



アメフラシニューロンのスパイク活動の検出へのカルシウムイメージング法の適用、およびこの方法を用いた摂食神経回路ニューロン群の探索

吉田, 竜介

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2002-03-31

(Date of Publication)

2009-06-16

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2582

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002582>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士学位論文

アメフラシニューロンのスパイク活動の検出へのカルシウム

イメージング法の適用、およびこの方法を用いた

摂食神経回路網ニューロン群の探索

神戸大学自然科学研究科生命科学専攻

吉田 竜介

2002年3月

謝辞

本研究を行うにあたり、大変多くのご助言と懇切丁寧なご指導をして頂きました長濱辰文助教授に心から感謝し、厚く御礼申し上げます。また、本論文の審査を快く引き受けて下さいました土屋禎三教授、尼川大作教授、竹田真木生教授に厚く御礼申し上げます。

新井秀和様、成末憲治様をはじめとする研究室の皆様には、様々な面で大変お世話になり、ここに感謝の意を表します。

最後に、あらゆる面で私を支えて下さいました、家族、友人の皆様には感謝し、厚く御礼申し上げます。

Ryusuke Yoshida

吉田 竜介

2002年3月

目次

第1章.....	1
序論.....	2
1. 本研究の目的.....	2
2. カルシウムイメージング法.....	3
3. アメフラシ口球神経節内の摂食神経回路網.....	5
4. ニューロン活動に伴う細胞内カルシウムイオン濃度増加の機構.....	6
略語.....	8
実験方法.....	9
実験動物.....	9
測定用試料の作成.....	9
色素の導入法.....	9
レーザー顕微鏡 (LSM) を用いたカルシウムイメージング.....	12
ステージ固定型落射蛍光顕微鏡 (EFM) を用いたカルシウムイメージング.....	13
試薬と溶液.....	14
結果.....	16
1. 様々な方法によるカルシウム感受性色素の アメフラシニューロンへの導入効率.....	16
2. アメフラシニューロンのスパイク発生に伴う蛍光強度変化.....	18
3. スパイク発火に伴う蛍光強度変化の測定部位依存性.....	19
4. ニューロンのスパイク活動に伴う蛍光強度変化の定量的解析.....	20
5. 複数ニューロンにおける蛍光強度変化の 同時記録による発火パターンへの差の検出.....	23
6. ニューロンのスパイク活動に伴う 細胞内カルシウムイオン濃度増加のメカニズム.....	24
考察.....	28
1. アメフラシニューロン活動観察へのカルシウムイメージング法の適用.....	28
2. 測定部位による蛍光強度変化の差違.....	30
3. ニューロンのスパイク活動とそれに伴う蛍光強度変化との関係.....	31
4. スパイク活動に伴う細胞内カルシウムイオン濃度増加のメカニズム.....	33
5. まとめ.....	35
第2章.....	36
序論.....	37
1. 本研究の目的.....	37
2. アメフラシの神経節.....	38

3. アメフラシ摂食行動とそれに関与する神経機構.....	39
略語.....	41
実験方法.....	42
実験動物.....	42
測定用試料の作成.....	42
カルシウムイメージング.....	43
電気生理学的実験.....	43
溶液.....	44
結果.....	46
1. 脳神経節内ニューロンの海藻味刺激に対する応答.....	46
2. 海藻味刺激に対するGクラスターニューロンの応答.....	47
3. 海藻味刺激に対するGクラスター周辺領域ニューロンの応答.....	49
4. 前触角を動かす運動ニューロンの同定.....	51
5. 口唇を開閉させる運動ニューロンの同定.....	52
考察.....	55
1. カルシウムイメージング法を用いたニューロンの探索.....	55
2. 海藻味刺激により生じる脳神経節内ニューロンの活動.....	56
3. 前触角短縮運動ニューロン、 開口新運動ニューロンと閉口唇運動ニューロン.....	58
4. まとめ.....	60
引用文献.....	62
図.....	79

第1章

カルシウムイメージング法による
アメフラシニューロンでのスパイク活動の検出

序論

1. 本研究の目的

海産の軟体動物、アメフラシ (*Aplysia*) は神経生理学の分野で良く用いられる実験動物の1つである (Kandel, 1976)。この動物を用い、これまで様々な行動に関わる神経回路 (Chiel et al., 1986; Cleary and Byrne, 1993; Frost and Kandel, 1995; Nagahama and Takata, 1989, 1990a; Plummer and Kirk, 1990; Rosen et al., 1991, 2000; Xin et al., 1996)、記憶、学習に関わる行動実験 (Carew et al., 1972; Lechner et al., 2000a; Matsumoto and Nagahama, 2000; Susswein et al., 1986)、またそれらに関わる細胞機構 (Byrne and Kandel, 1996; Lechner et al., 2000b; Mothet et al., 1996; Schaffhausen et al., 2001) など、数多くの研究がなされてきた。アメフラシでは、中枢神経系を形成するニューロンの数が比較的少なく ($10^3\sim 10^5$ 個)、個々の細胞体が大きいこと (20~200 μm) からニューロンレベルの電気生理学的実験を行うことが容易であり、行動に関わる神経機構を細胞レベルから個体レベルに至るまで一貫して研究することが可能である。

アメフラシを含めた無脊椎動物や脊椎動物において、ニューロンの活動は細胞の電位変化として捉えることができ、この電気的变化は、細胞外電極による記録、ガラス微小電極を用いた細胞内記録法 (Hodgkin and Huxley, 1939)、パッチクランプ法 (Neher et al., 1978)、及びこれらを改良した様々な技術により記録されてきた。これらの方法では、個々のニューロンの活動や、ある一定集団のニューロン活動の総和などを詳しく観察することができる。しかし、多くのニューロンから同時に活動を記録し、それらの活動パターンを解析することや、ニューロン集団の中から興味ある活動を示すニューロンを特定化するという実験には不向きであった。

そこで、私は先述した問題点を克服し、アメフラシニューロンの活動を記録する新たな手法を導入することを目的として本実験を行った。多数のニューロン活動を同時に観察する有力な手法の1つとしてイメージングという手法がある。例えば、アメフラシでは電位感受性色素を用い、腹部神経節内の多数ニューロンの活動を同時に記録した報告がある (Wu et al., 1994)。しかし電位感受

性色素を用いる場合、色素の毒性や褪色、S-N 比の悪さなどの問題が多い。カルシウム感受性色素を用いたカルシウムイメージング法ではこのような問題はかなり回避できる。これまでの研究によりアメフラシの Bursting ニューロン、神経分泌細胞、感覚ニューロン等で、これらのニューロンのスパイク発火により細胞内カルシウムイオン濃度が増加することが知られていることから (Blumenfeld et al., 1990; Gorman and Thomas, 1978; Knox et al., 1996; Stinnakre and Tauc, 1973)、間接的にはあるがカルシウムイメージング法を用い、容易に多数ニューロンの記録ができるのではないかと考えた。本研究では、カルシウムイメージング法を一般的なアメフラシニューロンに適用するために様々な色素導入法を試み、どの方法が最も効率的であるのかを比較、検討した。また、色素負荷されたニューロンがその活動により蛍光強度を変化させるかについて調査した。次に、カルシウムイメージング法によりとらえられる蛍光強度変化とニューロンのスパイク活動との関係を明らかにすることを目的とし、蛍光強度変化とスパイク発火頻度、又はスパイク発火期間との関係を定量的に検証した。また、全てのニューロンにおいてスパイク活動の検出にカルシウムイメージング法を用いることができるのかを検討するため、スパイク活動に伴う細胞内カルシウムイオン濃度増加のメカニズムについて調査した。

2. カルシウムイメージング法

カルシウムイメージング法は、カルシウム感受性色素を細胞内に導入し、細胞内カルシウムイオン濃度の増減により生じる蛍光強度変化を CCD カメラなどの記録装置を用い映像としてとらえる方法である。この様にして得られた映像を解析することで、細胞内カルシウムイオン濃度変化を高解像度の時空間軸上で分析することができる。この方法は、最近の画像取得及び解析装置の急速な進歩により非常によく利用されるようになってきた手法の1つであり、これからもその測定機器の能力向上と共にますます強力な実験手法になるのではないかと予想される。この手法は、様々な動物においてカルシウムイオンが関与する現象、例えばシナプス前末端における伝達物質の放出 (Dowdall et al., 1997; Edmonds et al. 1990; Eliot et al., 1993)、シナプス後細胞における受容体の機能

(Kyrozis et al., 1995; Regehr and Tank, 1992; Spruston et al., 1995; Svoboda et al., 1997; Yuste and Denk 1995)、神経分泌 (Jonas et al., 1997)、細胞内カルシウムストアからのカルシウム放出 (Friel and Tsien, 1992; Jonas et al., 1997) などを研究するために用いられてきた。神経細胞では、その活動に伴いカルシウムイオン濃度が増加することが知られており、事実幾つかの動物では、実際にこれを用いてニューロンの活動を検出できることが知られている (Fetcho and O'Malley, 1995; Lev-Tov and O'Donovan, 1995; McClellan et al., 1994; O'Donovan et al., 1993; O'Malley et al., 1996)。電位感受性色素を用いたイメージングでは電位変化を可視化しているため、とらえられた蛍光強度変化はニューロン活動そのものを示しているといえる。しかしカルシウムイメージング法は、細胞内カルシウムイオン濃度変化を直接可視化する方法であるため、ニューロン活動の実態である電位変化を直接観察できない。カルシウムイメージング法をニューロンのスパイク活動の測定に利用するためには、スパイク活動により細胞内カルシウムイオン濃度変化が常に生じており、それらはお互いに関連していることを明らかにする必要があった。

本研究では、その初期にはレーザー顕微鏡と画像解析装置を組み合わせた機器を、後期にはステージ固定式蛍光顕微鏡、冷却 CCD カメラと画像解析装置を組み合わせた機器を利用した。前者は空間分解能に優れているが時間分解能はかなり劣る。後者はやや空間分解能に劣るが時間分解能は圧倒的に優れている。最近ではこの両方の特性を満たすような機器 (nipkow disk 回転方式共焦点顕微鏡: CSU10, Yokogawa) も市販され、用いられるようになってきている。

カルシウムイメージング法では、用いるカルシウム感受性色素の選択が重要である。カルシウム感受性色素は、現在非常に多くの種類が利用できる (Haugland, 2001)。その性質により、ratiometric 色素と non-ratiometric 色素に大別され、蛍光スペクトル、カルシウム感受性等の違いにより多種類の色素が存在する。これら化学合成により製造される色素とは異なり、遺伝子によりコードされるカルシウム感受性蛍光タンパク質、カメレオン (cameleon) が開発され、これも近年用いられるようになってきている (Kerr et al., 2000; Miyawaki et al., 1997)。ratiometric 色素は蛍光強度の比を取りカルシウムイオン濃度を計算できるタイプの色素で、2 波長励起 1 波長蛍光測光の Fura-2、1 波長励起 2 波長蛍光測光

の Indo-1 等がある。non-ratiometric 色素はカルシウムイオン濃度の増減を見ることはできるが、カルシウムイオン濃度を計算することができない色素で fluo-3、Calcium Green-1 等がある。特徴の異なる non-ratiometric 色素を 2 種類組み合わせレシオ測定を行い、カルシウムイオン濃度を計算することもできる (Chen et al., 1998; Schild et al., 1994)。本研究では最も容易に用いることのできる non-ratiometric 色素である Calcium Green-1 を色素として用いた。

カルシウム感受性色素はその染色手法により、アセトキシメチルタイプ、デキストランタイプ、塩タイプのいずれかを用いることになる。アセトキシメチルタイプの色素は、カルシウム感受性色素にアセトキシメチル基をエステル結合させることにより脂溶性になっており、細胞膜を通過できる。細胞内ではエステラーゼ活性によりアセトキシメチル基が切り離され、通常のカルシウム感受性色素に戻り、これは細胞膜を通過できないため細胞内に保持される。このタイプの色素を用いると細胞外溶液に色素を加えておくだけで容易に多数の細胞を染色できる。デキストランタイプの色素は、色素にデキストラン分子を結合させ、細胞内コンパートメントへの吸着極在化の影響を小さくした色素である。この色素は主に逆行的染色法のときに用いられている。また、細胞内へ色素を直接注入するインジェクション法の場合に利用されることもある (Fetcho and O'Malley, 1995)。塩タイプの色素は水溶性の色素で、主に細胞内へ直接色素を注入するインジェクション法のときに用いられる。本研究ではアメフラシニューロンへの色素の負荷について、それぞれの方法を試し、どの方法が最も有効であるのかを比較、検討した。

3. アメフラシ口球神経節内の摂食神経回路網

動物の神経系において、個々のニューロンは多数のニューロンと興奮性、又は抑制性シナプスを介し結合し、全体として非常に複雑なネットワークを形成している。この様にして形成される神経回路網を把握することは、動物の行動がどのようにして生じるかを理解するために非常に重要である。哺乳類の脳内には億を超えるニューロンが存在するため、それらの結合様式を個々のニューロンレベルで解明し神経回路網を明らかにすることは非常に難しい。それに比

較し、アメフラシのような下等な生物では、神経系のニューロンの数はかなり少なく、その回路網の把握は容易になる。事実、アメフラシやヨーロッパモノアラガイ (*Limnaea stagnalis*) では、CPG (central pattern generator) 回路網を含む摂食神経回路網がよく研究されている (Hurwitz et al., 1994, 1997; Plummer and Kirk 1990; Rose and Benjamin, 1981a, 1981b; Rosen et al., 1991, 2000b)。

本実験では、日本産アメフラシ (*Aplysia kurodai*) の口球神経節内で摂食神経回路網に関わる3種類の既同定ニューロン MA、JO、JC ニューロンを用いた (Nagahama and Takata, 1988, 1989, 1990a, 1990b)。JO (jaw-opening motor neuron) は開口運動に関与する筋に EJP (興奮性筋接合部電位、excitatory junction potential) を発生させ、JC (jaw-closing motor neuron) は閉口運動に関与する筋に EJP を発生させる運動ニューロンである。MA (multi-action neuron) は多数の機能を持つニューロンで、口球神経節内で JO に対し EPSP (興奮性シナプス後電位、excitatory postsynaptic potential) を、JC に対し IPSP (抑制性シナプス後電位、inhibitory postsynaptic potential) を誘発し、更に閉口筋に対し IJP (抑制性筋接合部電位、inhibitory junction potential) 発生させることが知られている。そのため MA ニューロンが活動すると、JO ニューロンはより興奮し、JC ニューロンはより抑制を受ける。実際の摂食行動時には、これらのニューロンにはほぼ同時にリズムカルな興奮性入力が生じ、MA ニューロンの活動により JO、JC ニューロンの発火パターンの差が形成される。本実験では、これら同定済みのニューロンを中心に用い、ニューロンのスパイクと細胞内カルシウムイオン濃度の増加との関連について検討した。そして、それらの関連を明らかにした後、神経刺激により MA、JC に擬似摂食パターンを発生させ、摂食行動時に生じるニューロンの活動パターンの差をカルシウムイメージングにより捉えることができるかについて検討を行った。

4. ニューロン活動に伴う細胞内カルシウムイオン濃度増加の機構

通常細胞では、ナトリウム-カルシウム交換ポンプや細胞内ストアの働きにより、細胞内外のカルシウムイオン濃度差は極めて高い状態に保たれている。一般的に、細胞内においてカルシウムイオンはセカンドメッセンジャーとして

働き、様々な条件により常に変動するものであると考えられるが、これには細胞膜上にあるチャンネルを通るカルシウムイオンの細胞内への流入や細胞内ストアからのカルシウムイオンの放出が関与している。アメフラシを含む様々な動物でニューロン活動時に細胞内カルシウムイオン濃度は増加するが、その機構や役割について完全にはわかっていない。本実験では、このスパイク活動に伴う細胞内カルシウムイオン濃度の増加のメカニズムについて更に調査した。

細胞外からのカルシウムイオンの流入に関与するカルシウムチャンネルは、電位依存性カルシウムチャンネルやリガンド依存性カルシウムチャンネル等が挙げられる(Kostyuk and Verkhratsky, 1995)。電位依存性カルシウムチャンネルは細胞が脱分極したときに、カルシウムイオンを選択的に透過させるチャンネルで、その性質により脊椎動物、無脊椎動物に関わらず L、N、T、P/Q、R タイプと分けられている (Nowycky et al., 1985, Zhang et al., 1993)。リガンド依存性カルシウムチャンネルは、細胞外の結合部位にリガンドが結合した時にカルシウムイオンを含む陽イオンを透過させるチャンネルで、興奮性アミノ酸受容体チャンネルがニューロンに存在し、カルシウムを流入させることが知られている (Iino et al., 1990; Mayer and Westbrook, 1987)。一方、細胞内ストアからのカルシウムイオンの放出には、イノシトール三リン酸が関与する系と、カフェインなどのリガンドが関与する系 (Friel and Tsien, 1992; Jonas et al., 1997; Knox et al., 1996) が存在することが知られている。実験の過程において、これらの中でスパイク発火に伴う細胞内カルシウムイオン濃度増加に関与しているものは電位依存性カルシウムチャンネルであると考えられた。本実験ではどのタイプの電位依存性カルシウムチャンネルがニューロンのスパイク活動時における細胞内カルシウムイオン濃度増加に関与しているのかを、それぞれのチャンネルに対する特異的阻害剤を用いることで検討を行った。

略語

AM: acetoxymethyl

CBC: cerebral-buccal connective

CPG: central pattern generator

DMSO: dimethyl sulfoxide

EFM: epifluorescent microscope

EJP: excitatory junction potential

EPSP: excitatory postsynaptic potential

IJP: inhibitory junction potential

IPSP: inhibitory postsynaptic potential

JO: jaw-opening motor neuron

JC: jaw-closing motor neuron

LSM: laser-scanning microscope

MA: multi-action neuron

ROI: region of interest

SEM: standard error of mean

VGCC: voltage gated calcium channel

実験方法

実験動物

日本産アメフラシ (*Aplysia kurodai*) は1年周期の動物であり、梅雨前後に産卵し、親個体はその後衰弱死する。実験で用いた動物は11月から翌年7月までの間、兵庫県洲本市、又は福井県三方郡三方町にて採取したものをを用いた。採取した動物は、14~15℃の人工海水を満たし、エアポンプ、ろ過装置を取り付けた水槽内で飼育した。餌として培養もしくは天然のアナアオサ (*Ulva pertusa*) または市販の塩ワカメ (*Undaria pinnatifida*; 製造: 乙女草(株)、販売: コープこうべ) を用い、1日1回適量を与えた。本実験では採集後水槽内で3日以上飼育し、きちんと餌を食べ、体重が50~250gの個体を用いた。

