モノアラガイにおける学習・記憶成立機構 ～生物学的階層性に基づく包括的理解～

島 山 大*

我々は学習・記憶のメカニズムを知るために、様々な視点からアプローチすることで研究を行っている。行動学的解析、生理学的解析、細胞生物学的解析、分子生物学的解析などが挙げられるが、これらは互いに密接に関連しているものであり、個別に考えては学習・記憶の全体像を明らかにするのは困難である。この問題を解決するためには、生物の階層性を正確に追跡した実験系を組まなければならない、それが可能な実験動物をモデルとして用いる必要がある。複雑な学習を習得できる能力を持ちながら、できるだけ簡単な脳を持つ生物である。本稿では、この条件に合う軟体動物腹足類ヨーロッパモノアラガイ *Lymnaea stagnalis* を用いて、これまで得られた研究結果を中心に、行動レベルから、細胞レベルを経て、遺伝子発現レベルまでの道筋に沿いながら学習成立のメカニズムを概説する。また、最近になって「エビジェネティクス」という新しい分子生物学的概念が、神経生物学の領域にも徐々に取り入れられつつある。この我々にはまだ目新しい研究分野についても合わせて紹介する。

1. はじめに

神経生物学研究の目的の一つは、いかにして神経系が個体の行動を、その外部環境に適応させているのかを理解することである。究極的には我々は、行動を調節する神経ネットワークの文脈の中で、いかにニューロンが情報を処理し、伝達するのに用いる細胞機構や分子がいかに機能するのか、を理解したいのである。生物は独自の階層性を持っている。すなわち、「行動」⇔「脳・ニューロン」⇔「遺伝子発現」という一連の機構であり、これを正確に捉えて研究を進めなければ上記の目標を達成するのは難しい。そのためには、どのような実験動物を選ぶか、ということが最も重要になってくる。複雑な学習を習得することが可能であり、一方でできるだけ単純な構造の脳を持つ動物。その条件を満たすのが、ヨーロッパモノアラガイである。本稿では、ヨーロッパモノアラガイの学習・記憶成立機構を、脳の階層性を順に追跡しながら概説する。

2. 脳の階層性(1)～学習行動～

モノアラガイはいくつかの種類の古典的条件付けを習得することができる。忌避性味覚学習である味覚嫌悪学習¹⁶⁾、嗜好性味覚学習¹³⁾、光と振動とを組み合わせた古典的条件付け³⁶⁾、呼吸行動のオペラント条件付け²⁴⁾などが挙げられるが、本研究では味覚嫌悪学習をモデルとして用いた。条件付けは、シャーレに入れたモノアラガイの唇に、味覚刺

激として10mM ショ糖溶液と10mM 塩化カリウム溶液をピペットで与えて行う。嗜好性刺激であるショ糖溶液刺激に対しては、モノアラガイは盛んに咀嚼反応を示す。一方、忌避性刺激である塩化カリウム溶液刺激により、モノアラガイは強く殻の中に引き込んでしまう。そこで、ショ糖溶液刺激を条件刺激、塩化カリウム溶液刺激を非条件刺激とし、ショ糖+塩化カリウムの組み合わせ刺激によるトレーニングを10回行った(図1 A)。その結果、モノアラガイはショ糖溶液刺激の後に塩化カリウム溶液刺激が与えられることを記憶し、ショ糖溶液刺激に対しても咀嚼運動を示さなくなった(図1 B)。同時に、コントロール群として2種類のグループを準備した。一つは、ショ糖溶液刺激と塩

図1 味覚嫌悪学習とモノアラガイの脳 A: 味覚嫌悪学習トレーニングの概略図。条件付けでは、ショ糖溶液による条件刺激(CS)、塩化カリウム溶液による非条件刺激(US)を10回繰り返す。コントロールとして、CSとUSの順番を逆にしたバックワード群、ショ糖溶液と塩化カリウム溶液を蒸留水に置き換えたナীব群を用意する。B: 条件付け後のショ糖溶液刺激に対し、ナীব群とバックワード群は通常と変わらない咀嚼回数を示したが、学習群においてはほとんど咀嚼反応を示さなかった。各バーに記された数字はモノアラガイの個体数を示す。論文12より一部改変。C: モノアラガイの脳の概略図。内臓神経節以外は左右に一对ある。体壁神経節だけは左右で大きさが異なる。脳の大きさは約1 mmである。D: 口球神経節のB2ニューロンがNADPH diaphorase法により選択的に染色された。スケールバーは50μm。論文33より一部改変。

