

(様式D-2)
(別 紙)

令和4年度 海外派遣研究員研究報告書

令和5年5月8日

日本大学理事長 殿
日本大学学長 殿

所 属 理工学部
資格・氏名 准教授・小松崎 良将

令和4年度海外派遣研究員（短期B）の研究実績を、下記のとおり報告いたします。

記

- 1 区 分 短期B
2 研究課題

認知表現型の異なるヨーロッパモノアラガイにおける植物フラボノイドの効果を探る研究

- 3 派遣期間 西暦2023年 2月25日 ~ 2023年 3月23日
4 派遣先 国名 カナダ ・都市名 カルガリー
5 研究目的

緑茶など植物に含まれるフラボノイドの一種であるエピカテキンには、認知能力を向上させる効果があることが知られている。我々の先行研究では、標準的な記憶学習能力を持ち、実験室で数十世代にわたって飼育されてきたヨーロッパモノアラガイ（以下、モノアラガイ）が、学習中にエピカテキンを与えると、記憶をより長く保持できることを明らかにした。モノアラガイは、生息地によって異なる認知機能型を発現し、また環境ストレスなどに対する感受性も異なることが知られている。そこで、本研究では、共同研究者であるカルガリー大学の Ken Lukowiak 教授とともに、カルガリー周辺に生息する認知表現型の異なるモノアラガイを数種類採取し、それらの個体に対する影響を行動学的及び電気生理学的手法により検討する事が目的である。行動学的手法による研究では、モノアラガイの記憶学習能力を検証するために、2種類の味覚物質を関連づけて学習させる味覚連合トレーニングを行う。

6 研究概要

淡水性軟体動物であるモノアラガイは、主に欧州・北米に生息し、その認知能力は生息環境（天敵の有無など）による自然発生的な変動を示す (Lukowiak et al., 2014)。このモノアラガイの認知表現型は、オペラント条件付け学習による長期記憶の形成能力に応じて、「smart (賢い)」系統、「average (平均)」系統、「below-average (平均以下)」系統に分類される。熱ストレスを与えた場合、smart 系統では長期記憶形成が抑制されるが、平均系統では抑制されない (Sunada et al., 2017)。植物フラボノイドのエピカテキンを投与すると、実験室で飼育された平均系統では長期記憶形成が増強されるが、その他の系統においてどのような効果を示すのか不明である。

緑茶やココアに含まれるカテキンの一種であるエピカテキンは、認知能力を高める可能性がある。哺乳類では、エピカテキンを多く含む食品を経口摂取すると、脳内のエピカテキン濃度が上昇する (Abd El-Mohsen et al., 2002)。また、脳血管新生の増加や、海馬での学習に関連する遺伝子発現の増加、神経シナプスの増加とともに、空間記憶の向上が認められる (van Praag et al., 2007)。これらの認知機能に対するポジティブな効果を示した研究は、エピカテキンの長期投与に基づく結果であり、エピカテキンが神経系に直接作用するかどうかは不明であった。そこで申請者らは、エピカテキン及びエピカテキン含有食品が、モノアラガイを用いた学習モデルにおいて、呼吸行動のオペラント条件付け学習による長期記憶の形成を迅速(数分以内)かつ活動依存的に促進することを見出した (Knezevic et al., 2016; Swinton et al., 2018)。しかしながら、現在までのところ、神経回路・分子レベルでの記憶増強作用メカニズムは不明のままである。

そこで、本研究ではカルガリー大学にある Lukowiak 教授の協力を得て、様々な認知表現型の系統が棲息するカルガリー市近郊の池を調査して、モノアラガイを採集する。そして、それらの個体の長期記憶形成能力に対するエピカテキンの効果を Lukowiak 研究室で検証する。具体的には、各系統のモノアラガイをエピカテキン存在下でオペラント条件付け学習させ、その後の長期記憶形成を確認する。また、これらの個体から中枢神経系標本を作製し、エピカテキンが長期記憶形成に関わる神経系に及ぼす影響を電気生理学的手法により検討する。カルガリー大学では神経科学の専門家が多数おり、研究セミナーなどを通じて本研究の成果に関する意見交換の機会を設ける予定である。このようにエピカテキンが様々な系統の認知能力に及ぼす神経作用様式を詳細に解析することで、エピカテキンの記憶増強作用のメカニズムやモノアラガイの種に共通する記憶形成機構を理解する手がかりが得られると予想される。さらに、ここで得た知見は軟体動物のみならず、哺乳類の認知機能の解明への応用・展開が期待される。

(様式D-2)

7 研究結果・成果

出国当日、カナダは冬の嵐に襲われ、経由地であるバンクーバー到着後、ほぼ全ての便が欠航となり、2日間足止めとなった。そのため、カナダ入国から2日後に最終目的地であるカルガリーに到着した。そのため、当初の予定よりも多少遅れたが、カルガリー市近郊にある、Gull Lake, Spirit Creek や、Stoney Trail, Trans-Canada Highway 脇にある湖沼 (Stoney, TC1, TC2) などから、モノアラガイを採取し、研究室の水槽で飼育を行った。また、例年に比べて気温が低く、3月中旬まで最高気温が -10°C 以下の日が続いた。そのため、研究室内の温度環境に慣らす必要があり、研究室内の水槽内でエサであるレタスを十分に与えて10日以上飼育した (図1)。このため、以下に述べるように、スケジュールが大幅に遅れることとなった。



