

プラナリアの移植と学習した記憶の継承

浜松市立高等学校
自然科学部 2 年 丸山暖奈 他 3 名

1 動機

本校の先行研究である「プラナリアの移植による記憶の継承(2020)」では、ある個体に光を用いて学習させた後に、学習していない別個体と移植を行った。その際、接合した個体に記憶が継承されることが明らかにされている。この先行研究では、移植にクローン同士の個体のみを用いている。

そこで私たちは、移植にクローンでない個体を用いた際、記憶が継承されるのかに興味を持った。そのため、本校の先行研究を参考にして考えた学習・移植実験の新たな方法を用いて、クローンでない個体同士の移植や記憶の継承が可能かを検証する。また、実験を通して記憶の継承がどのように行われたかを明らかにしたいと考えた。

2 仮説

「プラナリアの再生時における位置情報と記憶の継承実験 4 (2015)」で、「記憶は脳ではなく、幹細胞一つ一つに残っていて、再生したクローンに記憶は継承される」と示されている。この記憶とは学習した記憶である。幹細胞は体中に散在していて、すべての細胞に分化できる仕組みを持つ。そのため、私たちはクローン同士でなくても移植が可能である場合、移植が成功した際に幹細胞が神経細胞に分化するのではないかと考えた。学習記憶を持つ幹細胞が、脳に繋がる神経細胞の一部となることによって、脳に学習記憶が伝わる。そして、学習させた個体由来の部位から学習していない個体由来の部位に記憶を継承することが可能になると考えた。

3 研究方法

プラナリアの採集場所

浜松市東区半田町染地川付近の、比較的水がきれいな用水路で採集した(写真 1・2)。

プラナリアの飼育環境

17℃に設定した定温器の中で飼育した。



写真 1. 採集場所



写真 2. 採集の様子

(1) 【実験1】光を利用した学習

使用した器具：段ボールで作成した暗室(写真3・4)、Φ90mmのシャーレ、駒込ピペット
ピンセット、照度計(TOPCON デジタル照度計 IM-3)、温度計

使用した光源：スマートフォン(iPhone 12 mini、OPPO Reno5 A)のLEDライト



写真3. 実験に使用した暗室



写真4. 暗室の中の様子

ア 負の光走性の確認

暗室に光源を置き、プラナリアに当たる光の強さが40 lxとなるようにする。その後、3.5mLの水を入れたシャーレにプラナリアを一匹入れる。そのシャーレを暗室に入れ、プラナリアの進行方向に光が当たるようにシャーレを移動させる。プラナリアが光の手前で方向転換をして光を避けるか確認する。負の光走性が確認できた個体は2分間暗室に放置し、その後の実験に用いる。負の光走性が確認できなかった個体は実験を終了し、2週間以上経過してから再度負の光走性を確認する。

イ 学習実験

(ア) 学習

プラナリアが一匹入っているシャーレに小さく切った餌(鶏レバー)を追加する。そのシャーレを暗室に入れ、プラナリアが直径1.4cmの光の輪の中心にある餌に近づくか確認する。この時プラナリアが餌に近づくまでの時間を学習時間として計測する(計測時間は1分30秒とする)。この間、常にプラナリアの進行方向と光の輪の中心にある餌が重なっている状態があるようにする。学習が終わった個体は餌の入っていない別のシャーレに移動させ、暗室に5分間放置する。

(イ) 学習の確認

プラナリアの進行方向に光が当たる状態にする。プラナリアが光の輪の中を通過するか確認する実験を5回行う。光の輪の中を半分以上通過した回数が5回中3回以上だった個体を「学習確認個体」とする。それぞれの実験に制限時間は設けず、各実験の間のインターバルは30秒とする。翌日に学習達成の確認を行う。

ウ 学習達成の確認

学習確認の翌日に、イ-(イ)と同様の実験を行う。プラナリアの進行方向に光が当たる状態を作り、プラナリアが光の輪の中を通過するか確認する実験を5回行う。光の輪の中を半分以上通過した回数が5回中3回以上だった個体を「学習達成個体」とする。それぞれの実験に制限時間は設けず、各実験の間のインターバルは30秒とする。

(2) 【実験2】学習達成したプラナリアを移植する実験

使用した器具：Φ90 mmのシャーレ、スライドガラス、キムワイプ、ラップ、駒込ピペット
マイクロピペット、メス、ピンセット

使用した薬品：21%エタノール

テトラコントラコロラインでカルキ抜きした水道水(以下、水と称す)