*Dai HATAKEYAMA, 徳島文理大学 薬学部 薬学科 生化学講座 (〒770-8514 徳島市山城町西浜傍180)

化カリウム溶液刺激の順番を逆にしたバックワード群、もう一つはショ糖溶液と塩化カリウム溶液を蒸留水に置き換えたナイーブ群である(図1 A)。2つのコントロール群では、トレーニング後にもショ糖溶液刺激に対して盛んな咀嚼応答を示し、味覚嫌悪学習の条件付けが有効であったことが示された(図1 B)。なお、この味覚嫌悪学習は、長期記憶として少なくとも1カ月は保持されることが分かった^{16), 48)}。

3. 脳の階層性(2)~脳と学習の鍵を握るニューロン~

私がモノアラガイを実験動物に選んだ最大の理由は、その脳の構造が非常に単純である、という点である。モノアラガイの脳は、前部で11個の神経節で構成されており(図1 C)、それに含まれるニューロンの総数は 10^5 個程度である。研究に用いられる最も小型の哺乳類であるマウスでも、脳内のニューロンの総数は約 10^7 個と考えられており、モノアラガイの100倍の数である。モノアラガイの脳がいかに単純な作りをしているかが分かる。そんな単純な脳でも、上記に述べたようにモノアラガイはかなり複雑な学習を習得することができる。そして、非常に限られた数のニューロンによって、これらの学習が制御または調節されているため、そういったニューロンにターゲットを絞った研究を遂行することが可能なのである。

モノアラガイの味覚嫌悪学習成立のカギを握るニューロンはいくつか同定されている。筆者は其中で、特に口球神経節に含まれるBuccal 2 (B2) ニューロンに着目した。B2ニューロンはモノアラガイの食道に軸索を伸ばし、食物の飲み込みをコントロールする運動ニューロンである。神経型NO合成酵素(NOS)の特異的なマーカーであるNADPH diaphoraseの酵素組織化学染色法により、B2ニューロンはNO産生ニューロンであることが示された(図1 D)^{27), 33), 37)}。免疫組織化学的手法および*in situ* ハイブリダイゼーション法によっても、B2ニューロンはNOSを含んでいることが示されている³⁷⁾。

このB2ニューロンから放出されるNOが、モノアラガイにおける味覚嫌悪学習成立の要因ではないかと考え、生理学的な実験を行った。はじめに、NO電極を用いて、B2ニューロンを含む口球神経節から放出されるNOの濃度をセミ・インタクト標本で測定した。その結果、一個体の口球神経節から約20nMのNOが放出されることが分かった¹⁴⁾。放出されたNOの濃度はNOスカベンジャーであるPTIO、およびNOS阻害剤であるL-NAMEを投与したことにより有意に減少し(図2 A, C)、同時に咀嚼回数は有意に増加した(図2 B, D)。また、NOS含有細胞であるB2ニューロンを物理的に破壊すると、PTIOやL-NAMEを投与した時と同様に、NO放出量は減少し(図2 E)、咀嚼回数は有意に増加した(図2 F)。これは、B2ニューロンから放出されるNOが、モノアラガイの咀嚼運動を阻害していることを示唆するものであり、味覚嫌悪学習成立時に咀嚼運動の回数が有意に減少する要因となっていることが考えられる。その後の他の研究からの報告により、B2ニューロンから放出されるNOが有効濃度を保つ拡散半径は約96 μ mであることが、コンピュータ・シミュレーションにより示された²⁹⁾。B2ニューロンから半径96 μ m以内には、モノアラガイの咀嚼運動に関与する他の運動ニューロンや介在ニューロンが多数存在し、その中には、NOの分子

図2 NO阻害およびB2ニューロン破壊によるNO放出量と咀嚼回数の変化 NOスカベンジャーであるPTIO、およびNOS阻害剤であるL-NAMEの投与により、NO放出量は有意に減少し(A, C)、水やショ糖溶液に対する咀嚼反応回数は有意に増加した(B, D)。B2ニューロンを物理的に破壊することにより、同様の結果が観察された(E, F)。論文14, 15より一部改変。

カスケードの下流に位置するcGMP合成酵素を持つものもある^{31), 32)}。したがって、味覚嫌悪学習成立の際には、B2ニューロンから放出されるNOが咀嚼運動を抑制していることが示唆された。

