

プラナリアの記憶はどこにあるのか？

－ 切断・再生を通して考察 －

黒田 有紀 新崎 康太 鈴木 豪人 原田 珠華 矢部 清隆
兵庫県立神戸高等学校 総合理学科 2年

プラナリアの記憶に関して、Tal Shomrat and Michael Levin (2013)により“頭部を切断して、尾部から再生させた個体に、切断前の記憶が残存している可能性”，つまり，“脳以外の部位に記憶が存在する可能性”が示唆されている。そこで我々はプラナリアにおいて「記憶は頭部以外の神経にも存在している」という仮説を立て、条件付け・学習を通してプラナリアの記憶について探った。

その結果、プラナリアが電気刺激による学習をすることが可能であることがわかった。また、「学習後1日後においても学習の記憶が残存している可能性」、「学習後切断・再生を経た個体において2週間後においても学習の記憶が残存している可能性」を示唆する結果を得た。

1. はじめに

プラナリア (Planaria) は扁形動物門ウズムシ綱ウズムシ目ウズムシ亜目に属する動物の総称である。今回の実験ではその一種を採集、使用した。

プラナリアの記憶に関して、Tal Shomrat and Michael Levin (2013)により“頭部を切断して、尾部から再生させた個体に、切断前の記憶が残存している可能性”，つまり，“脳以外の部位に記憶が存在する可能性”が示唆されている。

2. 仮説と実験系

先行研究から、我々は「プラナリアにおいて記憶は頭部以外の神経にも存在している」という仮説を立てた。実験を通して“頭部を切断し尾部断片から再生した個体には、切断前の頭部神経節はないにもかかわらず切断前の記憶が残存していること”を明らかにし、上記の仮説を証明することをめざす。

条件付けまたは学習を行い、一定期間後、再度同じ条件付けまたは学習を行う(図1)。再条件付け・再学習に要する時間が1回目の条件付け・学習よりも短縮されている場合、「プラナリアには一定期間後においても条件付け・学習の記憶が残存している」と言える。

また1回目の条件付け・学習後に頭部を切断、尾部断片から再生した個体についても、同様に再条件付け・再学習を行う(図1)。切断・再生を経た個体においても再条件付け・再学習に要する時間が1回目の条件付け・学習よりも短縮されている場合、「プラナリアの尾部断片から再生した個体に、切断前の記憶が残存している」と言える。



図1

まず、どの刺激を用いて「条件付け・学習」を行うかを実験を通して決定した。ここでの「条件付け・学習」は①刺激を与えることで後天的に獲得される反応、②反応が獲得されるまでに与えた刺激の回数で記憶を数値化できるもの、③切断・再生に必要な期間の間その条件付けまたは学習の記憶が残っているもの、の以上3つを満たす必要がある。

3. 自動装置



写真1

写真1は、プラナリアに光刺激・電気刺激を与える装置である。マイコン(Arduino)の信号をトランジスタで増幅し、プラナリアに自動で光刺激・電気刺激を与えることができる。電源は、ACアダプタ・電源装置から取り、電気刺激の強さは電源の電圧を指標とする。自動化したことにより、先行研究で共通の問題であった手動による条件のばらつきを減らすことが可能となった。

3.1. 光刺激

光刺激にはテープLEDを用いた。長期条件付け(後述)においてはシャーレの直下に(図2a)、それ以外の実験

ではシャーレの上方約10cm程度の位置に(図2b)LEDを設置した。

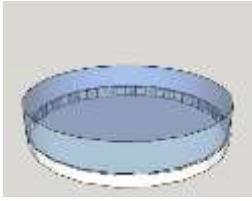


図2a

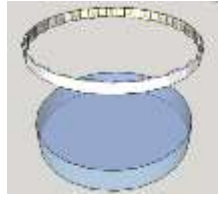


図2b

3.2. 電気刺激

体が電流の方向と直角の向きにある場合、プラナリアは電気刺激による収縮反応を示さないことが多い。そこで装置は3対(6本)の炭素電極をシャーレの周囲に設置し、各対から順に電流を流すことができるものにした(図3)。これによりプラナリアの位置・方向に関わらず刺激の強度をある程度均一化することが可能となった。