用いるプラナリア：学習達成個体と、学習していない個体を各一匹

ア 麻酔

(ア) 学習達成個体と学習していない個体の両個体を一枚のスライドガラスの上に置く。

(イ) それぞれにマイクロピペットで21%エタノールを10μL かける。

イ 切断

(ア) 学習達成個体と学習していない個体のどちらも動かなくなったら、それぞれに駒込ピペットで水を一滴垂らし、ア-(イ)でかけた21%エタノールを洗い流す。

(イ) スライドガラス上の水をキムワイプで拭き取る。この時、プラナリアの周囲にわずかな水分を残す。

(ウ) 学習達成個体と学習していない個体の両個体を、メスで頭部・咽頭部・尾部にわけて切断する(写真5)。移植では頭部と尾部のみ使用する。

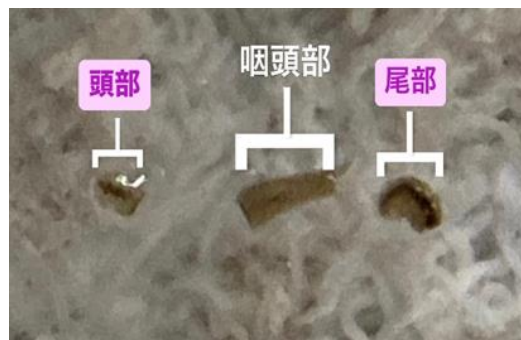


写真5. 切断部位の名称

ウ 移植

(ア) 学習達成個体の頭部の切断面を学習していない個体の尾部の切断面に、もしくは学習達成個体の尾部の切断面を学習していない個体の頭部の切断面に密着させる(写真6)。

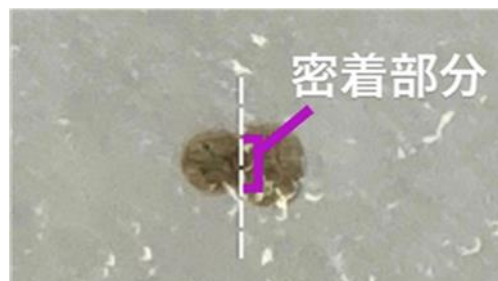


写真6. 切断面を密着させた様子

(イ) スライドガラスの周りを両手で5分程度ドーム状に覆う。

(ウ) スライドガラスを濡らしたキムワイプで包む。それをシャーレに入れ、スライドガラスの全体が沈むまで駒込ピペットで水を入れる。また、乾燥を防ぐためシャーレをラップで覆う。

(エ) シャーレを定温器の中に入れて1日静置する。

エ 移植した個体の確認

移植をした翌日にプラナリアの状態を確認する。頭部と尾部が一部でも接合していた場合、移植が成功したと判断する。移植が成功した日以降プラナリアの状態の観察を続け、移植した部分全体が接合していた場合、学習継承確認を行う。

(3) 【実験3】移植が成功した個体の学習継承確認

条件は【実験1】アと同様で、プラナリアにあたる光の強さは40 lxになるようにする。次に、3.5mLの水を入れたシャーレにプラナリアを入れた後、それを暗室に入れる。方法は【実験1】イ-(イ)と同様で、プラナリアの進行方向に光がある状態をつくり、プラナリアが光の輪の中を通過するか確認する。光の輪の中を半分以上通過した回数が5回中3回以上だった個体を「学習継承個体」とする。

4 結果

(1) 【実験1】光を利用した学習

本校の先行研究では学習と学習確認を行った同日に、学習達成確認として学習同様の実験を行った。そして、学習達成確認で餌を食べた個体を学習達成個体としていた。しかし、私たちの実験では学習確認と学習達成確認を連続した2日で行い、それぞれ5回ずつ実験を行った。また、学習達成確認に餌は使用しなかった。このように実験の回数を増やし、餌のない状態でも光の輪の中を通過する個体を学習達成個体とすることによって、確実に学習した個体を見つけることができた。89個体を用いて負の光走性を確認し、60個体(67%)で負の光走性が確認できた。負の光走性が確認できた60個体のうち、学習確認個体は32個体(36%)であった。学習確認個体32個体のうち、学習達成個体は25個体(28%)であった(表1)。

表1. 学習実験結果(個体)

