

線虫の記憶のしくみを探る

土浦日本大学中等教育学校
3年 太田ことま

はじめに



私は、線虫が匂いに対する優れた特性を持ち、がん検診にも利用されている事を知り線虫に興味を持った。線虫は「線形動物」というカテゴリーに属する長さ0.3~1mm程度の小さく細長い生き物で、約2~3日で成虫になり、約200~300個の卵を産み、約2週間ほど生存する。神経系やゲノムの解析も行われており、嗅覚だけではなく様々な優れた特性を持っているため、幅広く生物学の研究でも用いられている。

本校では数年前から線虫を使った研究を行っており、餌として納豆菌を与えて飼育している。さらに、今年に入り大腸菌での飼育も開始した。そこで、大腸菌と納豆菌それぞれで育てた線虫に餌の記憶が成立するかを調べることにした。記憶が成立するならば、飢餓状態に置くなど様々な刺激を与えて、記憶をなくさせ忘却のメカニズムについても調べたいと思った。シンプルな神経系を持つ線虫を使って、記憶と忘却のメカニズムを調べ、認知症の解明につなげて行きたいと考えている。

実験の準備

(1) 大腸菌の培養

LB培地を作製し、滅菌後、大腸菌を入れ培養する。



(2) 納豆菌の培養

グルコース水溶液に牛乳を加え、滅菌後納豆を入れ培養する。



(3) 線虫飼育用培地の作製

M9バッファーに寒天粉末を入れて滅菌後、滅菌済みシャーレに分注する。



(4) 線虫の飼育

飼育中のシャーレから先を平らにした白金耳で線虫を釣り、餌入りシャーレに植え替えて、20℃で飼育する。



研究1 「線虫は餌を記憶するのか」

- 優れた嗅覚を持つ線虫は、飼育時に使った餌を記憶し、餌に対する化学走性を形成するかを調べる。
- 餌の匂いを線虫は気体として受容するのか、寒天を介して液体として受容するのかを調べる。

実験1 「餌の記憶の確認」

「仮説」線虫は餌の匂いを記憶し、飼育時の餌へ移動する。

「方法」1. 大腸菌と納豆菌で育てた線虫をM9バッファーで洗い流す。
2. 洗い流したM9を遠心分離し、線虫を寒天の中央に滴下する。
3. 30分毎に観察し、数取器で線虫の数を数える。

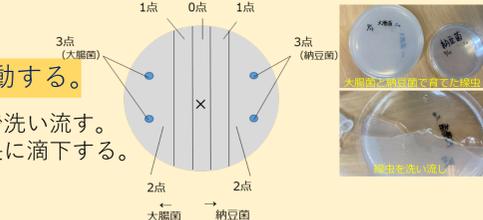
「結果と考察」

90分(シャーレ①~③)では移動途中だったため(表1)、150分(シャーレ④~⑦)まで30分おきに線虫の位置を確認し(図1)移動指数を求めた。大腸菌飼育群の大腸菌移動指数(I_D)=0.75、納豆菌移動指数(I_N)=0 (p<0.01)で、納豆菌飼育群のI_N=0.86、I_D=0 (p<0.01)となった(表2)。また、移動した方向だけでなく、移動距離で重み付けした「移動得点」は図2となり、納豆菌で育てた線虫も、大腸菌で育てた線虫も餌を記憶し、飼育に用いた餌の方向に移動することが分かり、仮説は支持された。

しかし、寒天は水分で出来ており、大腸菌や納豆菌から出た液体物質は寒天内を拡散する。そのため、気体としての「匂い」を線虫が受容し反応したのか、液体としての「化学物質」を受容し反応したのかを断定することはこの実験からは難しい。そこで、「気体」か「液体」かを調べ、線虫の化学物質受容のしくみ、記憶のメカニズムを調べたいと思った。

表1 90分経過後の各シャーレの移動指数とその平均

移動指数	大腸菌飼育群				納豆菌飼育群			
	①	②	③	平均	①	②	③	平均
I _D	0.8	0.6	0.3	0.59	0.0	0.0	0.0	0.00
I _N	0.0	0.0	0.0	0.00	0.4	0.9	0.9	0.72
	p<0.05				p<0.05			



実験2 「線虫はにおいを気体と液体どちらで感じるか」

「仮説」仮説1: 線虫は匂いを気体として受容する
⇒実験1(プラスチックなし)と同様の移動指数を示す。
仮説2: 線虫は匂いを寒天に溶けた物質の濃度勾配で受容する
⇒特定の細菌への走性を示さず、移動指数は0.5以下

「方法」

- 餌が寒天に浸透しないようプラスチックで仕切る。
- プラスチック上に大腸菌と納豆菌を置く。
- 実験1同様の処理後、線虫を中央に滴下し計測する。

「結果と考察」

寒天に餌が触れない「気体」の移動指数が、大腸菌飼育群でI_D=0.60、納豆菌飼育群でI_N=0.56、半数以上が条件付けられた餌に向かい、条件付けられていない餌への移動指数は、全実験群・時間帯ともI_D=0、I_N=0だった。また、表3-Eより寒天の穴に直接餌を滴下した「液体」との間にも有意差がみられなかった。これらのことから、仮説1「線虫は餌のにおいを気体として受容する」が支持された。