以後、電流を流す対が変わる周期をサイクルと呼ぶ。

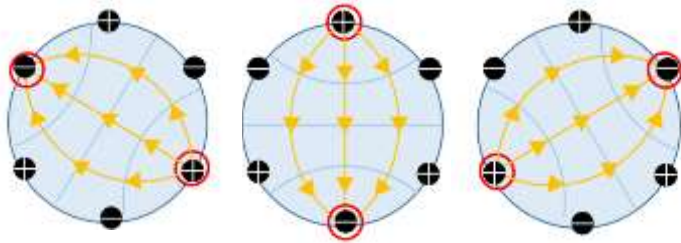


図3

3.3. その他

短期実験以降は、シャーレの中央にメンブレンフィルターで作った囲いをつくり、その中にプラナリアを入れた。これによりプラナリアの動く範囲を制限し、位置による電気刺激の強度差をより減らした。

また、水の電気抵抗の影響を減らすためシャーレ内の水は50mLに統一した。

4. 光刺激と電気刺激による条件付け

図1における「条件付け・学習」として、まず光刺激と電気刺激による条件付けに注目した。

プラナリアは電気刺激に対しては収縮反応を示すが、光刺激だけでは収縮反応をしない。しかし電気刺激と光刺激を同時に与え続けると、光刺激だけで収縮反応をするようになる。これを光刺激と電気刺激による条件付けが成立したという。

光刺激と電気刺激の条件付けについてはこれまで数多くの研究(参考文献[2][3]等)が行われており、後述の長期間条件付けを行う長期条件付け、短期間で行う短期条件付けのどちらにおいても条件付けが成立することが報告されている。

4.1. 長期条件付け

手代木氏の先行研究(参考文献[4])を参考にし、光刺激と電気刺激を使用した長期条件付け(図4)を行った。1日120回の条件付けを17日間繰り返したが、条件付け成立は見られなかった。



図4

4.2. 短期条件付け1

次に刺激を与える間隔を短くした短期条件付け(図5)を行った。電気刺激の強さを12V, 9V, 6Vと変えて実験したが、いずれも条件付けが成立するより前に「体を縮めたまま光刺激にも電気刺激にも反応しない状態(写真2)」になった。そのため条件付けを確認することはできなかった。



図5

4.3. 短期条件付け2

また短期条件付けが成立するとしていた佐野日大の報告(谷津)の追実験(図6)をおこなった。刺激の与える間隔の設定は同じにした。また先行研究では行われていなかった、電気刺激のみ与えた対照個体群との比較も行った。しかし条件付けは見られなかった。



図6

4.4. 結論

以上から我々の採集した個体では光と電気による条件付けが成立しないという結論に達した。

5. 電気刺激による学習

次に我々は上記の短期条件付けのときにみられた「電気刺激を与え続けると、体を縮めたまま光刺激にも電気刺激にも反応しなくなる反応(写真2)」(以後「固定」)に注目した。「固定」したプラナリアは筆でかきまわすと刺激を与えていない個体(写真3)と同じようにすぐに動きだす。このことから固定は電気刺激による疲労が原因ではないといえる。また固定を解除した個体が再び固定するまでに要した刺激の回数は、徐々に短くなっていった。

これらのことから我々は、プラナリアは電気刺激に対し「固定」という反応を学習できる、と予想した。そこで「固定」を図1の「学習」として使用できるかを確認するため、①「固定」が電気刺激によるものであること、②「固定」が学習であること、③「固定」

という学習の効果がある程度持続すること、の3点をそれぞれ後述の実験で確認した。



写真2: 「固定」状態

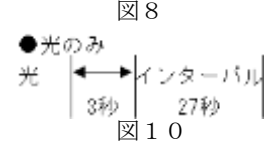
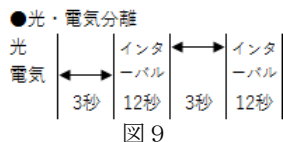
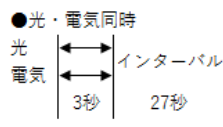
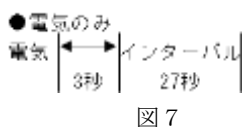
写真3: 通常状態

5.1. 実験1『固定』は電気刺激によるものか

「固定」が確認されたのは短期実験(図5)の際であったため、「固定」が光刺激・電気刺激のどちらによるものなのかは断定できなかった。そこで光刺激・電気刺激のそれぞれがプラナリアの「固定」にどう作用するのかを調べた。

・5.1.1. 方法

体長2~3cmの個体を1シャーレに5匹ずつ入れた。自動装置で図7~10の設定で刺激を与え続け、各個体が「固定」するのに要した刺激の回数を記録した。また刺激をまったく与えない個体についても、同様に固定までにかかる時間を記録した。なお、実験中に囲いから出た個体は以降のデータに含めないものとした。