実験 個 体 数	89	負の光走性の 確認○	60	学習確認 個体	32	学習達成 個体	25
						非学習達成 個体	7
		負の光走性の 確認×	29	非学習確認 個体	28		

学習実験の際に、十分な絶食期間を設けていない個体は、あまり餌に近づかなかったため、学習実験を行う前に2週間程度の絶食期間が必要であった。また、夏の間はシャーレの中の水温が上がり、プラナリアの動きが鈍くなった。そのため、シャーレの中に入れる水をあらかじめ冷やしておき、温度を調整した。実験に適した水温は16℃以上20℃以下であった。学習時間と学習確認・学習達成の結果との間には、相関関係は見られなかった。

(2) 【実験2】学習達成したプラナリアを移植する実験

学習達成個体24個体(※1)と学習していない個体を用意し、39回(※2)移植を行った。その内、2回移植に成功した。成功した2回の組み合わせは、学習達成個体の尾部と学習していない個体の頭部の組み合わせであった(表2)。

表 2. 移植結果(回)

学習達成個体 学習していない個体	頭部	尾部
	頭部	成功数 2 実験数 19
尾部	成功数 0 実験数 20	

注：学習していない個体は、表 1 の非学習確認個体と非学習達成個体である。

- ※ 1 学習達成個体は 25 個体であったが、【実験 2】ウの手順に入るまでにプラナリアが死んだため、移植に用いた個体は 24 個体である。
- ※ 2 学習達成個体の頭部と尾部を移植実験に用いるため、学習達成個体 1 個体につき、実験数は 2 回と数える。そのため、実験数は $24 \times 2 = 48$ 回となる。しかし、【実験 2】ウの手順に入るまでにプラナリアが死んだため、実験数は $48 - 9 = 39$ 回となる。

2 回目に移植が成功した個体は、頭部が白色で尾部が黒色だった(写真 7)。移植成功直後はそれぞれの切断面の一部のみが接合された不安定な状態であった。そのとき頭部は動いていたが尾部は全く動かず、移動の際には頭部に引っ張られている状態であった。移植から 8 日目には広範囲の切断面同士が接合し、尾部も伸縮するように動いていた。さらに 1 週間後には、黒色だった尾部は頭部と同じ白色に変化していた(写真 8)。



写真 7. 移植成功直後



写真 8. 移植成功から 15 日後

(3) 【実験 3】移植が成功した個体の学習継承確認

移植が成功した 2 個体で学習継承確認を行った。成功率はそれぞれ 80% と 100% であった。このことから、2 個体とも移植する前に行った学習が継承されていることが確認できた(表 3)。

表 3. 移植と学習継承確認結果

一例目

	個体番号	実験 1		実験 2	実験 3		
		学習日	学習達成日	移植日	学習継承確認日	成功率(%)	結果(○/×)
頭部	B6	2022.8.1	2022.8.2	2022.8.3	2022.8.8	80	○
尾部	B21						

二例目

	個体番号	実験 1		実験 2	実験 3		
		学習日	学習達成日	移植日	学習継承確認日	成功率(%)	結果(○/×)
頭部	B20	2022.8.17	2022.8.18	2022.8.23	2022.8.26	100	○
尾部	B7						

5 考察

プラナリアの切断がうまくいかなかった場合、プラナリアの体から消化酵素が出る。それによってプラナリア自身が溶けてしまうことを防ぐため、絶食期間が必要だった。様々な絶食期間を試したが、学習確認を行ってから 1 週間程度が望ましい。

プラナリアは麻酔をかけても切断後、すぐに動き始めてしまう。そのため、切断面同士を密着させた直後から、実験者がスライドガラスを手で覆う。プラナリアが活発に動くことを抑制することで、一部が接合するまで密着状態を保つことができた。

本校の先行研究では移植にクローンを用いていた。そのため、プラナリアが再生するまで待つ必要があり、実験を行うまでに長い期間が必要だった。また、小さい状態で実験を行わなければならないことも多く、移植の切断・密着の作業が行いにくかった。しかし、私たちは別個体で移植を行ったため、プラナリアの再生を待つ必要がなく、移植に適した大きさに実験を行うことができた。

学習時間の計測ではプラナリアと餌の距離を定めていなかったため、学習時間と学習確認・学習達成の結果の間にある関係を見つけることが出来なかった。今後、計測方法を検討し、どのような関係があるのか明らかにしたい。