4. 脳の階層性(3)~遺伝子発現~

4-1) 転写調節因子C/EBP

生物の記憶は、その持続時間によって短期記憶と長期記憶に分けられるが、長期記憶として1カ月以上にも及んで記憶が保持される場合には、新しい遺伝子の発現が必要であることが定説とされている。そこで筆者は、B2ニューロンにおけるNOS遺伝子発現をコントロールしていると考えられる遺伝子の探索と解析を行った。モノアラガイのNOS遺伝子は、その上流のプロモーター領域も含めてクローニングされているので、まずはNOS遺伝子がどういった転写因子によって転写制御を受けているのかを調べた。その結果、CCAATまたはCAATという配列が少なくとも3カ所存在することが分かった。これは転写調節因子CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) が特異的に結合するコンセンサス配列である。C/EBPは、cAMP-responsive element binding protein (CREB) と同様^{34), 35)}、塩基性アミノ酸の領域とロイシンジッパーを持ったbZIP

タンパク質である。もともとは哺乳類のグロビン遺伝子の転写調節を行う遺伝子としてクローニングされた⁸⁾。その後の研究により、哺乳類において現在までに、 α から γ までの6種類のアイソフォームからなるC/EBPファミリーを構成しており³⁰⁾、細胞や肝細胞の最終分化、細胞増殖抑制作用などがあることが分かった。そして、近年になって、C/EBPは、アメフラシ²⁾・²¹⁾・⁴⁷⁾・ナメタジ⁷⁾といった軟体動物やマウス⁵⁾・³⁸⁻⁴¹⁾・⁴⁹⁾において、学習・記憶に関与することも明らかになってきている。

4-2) モノアラガイにおけるC/EBP

モノアラガイの味覚嫌悪学習成立におけるC/EBPの関与を調べるために、まずはモノアラガイのC/EBPのクローニングを行った¹²⁾。モノアラガイのC/EBPはアミノ酸配列のレベルにおいて、アメフラシのC/EBPと約60%の相同性を示した。しかし、塩基性アミノ酸領域やロイシンジッパー領域といった機能部位に限っては、約86%という非常に高い保存性を有していた。その他、核内輸送シグナルとなるアミノ酸配列や、プロテインキナーゼC、チロシンキナーゼ、MAPキナーゼ、カゼインキナーゼIIといったリン酸化酵素によるリン酸化部位も保存されていた。哺乳類、ショウジョウバエ、アメフラシのC/EBPのロイシンジッパー領域には、カルシウム／カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼによるリン酸化部位も保存されているのだが、おもしろいことにモノアラガイのC/EBPにおいては、それに相当するセリン残基がグリシン残基に置換されており、カルシウム／カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼによるリン酸化を受けないことが予想された。また、アメフラシのC/EBPはalternative splicingにより2種類のアイソフォームが存在することがわかっているが²⁾、モノアラガイにおいてもアメフラシと同じインサート部位を持つアイソフォーム1と、それを持たないアイソフォーム2の2種類が存在した。両方のアイソフォームのmRNAを同時に増幅できるようなプライマーを用いて通常のRT-PCRを行うと、モノアラガイの脳においては、インサート部位を持つアイソフォーム1のmRNAの方がより多く含まれていることが分かった(図3A)。タンパク質レベルにおいても同様の結果が得られた。モノアラガイの脳ホモジネートを二次元電気泳動で展開し、ウェスタンブロッティング法を用いて観察すると、分子量の大きいアイソフォーム1の

図3 モノアラガイC/EBPのmRNAレベルでの発現解析 A:モノアラガイC/EBPの2つのアイソフォームを同時にRT-PCRにより増幅したところ、長いアイソフォーム1(矢尻1個)のバンドが短いアイソフォーム(矢尻2個)のバンドより強度が強かった。B, C: *in situ* ハイブリダイゼーションにより、左右のB2ニューロンにおいて特異的な染色が確認された。スケールバーは50 μ m。論文12より一部改変。

図4 モノアラガイC/EBPのタンパク質レベルでの発現解析 A:モノアラガイの脳ホモジネートを二次元電気泳動法で展開し、ウェスタンブロッティング法を行ったところ、長いアイソフォームのC/EBPのスポットが観察された。リン酸化を受けたと思われるC/EBPのスポットも同時に見られた。B, C:免疫組織化学染色により、左右のB2ニューロンにおいて特異的な染色が確認された。スケールバーは25 μ m。論文12より一部改変。