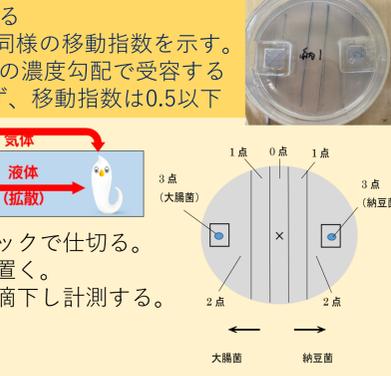


図3 寒天への拡散の有無による移動指数比較

表2-a 150分経過後の大腸菌飼育群の移動指数

	④	⑤	⑥	⑦	平均
I _D	0.87	1.00	0.64	0.49	0.75
I _N	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	P<0.01				

表2-b 150分経過後の納豆菌飼育群の移動指数

	④	⑤	⑥	⑦	平均
I _D	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
I _N	0.94	0.85	0.90	0.73	0.86
	P<0.01				

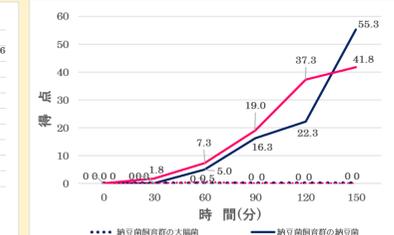
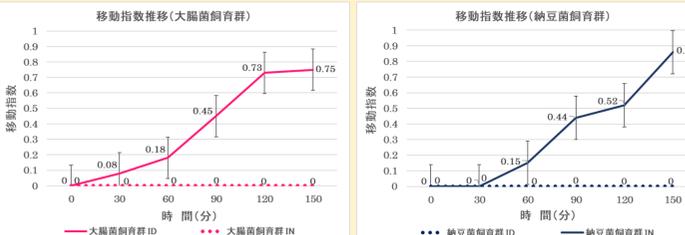


図1 0~150分の時間毎の移動指数推移

図2 時間経過に伴う移動得点の推移

表3 餌の伝わり方による比較(120分後)

A【気体】大腸菌飼育群					
	①	②	③	④	平均
I _D	0.93	0.54	0.57	0.35	0.60
I _N	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	0.01<p<0.05				
B【液体】大腸菌飼育群					
	④	⑤	⑥	⑦	平均
I _D	0.87	0.92	0.64	0.49	0.73
I _N	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	P<0.01				
C【気体】納豆菌飼育群					
	①	②	③	④	平均
I _D	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
I _N	0.33	0.95	0.66	0.31	0.56
	0.01<p<0.05				
D【液体】納豆菌飼育群					
	④	⑤	⑥	⑦	平均
I _D	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
I _N	0.42	0.60	0.60	0.45	0.52
	P<0.01				

E 伝わり方×飼育時の餌の移動指数比較

	大腸菌飼育群		納豆菌飼育群	
	I _D	I _N	I _D	I _N
気体(実験2)	0.60	0.00	0.00	0.56
液体(実験1)	0.73	0.00	0.00	0.52
有意差	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05

※ 移動指数は各飼育群の移動指数の平均で算出

研究2 「餌が無くなると記憶はなくなるのか」

「目的」線虫の餌に対する記憶は、長期間保持されるのか。それとも、ヒトの短期記憶同様、餌の摂取が中断されると忘れるのだろうか。餌が無い環境に置かれると餌の記憶がどう変化するかを、餌に対する走性を調べることで確認する

「仮説」仮説1: 記憶を保持 ⇒ 飼育時の餌にのみ移動し、負の化学走性を示す個体の存在なし
仮説2: 飢餓状態では忘却が生じる ⇒ 化学走性に傾向が見られず、負の走性個体が増加
仮説3: 飢餓状態による忌避行動が生じる ⇒ 負の化学走性を示す個体が半数以上存在

「方法」1. 大腸菌/納豆菌それぞれから線虫を洗い流し、遠心分離で集め餌なしシャーレに植え替えて1日以上飢餓条件下に置く。
2. 研究1同様の操作で線虫を集め、実験シャーレの中央に滴下し計測する。

「結果と考察」大腸菌・納豆菌それぞれの餌で飼育した線虫を、1日・7日・12日餌なし寒天で培養した。その後、どちらの餌に移動するか調べたところ、移動した線虫は全て飼育時の餌に移動し(表4)、飢餓の有無での移動指数に差はなく(図4)、仮説1「記憶の保持」が支持された。したがって、単に飢餓状態に置くだけでは、特定の温度、特定の塩分濃度等への条件付けとは異なり、先行研究に見られた忌避行動は起きず、また、12日間の飢餓でも餌の記憶は保持された。