測定用試料の作成

解剖のために、動物の体重の20~30%に当たる等張塩化マグネシウム溶液(0.4M)をシリンジにて腹腔内に注入し、麻酔を施した。麻酔後、動物を解剖台の上にピンで固定し、解剖用ハサミを用いて口球、口球神経節、及びそれらを連結する口球神経を傷つけないように取り出した。口球は正中線に沿って左右2つに分割し、CBC神経(cerebral-buccal-connective)、radula神経、esophageal神経とn1神経を切り離し、n2神経、n3神経のみ残した。次に口球および口球神経節をシルガード(Dow)でコーティングしたアクリル製測定用チェンバーに虫ピンで固定し、口球神経節上を覆っている上皮組織を眼科手術用ハサミで切除した。尚、実験は全て室温(22~24℃)にて行った。

色素の導入法

アメフラシニューロンへの色素の導入に際し、3種類の染色法を比較研究した。以下にそれぞれの染色法について記す。

(1) アセトキシメチル (AM) タイプの色素を用いた場合

AM タイプの色素を用いた実験では、Calcium Green-1 AM (Molecular Probes) 又は Fluo-3 AM (Dojin) を色素として用いた。DMSO (dimethyl sulfoxide)、又は 10% の pluronic F-127 (Molecular Probes) を含む DMSO にこの色素を溶解したもの (色素濃度: 10 mM) をストック溶液として -50°C にて保存した。使用時にこれを人工海水にて 100~1000 倍に希釈し (最終色素濃度 10~100 μ M)、場合によっては Cremophor EL を加え (2 mg/ml)、この希釈溶液中で口球神経節を様々な条件下で培養し染色を行った。染色後、神経節は人工海水にてよく洗浄し、観察を行った。

(2) バックフィル染色の場合

バックフィル染色は軸策断端から色素を細胞体へ導入する方法である。この方法では、Calcium Green-1 Dextran (10,000 MW), potassium salt 又は Calcium Green-1 Dextran (3,000 MW), potassium salt (共に Molecular Probes) を色素として利用し、これを 50 mM 炭酸水素ナトリウム水溶液に 20% (重量パーセント) の割合で溶かしたものを実験に用いた。この染色法を用いる場合、前述のプレパレーションから n2 神経、n3 神経を切り離すことで口球を完全に取り除き、口球神経節のみを利用した。先端を細く熱加工したポリエチレンチューブ (長さ 3~5 cm) をワックスによりチェンバー縁に固定し、細径部に n3 神経を吸引し、神経が抜けないように虫ピンで神経近傍の組織部分を固定した。その後ポリエチレンチューブ内の溶液を完全に取り除き、ここへ神経断端部が浸るように色素溶液を少量注入し、この色素溶液が蒸発しないようにワセリンでチューブ外部断端を塞いだ。神経節の周りは新鮮な人工海水で満たし、この人工海水が蒸発しないようワセリンをつけたスライドガラスでチェンバー上面を覆い完全に密閉した。この様にして作成した試料を約 2 日間 4°C の冷蔵庫内に保存し染色を行った。この間、色素溶液や神経節の周りの人工海水が蒸発していないかの確認を数回行い、同時に人工海水の入れ替えを行った。染色後には 2~3 時間かけて室温に戻した後、観察を行った。

(3) インジェクション法の場合

インジェクション法では色素を直接電気泳動的に細胞体に注入した。この方法では、Calcium Green-1 hexapotassium salt (Molecular Probes) を色素として利用した。芯入ガラス管 (GD-2; Narishige) を材料として電極作成プレーヤー (Narishige) を用いて作成したガラス微小電極内に、4%色素水溶液 (重量パーセント) を満たし、これを細胞内染色用かつ記録用電極として用いた (電極抵抗: 10~20M Ω)。この微小電極をホルダーに固定後、マイクロマニピュレーター (Narishige) を用いてニューロン細胞体にこの電極を刺入し、10~20 nA の過分極通電を 0.5~10 分与えることにより染色を行った。染色時間は細胞のサイズにより異なり、大きいニューロンほど染色に時間を要した。

また、この方法を用いたときはニューロンの同定も可能であった。開口運動ニューロン (JO) と閉口運動ニューロン (JC) は、共に口球神経節内の細胞体の位置と、細胞内脱分極通電 (3 秒、10~30nA) によりニューロンを興奮させたときに生じる口球筋の動きから同定した。また多機能介在ニューロン (MA) は口球神経節内の細胞体の位置、活動電位の波形や神経刺激により生じるニューロンの発火パターンの特徴から同定した。神経刺激には、電気刺激装置 (SEN-3301; Nihon Kohden) とアイソレータ (SS403J; Nihon Kohden) を用い、膜電位変化は微小電極用増幅器 (MEZ-8201 又は MEZ-8301; Nihon Kohden) で処理後、前置増幅器 (AVM-11) 付きオシロスコープ (VC-11; Nihon Kohden)、又はストレイジオシロスコープ (AD-5141; AND) にて観察し、その信号を A-D 変換ボード (Mac ADIOS II 又は InstruNet; GW instruments) でデジタル化し、パーソナルコンピュータ (Power Mac 7100/80 AV 又は Power Mac 7500/100; Apple) 上のコンピュータソフト (Super Scope II; GW instruments) を用いてファイルとして記録した。全てのデータは MO ディスク (Teijin, sony 又は Mitsubishi Chemical) にコピーし保存した。

尚、染色の比較実験以外では全てインジェクション法を用いニューロン細胞を染色した。

レーザー顕微鏡 (LSM) を用いたカルシウムイメージング

レーザー顕微鏡 (Laser scanning microscope; LSM) を用いたイメージングシステムの概略を図 1 に示す。神経刺激を行うため、染色後 n2、n3 神経を切り離し、n3 神経及び esophageal 神経断端にポリエチレン製の吸引電極を取り付け、神経刺激を行えるようにした。その後、測定用チェンバーをレーザー顕微鏡 (LSM-310; Carl Zeiss) のステージに固定し、10 倍の対物レンズ (開口数: 0.3) を用いニューロンを観察した。この顕微鏡には共焦点観察用のユニットが装備されているが、口球神経節内のニューロン細胞体は 3 次元的に配置しており、またできる限り大きな蛍光強度を得るため、共焦点観察は行わなかった。Calcium Green-1 で染色されたニューロンは 488nm のアルゴンレーザーにより励起され、生じた蛍光はダイクロイックミラー (FT510) とバリアフィルター (LP515) を通り光電子増倍管により感知した。明るさ、及びコントラストは染色ニューロンからの蛍光が観察でき、バックグラウンド蛍光ができるだけ少なく、かつ生じる蛍光強度変化が十分に捉えられるように調節した。この機器では全体像 (512 × 512 ピクセル) で測定した場合、時間分解能が非常に悪く (最速で約 1 frame/sec)、かつコンピュータのメモリの限界により長時間の測定もできない (最大 30 枚)。そこで全体像の中から好みの領域の蛍光変化のみを測定できる ROI (region of interest) 機能を利用し、必要な領域のみで測定した。この ROI を使用すると最速で 5 frames/sec、最大 100 枚のイメージを記録することができた。本研究では通常、ROI イメージの記録を 30~90 秒間行った。

蛍光強度は指定 ROI 内の全ピクセルの平均値を算出した。蛍光強度変化の解析は、測定後、数値化された蛍光強度の時系列データから $\Delta F/F$ (%) の時間変化を算出しプロットした。ここで、 F は刺激前 1 秒間の平均蛍光強度、 ΔF はある時間における蛍光強度から F を引いたものである。実験では、n3 神経、CBC 神経または esophageal 神経を刺激装置 (SEN-3301; Nihon Kohden) に接続したアイソレーター (SS-403J; Nihon Kohden) を用いて刺激し、ニューロンの活動に伴う蛍光強度変化を捉えた。全ての測定データは MO メディア (Teijin, Sony 又は Mitsubishi Chemical) に保存し、後の解析に利用した。同じ試料を用い、最大数十回の測定を繰り返した。

ステージ固定型落射蛍光顕微鏡 (EFM) を用いたカルシウムイメージング

ステージ固定型落射蛍光顕微鏡 (EFM; BX50WI, Olympus) を用いたイメージングシステムの概略を図 2 に示す。このシステムでは、ニューロンの電位変化と蛍光強度変化を同時に測定することができた。実験では測定用試料を作成後、染色を行わない状態で測定用チャンバーを EFM のステージに固定した。次に 0.5~1% Calcium Green-1 を含む 200mM 酢酸カリウム溶液を満たしたガラス微小電極を、透過光のもと、マイクロマニピレーターを用いてニューロン細胞体に刺入した。10~16 nA の過分極通電 (2~5 分) により細胞体に色素を導入し、5 分以上放置後、カルシウムイメージングおよび電気生理学実験を同時に行った。この実験では、高濃度の Calcium Green-1 溶液 (4%) を電極溶液として用いた場合、長期間の測定では細胞内への色素の流入に伴う蛍光強度の時間的増大が認められた。これは、目的とする蛍光強度の時間変化の解析を不明瞭にするだけでなく、カルシウム濃度検出での色素濃度依存性をも考慮する必要性を生じさせるであろう。そこで、実験では色素流入による蛍光強度変化を押さえるため電極内の色素濃度を減少させた。ただこの場合、電極抵抗が増大して電気生理学実験が困難になるため、色素を蒸留水ではなく低濃度の電解質溶液に溶解し電極溶液として用いた。

蛍光測定の励起光発生装置としては SpectroMASTER (Olympus) を利用した。これはキセノンランプを光源とし、300~700 nm の間で、1nm 単位、5~30 nm 波長幅 (半値幅) で励起光の波長を調節できる。今回は 488 nm を中心とした 15 nm 波長幅の光を励起光として設定した。生じた蛍光は、ダイクロイックミラー (DM510) とバリアフィルター (BA515) を通過し、冷却 CCD カメラ (Olympix FE250; Olympus) により検出した。このカメラの解像度は最大で 512×512 ピクセルであるが、大きな蛍光強度を得、かつ検出速度を上げるため 5×5 ピクセルのビニングをかけ、104×104 ピクセルのイメージデータとして取得した。この時の検出速度は 20~25 flames/sec で、通常 30~120 秒間蛍光強度変化を測定した。これらのシステムは MERLIN imaging system (Olympus) でコントロールされ、これを用いて画像の取得を行った。蛍光強度変化は、画像取得後、ROI を細胞体部位に設定することで細胞体部位における蛍光強度を数値化し、LSM 記

録と同様に $\Delta F/F$ の時間変化を算出した。

この実験ではガラス微小電極を細胞体内に刺入保持しており、ニューロンの膜電位記録のみならず脱分極通電にて刺激を行うこともできた。刺激や色素導入用通電は刺激装置 (SEN3301; Nihon Kohden) を用いて行った。生じた膜電位変化は微小電極用増幅器 (MEZ-8301; Nihon Kohden) からノイズ除去装置 (Hum Bug; Quest Scientific) を介し、ストレージオシロスコープ (AD-5142; AND) にて観察し、同時にその信号を A-D 変換ボード Mac ADIOS APO (GW instruments) を介してデジタル化し、パーソナルコンピュータ (Machintosh Powerbook DUO & DUO Dock; Apple) のハードディスク上の電気生理学用ソフト (Super Scope II; GW instruments) を用いファイルとして記録した。カルシウムイメージング実験、及び電気生理学実験の全てのデータは MO メディア (Teijin, Sony 又は Mitsubishi Chemical) にコピーし保存した。

試薬と溶液

本実験で使用した溶液組成は次のとおりであった。

人工海水 (ASW) : NaCl 470; KCl 11; CaCl₂ 11; MgCl₂ 25; MgSO₄ 25; Tris-HCl 10 (pH7.8~7.9)

Ca²⁺ Free 溶液. : NaCl 470; KCl 11; MgCl₂ 35; MgSO₄ 25; Tris-HCl 10 (pH7.8~7.9)

Low Ca²⁺, Low Mg²⁺ 溶液. : NaCl 470; KCl 11; CaCl₂ 1; MgSO₄ 1; Tris-HCl 70 (pH7.8~7.9)

電位依存性カルシウムチャンネルのブロッカーのうち、 ω -conotoxin GVIA (Sigma) を用いる場合、2価陽イオンが溶液中に多いと効果を発現しないため、Low Ca²⁺, Low Mg²⁺溶液中にこれを溶解し (5 μ M)、この溶液に 30 分間試料を浸した。その後、作用効果は不可逆的なため通常の人工海水に戻し 15~20 分後に実験を行った (Fossier et al., 1994)。また、nifedipine (Sigma) と amiloride (Sigma) は DMSO にそれぞれ 10 mM、500 mM の濃度で溶かし、これを保存溶液として冷蔵保存 (4 $^{\circ}$ C) し、使用時に人工海水で 1000 倍に希釈して用い

た。 ω -conotoxin GVIA と ω -agatoxin TK (Sigma) は蒸留水に 100mM の濃度で溶かし、これを保存溶液として冷蔵保存し、使用時にそれぞれ Low Ca^{2+} , Low Mg^{2+} 溶液 (ω -conotoxin GVIA の場合)、人工海水 (ω -agatoxin TK の場合) で使用濃度 (それぞれ 5 μM , 300nM) にまで希釈して用いた。Cremophor EL は Sigma より購入した。その他、特に記載した以外の試薬は全て Wako Pure Chemical より購入した。

結果

1. 様々な方法によるカルシウム感受性色素のアメフラシニューロンへの導入効率

アメフラシニューロンにおいてカルシウムイメージング法を用いるためには、ニューロン内にカルシウム感受性色素を導入しなければならない。カルシウム感受性色素をニューロン内に導入する手法として、現在主に3種類の手法が利用されている。1つは、細胞膜を透過できるアセトキシメチル型 (AM 型) 色素を用いる方法 (Friel and Tsien, 1992; Lipscombe et al., 1988; Tareilus et al., 1995)、もう1つは軸策断端からの逆行的染色法 (Cox and Fetcho, 1996; McClellan et al., 1994; O'Donovan et al., 1993)、最後に微小電極を用いた細胞内への直接注入法 (Jonas et al., 1997; Knox et al., 1996; Sugimori and Llinàs, 1990) である。

AM 型色素を用いた染色法は、主に脊椎動物において培養細胞 (Manning Jr and Sontheimer, 1999; Quintero and McMahon, 1999) や、脳スライス切片 (Peterlin et al., 2000) など広範な細胞に対しこの色素を導入する方法としてよく用いられており、多くの細胞に色素を同時に導入できるため、最初にこの方法をアメフラシニューロンで利用できるかを調べた。実験では単離した口球神経節の上皮組織を切除して直接細胞体が溶液に浸るようにした。色素濃度を 10~100 μM 、染色時間を 0.5~24 時間、温度を 4~36 $^{\circ}\text{C}$ と変化させ、浸潤性を良くする Pluronic F-127 や Cremophor EL を溶液に加えるなど、様々な条件で色素の導入を試みた。しかしながら、どの条件下でも良い染色結果は得られず、多くは膜領域のみがやや蛍光を発するような像しか得られなかった (図 3)。また、このような染色状態ではニューロン活動に伴う蛍光強度変化は全く観察できなかった。

軸策断端からの逆行的染色では、デキストランタイプのカルシウム感受性色素を用いた。これは、カルシウム感受性色素に様々な分子量のデキストラン分子を結合させたもので、通常 of 低分子カルシウム感受性色素に比べて色素の吸着が起こりにくく (Blatter and Wier, 1990; Luby-Phelps, 1989;)、このため、軸策断端から細胞体までの長距離を色素が有効に移動すると期待できる。単離したアメフラシ口球神経節の n3 神経断端から色素の逆行的染色を試みた。この結

果、少数の試料において長時間（2日間）かけて n3 神経に軸策を伸ばしている数個のニューロンが染色でき、神経刺激によりこれらの染色されたニューロンから蛍光強度変化を得ることができた（図4）。しかし、この方法は逆行性染色から期待されるほど多くのニューロンを染色することはできず、染色効率が非常に悪かった。またこの方法では神経に軸策を伸ばしていない介在ニューロンを染色できないという問題点もあった。

インジェクション法では、デキストランタイプの色素を用いることもある（Fetcho and O'Malley, 1995）が、本実験では通常の hexapotassium salt タイプの色素を用いた。この色素は水溶性で、ガラス微小電極の電極内溶液としても用いることができ、電極を刺入した1個のニューロン細胞体に過分極通電を行うことにより容易かつ確実に染色することができた。この方法で3種類の同定ニューロン、MA、JC、JO を同時に染色した結果を図5A に示す。また、神経電気刺激を行うと染色されたニューロンから大きな蛍光強度変化を得ることができた（図5B）。この方法では AM タイプ色素のように簡単に不特定多数のニューロンの染色はできないが、通常の電気生理学実験を行うことのできる技術があれば20個程度のニューロンを2時間程度で染色でき、さほど問題とはならなかった。インジェクション法ではガラス微小電極を用いることで電気生理学的手法を用いることができ、ニューロンの同定が可能であるなどの利点もある。また目立った褪色効果も無く、多くの場合長時間（2時間以上）安定した測定が可能であった。

この他、遺伝子導入装置を用いた電気穿孔法による色素導入（Bright et al., 1996; Gift and Weaver, 2000）をアメフラシニューロンでも試みた。しかしながら、この方法では染色できるまで電圧を上げるとほとんどすべての細胞の応答性が消失し、実用には耐えなかった。

以上の結果、アメフラシニューロンのカルシウム感受性色素染色にはインジェクション法を用いるのが最適であると判断した。また、神経電気刺激によりニューロンに活動を起こさせると蛍光強度変化を生じたことから、以後の実験では全てインジェクション法によりニューロンを染色し、蛍光強度の増大とニューロンの活動との関連をより詳しく調べた。