ポットは確認できたが、アイソフォーム2のスポットは見られなかった(図4A)。以上より、モノアラガイの脳内においては、スプライシングを受けない長いアイソフォーム1が主に機能していることが示唆された。

4-3) C/EBPの発現箇所の同定

モノアラガイの脳におけるC/EBPのmRNAおよびタンパク質の発現箇所を組織学的に解析した¹⁰⁾・¹²⁾。mRNAの局在解析には*in situ* ハイブリダイゼーション法、タンパク質の局在解析には免疫組織化学法を用いた。*in situ* ハイブリダイゼーションのプロープには、塩基性アミノ酸領域やロイシンジッパー領域などを含むC/EBPの機能部位から作製したので、両方のアイソフォームのmRNAをラベルすることができる。その結果、NOを放出するB2ニューロンの細胞質において強いシグナルを観察することができた(図3B, C)。免疫組織化学法の抗体は、ヒトのC/EBP β に対するポリクローナル抗体を用いた。この抗体のエピトープ配列は、モノアラガイのC/EBPでも特に保存性の高い塩基性アミノ酸領域やロイシンジッパー領域であり、モノアラガイのC/EBPも特異的に認識することがウェスタンブロッティング法でも証明されている。実験の結果、C/EBPのタンパク質も、そのmRNAと同様、B2ニューロンでの発現を観察することができた(図4B, C)。

4-4) 味覚嫌悪学習成立に伴うC/EBPの量的および質的变化

モノアラガイの味覚嫌悪学習成立に伴うC/EBPのmRNAおよびタンパク質の変化を解析した。通常リアルタイムRT-PCR法ではトータルRNAを抽出した後にmRNAのコピー数を計測するが¹⁷⁾、一つのニューロンからトータルRNAを抽出するのは技術的に不可能である。可能だとしても、RNAの抽出過程においてRNAをロスしてしまうため、正確なmRNAのコピー数を計測することはできない。そこで、単一のB2ニューロン内におけるmRNAコピー数を計測するために、筆者らは単一細胞リアルタイムRT-PCR法を確立した¹¹⁾・⁴⁴⁾。この方法では、ニューロンを神経節から物理的に単離し、それを逆転写プライマーなどが混和された溶液に入れ、1分間加熱する。すると、熱によってニューロンの細胞膜が破れ、ニューロン内のmRNA

が液中に放出される。そこに直接、逆転写酵素などを加えて逆転写反応を行うことで、細胞内の mRNA をロスすることなく計測することが可能になった。筆者はまず、モノアラガイに味覚嫌悪学習の条件付けを施した。他にコントロール群としてバックワード群とナイブ群を準備し、それぞれのモノアラガイから B2ニューロンを単離した。そして、単一細胞リアルタイム RT-PCR 法により各群の B2ニューロン内における C/EBP の mRNA コピー数を計測したところ、学習群の B2ニューロンではバックワード群やナイブ群と比べて、予想に反して有意に減少していることが明らかになった (図 5 A)。

図 5 味覚嫌悪学習成立に伴う C/EBP の mRNA およびタンパク質の量的・質的变化 A: 図 1 B で示したモノアラガイから B2ニューロンを単離し、単一細胞リアルタイム RT-PCR で B2ニューロンに含まれる C/EBP の mRNA 量を定量した。その結果、学習群の B2ニューロンにおいて C/EBP の mRNA 量が有意に減少していた。B: B2ニューロンを含む口神経節のホモジネートを等電点電気泳動法で展開し、ウェスタンブロッティングを行ったところ、学習群において C/EBP タンパク質の翻訳レベルおよびリン酸化レベルが増加していた。論文 12 より一部改変。

次に、C/EBP のタンパク質量の変化を解析した。残念ながら、現在の技術では mRNA のように一個の細胞におけるタンパク質量を測ることのできる技術はない。そこで、B2ニューロンを含む口神経節全体を用いて、ウェスタンブロッティング法で解析した。学習成立の過程で C/EBP はリン酸化される可能性がある。そこで、通常の C/EBP とリン酸化された C/EBP を分離するために、等電点電気泳動を行った。その結果、味覚嫌悪学習に伴い、C/EBP の発現レベルとリン酸化レベルは、どちらも有意に増加していた (図

