようになると考えられる。また、1 日絶食は、移動を制御する運動ニューロンを活性化し (Dyakonova et al., 2015a, 2015b; Aonuma et al., 2020)、探索行動を誘発するとも想定されている。一方、これらの戦略が失敗して絶食が長期化した場合、CNS におけるオートファジーの活性化は、タンパク質分解によってアミノ酸欠乏を回復すると同時に、学習能力を基礎レベル (絶食なしと等しいレベル) に戻して余分なエネルギー消費を防ぐことで、生存率を高めることができる。

このように本研究によって、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少なくとも 2 つの経路によって、CNS 内 5-HT 含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 5-HT 含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。

謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なご指導とご教示を賜りました早稲田大学 教育・総合科学学術院 伊藤悦朗教授に、深く感謝し心より御礼申し上げます。早稲田大学での研究室の一期生として迎えていただき、学部生のころから現在に至るまで、研究活動だけでなくあらゆる面において、熱心なご指導を賜りましたこと、重ねて御礼申し上げます。

筆者が修士課程と博士後期課程で研究を進めるにあたり、多くの先生方から数多くのご助言をいただきました。自動学習装置の作製に当たり、電気工学と情報処理について多くのご助言をいただきました、東海大学の榊原学教授、国土舘大学の小田井圭教授、沼津工業高等専門学校の小谷進准教授に、深く感謝の意を表します。また、実験手法からデータ解析まで、幅広くご相談に乗っていただきました、徳島文理大学の畠山大准教授、総合研究大学院大学の渡邊崇之助教に、心より感謝いたします。

本研究の遂行に際し多大なご協力を頂きました一般財団法人 守谷育英会様に深く感謝の意を表します。さらに、研究生活を支えてくださいました伊藤研究室秘書の、渡部秀子氏、田中雪子氏、中村洋子氏に厚く御礼申し上げます。そして、これまで研究室生活を共にしてきた伊藤研究室の皆様には感謝いたします。

2022年2月

戸谷 勇輝

参考文献

- Aonuma, H., Kaneda, M., Hatakeyama, D., Watanabe, T., Lukowiak, K., and Ito, E. (2016). Relationship between the grades of a learned aversive-feeding response and the dopamine contents in *Lymnaea*. *Biol. Open* 5:1869–1873.
- Aonuma, H., Kaneda, M., Hatakeyama, D., Watanabe, T., Lukowiak, K., and Ito, E. (2017). Weak involvement of octopamine in aversive taste learning in a snail. *Neurobiol. Learn. Mem.* 141:189–198.
- Aonuma, H., Totani, Y., Kaneda, M., Nakamura, R., Watanabe, T., Hatakeyama, D., Dyakonova, V.E., Lukowiak, K., and Ito, E. (2018). Effects of 5-HT and insulin on learning and memory formation in food-deprived snails. *Neurobiol. Learn. Mem.* 148:20–29.
- Aonuma, H., Mezheritskiy, M., Boldyshev, B., Totani, Y., Vorontsov, D., Zakharov, I., Ito, E., and Dyakonova, V. (2020). The role of serotonin in the influence of intense locomotion on the behavior under uncertainty in the mollusk *Lymnaea stagnalis*. *Front. Physiol.* 11:221
- Bagherniya, M., Butler, A.E., Barreto, G.E., and Sahebkar, A. (2018). The effect of fasting or calorie restriction on autophagy induction: A review of the literature. *Ageing Res. Rev.* 47:183–197.
- Beck, G., Munno, D.W., Levy, Z., Dissel, H.M., Van-Minnen, J., Syed, N.I., and Fainzilber, M. (2004). Neurotrophic activities of trk receptors conserved over 600 million years of evolution. *J. Neurobiol.* 60:12–20.
- Bell, C., Abrams, J., and Nutt, D. (2001). Tryptophan depletion and its implications for psychiatry. *Br. J. Psychiatry* 178:399–405.
- Bendesky, A., Tsunozaki, M., Rockman, M. V, Kruglyak, L., and Bargmann, C.I. (2011). Catecholamine receptor polymorphisms affect decision-making in *C. elegans*. *Nature* 472:313–318.