2. アメフラシニューロンのスパイク発生に伴う蛍光強度変化

口球神経 n3 などを電気刺激すると、カルシウム感受性色素を導入したニューロンで蛍光強度の増大が観察された (図 4 C、図 5 B)。この蛍光強度変化はニューロンのどのような活動を反映しているのでしょうか？そこで、蛍光強度変化とニューロン活動の関係を口球神経節内の同定済みニューロンを用いて調べた。

今回の実験ではまず始めに LSM システムを用いて実験を行い、後に EFM システムを新たに導入した。LSM システムを用いた実験では、最初にガラス微小電極を用い神経電気刺激に伴うニューロンの膜電位変化を記録し、その後 LSM にて神経刺激を行ったときに生じる蛍光強度変化を同じニューロンで記録した。それに対し EFM システムを用いた実験では、神経刺激による膜電位変化と蛍光強度変化を同時に記録することができた (実験方法を参照)。さらにこの方法では、ニューロンへ脱分極通電を与えることにより誘発されるスパイク活動とその時の蛍光強度変化を同時に調べることもできた。

実験では口球神経節内の多機能介在ニューロン、MA を主に用いた。この MA は同側 n3 神経に軸索を伸ばしており、この神経を電気刺激することにより逆行性スパイクと EPSP により生じるスパイクとの両方を発生する。同側 n3 神経刺激を行ったときの MA の膜電位変化と蛍光強度変化を LSM により別々に記録した実験結果の一例を図 6 A 示す。同側 n3 神経を一定の刺激条件 (5msec、10Hz、1V、20 パルス) で刺激すると、MA は図 6 A1 のような高頻度スパイク発火を生じ、その放電頻度は同一刺激条件ではほぼ一定であった。次に LSM で同じ MA の細胞体領域に ROI を設定し、同じ条件で神経を電気刺激すると、図 6 A2 のような一過的な蛍光強度の増大が生じた。この蛍光強度の増大は、ほぼニューロンのスパイク発生時期に一致していた。また、3 種類の同定ニューロン MA、JO (開口運動ニューロン)、JC (閉口運動ニューロン) を染色し、esophageal 神経の電気刺激に伴いこれらのニューロン細胞体領域から生じる蛍光強度変化を LSM によって同時に測定した (図 6 C)。同側 esophageal 神経刺激 (5msec、33Hz、20 パルス、6V) によるこれらのニューロンの膜電位変化を図 6 C1 に示す。MA は神経刺激直後から高頻度のスパイクを発火し、それが数

秒続いた。JO、JCにはこの間 slow EPSP が誘発され、MA の高頻度発火が終了したときに遅れてスパイク発火した。LSM を用いて、同一刺激を行った時の MA、JO、JC の活動を同時測定すると、MA の細胞体領域では刺激直後から大きな蛍光強度変化が見られたが、JO と JC の細胞体領域では蛍光強度の増大は刺激より数秒遅れて生じており、この時期はこれらニューロンの発火時期とほぼ一致していた (図 6 C2)。以上の結果から、ニューロンのスパイク活動に対応して蛍光強度変化が生じていると予想された。しかし、LSM システムによる測定では、膜電位測定と蛍光強度変化測定は別々に行われており、実際にスパイク活動に応じ蛍光強度が増加しているのかを直接的に証明するために、これらを同時に記録する必要があった。そのため、新たに EFM システムを導入し、膜電位測定と蛍光強度測定を同時に行った。

EFM システムにより、MA 細胞体に微小電極を刺入した状態でこのニューロンの膜電位変化と細胞体領域での蛍光強度変化を同時に測定した一例を図 6 B に示す。同側 n3 神経を刺激した時に生じるスパイク活動と細胞体領域での蛍光強度変化は同時期に生じており、この結果、蛍光強度変化はニューロンのスパイク活動の時期に生じることが確認された。更に MA が自発的なバースト発火をしている時の膜電位と細胞体領域での蛍光強度変化を EFM にて同時に測定すると、ニューロンのバースト発火によく一致して蛍光強度の一過的な増加が観察された (図 6 D)。これらの結果は蛍光強度変化が、ニューロンのスパイク活動のために生じていることを強く示唆している。

以上の結果、ニューロンのスパイク活動が細胞体領域での蛍光強度の増加、すなわち細胞内カルシウムイオン濃度の増加に関与しており、このためカルシウムイメージング法を用いることでニューロンのスパイク活動を検出できると考えられる。また、時空間分解能には大きな差があるが、LSM、EFM どちらを用いた場合でもニューロンのスパイク活動の検出が可能であることも判明した。

3. スパイク発火に伴う蛍光強度変化の測定部位依存性

本実験ではここまで、スパイク発火に伴うニューロンの蛍光強度変化を細胞体領域に ROI を設定し測定したが、このような蛍光強度変化は測定部位領域に

より異なるかもしれない。そこで、空間解像度に優れるレーザー顕微鏡を用い、測定部位を変えてニューロンのスパイク発火に伴う蛍光強度変化を調べた。図 7 A は、同側 n3 神経の電気刺激（5msec、33Hz、10 パルス、6V）に伴う MA の細胞体中心部と軸索小丘部（図上部イメージ内の白枠で示す）での蛍光強度変化を示す。また、図 7 B は、同側 esophageal 神経の電気刺激（5msec、33Hz、20 パルス、6V）に伴う JO のスパイク応答と細胞体中心部と軸索小丘部での蛍光強度変化を示す。MA では刺激直後から、JO では刺激開始から約 5 秒ほど遅れて細胞体中心部、軸索小丘部共に大きな蛍光強度増加を生じ、どちらの場合にも、軸索小丘部の方が細胞体中心部に比べてより大きな蛍光強度変化を示した。更に JO を用いた実験では、神経刺激から約 5 秒後にスパイクが発生し、これに対応して細胞体中心部、軸索小丘部で共に大きな蛍光強度変化が生じたが、軸索小丘部ではスパイクを発生していない刺激直後から、僅かであるが蛍光強度の増加が観察された。この期間は、JO に小さな脱分極が生じている期間であり、この時の蛍光強度増加はニューロンの脱分極により生じているかもしれない。これらの結果、ニューロンのスパイク活動のみをカルシウムイメージングにより検出するためには、細胞体中心部における蛍光強度変化を測定すべきであることが示唆された。また、細胞体全体から蛍光強度変化を測定する場合、その蛍光強度変化は細胞体中心部から測定したものとほとんど変わらない事がわかった。これは、軸索小丘部は細胞体全体に比較すると非常に小さな領域であり、細胞体全体から蛍光強度変化を測定した場合、軸索小丘部で生じている小さな蛍光強度変化は、全体の中で埋もれてしまうからではないかと考えられる。そこで本研究ではこれ以降、蛍光強度変化は全て細胞体全体から測定した。

4. ニューロンのスパイク活動に伴う蛍光強度変化の定量的解析

次に、カルシウムイメージングによってスパイク活動をどこまで定量的に検出できるかを知るため、スパイク頻度やスパイク発火期間と蛍光強度変化の関係を詳細に調べた。これらの実験では、2 種類の刺激方法、すなわち神経の電気刺激と細胞内脱分極通電によりニューロンにスパイクを発生させ、刺激方法

によるニューロンのスパイク形成機構と蛍光強度変化の関係も調べた。神経刺激実験では LSM システムを、脱分極通電実験では EFM システムをそれぞれ使用した。MA ニューロンは同側 n3 神経刺激によりそのスパイク発火をコントロールし易いため、実験にはこのニューロンを利用した。

まず、ニューロンのスパイク発火頻度と蛍光強度変化との関係を調べた。神経刺激を行った実験 (n=5 preparation) では、MA の発火頻度は神経刺激のパルス頻度を変えて調節し (それぞれ 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20Hz)、発火期間は刺激パルスの回数 (それぞれ 5, 10, 15, 20, 30, 40 パルス) を調節することによりほぼ一定 (約 2 秒間) に保った。このように同側 n3 神経を電気刺激することにより、MA では逆行的スパイクと EPSP 加算によるスパイクが生じた。同一試料で神経刺激により生じる膜電位変化の記録と蛍光強度変化の記録をそれぞれの刺激頻度ごとに 10 回ずつ繰り返し、平均値と標準誤差を計算した。ある試料において、神経刺激により生じた MA の平均スパイク数の時間変化をそれぞれの刺激頻度に対してグラフ化し図 8 A に示す。平均スパイク数は、個々の試行により生じたスパイク数を 0.3 秒ごとにカウントし、10 試行分を平均したものである。グラフ中の縦線は SEM (n=10) を示す。刺激頻度を増大させると MA の平均スパイク頻度も増加し、刺激期間中ほぼ一定値を保った。また、同一試料で膜電位記録と同じ刺激を与え、それにより生じた蛍光強度変化の 10 試行分平均値の時間変化を図 8 B に示す (縦線は SEM、n=10)。蛍光強度はスパイク発火開始と共に増大し、ほぼ発火終了時期にピークとなりその後減少した。この時、蛍光強度のピーク値はスパイク頻度の増加に伴って増大した。ピークに至るまでの蛍光強度変化の傾きの平均を求め、MA の平均スパイク頻度に対してプロットしたグラフを図 8 C に示す。この結果、両者の間には良い直線関係が得られ、蛍光強度変化の傾きはニューロンのスパイク頻度に比例することが示唆された。

さらに EFM システムを用い、細胞内脱分極通電により生じるスパイク頻度と蛍光強度変化の関係を調べた (n=6 preparation)。ここでは MA に 1 秒間の異なる強さの脱分極電流 (4~10nA) を与えて様々な頻度のスパイクを発火させ、その時の膜電位変化と蛍光強度変化を同時に記録した。図 8 D~E はこの実験結果の一例であり、この MA ニューロンでは脱分極通電により 1 秒間に 0~37

発のスパイクが発生した。そのうち 1 秒間に 8 発と 3 1 発のスパイクが発生した時の膜電位変化と蛍光強度変化の同時記録の結果を図 8D に示すが、スパイク発火頻度が高いほどより大きな蛍光強度変化を生じた。図 8E では図 8C と同様に、横軸にスパイク頻度を、縦軸に蛍光強度変化の平均傾きをプロットした。この結果、神経刺激の場合と同様に蛍光強度変化の傾きはニューロンのスパイク頻度に比例することが示唆された。また、このような関係は MA だけに限らず、他のニューロン (JC、JO や未同定ニューロン) でも一般的に認められた。以上の結果より、LSM、EFM どちらのシステムを用いても、カルシウムイメージングで得られる蛍光強度増大時の傾き、すなわち蛍光強度増加率の大小はニューロンのスパイク頻度の大小に対応することがわかった。実際、図 8A では刺激後半になると前半より発火頻度は減少し、これは図 8B の蛍光強度変化の傾きが時間と共に減少していることに対応すると解釈できる。

ここまでの実験から、蛍光強度の増大はニューロンのスパイク発火の終了時にほぼピークとなり、その後直ちに減少していく傾向が見られた。そこで、ニューロンの発火期間と蛍光強度の増加期間に関連があるのかを調べた。実験は先ほどの実験同様、2 種類の刺激を MA に与えて行った。LSM を用いた神経刺激の実験 (n=6 preparation) では、刺激パルスの頻度、および刺激強度を一定とし (5msec、14.3Hz、0.5V)、刺激回数を変える (10~60 パルス) ことでスパイク発火期間を調節した。それぞれの長さの刺激において膜電位測定、蛍光強度変化測定を 10 回ずつ繰り返し、スパイク数と蛍光強度変化の平均値および標準誤差を計算した。このような刺激により MA が発生したスパイクの数を 0.3 秒ごとに平均し、この時間変化を図 9A に示す (縦線は SEM、n=10)。この試料では刺激期間のスパイク発火頻度は刺激直後で高く、その後減少する傾向が見られたが、刺激期間を変えても初期の時間経過はほぼ同様であった。同一試料で刺激期間を同様に変化させた時に生じる蛍光強度変化の時間経過を 10 試行平均した結果を図 9B に示す (縦線は SEM、n=10)。蛍光強度変化のピークは刺激期間が増すと増加したが、初期の蛍光強度増大はどの刺激期間でもほぼ同様の時間経過を示し、ピークに達する時間はニューロンのスパイク発火終了時にほぼ一致している。図 9C は各刺激期間について、蛍光強度増加開始からピークに至るまでの平均時間をニューロンの平均スパイク発火期間に対してプ

ロットしたものであるが、これらの良い対応が見られる。

さらに EFM システムを用い、脱分極通電により生じるスパイクの発火期間と蛍光強度増加期間の関係を調べた (n=5 preparation)。一定強度 (7nA) で、通電時間 (0.5~2.0sec) のみ変えた脱分極通電を MA に与えてスパイクを発生させ、そのときの膜電位変化と蛍光強度変化を同時に測定した。図 9D にその一例を示す。この場合もスパイク発火期間が長いほど蛍光強度増大は長く続いた。同じ試料におけるスパイク発火期間と蛍光強度の増大期間の関係をプロットすると図 9E のようになり、この実験でもスパイク発火期間と蛍光強度増加期間がほぼ一致することがわかった。このような関係は、MA ニューロンのみならず、他のニューロン (JO、JC、未同定ニューロン) でも一般的に見られた。これらの結果より、LSM、EFM どちらのシステムを用いても、カルシウムイメージングで観察される蛍光強度増大の期間はニューロンがスパイクを発火している期間にほぼ一致することが示された。

5. 複数ニューロンにおける蛍光強度変化の同時記録による発火パターンの差の検出

アメフラシでは摂食行動中に口球神経節や脳神経節内のニューロンでリズムカルな発火パターンが生じる。これらのニューロンは、歯舌の突出しと引っ込み、歯舌の開閉、口の開閉などに応じ発火パターンを形成しており、それぞれの役割に応じて発火パターンが異なり、パターンに位相差が生じる。このような多数のニューロンの発火パターンを同時に記録する様な実験を行う場合、微小電極を用いたこれまでの手法では物理的に明らかな限界があり、また微小電極を細胞内に長期間に渡り保持し記録を続けることも困難である。しかし、これまで示してきたカルシウムイメージング法を用いることにより容易に多数ニューロンの活動を同時記録することができ、5~6 時間にわたる長期の記録も可能であると考えられた。そこで、この方法を用い、実際に摂食様発火パターンを示している同定済みニューロンから活動を観察し、このような目的にカルシウムイメージング法を用いることができるかについて検討した。

CBC 神経を電氣的に連続頻回刺激すると、MA や JC、JO に摂食行動で見ら

れるのと類似したリズムカルな発火パターン（疑似摂食パターン）が誘発されることが報告されている（Nagahama and Takata, 1988, 1990a）。図10Dは、このような疑似摂食パターンを MA と JC から同時に微小電極を用いて細胞内記録した例で、この場合、MA は JC よりも常に発火が先行していることがわかる。MA 細胞体は口球神経節内で最も内側に、JC 細胞体は中央腹側辺りに存在し、両者とも細胞体サイズが大きいことから同定が容易である（図10A）。CBC 神経を連続頻回刺激（5msec、2Hz、1V）し、カルシウムイメージング法により MA と JC ニューロンの発火パターンを同時記録した結果の1例を図10B、C に示す。この刺激により MA、JC 細胞体では共にリズムカルな蛍光強度変化を生じた。これらニューロンのリズムカルな蛍光強度変化の位相関係をより明確にするため、図10B の 30~60 秒までの部分を拡大し図10C に示す。これを見ると、MA の蛍光強度が増大を始める時期は JC よりも早く、また MA の蛍光強度ピークは常に JC の蛍光強度ピークに先んじていた。この結果を蛍光強度変化の定量的解析の結果に照らし合わせ類推すると、MA は常に JC に先だって発火し、かつ先に発火を停止していることを意味しており、実際の電気生理学的手法を用いて得られたデータとよく一致した。これらの結果より、カルシウムイメージング法を用いて多くのアメフラシニューロンの発火パターンを同時に観察し、それらの位相関係を議論できることが示唆された。

6. ニューロンのスパイク活動に伴う細胞内カルシウムイオン濃度増加のメカニズム

今回カルシウムイメージングの実験に使用した calcium green-1 という色素は、カルシウムイオンと結合することにより励起光に対する蛍光を増大させる色素であり、これまで本研究で調べたニューロンではスパイク活動に伴い細胞体での蛍光強度が増大していたことから、ニューロンのスパイク活動に伴い細胞体での細胞内カルシウムイオン濃度が増大しているものと考えられる。この性質は、今回主に実験に用いている MA や JO、JC などのニューロンが持つ特有のものなのか、それともニューロン全般に共通したものなのかを調べるため、どのような機構によりスパイク活動に伴う細胞内カルシウムイオン濃度増加が生

じるのかについて詳しく調べた。細胞内カルシウムイオン濃度が増大する要因としては、大きくわけて2つのメカニズムが考えられる。1つは細胞外からのカルシウムイオンの流入、もう1つは細胞内ストアからのカルシウムイオンの放出である。まず最初の実験として、細胞外からのカルシウムイオンの流入がどの程度影響を持っているのかを、外液からカルシウムイオンを取り除くことで調べた。