5 B)。さらに、B2ニューロンでの C/EBP タンパク質の発現量増加を調べるために蛍光抗体染色を行ったところ、2つのコントロール群と比べて、学習群において蛍光強度が有意に強くなっていた (図 6)。これは大きな驚きであった。セントラルドグマに則れば、mRNA レベル、タンパク質レベルともに増加するはずであるが、mRNA レベルは減少し、タンパク質レベルは増加していたのである。これは、C/EBP の翻訳活性が上がると同時に、mRNA の分解活性も同時に増加した結果ではないかと考えられるが、今後このメカニズムの解析をより詳細に解析したい。

図 6 味覚嫌悪学習成立に伴う B2ニューロンにおける C/EBP タンパク質量の変化 A-C: 蛍光免疫組織化学染色による各群の B2ニューロンにおける染色パターン。D: 学習群の B2ニューロンにおける蛍光強度が有意に高かった。論文 12 より一部改変。

4-5) エピジェネティクス研究

ここまで述べてきた C/EBP や CREB のみならず、長期記憶成立時の遺伝子発現に関与する転写因子が次々に同定されてきた³⁾。しかし、遺伝子発現を議論する上で、避けて通れない道がある。それは「エピジェネティクス epigenetics」の概念である。エピジェネティクスの「エpi」がギリシャ語に由来する「後」を意味することからも分かります。ゲノム DNA への後天的な修飾により遺伝子発現が調節され、結果として多様性が生み出される仕組みを意味する。然るべき場所で、然るべき時に、然るべき遺伝子が発現するシステムを構築しているのがエピジェネティクスである。このゲノム DNA 修飾の際、ゲノム DNA の塩基配列が変えられることはなく、修飾による遺伝子機能の変化は細胞分裂を経て娘細胞に伝達される特徴を持つ。エピジェネティクスの最初の基礎的な知見は、細胞分裂・発生・癌の研究からもたらされたが、近年になって神経生物学の分

野にもエピジェネティクスの概念が徐々に浸透しつつある²³⁾。長期記憶に基づく生物の長期間に及ぶ行動変容に、エピジェネティックなゲノム修飾が関与することが明らかになってきたのである。

では、エピジェネティックなゲノム DNA 修飾とは、具体的にどんなものなのか。その1つは「ヒストンの化学修飾による遺伝子発現の変化」である。ゲノム DNA は、ヒストン・タンパク質に巻き取られたクロマチン構造を形成している。このままの状態では、転写活性に必要な RNA ポリメラーゼや転写調節因子はゲノム DNA に結合することはできないので、ヒストンからゲノム DNA を解く必要がある。そのヒストンの構造的変化は、ヒストンをアセチル化させることによって引き起こされる。哺乳類のヒストンには4種類のアイソフォームが存在するが、すべてのアイソフォームにおいて2個または4個のリジン残基がアセチル化されることが明らかになっている。無脊椎動物のヒストンは哺乳類のヒストンと比較しても、アミノ酸レベルで非常に高い保存性(90%以上)を示すことが分かっており、無脊椎動物においても同様のメカニズムが存在することが予想される。このヒストン・アセチル化を担っているのが、CREB binding protein (CBP) に代表されるヒストン・アセチル化酵素であり、CBP が学習・記憶の形成にも深く関与していることが明らかになってきている。CBP の遺伝子に変異が生じたマウスや不完全な CBP を過剰発現させたマウスでは長期記憶は成立しなかったが^{1), 4), 18), 28), 46)}、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤を投与することによって長期記憶が回復または増強された^{1), 18), 43)}。また、CBP と CREB の複合体が長期記憶形成に伴う遺伝子発現に関与することは、アメフラシでも示されている⁹⁾。