- Benjamin, P.R. (2012). Distributed network organization underlying feeding behavior in the mollusk *Lymnaea*. *Neural Syst. Circuits* 2:4.
- Bernstein, I.L. (1999). Taste aversion learning: A contemporary perspective. *Nutrition* 15:229–234.
- Black, R.E., Victora, C.G., Walker, S.P., Bhutta, Z.A., Christian, P., De Onis, M., Ezzati, M., Grantham-Mcgregor, S., Katz, J., Martorell, R., et al. (2013). Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. *Lancet*. 382:427–451.
- Brüner, B., Saumweber, J., Samur, M., Weber, D., Schumann, I., Mahishi, D., Rohwedder, A., and Thum, A.S. (2020). Food restriction reconfigures naïve and learned choice behavior in *Drosophila* larvae. *J. Neurogenet.* 34:123–132.
- Chang-Yeon, J. (2008). Face detection using LBP features. *Final Proj. Rep.* 77:1–4
- Chaouloff, F., Laude, D., Merino, D., Serrurier, B., Guezennec, Y., and Elghozi, J.L. (1987). Amphetamine and α -methyl-p-tyrosine affect the exercise-induced imbalance between the availability of tryptophan and synthesis of serotonin in the brain of the rat. *Neuropharmacology* 26:1099–1106.
- Cui, R., Fan, J., Ge, T., Tang, L., and Li, B. (2018). The mechanism of acute fasting-induced antidepressant-like effects in mice. *J. Cell. Mol. Med.* 22:223–229.
- Dyakonova, V.E., Hernádi, L., Ito, E., Dyakonova, T.L., Chistopolsky, I.A., Zakharov, I.S., and Sakharov, D.A. (2015a). The activity of isolated neurons and the modulatory state of an isolated nervous system represent a recent behavioural state. *J. Exp. Biol.* 218:1151–1158.
- Dyakonova, V.E., Hernádi, L., Ito, E., Dyakonova, T., Zakharov, I., and Sakharov, D. (2015b). The activity of isolated snail neurons controlling locomotion is affected by glucose. *Biophys.* 11:55–60.
- Fainzilber, M., Smit, A.B., Syed, N.I., Wildering, W.C., Hermann, P.M., Van Der Schors, R.C., Jiménez, C., Li, K.W., Van Minnen, J., Bulloch, A.G.M., et al.

- (1996). CRNF, a molluscan neurotrophic factor that interacts with the p75 neurotrophin receptor. *Science*. 274:1540–1543.
- French, A.S., Sellier, M.-J., Agha, M.A., Guigue, A., Chabaud, M.-A., Reeb, P.D., Mitra, A., Grau, Y., Soustelle, L., and Marion-Poll, F. (2015). Dual mechanism for bitter avoidance in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 35:3990–4004.
- Freund, Y., and Schapire, R.E. (1997). A decision-theoretic generalization of on-line learning and an application to boosting. *J. Comput. Syst. Sci.* 55:119–139.
- Garcia, J., McGowan, B.K., Ervin, F.R., and Koelling, R.A. (1968). Cues: Their relative effectiveness as a function of the reinforcer. *Science*. 160:794–795.
- Gomes, L.C., Benedetto, G. Di, and Scorrano, L. (2011). During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat. Cell Biol.* 13:589–598.
- Gomez-Marin, A., Stephens, G.J., and Louis, M. (2011). Active sampling and decision making in *Drosophila* chemotaxis. *Nat. Commun.* 2:441.
- Gordesky-Gold, B., Rivers, N., Ahmed, O.M., and Breslin, P.A.S. (2008). *Drosophila melanogaster* prefers compounds perceived sweet by humans. *Chem. Senses* 33:301–309.
- Haque, Z., Lee, T.K.M., Inoue, T., Luk, C., Hasan, S.U., Lukowiak, K., and Syed, N.I. (2006). An identified central pattern-generating neuron co-ordinates sensory-motor components of respiratory behavior in *Lymnaea*. *Eur. J. Neurosci.* 23:94–104.
- Haupt, S., Eckstein, M.L., Wolf, A., Zimmer, R.T., Wachsmuth, N.B., and Moser, O. (2021). Eat, train, sleep—retreat? Hormonal interactions of intermittent fasting, exercise and circadian rhythm. *Biomol.* 11:516.
- Höglund, E., Øverli, Ø., and Winberg, S. (2019). Tryptophan metabolic pathways and brain serotonergic activity: A comparative review. *Front. Endocrinol.* 10:158.
- Holly, K.S., Orndorff, C.O., and Murray, T.A. (2016). MATSAP: An automated