図11Aでは、LSMを用い、人工海水中と Ca^{2+} Free 溶液中におけるMAニューロンの膜電位変化と細胞体での蛍光強度変化を別々に記録した実験の一例を示す。同側n3神経を刺激(5msec、14.3Hz、30パルス、0.3V)した時のMAの膜電位変化を測定すると、 Ca^{2+} Free 溶液中でもスパイクは発生し、そのスパイク頻度も人工海水中で刺激した場合と変わらなかった(図11A1)。同一ニューロンにて、それぞれの溶液中で同じ刺激を行ったときの細胞体での蛍光強度変化を10回試行繰り返し、その平均値と標準誤差を計算した結果を図11A2に示す(縦線はSEM、 $n=10$)。この結果から、人工海水中ではスパイク活動に応じ蛍光強度変化を生じているが、 Ca^{2+} Free 溶液中ではスパイクが生じているにも関わらず全く蛍光強度変化を生じていない事がわかる。図11BではJ0mニューロン(Nagahama and Inoue, 1999)を用い同様の実験を行った。J0mニューロンは、JCと同調して脱分極し、JCよりも少し後から放電をはじめ、JCが放電を追えた後も引き続き放電をしつづける開口運動ニューロンである。J0mニューロンは同側n2神経に軸索を伸ばしており、この神経を刺激することで逆行性スパイクを発生させることができる。口球神経節を人工海水、もしくは Ca^{2+} Free 溶液中に浸し、同側n2神経刺激(5msec、20Hz、40パルス、0.4V)を行うことによりこのニューロンにスパイクを発生させた時の細胞内電位記録と細胞体での蛍光強度変化をEFMにて同時に記録した結果を図11Bに示す。このニューロンでも、 Ca^{2+} Free 溶液中ではスパイクを発生したにも関わらず蛍光強度変化は完全に消失した。同様の結果は他の口球神経節ニューロンでも観察され、これらの結果は、ニューロンのスパイク発火に伴う細胞体での細胞内カルシウムイオン濃度の増加には細胞外カルシウムイオンの存在が必須で、細胞外よりカルシウムイオンが流入するために生じていることを示している。

細胞外からのカルシウムイオンの流入には幾つかの機構が考えられるが、ス

スパイク発生、つまり電位変化に伴い生じていたことから、電位依存性カルシウムイオンチャンネル (voltage-gated calcium channel, VGCC) が関与している可能性が高いと考えられた。そこで、スパイク発火に伴う細胞体での細胞内カルシウムイオン濃度増加にこのチャンネルが関与しているかについて調査した。脊椎動物における電気生理学的、薬理学的実験に基づき、VGCC は幾つかのタイプに分類されることが報告されている (Nowychy et al., 1985; Regan, 1991; Zhang et al., 1993)。また脊椎動物で使用されたものと同じ VGCC に対する特異的阻害剤が、無脊椎動物の VGCC を分類するために用いられている (Edmonds et al., 1990; Fossier et al., 1994; Ma and Koester, 1995)。これらの VGCC に対する特異的阻害剤を用い、MA において、スパイク発火に伴う細胞体での細胞内カルシウムイオン濃度増加にどのタイプの VGCC が関与しているのかについて調べた。ニッケルイオンや amiloride を細胞外溶液に加えることで T タイプの VGCC を選択的に阻害することが知られている (Kits et al., 1997; Tang et al., 1988; Todorovic and Lingle, 1998; Viana et al., 1993)。同側 n3 神経を神経刺激し、NiCl₂ (100 μ M, 5msec, 14.3Hz, 30 パルス, 1.5V) または amiloride (500 μ M, 5msec, 14.3Hz, 30 パルス, 0.4V) を細胞外溶液に添加した時の MA 細胞体での蛍光強度変化を薬剤添加前と比較した (図 1 2 A, B)。これらの薬剤の添加前後で、神経刺激により生じる蛍光強度変化に差は無かったことから、T タイプの VGCC はスパイクに伴う細胞体での細胞内カルシウムイオン濃度増加に関与していないと考えられる。同様にして、同側 n3 神経を神経刺激し、N タイプ VGCC の特異的阻害剤 ω -conotoxin GVIA (5 μ M) や P/Q タイプ VGCC の選択的阻害剤 ω -agatoxin TK (300nM, Teramoto et al., 1995) を細胞外溶液に添加した時の MA 細胞体での蛍光強度変化を薬剤添加前と比較した (図 1 2 C, D)。しかし、これらの薬剤を細胞外溶液に添加しても、その添加前後で神経刺激により生じる MA 細胞体での蛍光強度変化に差は現れなかった。これらの結果から、T、N、P/Q タイプの VGCC はニューロンのスパイク活動に伴う細胞体での細胞内カルシウムイオン濃度増加に関与していないと考えられる。これらに対し、L タイプの VGCC の阻害剤である nifedipine (10 μ M) を用いた場合には、異なる実験結果を得た (図 1 3)。LSM を用いた実験では (図 1 3 A)、膜電位変化と蛍光強度変化は別の試料を用い実験を行っている。これは初期の実験において、nifedipine

を洗浄後1時間経った後にスパイク活動に伴う蛍光強度変化を測定すると、蛍光強度変化がまだ回復しなかったことから、nifedipine の効果はほぼ不可逆的であると考えられるためである。nifedipine を細胞外溶液に添加すると、同側 n3 神経刺激により生じる MA のスパイク発火には特に影響を与えなかった。しかし、蛍光強度変化の方はこれを加えることで約半分にまで抑制された。EFM を用いた膜電位変化と蛍光強度変化の同時記録を行った場合にも (図 1 3 B)、nifedipine 添加前後ではほぼ同様に MA のスパイクが生じているが、蛍光強度変化は半減した。これらの結果は、アメフラシニューロンにおいて、L タイプ VGCC がスパイク発火に伴う細胞内カルシウムイオン濃度の増加に関与していることを示している。

人工海水中、 Ca^{2+} Free 溶液中または nifedipine (10 μM) 添加後の蛍光強度変化のピーク値を全実験について比較した結果を図 1 3 C に示す。 Ca^{2+} Free 溶液中では蛍光強度変化がほぼ消失しており (n=5)、nifedipine を用いた場合は蛍光強度変化が約半分 (56.0 \pm 4.7%, n=8) にまで減少した。また、それぞれコントロールとの差は有意であった (P<0.001, two sample t-test)。これらの結果より、ニューロン細胞体ではスパイク発生時にカルシウムイオンが細胞外から流入し、これには L タイプの VGCC が寄与していることが示唆された。また、L タイプの VGCC はニューロンに一般的に存在することから、一般的なニューロンのスパイク活動をカルシウムイメージング法により検出できると考えられる。

考察

1. アメフラシニューロン活動観察へのカルシウムイメージング法の適用

本実験では、カルシウムイメージング法をアメフラシニューロン活動の観察に用いることができるのかについて詳しく調べた。カルシウムイメージング法を行うためにはカルシウム感受性色素を細胞内に導入しなければならず、最初に細胞内へ色素導入を行うためにはどの手法が最も優れているのかについて調べる実験を行った。カルシウム感受性色素を神経細胞に導入する手法は、AM型色素を用いる bulk 染色法 (Friel and Tsien, 1992; Kyrozis et al., 1995; Tareilus et al., 1995)、軸策断端からの逆行的染色 (Cox and Fetcho, 1996; McClellan et al., 1994; O'Donovan et al., 1993)、微小電極、パッチ電極を用いたインジェクション法 (Jonas et al., 1997; Knox et al., 1996; Sugimori and Llinás, 1990) の3種類が主に用いられている。この中で最も容易に多数の細胞を染色できるのが AM 型色素を用いる方法であり、これを用いることができれば顕微鏡観察可能な神経節内の全てのニューロン活動を同時に検出できる可能性があると考えた。そこで、この色素を用いアメフラシ口球神経節内のニューロンを染色しようと試み、様々な条件下 (温度、時間、色素濃度、界面活性剤の有無等) で培養したが、いずれの場合も染色することができなかった。また、特に口球神経節のニューロンのみが染色できないという訳ではなく、他の神経節 (脳神経節、足神経節、側神経節) のニューロンも同様に染色できなかった。一般的に AM 型色素は脊椎動物の細胞を染色するのに良く用いられているが、これまでに無脊椎動物では昆虫を除き、この色素により染色されたという報告は無い。この原因として、無脊椎動物では AM 型色素が細胞膜を透過できない、または細胞内にあるエステラーゼ活性が弱いため AM 型色素が通常の色素に変換されないためではないかと考えられる。逆行的染色では、10,000MW のデキストランタイプの色素や、それよりも早く拡散するといわれている 3,000MW のデキストランタイプの色素 (Fritsch, 1993; Popov and Poo, 1992) を用い、少数の試料で幾つかのニューロンの染色には成功したが、一般的にニューロンの形態を確認するために用いられるコバルトバックフィル染色をアメフラシ (*Aplysia californica*) の口球神

経節ニューロンに適用した場合と比較しても (Scott et al., 1991)、染色されたニューロンの数が非常に少なかった。これは、デキストランタイプの色素の大きさや軸索内での拡散の遅さ等が影響を及ぼしているのではないかと考えられる。また、小型のニューロンがほとんど染色されなかったことから、細い軸策を持つニューロンは染色され難いのかもかもしれない。さらにこの方法では特定の神経に軸策を伸ばすニューロンは染色できるが、神経節内にしか軸策が無い介在ニューロンなどは染色できず、他の方法に比べ染色に非常に時間がかかり、単離試料で染色した場合、ニューロンの活性が落ちる可能性が高いという問題がある。これらの方法と比較して、インジェクション法ではガラス微小電極を刺入できる全てのニューロンで、確実に染色可能である。高濃度の色素溶液を用いることにより、1つの細胞当りの染色時間を短くすることができ、アメフラシニューロンの場合、巨大なものを除き通常 3~5 分の過分極通電で十分に染色できた。長時間の微小電極保持が困難な小さなニューロンの場合では、染色時間は 30 秒ほどでも十分であった。この操作を繰り返すことにより多数のニューロンを短時間で染色することができた。そして、この方法により染色されたニューロンはそのスパイク活動に伴って蛍光強度変化を示し、長時間 (2 時間以上) 安定して記録をとることも可能であった。このことは、カルシウムイメージング法は、長時間微小電極を保持することが難しい非常に小さなニューロンでも、その活動を長時間観察することができることを示している。この方法の問題点としては、電極刺入によりニューロンが壊れる場合がある、染色できるニューロン数にはある程度限度があるといったことが挙げられる。しかし、これらの3つの方法を総合的に比較すると、アメフラシニューロンでカルシウムイメージング法を用いるためにはインジェクション法によりカルシウム感受性色素を細胞内に注入するのが最も適していると考えられる。

また、本実験では蛍光強度測定のために2種類の機器を利用した。1つは LSM で、もう1つは EFM である。本実験で利用した LSM は EFM よりも空間解像度に優れていたが、時間解像度は明らかに EFM に劣っていた。EFM ではニューロンにガラス微小電極を刺しその膜電位変化を測定し、かつ同時にカルシウムイメージングにより蛍光強度変化を測定することができ、この点でも LSM に勝っていた。さらに EFM を用いた場合、ニューロンに脱分極通電を与え直

接興奮させることもできた。それぞれの機器には特性があるが、今回の実験ではどちらの機器を用いても神経刺激時又は脱分極通電時に生じるニューロンのスパイク活動を検出することができた。しかし、どちらの機器を用いても、アムフラシニューロンで検出可能なスパイク活動はバースト発火している場合であり、ニューロンの1発のスパイク活動を検出することはできなかった。これは、LSM の場合時間解像度が悪く、1発のスパイクのような早く小さい蛍光強度変化を捉えることができないためであると考えられる。EFM の場合には最大で±0.5%もの測定ノイズが生じており、1発のスパイクにより生じる小さな蛍光強度変化はこのノイズ上では信号として認識できないためであると考えられる。

2. 測定部位による蛍光強度変化の差違

無脊椎動物の神経系では、神経節から生じている神経は、通常、求心性神経と遠心性神経を共に含んでいる。そのため、微小電極をニューロン細胞体に刺入し、神経を電氣的に刺激した時の電位変化を観察した場合、逆行性のスパイクと EPSP 加算により生じるスパイクが観察される。カルシウムイメージングによりこのようなニューロン活動を観察した場合、スパイク活動に伴う細胞内カルシウムイオン濃度変化だけでなく、シナプス活動により生じる細胞内カルシウムイオン濃度変化も同時に検出している可能性がある。

本実験では、軸策小丘での蛍光強度変化が常に細胞体中心部での蛍光強度変化より大きいという結果を得た。このような結果は、脊椎動物で得られた軸策部の方が細胞体部より大きな蛍光強度変化を生じるという結果(Jaffe et al., 1992; Lev-Ram et al., 1992; Midtgaard et al., 1993; Regehr and Tank, 1992; Svoboda et al., 1997) と良く一致する。ニューロン活動に伴う細胞内カルシウムイオン濃度の増加は細胞外からのカルシウム流入により生じることから、このような現象は、単に細胞体部位と軸策小丘での体積に対する表面積の割合 (surface-volume ratio) の違いにより生じているのかもしれない。しかしながら、図7で示したJOを用いたの実験では、軸策小丘部の蛍光強度は刺激開始から数秒間スパイク活動が無いにも関わらず僅かながら増加していた。無脊椎動物のニューロンで

は、一般的に脊椎動物の樹状突起とは異なり、細胞体から樹状突起が出ておらず、シナプス情報が軸索小丘の近辺に集中し、これがスパイク生成に関わっているのではないかと考えられている。このようなシナプス活動が軸索小丘での細胞内カルシウムイオン濃度増加に関わっているために、軸索小丘では細胞体中心部よりも大きな蛍光強度変化を生じ、EPSP に伴う蛍光強度の増加といった現象が生じている可能性がある。このような可能性以外にも、この領域に低閾値型のカルシウムチャンネルが高濃度で極在しているため、軸索小丘部と細胞体中心部での蛍光強度変化の差異が生じている可能性もある。これに対し、細胞体部位での蛍光強度変化はニューロンのスパイク活動に対応してのみ生じた。これらの結果から、ニューロンのスパイク活動を検出するためには細胞体から蛍光強度変化を記録するべきであることが示唆される。

3. ニューロンのスパイク活動とそれに伴う蛍光強度変化との関係

本実験では、アメフラシのニューロンにおいて、そのスパイク活動がカルシウムイメージングにおける蛍光強度変化と対応していることを示した。そして、より定量的な実験により、ニューロンのスパイク頻度は蛍光強度の増加率に対応し、その発火期間は蛍光強度の増加期間と一致することを示した。ニューロンのスパイク活動と蛍光強度変化との関連は、脊椎動物において幾つか報告されている (Lev-Tov and O'Donovan, 1995; O'Donovan et al., 1993; O'Malley et al., 1996)。中でも脊椎動物であるゼブラフィシュのマウスナー細胞では1発のスパイクに対応した非常に大きな蛍光強度変化が観察されている (O'Malley et al., 1996)。このようなスパイク活動と蛍光強度変化の関係は、細胞内電極を利用せず、カルシウムイメージング法の結果からニューロンのスパイク活動がどのように生じているのかを推測するためには非常に重要である。実際、擬似摂食放電パターンを発生させたときの MA と JC のニューロン活動をカルシウムイメージングにより同時記録した実験において、これらのニューロンで生じる発火パターンの位相差をカルシウムイメージングの結果のみから十分に類推することができる。また、MA のリズムカルな成分を除いた蛍光強度を見ると、刺激直後大きく増加し時間と共に少しずつ下がる傾向があり、これは実際電気生

理学的手法により記録した場合、MA ニューロンが連続頻回神経刺激直後に高頻度でしばらく続くスパイク発火を発生している現象 (Nagahama and Takata, 1990a) を示しているのではないかと類推できる。更に JC において、リズムカルな蛍光強度変化が時間と共に徐々に小さくなっていったのは、神経刺激により引き起こされるリズムカルな活動中に、徐々にこのニューロンのスパイク活動が減少すること (Nagahama and Takata, 1990a) を示していると類推できる。

カルシウムイメージングの実験では、スパイク活動により生じた蛍光強度の増加分は、スパイク活動終了後ゆっくりと静止レベルにまで減衰した。また、蛍光強度は無限に増加しつづけるわけではなく、その増加量には限界が存在する。カルシウムイメージングによって捕えられる蛍光強度変化のこのような特性は、例えばニューロンの高頻度スパイク発火が非常に長期に渡り続く場合や、発火パターンのリズムがとても早い場合には、カルシウムイメージングによるスパイク活動の類推を妨げる要因となる可能性がある。アメフラシの摂食リズムでは、そのリズムの1サイクルは4秒程度、バーストの期間はその70%以下であることが多く、このレベルのリズムカルなスパイク活動は問題無くカルシウムイメージングで捕えることができた。スパイク活動により増加した蛍光強度がゆっくりと静止レベルにまで減衰していく原因は、細胞内カルシウムイオン濃度の制御機構により細胞内カルシウムイオン濃度がゆっくり減少しているからなのかもしれない。また、今回使用している色素 (Calcium Green-1) のカルシウムイオンに対するアフィニティーが高いことが影響を与えているかもしれない ($K_d=190\text{nM}$; Regehr and Atluri, 1995)。カルシウムイオンへのアフィニティーが低い色素 (Fura2, BTC 等) を用いた場合、より早い蛍光強度の減衰が生じるが、これらの色素の蛍光強度変化はアフィニティーの高い色素に比べ非常に小さい (Regehr and Atluri, 1995)。本実験で用いた、Calcium Green-1 はアメフラシニューロンのスパイク活動に伴い大きな蛍光強度変化を生じさせ、またそれらに良い相関が観察された。これは、この色素がアメフラシニューロンにおけるスパイク活動により生じる細胞内カルシウムイオン濃度変化の範囲にちょうど適合しているからなのかもしれない。この色素と同様の蛍光スペクトル特性を持つ fluo-3 を用いた場合にも、同様の結果が得られると考えられるが、Calcium Green-1の方が高カルシウムイオン濃度の場合に大きな蛍光を生

じることや静止時の蛍光強度が強いことなどの利点を持つ。

また、カルシウムイメージング法では、ニューロンのリズムカルなバーストのが生じている間、細胞内カルシウムイオン濃度が高まっていることを示している。この細胞内カルシウムイオン濃度の増加は、セカンドメッセンジャー (Gerday et al., 1988; Nishizuka 1992) や遺伝子発現 (Roche and Prentki, 1994) といった機能に何らかの影響を与えている可能性がある。また、これはリズムカルなバーストを引き起こしたり、それを維持することにも必要なのかもしれない (Wilson et al., 1996)。今後、細胞内カルシウムイオン濃度減少と Calcium Green-1 の蛍光強度減少との間の関係についてより詳しく調査せねばならない。