4-6) モノアラガイにおけるエピジェネティクス研究

CBP はその名の通り、転写調節因子 CREB と相互作用することはよく知られているが、CREB 以外の多種多様な転写調節因子とも相互作用することができる。そのターゲットの1つが C/EBP である¹⁹⁾。そこで筆者は、モノアラガイの味覚嫌悪学習に対する C/EBP と CBP の役割を調べるために、まずは CBP のクローニングを行った (GenBank accession number: AB217914, 投稿準備中)。モノアラガイの CBP はアメフラシの CBP と比較して、アミノ酸レベルにおいて約75%の相同性を示した。CBP が転写調節因子と相互作用するのに必要な KIX ドメインや、ヒストン・アセチル化ドメインなどの機能部位においては、さらに高い保存性(約90%)を有しており、CBP としての機能も保存されていると考えられる。次に、*in situ* ハイブリダイゼーションにより、CBP の mRNA の局在を解析した。その結果、C/EBP が発現していた B2 ニューロンではなく、脳神経節に存在する Cerebral Giant Cell (CGC) において強いシグナルが観察され、全体的には CREB の染色パターンとよく似ていたのである³⁴⁾。CGC は CREB が強く発現するニューロンであり、味覚嫌悪学習により活性型の CREB1 の働きを抑制する CREB2 の発現量が抑えられることが明らかにされている³⁴⁾。モノアラガイの C/EBP はその上流に CREB が結合する CRE 配列を持っており、CREB による発現促進が起こることが予想されている。今後は、学習成立に伴う CREB と CBP との相互作用や、下流遺伝子の発現調節のメカニズムを詳細に解析していく必要がある。

5. おわりに

本稿では、筆者がこれまで行ってきたモノアラガイの研究を、行動から遺伝子発現までの階層性を順に追いつながり紹介してきた。モノアラガイはニューロンが大きく、生理学的実験と分子生物学的実験を簡単にリンクさせることができるため、非常に扱いやすい実験動物である。しかし、全ゲノム配列がまだ解析されておらず、現在の神経生物学研究において新しい研究分野として徐々に開拓されつつあるエピジェネティクスの研究にまで、十分に踏み込むことができないのが唯一の欠点である。上で述べたヒストンのアセチル化以外に、エピジェネティクスにはもう一つ重要なファクターがある。それが「ゲノム DNA 塩基のメチル化による遺伝子発現の変化」である。DNA の塩基 (主にシトシン) のメチル化により転写活性が抑制される機構が存在し、マウスにおけるシナプス可塑性や学習・記憶との関連も示されてきている^{22), 25), 26)}。これは、全ゲノム配列が分かっている分野であれば非常に難しい領域である。無脊椎動物においても、例えばミツバチのゲノムにもメチル化された塩基が存在されていることが明らかにされてきているので^{6), 45)}、全ゲノム配列が既に解析されている利点を生かし⁴²⁾、私が2008年の本学会で発表したように、エピジェネティクスの視点から行動学的・神経生物学的・発生学的研究²⁰⁾が一気に進められることが考えられる。しかし、いかにミツバチでも脳の単純さという点ではモノアラガイの方が上であり、この利点をエピジェネティクス研究に応用できれば、他の実験動物では叶わないような、まったく新しい知見が得られるに違いない。今後モノアラガイを扱う研究者が増え、さらに研究 (特にゲノム配列解析) が進むことを望まずにはいられない。

謝 辞

本稿で述べた研究は、徳島文理大学香川薬学部の伊藤悦朗教授、およびサセックス大学 (イギリス) の George Kemenes 教授との共同研究として遂行されたものです。ここに深く感謝申し上げます。また、本稿執筆に当たり、徳島文理大学香川薬学部の小林卓先生・定本久世先生には、貴重な実験データを提供していただきました。最後に、このような寄稿の機会をいただきましたことに、多くの関係者の方々に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Alarcón, J.M., Malleret, G., Touzani, K., Vronskaya, S., Ishii, S., Kandel, E.R. & Barco, A.: Neuron, 42, 947-959 (2004).
- 2) Alberini, C.M., Ghirardi, M., Metz, R. & Kandel, E.R.: Cell, 76, 1099-1114 (1994).
- 3) Alberini, C.M.: Physiol. Rev., 89, 121-145 (2009).
- 4) Bourtochouladze, R., Lidge, R., Catapano, R., Stanley, J., Gossweiler, S., Romashko, D., Scott, R. & Tully T.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 100, 10518-10522 (2003).
- 5) Chen, A., Muzzio, I.A., Malleret, G., Bartsch, D., Verbitsky, M., Pavlidis, P., Yonan, A.L., Vronskaya, S., Grody, M.B., Cepeda, I., Gilliam, T.C. & Kandel, E.R.: Neuron, 39, 655-