・5.1.2. 結果

結果は表1の通りである。

表1

	固定の有無	回数(15個体の平均)
電気のみ	固定した	100
光・電気同時	固定した	86
光・電気分離	固定した	48
光のみ	固定せず	-
刺激無し	固定せず	-

「固定」は電気刺激を与えている個体にも見られたことから、「固定」には電気刺激が関与しているといえる。また光刺激が「固定」にかかる回数に影響することが示唆されたが、詳しい調査はできていない。この結果から、以後の実験では光の条件を統一した。

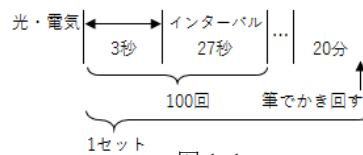
5.2. 実験2 学習の確認

・5.2.1. 方法

体長2~3cm個体を1シャーレに5匹ずつ入れた。図11の時間設定で、各個体が「固定」に要する刺激の回数を記録した。1セット終了毎に筆でシャーレをかき

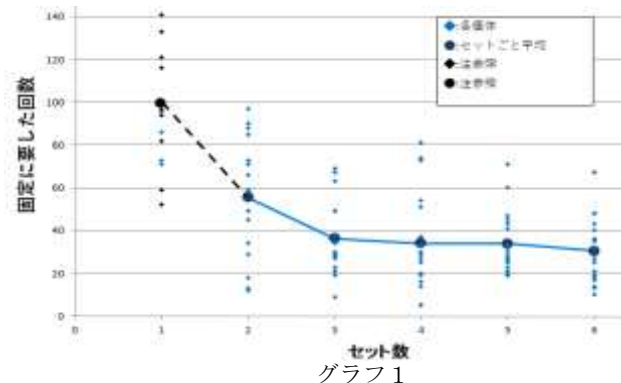
まわして、プラナリアがすぐに動き出すかを確認した(図11参照)。これは電気刺激による疲労でないことを確認するためである。

6セット実施し、セット数と各個体が「固定」するまでの刺激回数の関係をグラフ化した。



・5.2.2. 結果

学習曲線(グラフ1)を得た。



注*1セット目では100回の刺激の内、5/20匹の個体しか固定を示さなかったため、平均をとるには不十分と考えた。そこで別の個体10匹に同じ方法で刺激を与え、全個体が固定するまでの回数を記録した(点◆)。また、点●はその平均である。

グラフ1から、プラナリアの「固定」に要する刺激の回数が1セット目から2セット目にかけて急激に減少し、2セット目から3セット目にかけては緩やかに減少していることがわかる。これはプラナリアが「固定」を学習していることを示している。

また、3セット目以降の傾きがほぼ0であることは、「固定」が疲労等の記憶と関係のない物理的な反応によるものではないという予想を裏付けるものである

5.3. 実験3

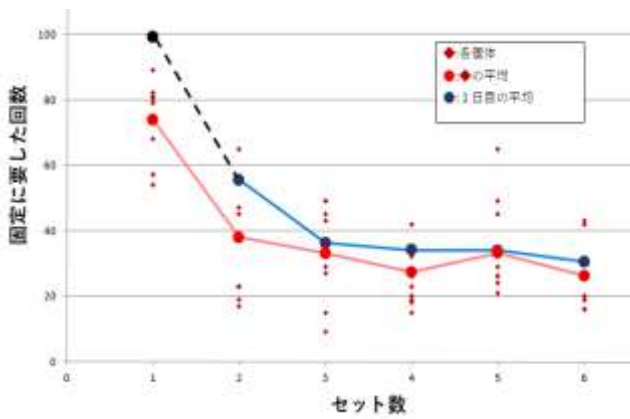
・5.3.1. 方法

実験2と同じ方法で「固定」を学習させ、1日後に同じ個体を使って実験2と同様に学習曲線をとる。

・5.3.2. 結果

標本数18個体で学習曲線を得た。グラフ2は前述の1日目の学習曲線(青)に2日目の学習曲線(赤)を重ねたものである。

2日目においても1日目と同様に学習がされていることがわかる。また、1セット目に「固定」した個体数が、1日目では20匹中5匹だったのに対し2日目では18匹中9匹だったことから、1日後においても「固定」を学習した記憶が残っている可能性は高いと言える。