4. スパイク活動に伴う細胞内カルシウムイオン濃度増加のメカニズム

本実験において、細胞外溶液中からカルシウムイオンを取り除くと、ニューロンは人工海水中と同様にスパイクを発生したが、それに伴う細胞内カルシウムイオン濃度の増加は生じなくなった。これは、細胞外からのカルシウムイオンの流入がスパイク活動に伴う細胞内カルシウムイオン濃度増加に必要不可欠であることを示している。このカルシウムイオン流入のメカニズムとして最も可能性の高いものは、電位依存性カルシウムイオンチャンネル (VGCC) である。VGCC は脊椎動物、無脊椎動物で薬理的、電気生理学的に幾つかのクラスに分類されている (Edmonds et al., 1990; Fossier et al., 1994; Ma and Koester, 1995; Nowycky et al., 1985; Regan, 1991; Teramoto et al., 1995)。実際幾つかの動物で、特定タイプの VGCC がスパイク活動に伴うカルシウムイオン濃度増加に関与しているという研究結果が報告されている (Jaffe et al., 1992; Lev-Ram et al., 1992; McClellan et al., 1994; Midtgaard et al., 1993; O'Donovan et al., 1993; Regehr and Tank, 1992; Viana et al., 1992; Yuste et al., 1994)。本実験ではこれらの VGCC に対する特異的阻害剤を用い、どのタイプの VGCC がアメフラシニューロンにおけるスパイク活動に伴う細胞内カルシウムイオン濃度の増加に関与しているのかを調査した。この結果、L タイプ VGCC の特異的阻害剤である nifedipine のみが、実験で使用した全てのニューロンにおいてスパイク発火には影響を与えず、スパイク活動に伴う蛍光強度増加を約半分にまで抑制した。これは、L

タイプ VGCC が、アメフラシのニューロンでスパイク活動に伴う細胞内カルシウムイオン濃度増加に関与していることを示している。この結果は、ラットの CA1 ニューロンの細胞体より得られた結果とよく一致する (Regehr and Tank, 1992)。また、L タイプの VGCC はほとんどのニューロンに存在すると考えられることから、カルシウムイメージングによるニューロンのスパイク活動の検出は、ほとんど全てのニューロンで可能であると考えられる。

アメフラシ (*Aplysia Californica*) の口球神経節では、N、P タイプのカルシウムチャンネルが、B4/5 ニューロンのシナプス前末端領域での伝達物質放出に関わっているという報告がある (Fossier et al., 1994)。この B4/5 ニューロンは日本産アメフラシ (*Aplysia kurodai*) の MA に相当すると考えられている。しかし、今回の実験では、N、P タイプ VGCC の特異的阻害剤は MA におけるスパイク活動に伴う細胞体での細胞内カルシウムイオン濃度増加に対しては何ら影響を示さなかった。それゆえ、N、P タイプ VGCC はシナプス末端に局在し、この領域での細胞内カルシウムイオン濃度増加に関与しているが、細胞体領域にはほとんど存在しないのかもしれない。

また、今回の実験では L タイプ VGCC を阻害するだけでは、細胞外溶液をカルシウムフリー溶液にした場合とは異なり、完全に蛍光強度変化を消失させることができなかった。これは、今回の実験で使用した全ての特異的阻害剤が効かないようなカルシウムチャンネルがスパイク活動に伴う細胞内カルシウムイオン濃度増加に関与している可能性を示している。モノアラガイ (*Limnaea stagnalis*) のニューロンでは、脊椎動物では知られていない VGCC が報告されている (Kits et al., 1997)。このようなチャンネルがアメフラシのニューロン活動に伴う細胞内カルシウムイオン濃度の増加に関与している可能性がある。その他にもナトリウムチャンネルを通るカルシウムイオン流入 (Bakar et al., 1971; Brown et al., 1975) や非選択的カチオンチャンネルを通るカルシウム流入 (Magoski et al., 2000) 等が関与しているかもしれない。これらの可能性を探る実験が今後必要である。

5. まとめ

本実験で、アメフラシニューロンにおいて、カルシウムイメージング法によりニューロン活動を観察し、またその蛍光強度変化の様子からニューロンのスパイク活動を類推できることがわかった。また、スパイク活動に伴う細胞内カルシウムイオン濃度増加のメカニズムの研究より、LタイプのVGCCがこれに関与していることが示され、このチャンネルは動物のニューロンに広く分布していることから、カルシウムイメージングによりアメフラシの広範なニューロンの活動を検出し、推測することができると考えられる。このような結果は、カルシウムイメージング法を用いることにより、動物の神経回路網の研究に対し電気生理学的手法では困難な新たなアプローチが可能であることを示している。この方法を用いることにより、同時に多数のニューロンからニューロン活動を記録し、それらのニューロンの発火パターンを議論したり、電気生理学の実験を組み合わせることでニューロンの発見、同定をより容易に行うことができるのではないかと期待される。

第2章

カルシウムイメージング法を用いた海藻味刺激に応答する
アメフラシ脳神経節内ニューロン群の探索

序論

1. 本研究の目的

これまでアメフラシの摂食行動に関わる神経回路の研究が、口球神経節や脳神経節で非常に多く行われてきた (Church and Lloyd, 1994; Cohen et al., 1978; Evans and Cropper, 1998; Hurwitz et al., 1994, 1999; Morton and Chiel, 1993a, 1993b; Nagahama and Takata, 1988, 1989, 1990a, 1990b; Perrins and Weiss, 1996, 1998; Rosen et al., 1991; Sánchez and Kirk, 2000; Xin et al., 1999)。しかし、まだその全容が解明されたわけではない。これらの神経節内には $10^3 \sim 10^5$ 個のニューロンが存在すると考えられるが、その中で同定済みのニューロンはわずか一部にしか過ぎない。このため、未同定である多くのニューロンの働きを知ることが、摂食行動に関わる神経回路網の解明のために必要であると考えられる。

これまで、ニューロンの同定は電気生理学的手法のみを用い行われてきた。しかし、闇雲にガラス電極を細胞内に挿入し、ニューロンの性質、機能を調べていくのでは効率が悪い。どの辺りのニューロンが行動時に反応を示しているのかという位置情報を得ることができれば、より効率的にニューロンの同定が行えるはずである。

近年、サルや人を実験対象として fMR、MEG や PET といった手法を用いた脳機能解析が行われるようになってきた (Kanwisher et al., 1997; Koeppe et al., 1998; Lam et al., 2001)。この手法により、活動しているニューロンがどの辺りに存在しているのかを、時空間軸上で非侵略的に調べることができる。アメフラシではこれら方法を用いることは不可能であるが、解剖下の動物において、前章で示したカルシウムイメージング法を利用し、同様の調査を行うことができるはずである。本実験では、同時に多数のニューロン活動を検出できるカルシウムイメージング法を用い、アメフラシ脳神経節内で海藻味刺激に応答を示すニューロンを探索することを目的とした。このために、頭部と脳神経節からなるプレパレーションを作成し、口唇部へ海藻味刺激を与えたときのニューロン活動をカルシウムイメージングにより調べた。海藻味刺激に反応を示したニューロン群は、摂食時に何らかの役割を果たしている可能性がある。これらの

ニューロンの具体的な働きを知るために、幾つかのニューロンに対し電気生理学的手法を用い、ニューロンの同定を試みた。この研究を通じ、神経回路網の研究に新たな手法としてイメージング法を利用することの有用性を示したい。

2. アメフラシの神経節

アメフラシには、幾つかの神経節がある (図 1 4)。腹部神経節、側神経節はえら引っ込め反射や水口引っ込め反射の実験で良く知られ (Cleary and Byrne, 1993; Frost and Kandel, 1995; Kandel, 1979; Walters et al., 1993)、足神経節は動物の移動や姿勢に関与し (Hall and Lloyd, 1990; McPherson and Blankenship, 1992; Nagahama et al., 1993; Xin and Kupfermann, 1995)、口球神経節では摂食に関与する実験が多数行われている (Borovikov et al., 2000; Chiel et al., 1988; Cohen et al., 1978; Evans and Cropper, 1998; Hurwitz et al., 1994, 1997; Morton and Chiel, 1993a, 1993b; Nagahama and Takata, 1988, 1989, 1990a, 1990b; Plummer and Kirk, 1990; Rosen et al., 2000a, 2000b)。本研究で用いた脳神経節は、これらの神経節に対し神経を伸ばし、動物の様々な行動に関与するニューロンが存在することが知られている (Mackey et al., 1989; Raymond and Byrne, 1994; Rosen et al., 1982, 1991; Teyke et al., 1990; Xin et al., 1996, 2000)。アメフラシでは、これら研究に用いられている神経節以外にも、小さな神経節が幾つか存在する。

アメフラシでは、これらの神経節内に存在するニューロンの細胞体はオレンジイエロー系の色をしたものが目立ち、他の組織などと容易に見分けることができる。更にその細胞体のサイズが大きいことから、電気生理学的実験を行うのに都合が良い。アメフラシと同様に神経回路網に関する実験動物として良く用いられているモノアラガイでは、ニューロン細胞体の大きさが小さく、またナメクジやマイマイでは、その上にニューロンと組織の区別がつきにくいいため、アメフラシと比較し電気生理学的実験を行うことは容易でない。神経節内では、これらのニューロン細胞体は葡萄の房の様に集まっており、このような房をクラスターとして分類している (Jahan-Parwar and Fredman, 1976)。脳神経節内では現在までに、これらのクラスターにそれぞれ A~M までのアルファベットが与えられている。1つのクラスターには数十~数千個のニューロンが存在する

と考えられている。それぞれのクラスター内で、運動ニューロン、感覚ニューロン、介在ニューロンなど様々な働きを示すニューロンが同定されてきているが、全ニューロン数に比較するとその数は少ないといえる。

3. アメフラシ摂食行動とそれに関与する神経機構

日本産のアメフラシは餌としてアオサやワカメといった海藻を好んで食べる。動物が摂食を行う場合、まず餌を認識せねばならない。餌を認識するための重要な手がかりは何らかの化学的シグナルや触覚であると考えられる。アメフラシでは口唇部や前触角にある感覚ニューロンにより、これらのシグナルを感知すると考えられている (Kandel, 1979)。受容されたシグナルは、頭部組織から伸びる左右3対の神経、ULABn (Upper labial nerve)、LLABn (Lower labial nerve)、ATn (Anterior tentacular nerve) を通じ脳神経節内へと送られる。そして、脳神経節を含む神経節内で記憶に基づき認知・判断されると考えられる。その後、動物は自らの判断に基づき、中枢パターン発生器 (CPG: central pattern generator) 回路網を通じて運動ニューロンの働きを調節し、運動 (行動) を引き起こす。

アメフラシの脳神経節は、ULABn、LLABn、ATn を通じて口唇部と、CBC を通じて口球神経節と繋がっており、摂食行動に関わるニューロンが多数存在すると考えられ、実際に幾つかのニューロンが同定され、研究されてきている (Chiel et al., 1986, 1988; Hurwitz et al., 1999; Perrins and Weiss, 1996, 1998; Rosen et al., 1979, 1982, 1991; Sánchez and Kirk, 2000; Weiss and Kupfermann, 1976; Xin et al., 1996, 2000)。しかしまだ、神経回路網の中でどのように情報が処理され、摂食行動が引き起こされるのかについて完全に明らかにされているわけではない。

脳神経節内では味覚情報の入力経路を調べるため、神経活動依存的に取りこまれると考えられている色素を用い、味刺激により応答を示すニューロンの分布が研究され (池田 2001)、この結果、A、B、G クラスターのニューロンが多数染色されることがわかった。A、B クラスターについては防御反応に関連する運動ニューロンが存在するという報告がある (Teyke et al., 1989)。G クラスターに存在するニューロンは、セロトニンを含有する巨大ニューロンである

MCC (Weiss and Kupfermann, 1976) を除きその機能は不明であるが、ULABn、LLABn、ATn からのコバルトや biocytin による逆行染色の結果から、これらの神経へ軸索を伸ばすニューロン細胞体が多数存在することがわかっており (Jahan-Parwar and Fredman, 1976; 池田, 2001)、このことから、感覚や運動といった機能を有するニューロンがこの領域に存在すると予想された。そこで今回の実験では、カルシウムイメージング法を用い、G クラスタやその周辺領域で実際に海藻味刺激に応答を示すニューロンを探索し、かつ一部のニューロンについてその機能を電気生理学的手法により明らかにした。

略語

ATS: anterior tentacle shortening motoneuron

ATn: anterior tentacular nerve

CBC: cerebral buccal connective

CPC: cerebral pedal connective

CPIC: cerebral pleural connective

LC_G: lip-closing motor neuron in G cluster

LLABn: lower labial nerve

LO_G: lip-opening motor neuron in G cluster

MCC: metacerebral cell

ULABn: upper labial nerve

実験方法

実験動物と海藻

実験で用いた日本産アメフラシ (*Aplysia kurodai*) は11月から翌年7月までの間、兵庫県洲本市、又は福井県三方郡三方町にて採取したものをを用いた。採取した動物は、14~15℃の人工海水を満たし、エアポンプ、ろ過装置を取り付けた水槽内で飼育した。動物採取時に餌となるアナアオサ (*Ulva pertusa*) を同時に採取し、これを150リットルの人工海水を満たしエアポンプを取り付けた水槽内で飼育した。餌は1日1回適量のアオサを動物に与えた。本実験では水槽内で3日以上飼育し、きちんと餌を食べ、体重が50~150gの動物を用いた。

測定用試料の作成

本研究では、reduced preparation を使用した (Nagahama et al., 1998; 図15)。解剖のために、動物の体重の20~30%に当たる等張塩化マグネシウム溶液 (0.4M) をシリンジにて腹腔内に注入し、麻酔を施した。麻酔後、動物を解剖台の上にピンで固定し、解剖用ハサミを用いて前触角、口唇部、脳神経節を取り出した。脳神経節と前触角、口唇部を繋ぐ左右3本の神経 upper labial nerve (ULABn)、lower labial nerve (LLABn)、anterior tentacle nerve (ATn) を残し、これ以外の脳神経節から伸びる全ての神経を切断した。また、前触角、口唇部へ伸びる血管を確保し、これにポリエチレン製チューブを差し込み、血管灌流を行った。前触角、口唇部と脳神経節は、表面をシルガード (Dow) でコーティングしたアクリル製測定用チェンバーにそれぞれ腹側を上にし虫ピンで固定した。このチェンバーは2つのコンパートメントに分けられており、その一方に脳神経節を、もう一方に前触角、口唇部をピン止めした。それぞれのコンパートメント間をワセリンで完全に仕切り、お互いの溶液が交じり合わない様にした。脳神経節を覆う上皮組織を眼科手術用ハサミで取り除き、脳神経節内の細胞体を直接目視できるようにした。解剖後は、人工海水を0.5~1.0ml/minの流速で常に血管灌流し続けた。

カルシウムイメージング

カルシウム感受性色素、Calcium Green-1 はインジェクション法により細胞内に導入した。4% Calcium Green-1 hexapotassium salt (Molecular Probes) 水溶液をガラス微小電極の電極内溶液として用い (電極抵抗: 10~20M Ω)、ニューロン細胞体に刺入し、12~18nA、2~5 分の過分極通電を行うことで、電気泳動的に色素を細胞体に注入した。通電時間、通電強度は染色するニューロン細胞体のサイズが大きいものほど長く、強くしている。この操作を繰り返すことで多数のニューロンを染色した。色素を導入後、測定用チェンバーをステージ固定式落射蛍光顕微鏡 (BX50WI stage-fixed microscope; Olympus) のステージに固定した。蛍光強度変化測定時の励起光発生装置として SpectraMASTER (Olympus) を用い、488nm を中心に 15nm の波長幅の光を励起光として試料に照射した。生じた蛍光はダイクロイックミラー (DM510) とバリアフィルター (BA515) を通過したものを冷却 CCD カメラで捉えた。イメージは 5 \times 5 または 3 \times 3 のピニングをかけ、20~25frames/sec の速度で 90~120 秒間取得した。これらの機器は MERLIN imaging system (Olympus) を用い操作され、このソフトを用いてデータの取得、解析を行った。得られたデータは一旦パーソナルコンピュータ (Dell) 上のハードディスクに蓄えられ、その後 MO ディスク (Mitsubishi chemical) にコピーし保存した。実験では、測定開始より 20~30 秒後にパストゥールピペットを用い、0.3~0.5ml の人工海水又はアオサ抽出液を口唇部に与えることにより刺激を行った。一度刺激を行った場合、次の刺激を行うまでに人工海水で洗浄後 15 分以上の間隔を空けた。この間常に前触角、口唇部は一定流速で血管灌流を行った。1つのプレパレーションで、それぞれの刺激を 2~6 回行い、蛍光強度変化を測定した。

電気生理学的実験

細胞内電位記録とニューロン形態を記録するために、4%の 5(6)-Carboxyfluorescein (Eastman Kodak) を含む 0.1M 酢酸カリウム溶液をガラス微小電極の電極内溶液として用い、これをニューロン細胞体に刺入した (電極抵

抗：10~20M Ω)。細胞外筋電位はポリエチレン製吸引電極(直径：200~400 μ m)を用い測定した。今回の実験で筋電位を測定した筋は、前触角や口唇部の内部に存在するため、通常のプレパレーションの状態ではどこに吸引電極を取りつけても筋電位は測定できなかった。そこで細胞外筋電位を測定するために、前触角、又は口唇部の外表皮を解剖用ハサミとピンセットを用いて一部剥し内部の筋を露出させ、そこへ吸引電極の先端を取りつけた。前触角や口唇部の横方向の動きは、それぞれ運動ニューロンを脱分極通電した時に最も大きな動きが生じる領域にフックを取りつけ、アイソトニックトランスデューサー(TD112S; Nihon Kohden)を用い測定し、その信号をA-D変換ボード(Mac ADIOS II又はInstruNet; GW instruments)によりデジタル化し、膜電位変化と共にパーソナルコンピュータ(Power Mac 7100/80 AV又はPower Mac 7500/100; Apple)とデータ取得・波形解析用プログラム(Super Scope II; GW instruments)を用い記録した。膜電位変化は微小電極用増幅器(MEZ-8201又はMEZ-8301; Nihon Kohden)で処理後、前置増幅器(AVM-11)付きオシロスコープ(VC-11; Nihon Kohden)、又はストレージオシロスコープ(AD-5141; AND)にて観察し、A-D変換ボードを介し、パーソナルコンピュータとデータ取得・波形解析用プログラムを用い記録した。全てのデータはMOディスク(Mitsubishi Chemical)に保存した。全ての実験終了後、5分間、10~12nAの過分極通電を与えることにより色素(5(6)-Carboxyfluorescein)を細胞体へ電気泳動的に注入した。その後、LLABn、ULABn、ATnを全て切り離し、前触角、口唇部を取り除き、12~24時間冷蔵庫の中で4 $^{\circ}$ Cにて保存した。これによりニューロンの細部まで色素が行き渡らせ、レーザー顕微鏡(LSM-310; Zeiss)にてニューロンの形態を観察し記録した。