- 669 (2003).
- 6) Elango, N., Hunt, B.G., Goodisman, M.A.D. & Yi, S.V.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 106, 11206-11211 (2009).
- 7) Fukunaga, S., Matsuo, R., Hoshino, S. & Kirino, Y.: J. Neurobiol., 66, 169-181 (2006).
- 8) Grosveld, G.C., Shewmaker, C.K., Jat, P. & Flavell, R.A.: Cell, 25, 215-226 (1981).
- 9) Guan, Z., Giustetto, M., Lomvardas, S., Kim, J.H., Miniaci, M.C., Schwartz, J.H., Thanos, D. & Kandel, E.R.: Cell, 111, 483-493 (2002).
- 10) Hatakeyama, D., Fujito, Y., Sakakibara, M. & Ito, E.: Cell Tissue Res., 318, 631-641 (2004).
- 11) Hatakeyama, D., Sadamoto, H. & Ito, E.: Acta Biol. Hung., 55, 157-161 (2004).
- 12) Hatakeyama, D., Sadamoto, H., Watanabe, T., Wagatsuma, A., Kobayashi, S., Fujito, Y., Yamashita, M., Sakakibara M., Kemenes, G. & Ito, E.: J. Mol. Biol., 356, 569-577 (2006).
- 13) Jones, N., Kemenes, G., & Benjamin, P. R.: J. Neurophysiol., 85, 89-97 (2001).
- 14) Kobayashi, S., Sadamoto, H., Ogawa, H., Kitamura, Y., Oka, K., Tanishita, K. & Ito, E.: Neurosci. Res., 38, 27-34 (2000).
- 15) Kobayashi, S., Ogawa, H., Fujito, Y. & Ito, E.: Neurosci. Lett., 285, 209-212 (2000).
- 16) Kojima, S., Yamanaka, M., Fujito, Y. & Ito, E.: Zool. Sci., 13, 803-812 (1996).
- 17) Korneev, S.A., Straub, V., Kemenes, I., Korneeva E.I., Ott, S.R., Benjamin, P.R. & O'Shea, M.: J. Neurosci., 25, 1188-1192 (2005).
- 18) Korzus, E., Rosenfeld, M.G. & Mayford, M.: Neuron, 42, 961-972 (2004).
- 19) Kovács, K.A., Steinmann, M., Magistretti, P.J., Halfon, O., Cardinaux, J.R.: J. Biol. Chem., 278, 36959-36965 (2003).
- 20) Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S. & Maleszka, R.: Science, 319, 1827-1830 (2008).
- 21) Lee, J.A., Kim, H.K., Kim, K.H., Han, J.H., Lee, Y.S., Lim, C.S., Chang, D.J., Kubo, T. & Kaang, B.K.: Learn. Mem., 8, 220-226 (2001).
- 22) Levenson, J.M., Roth, T.L., Lubin, F.D., Miller, C.A., Huang, I.C., Desai, P., Malone, L.M. & Sweatt, J.D.: J. Biol. Chem., 281, 15763-15773 (2006).
- 23) Levenson, J.M. & Sweatt, J.D.: Nat. Rev. Neurosci., 6, 108-118 (2005).
- 24) Martens, K., Amarell, M., Parvez, K., Hittel K., De Caigny, P., Ito, E. & Lukowiak K.: Neurobiol. Learn. Mem., 88, 232-242 (2007).
- 25) Miller, C.A., Campbell, S.L. & Sweatt, J.D.: Neurobiol. Learn. Mem., 89, 599-603 (2008).
- 26) Miller, C.A. & Sweatt, J.D.: Neuron, 53, 857-869 (2007).
- 27) Moroz, L.L.: Microsc. Res. Tech., 49, 557-569 (2000).
- 28) Oliveira, A.M., Wood, M.A., McDonough, C.B. & Abel, T.: Learn. Mem., 14, 564-572 (2007).
- 29) Philippides, A., Husbands, P. & O'Shea, M.: J. Neurosci., 20, 1199-1207 (2000).
- 30) Ramji, D.P. & Foka, P.: Biochem. J. 365, 561-575 (2002).
- 31) Ribeiro, M., Straub, V.A., Schofield, M., Picot, J., Benjamin, P.R., O'Shea, M. & Korneev, S.A.: Euro. J. Neurosci., 28, 1157-1165 (2008).
- 32) Ribeiro, M., Schofield, M., Kemenes, I., Benjamin, P.R., O'Shea, M. & Korneev, S.A.: Neuroscience, 165, 794-800 (2010).
- 33) Sadamoto, H., Hatakeyama, D., Kojima, S., Fujito, Y. & Ito, E.: Neurosci. Res., 32, 57-63 (1998).
- 34) Sadamoto, H., Sato, H., Kobayashi, S., Murakami, J., Aonuma, H., Ando, H., Fujito, Y., Hamano, K., Awaji, M., Lukowiak, K., Urano, A. & Ito, E.: J. Neurobiol., 58, 455-466 (2004).