グラフ 2

6. 切断・再生後の記憶

6.1. 方法

実験2と同じ方法で「固定」を学習させ、その直後に耳葉より上の頭部を切り落とした(図12)。尾部断片は2週間インキュベーター内で再生させた。この期間中、週2回の餌やりを行った。杯状眼、耳葉の再生を確認後、実験2と同様に学習曲線をとった(再学習)。

今回の実験では1/6に学習および切断した10個体を用いて1/20に学習曲線を描いた。

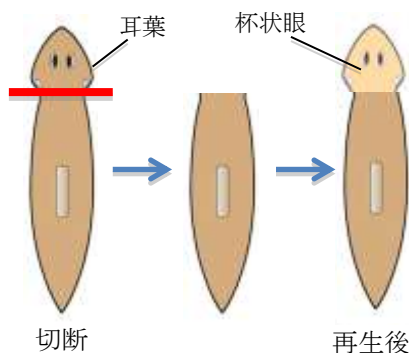


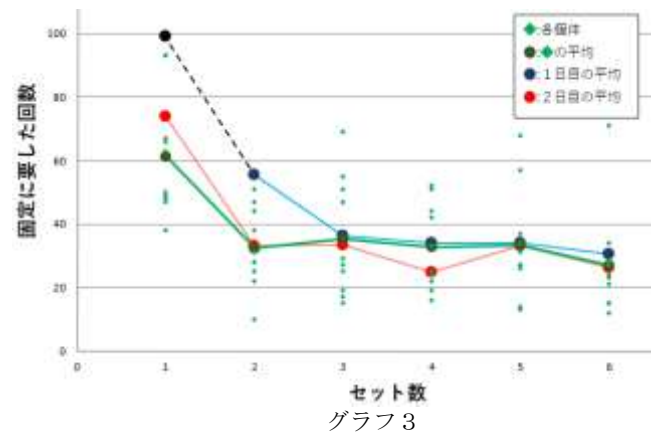
図 1 2

6.2. 結果

標本数10個体で学習曲線を得た。グラフ3は前述の1日目(青)、2日目(赤)の学習曲線に2週間後(緑)の学習曲線を重ねたものである。

2日目においても1日目と同様に学習がされていることがわかる。10匹すべてが1セット目で「固定」したことから、2週間後においても「固定」を学習した記憶が残っている可能性は高いと言える。つまり、頭部の切断・再生後も、切断前に学習した記憶が残っている可能性が高い。

また、尾部だけでなく、切断後新たに再生した頭部でも「固定」がみられた。これは学習を記憶した尾部が、新たにできた頭部にも影響を及ぼしているからだと考えられる。



グラフ 3

7. 結論と展望

これまでの実験から、我々の採集したプラナリアにおいては、光刺激と電気刺激による条件付けが成立しないこと、電気刺激による「固定」という反応を学習できることがわかった。

また、この「固定」を学習した記憶は、1日後、そして切断・再生を経た2週間後も残存している可能性が高い。このことから、プラナリアは学習後に頭部を切断しても、切断前に学習した記憶を維持することができる、つまりプラナリアにおいて記憶は頭部以外の組織にも存在している可能性が高いと言える。

さらに、再学習の際には、プラナリアの全身が「固定」した。これは、尾部だけでなく新たに再生した頭部も、尾部に存在する記憶に基づいた反応をしている、ということである。このことから、学習を記憶した尾部断片は、その尾部断片から再生した頭部の反応にも影響を及ぼすことができると考えられる。

今後は標本数を増やして個体差の影響を少なくするとともに、切断無しの2週間後、切断直後等の条件でも学習曲線を描き、プラナリアの記憶についてさらに考察する。

【謝辞】

本研究を進めるにあたり、監督・教示して下さいった本校教諭齋戸克彦先生、実験に協力して下さいった本校生徒の皆様、またご意見を頂きました佐野日本大学付属高等学校の谷津潤先生と生徒の皆様に、厚く御礼申し上げます。

【参考文献】

- [1] An automated training paradigm reveals long-term memory in planarians and its persistence through head regeneration (Tal Shomrat, Michael Levin, The Journal of Experimental Biology 216, 2013)
- [2] Distribution of practice in the classical conditioning of planarians (F.T.Crawford et al., Science Vol. 4, 1966)
- [3] Conditioned reflexes in planarians and regeneration experiments (A.N.Cherkashin et al., Neuroscience and Behavioral Physiology Vol. 1, 1967)
- [4] 『プラナリアの生物学-基礎と応用と実験-』(手代木 渉, 1987)