表4 飢餓の有無による移動指数比較

移動指数	1日(180分)			7日(120分)			12日(120分)		
	①	②	③	①	②	③	①	②	③
大腸菌飼育群	0.80	0.75	0.50	0.61	0.77	1.00	0.60	0.60	0.75
納豆菌飼育群	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
合計	287/4 (I _D =0.64)	223/1 (I _D =0.71)	16/29 (I _D =0.55)	66/104 (I _D =0.63)					

C 飢餓の有無での比較

	大腸菌飼育群		納豆菌飼育群	
	大腸菌移動指数	納豆菌移動指数	大腸菌移動指数	納豆菌移動指数
飢餓あり	0.62	0.00	0.00	0.78
飢餓なし	0.69	0.00	0.00	0.88



図4 飢餓の有無による移動指数比較

研究3 「餌の記憶は遺伝するのか」

「目的」研究1の実験過程の遠心分離等で、幼虫の孵化が確認された。生まれた時点では、食餌経験はない。しかし、その幼虫は、親が記憶した餌の方向に移動した。そこで、餌の記憶が子に受け継がれるのかを確認することにした。

「仮説」仮説1: 子に親の餌記憶が伝わる ⇒ 各餌への移動係数に差が生じる; I_D ≠ I_N
仮説2: 子に親の餌記憶が伝わらない ⇒ 各餌への移動係数が差なし; I_D = I_N

「方法」1. 大腸菌と納豆菌それぞれで飼育した線虫の孵化直後の幼虫を餌なし寒天に移す。
2. 洗い流して遠心分離し、実験用寒天の中央に滴下して移動位置を計測する。

「結果と考察」実験操作過程で孵化した食餌経験のない幼虫を、餌なし培地で培養し、1日後に走性を確認すると全て親の食べた餌側に移動した。しかし、個体数が少なかったため再実験を繰り返して移動指数を増やし移動指数を算出した(表5)。その結果、全て親が食餌した餌へ向かい、食餌経験のない子世代も親世代と同じ記憶を持つことが分かった(図5)。

表5 親世代(餌条件付け)と子世代(未食餌)の移動指数比較

移動指数	1日(180分)			7日(120分)			12日(120分)		
	①	②	③	①	②	③	①	②	③
大腸菌飼育群	0.50	1.00	1.00	0.50	1.00	1.00	0.50	1.00	1.00
納豆菌飼育群	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

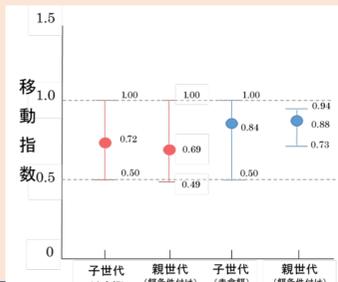


図5 条件付け世代と未条件付け世代の移動指数比較

まとめ

大腸菌と納豆菌それぞれで飼育されていた線虫が、100%飼育時の餌に移動したこと、また、線虫の嗅覚だけでなく、その記憶力にも驚かされた。さらに、餌を食べたことがない子世代に餌の記憶が伝わったことから、記憶や情報伝達のしくみにさらに興味が湧いた。

今後の予定

事前に練習を繰り返し、様々な実験操作の習得を行ったが、植え替えでの線虫捕獲や計測には予想以上に時間がかかった。今後さらに、先生や先輩にコツを教えてください、研究を深めたい。また、今回できなかった条件付けに対する忌避反応の確認を、大腸菌培養に使うLB培地を使って調べたい。さらに、線虫の遺伝や神経系について研究を進め、記憶と忘却のメカニズムを調べ、認知症の解明に繋げていきたい。

謝辞

土浦日本大学中等教育学校の宇佐神 潔先生より、本研究の取りまとめにおいてご指導を頂きました。ありがとうございました。

参考文献

- 森郁恵, 大島靖美, 1993, 「線虫は学習・記憶をするか?」 化学と生物Vol.31, No.7, 1993
- 飯野雄一, Lifang WANG, 2017, 「A gustatory neural circuit of Caenorhabditis elegans generates memory-dependent behaviors in Na+ Chemotaxis (いい思いをたどって濃い味に—線虫の味覚記憶の発見とその神経回路の解明—)」 DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1774-16.2017> 論文URL: <https://www.jneurosci.org/content/37/8/2097>
- 森郁恵 線虫の記憶と行動を追い求める <https://www.terumozaidan.or.jp/labo/interview/20/04.html>
- 「飢餓を学習・回避する機構発見」 2019年9月6日 東大新聞オンライン <https://www.todaihsibun.org/starvation20190906/#>
- 広津崇亮, 2016 「線虫を用いて明らかにするにおいの濃度によって嗜好性が変化する仕組み」 におい・かおり環境学会誌 Vol.47 No.1
- 富岡征大 線虫Caenorhabditis elegans の感覚応答と学習を制御する機構 比較生理生化学 Vol.28.No.2 (2011)
- 理化学研究所 ストレス耐性は親から子へ継承される https://www.riken.jp/press/2020/20200311_1/index.html