溶液

本実験で使用した人工海水の組成は以下の通りである。

人工海水(ASW) : NaCl 470; KCl 11; CaCl₂ 11; MgCl₂ 25; MgSO₄ 25; Tris-HCl 10 (pH7.8~7.9)

刺激用のアオサ抽出液はそれぞれの実験前に作成した。採取し培養した10gのアオサをすり鉢で10~15分すり潰し、これに15mlの人工海水を加え、室温

で 20 分間スターラーを用いて攪拌する。この溶液を遠心チューブに入れ、高速冷却遠心機 (Kubota) にて 10,000G、4℃、20 分間遠心分離し、その上清をアオサ抽出液として用いた。

結果

1. 脳神経節内ニューロンの海藻味刺激に対する応答

前章で検討した様に、アメフラシニューロンにおいて、スパイク活動をカルシウムイメージングにより検出できることが判明した。本実験ではこれを用いて、アメフラシ脳神経節内で味刺激に応答するニューロン群の探索を行った。味刺激に応答するニューロンの中には、味情報の受容、処理などに関与するニューロンが含まれていると考えられることから、これらのニューロンが摂食神経回路網の要素である可能性が高い。カルシウムイメージングにより味刺激に応答するニューロンを探索し、その位置を知り、スパイク発火パターンを類推することは、摂食回路網に関与するニューロンを新たに同定するために役立つと考えられた。

アメフラシ脳神経節では、ニューロン細胞体が幾つかの領域に集合して存在し、それぞれがクラスターとして分類されており (Jahan-Parwar and Fredman, 1976)、ニューロンの活動依存的に細胞内へ取りこまれると考えられる色素を用いた研究で、口唇部への味刺激に応答する可能性のあるニューロンが多く含まれるクラスターの候補が調べられた (池田 2001)。この実験で、脳神経節腹側では主に A、B、G クラスターがその候補として上げられた。これらのクラスターの内、A、B クラスターでは頭部引っ込め反射に関与する運動ニューロンが存在するという報告 (Teyke et al., 1989) があり、摂食行動とは別の機能を果たしていると考えられるが、G クラスターに存在するニューロンに関してはまだ機能がわかっておらず、摂食神経回路網に関与する可能性がある。そのため、このクラスターとその周辺領域に存在するニューロンについて注目し、カルシウムイメージング法を用い、実際に味刺激に応答するニューロンが存在するのか、またどのような活動を示すのかを調査した。

G クラスターとその周辺領域のニューロンの海藻味刺激に対する応答をカルシウムイメージング法により検出した実験例を図 16 に示す。この実験の場合、G クラスターとその周辺領域に存在する 20 個のニューロンを、インジェクション法によりカルシウム感受性色素、Calcium Green-1 で染色した。図 16 A2

の赤枠内で囲まれている領域が G クラスタにあたる。測定開始から 20 秒後に刺激として口唇部へアオサ抽出液を与え、全体で 120 秒間測定した。刺激前後の蛍光画像を比較すると、幾つかのニューロンで明らかに蛍光強度が増加していた (図 16 A)。海藻味刺激に対し蛍光強度変化を示した 10 個のニューロンに図 16 A1 中で番号をつけ、これらニューロンの細胞体領域に ROI を設定し、それぞれのニューロンの蛍光強度変化をグラフ化したものが図 16 C である。これらのニューロンの応答は、リズムカルなものや一過的な応答を示すもの等様々で、全てのニューロンが同じような蛍光強度変化、すなわちスパイク活動を示したわけではなかった。この結果から、G クラスタ及びその周辺領域には味刺激によりスパイク活動を示すニューロンが多数存在し、そのスパイク発生パターンもニューロンにより異なることが示唆された。

2. 海藻味刺激に対する G クラスタニューロンの応答

アメフラシの脳神経節の上皮組織を取り除いたとき、G クラスタには大きなニューロン細胞体が多数見られる。これらのニューロンの中には、すでに同定されている MCC ニューロンが存在し (Weiss and Kupfermann, 1976)、それ以外にも比較的大きな細胞体(150~200 μ m)を持つニューロンが多数存在する。G クラスタの中には ULABn、LLABn、ATn に軸索を伸ばすニューロンが存在し (Jahan-Parwar and Fredman, 1976)、最初に示した様に、このクラスタにはアオサ抽出液刺激に対し反応するニューロンが存在した。そこで、このクラスタのニューロンを多数染色し、海藻味刺激に対する応答をカルシウムイメージングにより同時記録し、応答を示すニューロン細胞体の位置やその活動に特徴があるのかを調査した。

G クラスタに存在するニューロン細胞体はこのクラスタ内でやや球状に配置しており、顕微鏡観察において全てのニューロンに焦点を合わせることが難しいため、出来るだけ多くのニューロンから大きな蛍光を得られるように焦点を調節し画像を取得した。また、MCC のようなあまりにも巨大なニューロンは、染色できない場合があった。これは、染色時間が不足したためかもしれない。図 17 A-C では、カルシウムイメージングによる G クラスタニュー

ロンの海藻味刺激に対する応答を観察した結果の一例を示す（全8プレパレーション）。この実験で染色したGクラスター内の16個のニューロンを図17Aに擬似カラー像で示し、アオサ抽出液を口唇部に与えたときの、これらのニューロン細胞体の蛍光強度変化を図17Bに、人工海水により刺激した時の蛍光強度変化を図17Cに示す。それぞれのニューロンの蛍光強度変化はグラフ中で色分けして示す。口唇部への人工海水刺激では、ほとんど蛍光強度変化が生じなかった。それに比べ、口唇部への海藻味刺激では非常に大きな蛍光強度変化が5つのニューロンで生じた（6、13、14、15、16番のニューロン）。このグラフでは小さすぎて判別できないが、3、5番のニューロンも僅かながら一時的な蛍光強度変化を生じていた。また、13番のニューロンは刺激前にも蛍光強度変化が生じており、自発的活動を行っているのではないかと考えられる。前章の結果から、蛍光強度変化はニューロンのスパイク活動を表しており、その蛍光強度変化の傾きや変動の様子から、ニューロンのスパイク活動を類推できる。Gクラスターでのカルシウムイメージングの結果から、海藻味刺激に対しリズムカルなバースト発火又は持続的なスパイク発火をするニューロンが存在し、これらのニューロンは弱い触刺激にはほとんどスパイク発火を示さなかったと考えられる。海藻味刺激により蛍光強度変化を示したニューロンは、Gクラスターの辺側部に特に多く存在した。また、全てのプレパレーションにおいて、Gクラスターの中央部から神経節中央側にかけて存在する大きい細胞体を持つニューロンではほとんど反応が得られなかった。さらに、別のプレパレーション（3/8 preparation）では図17Dのような特徴的な蛍光強度変化を示すニューロンが存在した。このニューロンでは口唇部へのアオサ抽出液刺激により直ちに大きな蛍光強度変化を生じたのだが、その後非常に早いリズムの蛍光強度変化の振動（0.5~2Hz）が見られた。これは非常に早いリズム性のバースト発火を示していると考えられる。このニューロンでは、刺激前にも自発的に早いリズム応答を生じている場合があった。このような性質を持つニューロンはGクラスターの神経節中央前側に存在した。

3. 海藻味刺激に対する G クラスター周辺領域ニューロンの応答

本実験では G クラスター以外に、その周辺領域に存在するニューロンの海藻味刺激に対する応答についても観察した。まず、G クラスターから見て後側方に存在するニューロンについて調べた。この領域は図 18 A の赤枠内で示す位置に相当する。この領域の外側部にはすぐに軸索束が見え、それを挟んで E クラスターが存在した。この領域には中～小サイズ (<80 μ m) のニューロン細胞体が顕微鏡下で観察できた。稀に 1、2 個のやや大きいニューロン細胞体 (100~150 μ m) が G クラスター近辺に観察される場合もあった。また、この領域は、通常ニューロン細胞体が散在している様に見える場合が多いが、数例のプレパレーションでは多数のニューロンが集まって存在するよう見えたこともあった。実験では脳神経節の上皮組織を取り除いているため、この操作によりこの領域のニューロンが壊れた可能性がある。この領域に存在するニューロンの海藻味刺激に対する反応をカルシウムイメージング法により観察し、味刺激に応答するニューロンが存在するののかについて調査した。

この領域では、16 プレパレーションを用いその応答について調査し、その 1 例を図 18 に示す。この例では右脳神経節内の 5 つのニューロンを染色した (図 18 A 2)。1 番のニューロンのすぐ外側 (画面左側) には軸索束が見えた。口唇部へアオサ抽出液、又は人工海水を与えた時の、これらのニューロンの蛍光強度変化を図 18 B、C にそれぞれ示す。この 5 つのニューロン中 3 つのニューロン (1、2、3 番) で、人工海水刺激ではほとんど蛍光強度変化が見られなかったが、海藻味刺激では刺激直後から蛍光強度が大きく増加し、その後リズムカルな蛍光強度変化が生じた。これらの結果から、この領域に存在するニューロンの幾つかは、口唇部への海藻味刺激により、リズムカルなバースト発火をすると考えられる。また、これらのニューロンに生じたリズムカルな蛍光強度変化を良く見ると、それらの位相に差が生じていたことがわかる。この動物の摂食時には口球、歯舌等で様々なリズムカルな運動を生じるので、このようなニューロン発火パターンの位相差は摂食行動時に生じる何らかのパターンを表しているのかもしれない。

同様にして、先ほどの領域よりも神経節中央側に存在するニューロンの反応

について調査した。この領域は脳神経節の中央に近い領域で、背側で F クラスターと呼ばれている領域の裏側にあると考えられる。この領域に存在するほとんどのニューロンの細胞体は 50 μ m 以下のもので、ガラス微小電極を挿入したときにスパイク応答がほとんど見られないニューロンが多かった。また、この領域に存在するニューロンは、G クラスター内のニューロン等に比較して染色時、または染色後に壊れることが非常に多かった。この領域のニューロンを幾つか染色し、これまでの実験と同様に、カルシウムイメージングにて味刺激によるニューロンの応答を観察した（12 プレパレーション）。このような実験の一例を図 19 に示す。この実験では図 19 A 1 の赤枠で示す領域のニューロンをカルシウム感受性色素で染色したが、そのうち幾つかは実験前後で壊れ、その残骸が図 19 A 2 の擬似カラー像内にも見られた。口唇部への海藻味刺激および人工海水刺激を行ったときに、これらのニューロンで生じた蛍光強度変化をカルシウムイメージングにより測定した結果を図 19 B、C に示す。この 4 つのニューロンのうち 3、4 番のニューロンは、海藻味刺激に対し小さい蛍光強度変化を示したが、人工海水刺激では全く蛍光強度変化を生じなかった。これらのニューロンは海藻味刺激に対してのみスパイクを発火すると考えられる。1、2 番のニューロンは海藻味刺激、人工海水刺激どちらに対しても全く蛍光強度変化を示さなかった。この領域で口唇部への海草味刺激に対するニューロン応答をカルシウムイメージングにより観察した場合、このプレパレーション以外の全てのニューロンは、1、2 番のニューロンと同様にほとんど蛍光強度変化を示さなかった。これらのニューロンは海藻味刺激に対しスパイク応答を示さないと考えられる。最初に述べた様に、この領域のニューロンは壊れやすく、存在するニューロンの数に比較して少数のニューロンからしか応答を調べられなかったが、今回の結果からはこの領域内のニューロンは味刺激に反応するものが少なく、摂食神経回路網に関わるニューロンも G クラスターなどに比べ少ないことが類推される。

4. 前触角を動かす運動ニューロンの同定

これまでの結果で示した様に、G クラスターやその周辺領域には口唇部への味刺激に対し蛍光強度変化、すなわちスパイク発火を示すニューロンが多数存在し、それらニューロンの位置も判明した。カルシウムイメージングの実験では色素導入時に電気生理学的手法によりニューロンの性質を調べることが可能であり、これら味刺激に応答するニューロンの同定を試みた。

まず、海藻味刺激に対しリズムカルな応答を示すニューロンが存在した、G クラスターから見て後側方部の領域でニューロンの同定を試みた。この領域では、カルシウム感受性色素で染色するために刺入した電極により脱分極通電を与えることで前触角を縮ませるニューロンが存在した。このニューロンの海藻味刺激への応答をカルシウムイメージングにより観察すると、リズムカルな蛍光強度変化、もしくは長期に渡り増加する蛍光強度変化を示し、この時実際に前触角は動いていた。これらのことから、G クラスターから見て後外側に存在するニューロンの中には、前触角を縮ませるように動かす運動ニューロンが存在するのではないかと予想された。そこで、このニューロンについて詳しく調べ、同定を行った。

始めに、5(6)-carboxyfluorescein を細胞内に注入し、その形態を調べた結果を図 2 0 A に示す。このニューロンの細胞体は 80 μ m 程度の大きさで、1本の軸索を持っている。この軸索は脳神経節内で2度大きく屈曲し、同側 ATn に向かい、そこから末梢の方へと伸びていた。ATn はその途中で幾つか分枝しているが、このニューロンの軸索は ATn の最初の分枝で二股に分かれていた。このニューロンの樹状突起は、主に ATn に入るまでの神経節内軸索から生じ、ニューロパイル中に埋もれていた。

右脳神経節にあるこのニューロンに脱分極通電を与えると、図 2 1 A の横縞で示す領域で、前触角が縮むような動きが生じた。この様にこのニューロンは同側の前触角のみを収縮させる。この時生じた張力を張力計で測定した場合、ニューロンの高頻度スパイク発火が生じた後、やや遅れて大きな張力が発生した (図 2 1 B)。このニューロンが実際に運動ニューロンかどうかを調べるため、前触角の動きが生じる位置に吸引電極を取りつけ、このニューロンのスパイク

に対応した筋電位を取れるかを調べた。前触角を収縮させる筋は、前触角の内部に存在するため、動きの生じる領域に直接吸引電極を取りつけても筋電位は観察できなかった。そこで、この領域の外表皮の一部を内部の筋が傷つかない様に注意して取り除き、そこへ吸引電極を取りつけ筋電位を測定した。図 2 1 C にその一例を示す。また、この結果の一部を拡大したものを図 2 1 D に示す。このニューロンのスパイクと筋電位は一定の遅れをとって 1 : 1 に対応していた ($\text{latency}=65.8 \pm 1.1\text{ms}$ (mean \pm SD)) ことから、この結合は単シナプス性であると考えられる。これらの結果は、このニューロンが実際に運動ニューロンであることを示している。そこでこのニューロンを前触角短縮運動ニューロン (anterior tentacle shortening motoneuron, ATS) と名づけた。

口唇部ヘアオサ抽出液を与えたときの、ATS の膜電位変化の例を図 2 1 E に示す。海藻味刺激により ATS には高頻度スパイク発火とそれに続くややリズムカルなバーストが誘発された。これらの結果より、摂食時、このニューロンの動きによりリズムカルな前触角の動きが生じるのではないかと考えられる。

5. 口唇を開閉させる運動ニューロンの同定

カルシウムイメージングの実験で、G クラスタ内では側方部に存在するニューロンにおいて口唇部への海藻味刺激に対する応答が特に多く見られた。この領域には G クラスタの中では比較的小さめから中サイズのニューロン (50~100 μm) が集まっており、これらのニューロンの中には、カルシウム感受性色素を負荷するために刺入した電極より脱分極通電を与えられることで口唇部や前触角を動かすものが存在した。これらのうち、口唇部を開く動きを生じさせるニューロンと、閉じる動きを生じさせるニューロンに着目し、この二つのニューロンの同定を行った。

まず、口唇部を開く動きを生じさせるニューロンの形態を、5(6)-carboxyfluorescein を注入することで調査した結果の一例を図 2 0 B に示す。このニューロンは G クラスタ内の前側方部に細胞体があり、1本の軸索を持っていた。腹側から G クラスタを見た場合、このニューロンの細胞体は他のニューロン細胞体の下に埋まっている場合もあった。軸索は M クラスタの後側

を通り同側 ATn より口唇部へ向かっていた。樹状突起は細胞体から ATn に入る前の神経節内軸索より生じていた。

このニューロンの機能と性質を電気生理学的実験により調べた結果を図 2 2 に示す。図 2 2 A では、右脳神経節内に存在するこのニューロンを興奮させたとき動きが生じる位置を横縞で、動きの方向を矢印で示す。このニューロンの活動により同側の口唇部で非常に明らかな開方向の動きが生じ、容易に他のニューロンと区別できた。この時の張力を測定すると、口唇開方向への大きな張力を観察できた (図 2 2 B)。このニューロンが実際に運動ニューロンであるかを調べるため、外表皮を剥ぎ取ることで内部の筋を露出させ、そこから筋電位を測定した結果、このニューロンのスパイクに 1 : 1 に対応して筋電位が生じた。(図 2 2 C) さらにこれを確認するため、このニューロンのスパイクと筋電位を重ね合わせて表示すると (図 2 2 D)、このニューロンのスパイクと筋電位は常に一定の遅れ ($60.6 \pm 0.7 \text{ms}$ (mean \pm SD)) を伴い生じたことが明らかであり、この結合は単シナプス性であると考えられる。以上の結果より、このニューロンは口唇を開方向に動かす運動ニューロンであることが判明し、このニューロンを開口唇運動ニューロン (lip opening motor neuron in G cluster, LO_G) と名づけた。また、口唇部への海藻味刺激を行ったときに生じるこのニューロンの膜電位変化を図 2 2 E に示している。LO_G では海藻味刺激後、非常にリズムミカルなバースト発火が観察された。