- analysis of stretch-attend posture in rodent behavioral experiments. *Sci. Rep.* 6:31286.
- Jahng, J.W., Kim, J.G., Kim, H.J., Kim, B.T., Kang, D.W., and Lee, J.H. (2007). Chronic food restriction in young rats results in depression- and anxiety-like behaviors with decreased expression of serotonin reuptake transporter. *Brain Res.* 1150:100–107.
- Jamshed, H., Beyl, R.A., Manna, D.L.D., Yang, E.S., Ravussin, E., and Peterson, C.M. (2019). Early time-restricted feeding improves 24-hour glucose levels and affects markers of the circadian clock, aging, and autophagy in humans. *Nutr.* 11:1234.
- Kandel, E.R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science.* 294:1030–1038.
- Kemenes, G., and Elliott, C.J.H. (1994). Analysis of the feeding motor pattern in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*: photoinactivation of axonally stained pattern-generating interneurons. *J. Neurosci.* 14:153–166.
- Kemenes, G., Staras, K., and Benjamin, P.R. (2001). Multiple types of control by identified interneurons in a sensory-activated rhythmic motor pattern. *J. Neurosci.* 21:2903–2911.
- Keszthelyi, D., Troost, F.J., and Masclee, A.A.M. (2009). Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. *Neurogastroenterol. Motil.* 21:1239–1249.
- Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M.J., Abeliovich, H., Arozena, A.A., Adachi, H., Adams, C.M., Adams, P.D., Adeli, K., et al. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12:1–222.
- Kohsaka, S., Takamatsu, K., and Tsukada, Y. (1980). Effect of food restriction on serotonin metabolism in rat brain. *Neurochem. Res.* 5:69–79.

- Kojima, S., Yamanaka, M., Fujito, Y., and Ito, E. (1996). Differential neuroethological effects of aversive and appetitive reinforcing stimuli on associative learning in *Lymnaea stagnalis*. *Zool. Sci.* 13:803–812.
- Kojima, S., Nakamura, H., Nagayama, S., Fujito, Y., and Ito, E. (1997). Enhancement of an inhibitory input to the feeding central pattern generator in *Lymnaea stagnalis* during conditioned taste-aversion learning. *Neurosci. Lett.* 230:179–182.
- Kondo, M., Nakamura, Y., Ishida, Y., and Shimada, S. (2014). The 5-HT₃ receptor is essential for exercise-induced hippocampal neurogenesis and antidepressant effects. *Mol. Psychiatry* 20:1428–1437.
- Liu, Z., Dai, X., Zhang, H., Shi, R., Hui, Y., Jin, X., Zhang, W., Wang, L., Wang, Q., Wang, D., et al. (2020). Gut microbiota mediates intermittent-fasting alleviation of diabetes-induced cognitive impairment. *Nat. Commun.* 11:855.
- Lumeng, C., and Saltiel, A.R. (2006). Insulin hinders autophagy. *Autophagy* 2:250–253.
- Luo, L., Gershow, M., Rosenzweig, M., Kang, K., Fang-Yen, C., Garrity, P.A., and Samuel, A.D.T. (2010). Navigational decision making in *Drosophila* thermotaxis. *J. Neurosci.* 30:4261–4272.
- Martinet, W., Meyer, G.R.Y. De, Andries, L., Herman, A.G., and Kockx, M.M. (2016). In situ detection of starvation-induced autophagy: *J. Histochem. Cytochem.* 54:85–96.
- Mattson, M.P. (2015). Lifelong brain health is a lifelong challenge: From evolutionary principles to empirical evidence. *Ageing Res. Rev.* 20:37–45.
- Mattson, M.P., Moehl, K., Ghena, N., Schmaedick, M., and Cheng, A. (2018). Intermittent metabolic switching, neuroplasticity and brain health. *Nat. Rev. Neurosci.* 19:63.
- Menon, M.B., and Dhamija, S. (2018). Beclin 1 phosphorylation - at the center of autophagy regulation. *Front. Cell Dev. Biol.* 6:137.