図1. 採取したヨーロッパモノアラガイ (TC1)。

報告者の派遣先は、様々な環境ストレスがモノアラガイの記憶学習能力に与える影響を約40年にわたって研究しているカルガリー大学生理・薬理学部の Ken Lukowiak 教授の研究室である。Lukowiak 研究室は、Health Science Center (健康科学センター、図2) 内にある Hotchkiss Brain Institute (ホッチキス脳研究所、以下 HBI) に所属している。HBI は、Samuel Weiss 教授のリーダーシップのもと2004年に設立され、“Healthy brains for better lives” (報告者訳：より良い人生のために脳の健康が如何に大事か) というビジョンを掲げ、脳神経系を研究する多くの研究室からなる組織である。



図2. Hotchkiss Brain Institute は入る建物。

まず、Lukowiak 研究室において、本研究の課題である「認知表現型の異なるヨーロッパモノアラガイにおける植物フラボノイドの効果を探る」の準備として、日本で行った予備実験の結果についてプレゼンテーションを行った。その後、活発な質疑応答などを経て、今後の実験計画や新たな実験実験の構想について具体的に議論した。

そこで、カルガリー市近郊の TC1 より採取したモノアラガイ (以下、TC1 モノアラガイ) を用いて、植物フラボノイドの一つであるエピカテキンの影響を行動学的手法により、検証した。TC1 モノアラガイが生息する沼には天敵であるザリガニが生息しており、呼吸に関わるオペラント条件づけ学習による評価では、Smart 系統に分類される。しかしながら、異なる学習による認知機能の評価はなされておらず、まずは摂食を誘発するショ糖刺激に対する影響を調べた。その結果、15秒間のショ糖刺激により誘発される摂食行動は5分間続くことがわかった。エピカテキンなどのカテキン類は渋み・苦味成分と知られ、高濃度においては摂食行動を抑制することが知られているが、緑茶と同程度の濃度のエピカテキンは、TC1 モノアラガイの摂食行動に影響を与えないことが明らかになった。しかしながら、TC1 モノアラガイの摂食行動に関わる味覚嫌悪学習に対するエピカテキンの影響を出張期間内に明らかにすることはできなかった。そのため、

(様式D-2)

2019 年より Lukowiak 研究室で研究員として携わっている Diana Kagan 氏 (図 3) に実験を引き継いで行ってもらうこととなった。なお、予備実験および Lukowiak 研究室で行った実験の結果は、2023 年 11 月に開催予定の第 61 回日本生物物理学会年会で発表する予定である。また、これら結果をもとにした論文を学術機関誌に投稿する予定である。



図 3. Lukowiak 研究室にて。写真左から、報告者、Kagan 氏、Lukowiak 教授。

Kagan 氏は特に Configural learning の研究で成果を挙げている。Configural learning とは、一緒に経験した 2 つの異なる刺激の間で、その構成要素の単純な足し合わせられた刺激とは異なる関連性が生じる高次連合学習の一種であり、文脈学習とも呼ばれる。モノアラガイの Configural learning では、ニンジンの匂い (摂食行動の誘発) とザリガニ飼育水 (モノアラガイの天敵であるザリガニが飼育されている水槽の水) をモノアラガイに同時に与えると、その後ニンジンの匂いに対して恐怖状態を誘発する。Kagan 氏より Configural learning の手法を学んだ。また、この手法を発展させた Social learning (社会的学習) について、Lukowiak 教授、Kagan 氏とともに議論を重ねて、その実験手法について検討した。社会的学習とは、他者の行動を観察し、模倣すること (社会的行動) によって、新しい行動を獲得することであり、社会的学習のメカニズムを明らかにすることは、例えば、ヒトの社会的行動原理の理解、生物の進化や遺伝における社会的行動の役割など、非常に多くの分野で有益な情報をもたらす可能性がある。この社会的学習法については、いくつかの提案がなされており、これらの提案に従って実験を行い、社会的学習手法を確立していく予定である。

報告者の派遣先である Hotchkiss Brain Institute では、毎週金曜日に HBI Seminar を開催し、神経科学の分野で著名な研究者を招待し、セミナーを行っている。出張の期間内に、“Ghrelin recruits the endocannabinoid system to modulate food reward” のタイトルで Dr. Alfonso Abizaid の講演や “Control of sleep and wakefulness across lifespan” のタイトルで Dr. Luis de Lecea の講演などを聴講し、睡眠リズムと精神疾患などのメカニズムなどについて質疑を行い、最新の研究について意見交換を行った。

この出張をより有意義なものにするために、今後もこの出張により構築された連携を維持・発展させていきたい。

以 上