同様にして口唇を閉じる動きを生じさせるニューロンの同定を行った。このニューロンの形態を 5(6)-carboxyfluorescein を注入することで調査した結果の一例を図 2 0 C に示す。このニューロンは G クラスタ内の後側方部に細胞体があり、1本の軸索を持っていた。細胞体の大きさはほぼ LO_G と同じ大きさであった。軸索はまっすぐ外側に向かい、同側 ATn に入り口唇部へ向かっていた。樹状突起は細胞体から ATn に入る前の神経節内軸索より生じていた。これまでその形態を示してきた ATS、LO_G、そしてこのニューロンの樹状突起は皆ほぼ同じ領域に存在し、同じような経路を通る軸索を持っていることに気付く。

図 2 3 A では、右脳神経節内に存在するこのニューロンを興奮させたとき動きが生じる位置を横縞で、動きの方向を矢印で示す。このニューロンは、LO_G が動かす領域とほぼ同じ部位を動かし、その方向は LO_G の動きとは逆方向で、

口を尖らせるような動きを生じさせた。実際にこのニューロンが運動ニューロンであるかを調べるため、図 2 3 A の横縞の位置から筋電位を測定すると、このニューロンのスパイクと一定の遅れ ($68.2 \pm 0.8 \text{sec}$ (mean \pm SD)) を取り 1 : 1 に対応する筋電位が観察された (図 2 3 B)。これらの結果から、このニューロンは口唇部を閉方向に動かす運動ニューロンであることが判明し、閉口唇運動ニューロン (lip close motor neuron in G cluster, LC_G) と名付けた。

LO_G と LC_G の両方の細胞体にガラス微小電極を刺入し、口唇部へアオサ抽出液を与え刺激した結果を図 2 4 に示す。アオサ抽出液刺激により、 LO_G には直ちに大きな脱分極が生じ、高頻度のスパイクを発生したが、 LC_G は徐々に脱分極が大きく、スパイク発火頻度が高くなった。そしてその後、 LO_G と LC_G 共にリズムカルなバースト発火を生じた。これらのバースト発火の位相は LO_G と LC_G の間で少しずれており、 LO_G の方が先に発火を開始し、先に発火を終えるようなパターンが見られた。また、これらのニューロンには一部同期した興奮性又は抑制性の入力が見られた。

考察

1. カルシウムイメージング法を用いたニューロンの探索

本実験では、多数ニューロンの活動を同時に観察するカルシウムイメージング法を利用し、アメフラシ脳神経節内で海藻味刺激に応答するニューロンの探索を行った。アメフラシの脳神経節内では、ニューロンがいくつかの房のように集まって存在しており、これをクラスターとして分類している (Jahan-Parwar and Fredman, 1976)。それぞれのクラスター内には多数のニューロンが属し、そのうち幾つかについては電気生理学的にその性質や機能が調べられ、一部は摂食神経回路網に関わることが示されている (Chiel et al., 1986, 1988; Fox and Lloyd, 1998; Hurwitz et al., 1999; Perrins and Weiss, 1996, 1998; Rosen et al., 1979, 1982, 1991; Sánchez et al., 2000; Teyke et al., 1990; Weiss and Kupfermann, 1976)。しかし、味刺激に関してはほとんどのニューロンで研究されておらず、どの辺りのどれくらい数のニューロンが応答を示すのか、その応答はどのようなものなのかは不明である。味刺激に応答するニューロンは摂食行動に関与している可能性が高く、このようなニューロンを探し出し、その機能を調べることは摂食神経回路網の研究を進める上で重要であると考えられる。脳神経節内にはまだ研究されていないニューロンが多数存在し、これらの中に味刺激に応答し、摂食行動に際し重要な働きを持つものが残されていると考えられる。このようなニューロンを探し出すためには、1つ1つニューロンを調べ上げていくよりも、多数のニューロン活動を同時に観察する方がはるかに効率的である。

今回はこのような実験を行うため、カルシウムイメージング法を利用した。前章で述べた様に、アメフラシニューロンではカルシウムイメージング法を利用することによりニューロンのスパイク活動を検出することができる。他の研究で、電位感受性色素を用い、多数ニューロンの活動を観察、解析した報告も存在するが (Wu et al., 1994)、電位感受性色素の毒性や褪色の早さ、蛍光強度変化の小ささ、特殊な装置が必要であること等多数の問題があり、本実験では用いていない。またアメフラシでは最高7つのニューロンを同時に電気生理学的に記録した報告もあるが (Church and Lloyd, 1994)、このような測定は技術的

に非常に困難で、また、それより多数のニューロン活動を記録することは物理的に不可能に近い。これらに比べ、カルシウムイメージングは技術的にも易しく、多数のニューロン活動を長時間記録するのに優れている。

動物の行動中のニューロン応答を観察するには、解剖を行わず元のままの動物を用いて海藻味刺激により生じる多数のニューロンの応答を同時に観察するような実験が最も望ましい。しかし、このような実験を行うことは現在の技術では不可能だと考えられる。これまでの研究により、日本産アオフラシではアオサを好んで食べることが知られており (Nagahama and shin, 1998)、reduced preparation を用いることで、口唇部へのアオサ抽出液刺激により摂食応答が発現することが知られている (Nagahama et al., 1999)。このような報告から、reduced preparation を用いカルシウムイメージング法で口唇部への海藻味刺激を行った時のニューロン活動を観察することで、脳神経節内で生じる摂食応答が観察されることが考えられる。

2. 海藻味刺激により生じる脳神経節内ニューロンの活動

脳神経節内のニューロンのうち、摂食行動に関与するものは主に M クラスタや E クラスタで研究が進んでいる (Hurwitz et al., 1999; Morgan et al., 2000; Perrins and Weiss, 1996,1998; Rosen et al., 1991; Xin et al., 1999)。しかし G クラスタのニューロンは細胞体が大きく、電気生理学的手法を用いることが容易であるにもかかわらず、MCC を除き (Fox and Lloyd, 1998; Koh and Jacklet, 1999; Rosen et al., 1989; Weiss and Kupfermann, 1976) ほとんど機能がわかっていない。今回の実験で、口唇部への海藻味刺激に対し、このクラスタに存在する多数のニューロンが応答を示すことが判明した。これらの味刺激に応答したニューロンは、位置的には G クラスタ内の側方部に多く見られ、中央部にある多数の巨大なニューロンはほとんど応答を示さなかった。カルシウムイメージングで得られた蛍光強度変化の結果から、このクラスタには、海藻味刺激によりリズムカルなバーストが長期に続くようなニューロンや、長期に渡り発火を続けるニューロン、刺激時に一過的なスパイク応答を示すニューロン、ほとんどスパイクを発火しないニューロン等様々なニューロンが存在することが予想さ

れる。これらニューロンのスパイク応答の違いは、えら引っ込め反射の場合と同様に、摂食行動におけるそれぞれのニューロンの機能差異を示しているかもしれない (Zochowski et al., 2000)。幾つかのプレパレーションでは、口唇部への海藻味刺激により、非常に早いリズムミカルな応答 (0.5~2Hz) を示したニューロンが存在した。膜電位の振動は、嗅覚で重要な働きをしていることが報告されており (Gelperin, 1999)、また同期した膜電位の振動は脊椎動物の脳で高次の機能を果たすために必須であると考えられている (Singer, 1993)。無脊椎動物では、ナメクジ (*Limax*) の PC ロープで、その中にある Bursting ニューロンの活動のため、局所場電位 (local field potential) が振動することが報告されている (Delaney et al., 1994; Kleinfeld et al., 1994)。アメフラシ G クラスター内で非常に早いリズムミカルな蛍光強度変化を示すニューロンは、早いサイクルのバースト発火をしていると考えられ、この活動は *Limax* の PC ロープにある Bursting ニューロンの活動と似ており、同様の機能を持っているのかもしれない。

また、G クラスターの周辺領域でも、口唇部への海藻味刺激に対し応答を示すニューロンが幾つか存在した。G クラスターの後側方部にある領域に存在するニューロンの幾つかは、口唇部への海藻味刺激に対しリズムミカルな蛍光強度変化を示した。この領域に存在するニューロンに関する研究報告は全く無く、本実験においてはじめて、この領域内のニューロンが海草味刺激に反応を示すことが判明し、摂食行動に関与している可能性が示唆された。この領域より神経節中央側の領域に存在するニューロンでは、口唇部への海藻味刺激に対しほとんど応答を観察できなかった。この領域は脳神経節を背側から見た場合 F クラスターといわれている領域で、このクラスター表層にある CF_Tニューロンは、ATn を刺激することで過分極することが報告されている (Rubakhin et al., 1999)。口唇部へ与えられた味情報の一部は ATn を通じ脳神経節内に伝えられると考えられており (Jahan-Parwar, 1972)、このようなニューロンは口唇部への味刺激や触刺激により抑制される可能性がある。これと同様に、今回調査したこの領域に存在するニューロンも、口唇部への味刺激により抑制入力を受けている可能性がある。

カルシウムイメージングでは 1 発のスパイクのような小さな活動を捉えるこ

とは難しく、スパイク応答は生じているのだがそれを捉えきれていない可能性もある。このことから、今回の実験で海藻味刺激に対し蛍光強度変化を示さなかったニューロンの中に低頻度でスパイクを発火しているものが存在するかもしれない。このような活動を捕捉するためには、より高感度の実験手法が必要になってくる。このような問題も残ってはいるが、今回の実験で明らかになった海藻味刺激に反応するニューロンについては、今後これらの機能や、すでに同定済みのニューロンとの結合様式の解析などが必要になるだろう。また、他の神経節や脳神経節の他のクラスターにおいても、同様の方法を用い味刺激に反応するニューロンを探ってみることも必要だと思われる。

3. 前触角短縮運動ニューロン、開口唇運動ニューロンと閉口唇運動ニューロン

カルシウムイメージングの実験では、口唇部への海藻味刺激により G クラスター内やその周辺領域において幾つかりズミカルな蛍光強度変化を示すニューロンが存在した。ニューロンのリズムカルな活動は動物のリズムカルな運動を生じさせるために重要であり、これらのニューロンが様々な神経回路網の中で重要な働きを担っている可能性がある。本実験で、口唇部への味刺激によりリズムカルな蛍光強度変化を示した幾つかのニューロンは、電気生理学的に詳しく調べた結果、口唇部または前触角を支配する運動ニューロンであることが判明した。

通常アメフラシは、摂食時に口球、歯舌、口唇が明らかにリズムカルな運動を示す。前触角の動きは摂食時に見られる場合もあるが、必ずしも常に生じるわけではなく、判別も難しい。摂食時における前触角の動きには、例えば食物の保持等を強めるなどの機能が考えられるが、詳しくは判っていない。しかし、今回使用したほとんどのプレパレーションでは、口唇部へ海藻抽出液を与えることにより明らかな前触角の動きが生じた。この前触角の動き、特に縮ませるような動きの一部は、今回新たに同定した前触角短縮運動ニューロン (ATS) の動きにより生じると考えられる。カルシウムイメージングの実験ではこの領域で3~4個のリズムカルな応答が見られる場合があったことや、電気生理学

的実験でこの領域のニューロンを調べたとき、まれに前触角の先端側を動かすようなニューロンが見つかることもあったことから、この領域には前触角の異なる領域を動かす運動ニューロンが片側に数個存在している可能性がある。

このような、触角を短縮させる動きは動物の防御反応にも関与している可能性がある。例えば、マイマイ (*Helix*) では、脳神経節内にある C3 ニューロンが触角の運動ニューロンであることが知られており、これが触角引っ込め反射に関わることが知られている (Chase and Hall, 1996; Prescott and Chase, 1999; Prescott et al., 1997)。アメフラシでは、防御行動である頭部引っ込め反射の一部は、摂食行動には関与しない B クラスターニューロンにより生じているという報告がある (Teyke et al., 1989)。アメフラシの口唇部や前触角に侵害刺激を与えた場合、前触角の引っ込め反応も生じることから、今回新規同定された ATS は B クラスターニューロンと関連して、この動物の防御反応にも関与しているかもしれない。

本実験では、ATS 以外に、口唇部を動かす開口唇運動ニューロン (LO_G) と閉口唇運動ニューロン (LC_G) を同定した。アメフラシ (*Aplysia californica*) の脳神経節 E クラスター内では、C15、C16、C17 が同側の inner lip を動かし、口を開かせる運動ニューロンであると報告されている (Perrins and Weiss, 1996)。C15、C16、C17 はそれぞれ前、中、後方の inner lip を動かすのに対し、 LO_G 、 LC_G は outer lip を開又は閉方向に動かした。この違いは動物の行動時におけるこれらのニューロンの役割が異なることを示唆するかもしれない。

動物の規則的な行動には、CPG が関与していると考えられる。今回同定した3種の運動ニューロンもリズムカルな発火パターンを示し、これらのニューロンの発火パターンは CPG により形成されていると考えられる。今回の実験で用いたプレパレーションは、口唇部、前触角、脳神経節からのみで構成され、口球や口球神経節など他の要素は全て取り払われている。それにも関わらず、このプレパレーションでは口唇部に海藻抽出液を与えることで、今回同定したニューロンにリズムカルな発火パターンを生じさせた。これより、ATS、 LO_G 、 LC_G の発火パターンを形成する CPG は脳神経節内、もしくは末梢領域に存在すると考えられる。これは、Perrins と Weiss (1996) の見解と一致する。現在のところ、ATS、 LO_G 、 LC_G の発火パターンを形成する CPG については何も解ら

ないが、単離標本で他のニューロンにリズムカルなスパイク活動を誘発させることの出来る脳神経節内のニューロンである C15 や CBI (CB_M) 等がこれらニューロンの CPG に関与しているかもしれない (Hurwitz et al., 1999; Narusuye and Nagahama, in press; Perrins and Weiss, 1996; Rosen et al., 1991)。

口唇部への海藻抽出液刺激により生じた LO_G と LC_G の発火パターンは、これまでに口球神経節内で同定され研究されてきた JO、JC ニューロンの発火パターンとよく似ている (Nagahama and Takata, 1988)。LO_G と LC_G では、口唇部への海藻味刺激により生じるリズムカルなバースト発火において、LO_G が常に先に発火開始し先に発火を終え、更にこの2つのニューロンは完全に逆位相で発火するのではなく、一部発火時期が重なり合っていた。JO と JC では、JO が先に発火開始し先に発火を終え、2つのニューロンの発火時期はやはり一部重なり合っている。このような発火パターンは、口唇や口球を開く、閉じるという完全に逆の運動が生じる場合でさえ、それぞれの運動が同種の運動ニューロンの活動のみにより生じるのではなく、むしろ逆の働きを持つ運動ニューロンとの協調により絶妙に調節されている可能性を示唆している。また、一連の摂食行動において、口球、歯舌、口唇の動きは協調しているはずであり、LO_G や LC_G をリズムカルに駆動させる CPG と、口球神経節内にある摂食 CPG とは協調している可能性が高いと予想される。今後、これらのニューロンの CPG を明らかにし、現在までにすでに同定されている摂食神経回路網 (Cohen et al., 1978; Evans and Cropper, 1998; Hurwitz et al., 1994; Morton and Chiel, 1993a, 1993b; Nagahama and Takata, 1988, 1989, 1990) との関連を明らかにすることで、動物に行動を起こさせる神経機構の一端をより明らかにしていきたい。

4. まとめ

本実験では、アメフラシの脳神経節において、カルシウムイメージング法を用いることで口唇部への海藻味刺激により生じる多数ニューロンの活動を同時記録した。これにより、今まであまり機能が調べられていなかった脳神経節内の領域で、多数のニューロンが味刺激に応答していることが示され、それらニューロン細胞体の位置情報やその活動に関する情報がもたらされた。これらの

ニューロンは、摂食行動時に何らかの役割を担っているニューロンであるかもしれない。さらに、これらのニューロンの一部を電気生理学的に詳しく調べることで、幾つかのニューロンを同定することができた。このように、イメージング法と電気生理学的手法を組み合わせ用いることで、動物の行動に関わるニューロンを今までより効率良く同定できると考えられる。今回の研究を発展させれば、動物行動を支配している神経機構について新たな知見が得られるかもしれない。

引用文献

Baker PF, Hodgkin AL, Ridgeway EB (1971) Depolarization and calcium entry in squid giant axons. *J. Physiol. (Lond.)* **218**: 709-755

Blatter LA, Wier WG (1990) Intracellular diffusion, binding, and compartmentalization of the fluorescent calcium indicators indo-1 and fura-2. *Biophys. J.* **58**: 1491-1499

Blumenfeld H, Spira ME, Kandel ER, Siegelbaum SA (1990) Facilitatory and inhibitory transmitters modulate calcium influx during action potential in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron* **5**: 487-499

Borovikov D, Evans CG, Jing J, Rosen SC, Cropper EC (2000) A proprioceptive role for an exteroceptive mechanosensitive neuron in *Aplysia*. *J. Neurosci.* **20**: 1990-2002

Bright GR, Kuo NT, Chow D, Burden S, Dowe C, Przybylski RJ (1996) Delivery of macromolecules into adherent cells via electroporation for use in fluorescence spectroscopic imaging and metabolic studies. *Cytometry* **24**: 226-233

Brown JE, Cohen LB, DeWeer P, Pinto LH, Ross WN, Salzberg BM (1975) Rapid changes of intracellular free calcium concentration. *Biophys. J.* **15**: 1155-1160

Byrne JH, Kandel ER (1996) Presynaptic facilitation revisited: State and time dependence. *J. Neurosci.* **16**: 425-435

Carew TJ, Pinsker HM, Kandel ER (1972) Long-term habituation of a defensive withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science* **175**: 451-454

Chase R, Hall B (1996) Nociceptive inputs to C3, a motoneuron of the tentacle withdrawal reflex in *Helix aspersa*. *J. Comp. Physiol. A* **179**: 809-818

Chen YH, Chow SN, Tsai MC (1998) Ratiometric confocal Ca^{2+} measurements with visible wavelength indicators in *d*-amphetamine-treated central snail neuron. *Gen. Pharmac.* **31**: 783-788

Chiel HJ, Kupfermann I, Weiss KR (1988) An identified histerminergic neuron can modulate the outputs of buccal-cerebral interneurons in *Aplysia* via presynaptic inhibition. *J. Neurosci.* **8**: 49-63