- 35) 定本久世: 比較生理生化学, 26, 163-168 (2009).
- 36) Sakakibara, M., Kawai, R., Kobayashi, S., & Horikoshi T.: Neurobiol. Learn. Mem., 69, 1-12 (1998).
- 37) Serfőző, Z., Veréb, Z., Kemenes, G. & Elekes, K.: J. Neurocytol., 31, 131-147 (2002).
- 38) Sterneck, E., Paylor, R., Jackson-Lewis, V., Libbey, M., Przedborski, S., Tessarollo, L., Crawley, J.N. & Johnson, P.F.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 95, 10908-10913 (1998).
- 39) Taubenfeld, S.M., Milekic, M.H., Monti, B. & Alberini, C.M.: Nat. Neurosci., 4, 813-818 (2001).
- 40) Taubenfeld, S.M., Wiig, K.A., Bear, M.F. & Alberini, C.M.: Nat. Neurosci., 2, 309-310 (1999).
- 41) Taubenfeld, S.M., Wiig, K.A., Monti, B., Dolan, B., Pollonini, G. & Alberini, C.M.: J. Neurosci., 21, 84-91 (2001).
- 42) The Honeybee Genome Sequencing Consortium: Nature, 443, 931-949 (2006).
- 43) Vecsey, C.G., Hawk, J.D., Lattal, K.M., Stein, J.M., Fabian, S.A., Attner, M.A., Cabrera, S.M., McDonough, C.B., Brindle, P.K., Abel, T. & Wood, M.A.: J. Neurosci., 27, 6128-6140 (2007).
- 44) Wagatsuma, A., Sadamoto, H., Kitahashi, T., Lukowiak, K., Urano, A. & Ito, E.: J. Exp. Biol., 208, 2389-2398 (2005).
- 45) Wang, Y., Jorda, M., Jones, P.L., Maleszka, R., Ling, X., Robertson, H.M., Mizzen, C.A., Peinado, M.A. & Robinson, G.E.: Science, 314, 645-647.
- 46) Wood, M.A., Kaplan, M.P., Park, A., Blanchard, E.J., Oliveira, A.M., Lombardi, T.L. & Abel T.: Learn. Mem., 12, 111-119 (2005).
- 47) Yamamoto, N., Hegde, A.N., Chain, D.G. & Schwartz, J.H.: J. Neurochem., 73, 2415-2423 (1999).
- 48) Yamanaka, M., Sadamoto, H., Hatakeyama, D., Nakamura, H., Kojima, S., Kimura, T., Yamashita, M., Urano, A. & Ito, E.: Zool. Sci., 16: 9-16 (1999).
- 49) Yukawa, K., Tanaka, T., Tsuji, S. & Akira, S.: J. Biol. Chem., 273, 31345-31351 (1998).

Abstract

Mechanisms of learning and memory in pond snails discovered by following biological hierarchy

Dai HATAKEYAMA

Laboratory of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University, 180 Nishihama-Houji, Yamashiro-cho, Tokushima 770-8514, JAPAN

Various kinds of approaches using behavioral, physiological, cellular biological and molecular biological techniques have been developed for understanding the mechanisms of learning and memory. However, the results of these analyses are intricately related to one another, and the complexity makes it difficult to clarify the association between each result and to provide an overview of the mechanism for learning and memory. To overcome this difficulty, it is important to develop an experimental system where correct tracing of the biological hierarchy from behaviors to genes via brains and neurons is possible. Careful selection of an experimental

animal that can learn complex conditions with a simple brain is essential for this purpose. A pond snail, *Lymnaea stagnalis*, is particularly suitable for such studies. In this article, I review recent progress in the study of mechanisms for the conditioned taste aversion in *Lymnaea*, and introduce an application of "epigenetics", which is recently attracting considerable attention in the field of neurobiology.

Key words: mollusk, conditioned taste aversion, nitric oxide (NO), CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)