- Menzel, R., and Giurfa, M. (2001). Cognitive architecture of a mini-brain: the honeybee. *Trends Cogn. Sci.* 5:62–71.
- Mita, K., Okuta, A., Okada, R., Hatakeyama, D., Otsuka, E., Yamagishi, M., Morikawa, M., Naganuma, Y., Fujito, Y., Dyakonova, V., et al. (2014). What are the elements of motivation for acquisition of conditioned taste aversion? *Neurobiol. Learn. Mem.* 107:1–12.
- Mitroulis, I., Kourtzelis, I., Kambas, K., Rafail, S., Chrysanthopoulou, A., Speletas, M., and Ritis, K. (2010). Regulation of the autophagic machinery in human neutrophils. *Eur. J. Immunol.* 40:1461–1472.
- Mizushima, N., and Komatsu, M. (2011). Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell* 147:728–741.
- Mizushima, N., and Yoshimori, T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3:542–545.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2004). In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol. Biol. Cell* 15:1101–1111.
- Naito, T., Kuma, A., and Mizushima, N. (2013). Differential contribution of insulin and amino acids to the mTORC1-autophagy pathway in the liver and muscle. *J. Biol. Chem.* 288;21074.
- Nikoletopoulou, V., Sidiropoulou, K., Kallergi, E., Dalezios, Y., and Tavernarakis, N. (2017). Modulation of autophagy by BDNF underlies synaptic plasticity. *Cell Metab.* 26:230–242.
- Ojala, T., Pietikäinen, M., and Harwood, D. (1996). A comparative study of texture measures with classification based on featured distributions. *Pattern Recognit.* 29:51–59.
- Picot, S., Faury, N., Arzul, I., Chollet, B., Renault, T., and Morga, B. (2020).

- Identification of the autophagy pathway in a mollusk bivalve, *Crassostrea gigas*. *Autophagy*. 16:2017–2035.
- Prado, E.L., and Dewey, K.G. (2014). Nutrition and brain development in early life. *Nutr. Rev.* 72:267–284.
- Pu, L., Kopec, A.M., Boyle, H.D., and Carew, T.J. (2014). A novel cysteine-rich neurotrophic factor in *Aplysia* facilitates growth, MAPK activation, and long-term synaptic facilitation. *Learn. Mem.* 21:215–222.
- Ribeiro, M., López de Figueroa, P., Blanco, F.J., Mendes, A.F., and Caramés, B. (2016). Insulin decreases autophagy and leads to cartilage degradation. *Osteoarthr. Cartil.* 24:731–739.
- Sahani, M.H., Itakura, E., and Mizushima, N. (2014). Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids. *Autophagy* 10:431–441.
- Schmidt, J., Laarousi, R., Stolzmann, W., and Karrer-Gauß, K. (2018). Eye blink detection for different driver states in conditionally automated driving and manual driving using EOG and a driver camera. *Behav. Res. Methods* 50:1088–1101.
- Song, Q., Liu, H., Zhen, H., and Zhao, B. (2020). Autophagy and its role in regeneration and remodeling within invertebrate. *Cell Biosci.* 10:111.
- Staras, K., Kemenes, G., and Benjamin, P.R. (1999). Electrophysiological and behavioral analysis of lip touch as a component of the food stimulus in the snail *Lymnaea*. *J. Neurophysiol.* 81:1261–1273.
- Sugai, R., Azami, S., Shiga, H., Watanabe, T., Sadamoto, H., Kobayashi, S., Hatakeyama, D., Fujito, Y., Lukowiak, K., and Ito, E. (2007). One-trial conditioned taste aversion in *Lymnaea*: good and poor performers in long-term memory acquisition. *J. Exp. Biol.* 210:1225–1237.