今回、頭部と尾部を接合すると咽頭部が移植後に再生した。これは、移植後の個体の位置情報が再編成されたことによると考えた。

移植が成功した場合、切断がうまくいかなかったときと同様に、切断後プラナリアから体液が出てきた。しかし、プラナリア自身が溶けることはなかったため、これは消化酵素でないと考えた。その体液は、頭部と尾部の切断面を密着させる際に接着剤のような役割を担っているように見えた。そこで私たちは、これに細胞接着に関わる細胞外基質(コラーゲン等)が含まれており、別個体の頭部と尾部の切断面同士の接合には細胞と細胞外基質の接着が関与しているのではないかと考えた。また、切断面同士を密着させた後で接合したことから、細胞接着分子であるカドヘリンも関与しているのではないかと考えた。

先行研究「細胞接着分子カドヘリンから体づくりの謎に迫る(2002)」で、シナプス形成にカドヘリンが関与していることが明らかになりつつある。このことから、カドヘリンの働きによってプラナリアの頭部と尾部の神経同士が結合したのではないかと考えた。

プラナリアを切断した際、神経細胞も切断される。その時、頭部と尾部それぞれで幹細胞が神経細胞に分化する。頭部では、幹細胞が分化してできた神経細胞が、元々構成されていた神経細胞とシナプス形成によって繋がる。尾部でも同様のことが起きる。そして移植後、頭部と尾部の神経同士がシナプス形成により繋がって、学習した記憶が脳に伝わると考えた。私たちは記憶が元々構成されている神経細胞(末梢神経)ではなく、脳(中枢神経)や幹細胞にあると考える。頭部と尾部の神経同士が繋

がった際、尾部には記憶を持つ幹細胞が分化してできた神経細胞が存在する。そのため、移植が成功し頭部と尾部の神経が繋がると、記憶を持つ尾部の幹細胞が分化してできた神経細胞から、学習していない個体の学習記憶を持たない脳へと学習記憶が伝わったと考えた。

本校の先行研究では、移植が成功したプラナリアは学習記憶を7日間のみ継承したとある。このことから、幹細胞から分化した神経細胞には、7日間記憶があると推測される。

6 結論

私たちは、学習・移植実験においてそれぞれの実験に適した絶食期間や水温、麻酔の量を見つけて実験を行い、学習達成個体の尾部と学習していない別個体の頭部の移植に成功した。

別個体同士の移植には、切断後にプラナリアから出る細胞外基質を含んだ体液が関与する。細胞と細胞外基質の接着に加え、細胞接着分子であるカドヘリンも関与していると考えた。

切断の際に頭部と尾部ではそれぞれ幹細胞が神経細胞に分化し、それが元々構成されていた神経細胞とカドヘリンからなるシナプス形成によって繋がる。その後、頭部と尾部の神経同士がカドヘリンからなるシナプス形成によって繋がった。そのため、尾部の持つ学習記憶が脳に伝わったと考えた。これらのことから、カドヘリンは今回の実験において、大きな役割を担っていると考えた。今後、さらに幹細胞や神経、カドヘリンに焦点を当てて実験を行い、記憶の継承方法についてより具体的に解明していきたい。

7 参考文献

- ・阿形清和,「Experiment プラナリアの脳は何を語るのか」
姫路工業大学理学部生命科学科助教授・BRC JT 生命誌研究館, 1999
- ・石原侑里子,「プラナリアの再生時における位置情報と記憶の継承実験4」
平成27年度千葉県児童生徒・教職員科学作品展 優良賞, 2015
- ・梶原大輝・大石裕太・藤城大,「プラナリアの移植による記憶の継承」
令和2年度浜松市立高等学校自然科学部 第37回(2020年度)山崎賞受賞
- ・竹市雅敏,「細胞接着分子カドヘリンから体づくりの謎に迫る」
神戸研究所 発生・再生科学総合研究センター 高次構造形成研究グループ
グループディレクター, 2002
- ・富樫英,「神経細胞における接着分子の多様な働き 細胞接着分子によるシナプス形成と神経突起間認識の分子機構」,
神戸大学大学院 医学研究科 生化学・分子生物学講座 分子細胞生物学分野, 2013
- ・吉里勝利・阿形清和・倉谷滋・鏑田武志・三村徹郎・村岡裕由,
「九訂版スクエア 最新図説生物 neo」(p 27, 179, 187), 第一学習社, 2021
- ・吉里勝利,「高等学校 改訂 生物」(p 278, 279, 285), 第一学習社, 2022