- Takigami, S., Sunada, H., Lukowiak, K., Ito, E., and Sakakibara, M. (2016). An automated learning apparatus for classical conditioning of *Lymnaea stagnalis*. *J. Neurosci. Methods* 259:115–121.
- Teng, L.L., Lu, G.L., Chiou, L.C., Lin, W.S., Cheng, Y.Y., Hsueh, T.E., Huang, Y.C., Hwang, N.H., Yeh, J.W., Liao, R.M., et al. (2019). Serotonin receptor HTR6-mediated mTORC1 signaling regulates dietary restriction–induced memory enhancement. *PLoS Biol.* 17:e2007097.
- Totani, Y., Aonuma, H., Oike, A., Watanabe, T., Hatakeyama, D., Sakakibara, M., Lukowiak, K., and Ito, E. (2019). Monoamines, insulin and the roles they play in associative learning in pond snails. *Front. Behav. Neurosci.* 13:65.
- Totani, Y., Kotani, S., Odai, K., Ito, E., and Sakakibara, M. (2020a). Real-time analysis of animal feeding behavior with a low-calculation-power CPU. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 67:1197–1205.
- Totani, Y., Nakai, J., Dyakonova, V.E., Lukowiak, K., Sakakibara, M., and Ito, E. (2020b). Induction of LTM following an insulin injection. *eNeuro* 7: ENEURO.0088-20.2020.
- Totani Y., Nakai J., Hatakeyama D., Dyakonova V.E., Lukowiak K., and Ito E. (in press) CNS serotonin content mediating food deprivation-enhanced learning is regulated by hemolymph tryptophan concentration and autophagic flux in the pond snail. *Nutr. Neurosci.*
- Viola, P., and Jones, M. (2001). Rapid object detection using a boosted cascade of simple features. *Proc. IEEE Conf. Comput. Vis. Pattern Recognit.* 1: I–511–I–518.
- Vogel, C., Walter, C., and Elkmann, N. (2017). Safeguarding and supporting future human-robot cooperative manufacturing processes by a projection- and camera-based technology. *Procedia Manuf.* 11:39–46.
- Xu, F., Gainetdinov, R.R., Wetsel, W.C., Jones, S.R., Bohn, L.M., Miller, G.W., Wang,

- Y.M., and Caron, M.G. (2000). Mice lacking the norepinephrine transporter are supersensitive to psychostimulants. *Nat. Neurosci.* 3:465–471.
- Zarrinpar, A., Chaix, A., Yooseph, S., and Panda, S. (2014). Diet and feeding pattern affect the diurnal dynamics of the gut microbiome. *Cell Metab.* 20:1006–1017.
- Zhan, Z., Wu, Y., Liu, Z., Quan, Y., Li, D., Huang, Y., Yang, S., Wu, K., Huang, L., and Yu, M. (2020). Reduced dendritic spines in the visual cortex contralateral to the optic nerve crush eye in adult mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 61:55.

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	<p>○ [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.</p> <p>[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.</p> <p>[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.</p> <p>○ [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.</p> <p>○ [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.</p> <p>[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.</p> <p>[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)</p> <p>○ [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)</p> <p>[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)</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	[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)
	[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)
	[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)
	[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
	[12] <u>戸谷勇輝</u> , 中居詢子, 榊原学, 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)
	[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
	[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
	[15] <u>戸谷勇輝</u> , 小田井圭, 伊藤悦朗, 榊原学. 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)
日本語解説	[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?”
獲得研究費	[1] 守谷育英会研究助成金 2020 年度－2021 年度
	[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