Chiel HJ, Weiss KR, Kupfermann I (1986) An identified histerminergic neuron modulates feeding motor circuitry in *Aplysia*. *J. Neurosci.* **6**: 2427-2450

Church PJ, Lloyd PE (1994) Activity of multiple identified motor neurons recorded intracellularly during evoked feedinglike motor programs in *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* **72**: 1794-1809

Cleary LJ, Byrne JH (1993) Identification and characterization of a multifunction neuron contributing to defensive arousal in *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* **70**: 1767-1776

Cohen JL, Weiss KR, Kupfermann I (1978) Motor control of buccal muscle in *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* **41**: 157-180

Cox KJA, Fetcho JR (1996) Labeling blastomeres with a calcium indicator: a non-invasive method of visualizing neuronal activity in zebrafish. *J. Neurosci. Methods* **68**: 185-191

Delaney KR, Gelperin A, Fee MS, Flores JA, Gervais R, Tank DW, Kleinfeld D (1994) Waves and stimulus-modulated dynamics in an oscillating olfactory network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 669-673

Dowdall MJ, Green AC, Richardson CM (1997) Dynamic imaging of functional nerve terminals and schwann cell in presynaptic 'nerve plates' isolated from the skate electric organ. *J. Exp. Biol.* **200**: 161-171

Edmonds B, Klein M, Dale N, Kandel ER (1990) Contribution of two types of calcium channels to synaptic transmission and plasticity. *Science* **250**: 1142-1147

Eliot LS, Kandel ER, Siegelbaum SA (1993) Imaging terminals of *Aplysia* sensory neurons demonstrates role of enhanced Ca^{2+} influx in presynaptic facilitation. *Nature* **361**: 634-637

Evans C, Cropper EC (1998) Proprioceptive input to feeding motor programs in *Aplysia*. *J. Neurosci.* **18**: 8016-8031

Fetcho JR, O'Malley DM (1995) Visualization of active neural circuitry in the spinal cord of intact zebrafish. *J. Neurophysiol.* **73**: 399-406

Fossier P, Baux G, Tauc L (1994) Presynaptic mechanisms regulating Ca^{2+} concentration triggering acetylcholine release at an identified neuro-neuronal synapse of *Aplysia*. *Neurosci.* **63**: 405-414

Fox LE, Lloyd PE (1998) Serotonergic neurons differentially modulate the efficacy of two motor neurons innervating the same muscle fibers in *Aplysia*. *J. Neurophysiol* **80**: 647-655

Friel DD, Tsien RW (1992) A caffeine- and ryanodine-sensitive Ca^{2+} store in bullfrog sympathetic neurons modulates effects of Ca^{2+} entry on $[Ca^{2+}]_i$. *J. Physiol. (Lond.)* **450**: 217-246

Fritzsche B (1993) Fast axonal diffusion of 3000 molecular weight dextran amines. *J. Neurosci. Methods* **50**: 95-103

Frost WN, Kandel ER (1995) Structure of the network mediating siphon-elicited siphon withdrawal in *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* **73**: 2413-2427

Gelperin A (1999) Oscillatory dynamics and information processing in olfactory systems. *J. Exp. Biol.* **202**: 1855-1864

Gerday C, Bolis L, Gilles R (1988) Calcium and calcium binding proteins. *Springer-Verlag, Berlin, Germany*

Gift EA, Weaver JC (2000) Simultaneous quantitative determination of electroporative molecular uptake and subsequent cell survival using gel microdrops and flow cytometry. *Cytometry* **39**: 243-249

Gorman ALF, Thomas MV (1978) Changes in the intracellular concentration of free calcium ions in a pace-maker neuron, measured with the metallochromic indicator dye Arsenazo III. *J. Physiol. (Lond.)* **275**: 357-376

Hall JD, Lloyd PE (1990) Involvement of pedal peptide in locomotion in *Aplysia*: Modulation of foot muscle contractions. *J. Neurobiol.* **21**: 858-868

Haugland RP (2001) Handbook of fluorescent probes and research products. *Molecular Probes, Eugene, OR*

Hodgkin AL, Huxley AF (1939) Action potentials recorded from inside a nerve fiber. *Nature* **144**: 710-711

Hurwitz I, Goldstein RS, Susswein AJ (1994) Compartmentalization of pattern-initiation and motor functions in B31 and B32 neurons of the buccal ganglia of *Aplysia californica*. *J. Neurophysiol.* **71**: 1514-1527

Hurwitz I, Kupfermann I, Susswein AJ (1997) Different roles of neurons B63 and B34 that are active during the protraction phase of buccal motor programs in *Aplysia californica*. *J. Neurophysiol.* **78**: 1305-1319

Hurwitz I, Perrins R, Xin Y, Weiss KR, Kupfermann I (1999) C-PR neuron of *Aplysia* has differential effects on “feeding” cerebral interneurons, including myomodulin-positive CBI-12. *J. Neurophysiol.* **81**: 521-534

Iino M, Ozawa S, Tsuzuki K (1990) Permeation of calcium through excitatory amino acid receptor channels in cultured rat hippocampal neurones. *J. Physiol. (Lond.)* **424**: 151-165

Jaffe DB, Johnston D, Lasser-Ross N, Lisman JE, Miyakawa H, Ross WN (1992) The spread of Na⁺ spikes determines the pattern of dendritic Ca²⁺ entry into hippocampal neurons. *Nature* **357**: 244-246

Jahan-Parwar B (1972) Behavioral and electrophysiological studies on chemoreception in *Aplysia*. *Am. Zoologist* **12**: 525-537

Jahan-Parwar B, Fredman SM (1976) Cerebral ganglion of *Aplysia*: Cellular organization and origin of nerves. *Comp. Biochem. Physiol.* **54**: 347-357

Jonas EA, Knox RJ, Caitlin T, Smith M, Wayne NL, Connor JA, Kaczmarek LK (1997) Regulation by insulin of a unique neuronal Ca²⁺ pool and of neuropeptide secretion. *Nature* **385**: 343-346

Kandel ER (1976) Cellular basis of behavior. *Freeman, San Francisco, CA*

Kandel ER (1979) Behavioral biology of *Aplysia*. *Freeman, San Francisco, CA*

Kanwisher N, McDermott J, Chun MM (1997) The fusiform face area: A module in human extrastriate cortex specialized for face perception. *J. Neurosci.* **17**: 4302-4311

Kerr R, Lev-Ram V, Baird G, Vincent P, Tsien RY, Schafer WR (2000) Optical imaging of calcium transients in neurons and pharyngeal muscle of *C. elegans*. *Neuron* **26**:583-594

Kits KS, Dreijer AMC, Lodder JC, Borgdorff A, Wadman WJ (1997) High intracellular calcium levels during and after electrical discharges in molluscan peptidergic neurons. *Neuroscience* **79**: 275-284

Kleinfeld D, Delaney KR, Fee MS, Flores JA, Tank DW, Gelperin A (1994) Dynamics of propagating waves in the olfactory network of a terrestrial mollusc: An electrical and optical study. *J. Neurophysiol.* **72**: 1402-1419

Knox RJ, Jonas EA, Kao L, Smith PJS, Connor JA, Kaczmarek LK (1996) Ca²⁺ influx and activation of a cation current are coupled to intracellular Ca²⁺ release in peptidergic neurons of *Aplysia californica*. *J. Physiol. (Lond)* **494**: 627-639

Koepp MJ, Gunn RN, Lawrence AD, Cunningham VJ, Dagher A, Jones T, Brooks DJ, Bench CJ, Grasby PM (1998) Evidence for striatal dopamine release during a video game. *Nature* **393**: 266-268

Koh H, Jacklet J (1999) Nitric oxide stimulates cGMP production and mimics synaptic responses in metacerebral neurons of *Aplysia*. *J. Neurosci.* **19**: 3818-3826

Kostyuk PG, Verkhratsky AN (1995) Calcium signaling in the nervous system. *John Wiley & Sons, West Sussex, U.K.*

Kyrozis A, Goldstein PA, Heath MJS, MacDermott AB (1995) Calcium entry through a subpopulation of AMPA receptors in rat dorsal horn neuron. *J. Physiol (Lond.)* **485**: 373-381

Lam K, Kakigi R, Mukai T, Yamasaki H (2001) Attention and visual interference stimulation affect somatosensory processing: A magnetoencephalographic study. *Neurosci.* **104**: 689-703

Lechner HA, Baxter DA, Byrne JH (2000a) Classical conditioning of feeding in *Aplysia*: I. Behavioral analysis. *J. Neurosci.* **20**: 3369-3376

Lechner HA, Baxter DA, Byrne JH (2000b) Classical conditioning of feeding in *Aplysia*: II. Neurophysiological correlates. *J. Neurosci.* **20**: 3377-3386

Lev-Ram V, Miyakawa H, Lasser-Ross N, Ross WN (1992) Calcium transients in cerebellar Purkinje neurons evoked by intracellular stimulation. *J. Neurophysiol.* **68**: 1167-1177

Lev-Tov A, O'Donovan MJ (1995) Calcium imaging of motoneuron activity in the en-bloc spinal cord preparation of the neonatal rat. *J. Neurophysiol.* **74**: 1324-1334

Lipscombe D, Madison DV, Poenie M, Reuter H, Tsien RY, Tsien RW (1988) Spatial distribution of calcium channels and cytosolic calcium transients in growth cones and cell bodies of sympathetic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 2398-2402

Luby-Phelps K (1989) Preparation of fluorescently labeled dextrans and Ficolls. *Methods Cell Biol.* **29**: 59-73

Ma M, Koester J (1995) Consequences and mechanisms of spike broadening of R20 cells in *Aplysia californica*. *J. Neurosci.* 15: 6720-2734

Magoski NS, Knox RJ, Kaczmarek LK (2000) Activation of Ca²⁺-permeable cation channel produces a prolonged attenuation of intracellular Ca²⁺ release in *Aplysia* bag cell neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 522:271-283

Manning Jr TJ, Sontheimer H (1999) Recording of intracellular Ca²⁺, Cl⁻, pH and membrane potential in cultured astrocytes using a fluorescence plate reader. *J. Neurosci. Methods* 91: 73-81

Matsumoto Y, Nagahama T (2000) Taste learning appeared in the food preference behavior of *Aplysia kurodai*. *Soc. Neurosci. Abstr.* 26: 2034

Mayer ML, Westbrook GL (1987) Permeation and block of *N*-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 349: 501-527

McClellan AD, McPherson D, O'Donovan MJ (1994) Combined retrograde labeling and calcium imaging in spinal cord and brainstem neurons of the lamprey. *Brain Res.* 663: 61-68

McPherson DR, Blankenship JE (1992) Neuronal modulation of foot and body-wall contractions in *Aplysia californica*. *J. Neurophysiol.* 67: 23-28

Midtgaard J, Lasser-Ros N, Ross WN (1993) Spacial distribution of Ca²⁺ influx in turtle Purkinje cell dendrites in vitro: Role of a transient outward current. *J. Neurophysiol.* 70: 2455-2469

Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY (1997) Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388**: 882-887

Morgan PT, Perrins R, Lloyd PE, Weiss KR (2000) Intrinsic and extrinsic modulation of a single central pattern generating circuit. *J. Neurophysiol.* **84**: 1186-1193

Morton DW, Chiel HJ (1993a) In vivo buccal nerve activity that distinguishes ingestion from rejection can be used to predict behavioral transients in *Aplysia*. *J. Comp. Physiol. A* **172**: 17-32

Morton DW, Chiel HJ (1993b) The timing of activity in motor neurons that produce radula movements distinguishes ingestion from rejection in *Aplysia*. *J. Comp. Physiol. A* **173**: 519-536

Mothet JP, Fossier P, Tauc L, Baux G (1996) Opposite actions of nitric oxide on cholinergic synapse: Which pathways? *Proc Natl. Acad. Sci.* **93**: 8721-8726

Nagahama T, Inoue M (1999) Diverse motor neurons produce jaw-opening at radula-protraction phase during the consummatory feeding response in *Aplysia kurodai*. *Soc. Neurosci. Abstr.* **25**: 1646

Nagahama T, Narusuye K, Arai H (1999) Synaptic modulation contributes to firing pattern generation in jaw motor neurons during rejection of seaweed in *Aplysia kurodai*. *J. Neurophysiol.* **82**: 2579-2589

Nagahama T, Shin N (1998) Patterned jaw movements and the motor neuron activity during rejection of seaweed in *Aplysia kurodai*. *J. Comp. Physiol. A* **182**: 551-562

Nagahama T, Takata M (1988) Food-induced firing patterns in motoneurons producing jaw movements in *Aplysia kurodai*. *J. Comp. Physiol. A* **162**: 729-738

Nagahama T, Takata M (1989) Neural mechanism generating firing patterns in jaw motoneurons during the food-induced response in *Aplysia kurodai*. I. Identification and characterization of premotor neurons. *J. Comp. Physiol. A* **166**: 143-150

Nagahama T, Takata M (1990a) Neural mechanism generating firing patterns in jaw motoneurons during the food-induced response in *Aplysia kurodai*. II. Functional role of premotor neurons on generation of firing patterns in motoneurons. *J. Comp. Physiol. A* **166**: 277-286

Nagahama T, Takata M (1990b) Innervation of buccal muscles by multifunctional MA1 neurons in *Aplysia kurodai*. *J. Comp. Physiol. A* **167**: 1-10

Narusuye K, Nagahama T Cerebral CB_M1 neuron contributes to synaptic modulation appeared during rejection of seaweed in *Aplysia kurodai*. *In press*

Neher E, Sakmann B, Streinbach JH (1978) Extracellular patch clamp: A method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflügers Arch.* **375**: 219-228

Nishizuka Y (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **258**: 607-614

Nowicky MC, Fox AP, Tsien RW (1985) Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* **316**: 440-443

O'Donovan MJ, Ho S, Sholomenko G, Yee W (1993) Real-time imaging of neurons retrogradely and anterogradely labeled with calcium-sensitive dyes. *J. Neurosci. Methods* **46**: 91-106

O'Malley DM, Kao Y, Fecho JR (1996) Imaging the functional organization of zebrafish hindbrain segments during escape behaviors. *Neuron* **17**: 1145-1155

Perrins R, Weiss KR (1996) A cerebral central pattern generator in *Aplysia* and its connections with buccal feeding circuitry. *J. Neurosci.* **16**: 7030-7045

Perrins R, Weiss KR (1998) Compartmentalization of information processing in *Aplysia* feeding circuit interneuron through membrane properties and synaptic interneurons. *J. Neurosci.* **18**: 3977-3989

Peterlin ZA, Kozloski J, Mao, BQ, Tsiola A, Yuste R (2000) Optical probing of neuronal circuits with calcium imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 3619-3624

Plummer MR, Kirk MD (1990) Premotor neurons B51 and B52 in the buccal ganglia of *Aplysia californica*: Synaptic connections, effects on ongoing motor rhythms, and peptide modulation. *J. Neurophysiol.* **63**: 539-558

Popov S, Poo MM (1992) Diffusional transport of macromolecules in developing nerve processes. *J. Neurosci.* **12**: 77-85

Prescott SA, Chase R (1999) Sites of plasticity in the neural circuit mediating tentacle withdrawal in the snail *Helix aspersa*: Implications for behavioral change and learning kinetics. *Learning and Memory* **6**: 363-380

Prescott SA, Gill N, Chase R (1997) Neural circuit mediating tentacle withdrawal in *Helix aspersa*, with specific reference to the competence of the motor neuron C3. *J. Neurophysiol.* **78**: 2951-2965

Quintero JE, McMahon DG (1999) Serotonin modulates glutamate responses in isolated suprachiasmatic nucleus neurons. *J. Neurophysiol.* **82**: 533-539

Raymond JL, Byrne JH (1994) Distributed input to the tail-siphon withdrawal circuit in *Aplysia* from neurons in the J cluster of the cerebral ganglion. *J. Neurosci.* **14**: 2444-2454

Regan LJ (1991) Voltage-dependent calcium currents in purkinje cells from rat cerebellar vermis. *J. Neurosci.* **11**: 2259-2269

Regehr WG, Atluri PP (1995) Calcium transients in cerebellar granule cell presynaptic terminals. *Biophys. J.* **68**: 2156-2170

Regehr WG, Tank DW (1992) Calcium concentration dynamics produced by synaptic activation of CA1 hippocampal pyramidal cells. *J. Neurosci.* **12**: 4202-4223

Rose RM, Benjamin PR (1981a) Interneuronal control of feeding in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. I. Initiation of feeding cycles by a single buccal interneuron. *J. Exp. Biology* **92**: 187-201

Rose RM, Benjamin PR (1981b) Interneuronal control of feeding in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. II. The interneuronal mechanism generating feeding cycles. *J. Exp. Biology* **92**: 203-228

Rosen SC, Miller MW, Evans CG, Cropper EC, Kupfermann I (2000a) Diverse synaptic connections between peptidergic radula mechanosensitive neurons and neurons in the feeding system of *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* **83**: 1605-1620

Rosen SC, Miller MW, Evans CG, Cropper EC, Kupfermann I (2000b) Outputs of radula mechanosensitive neurons in *Aplysia* are modulated by motor neurons, interneurons, and sensory neurons. *J. Neurophysiol.* **83**: 1621-1636

Rosen SC, Teyke T, Miller MW, Weiss KR, Kupfermann I (1991) Identification and characterization of cerebral-to-buccal interneurons implicated in the control of motor programs associated with feeding in *Aplysia*. *J. Neurosci.* **11**: 3630-3655

Rosen SC, Weiss KR, Cohen JL, Kupfermann I (1982) Interganglionic cerebral-buccal mechanosensitive afferents of *Aplysia*: Receptive fields and synaptic connections to different classes of neurons involved in feeding behavior. *J. Neurophysiol.* **48**: 271-288

Rosen SC, Weiss KR, Goldstein RS, Kupfermann I (1989) The role of a modulatory neuron in feeding and satiation in *Aplysia*: Effects of lesioning of the serotonergic metacerebral cells. *J. Neurosci.* **9**: 1562-1578

Rosen SC, Weiss KR, Kupfermann I (1979) Response properties and synaptic connections of mechanosensitive neurons in cerebral ganglion of *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* **42**: 954-974

Rubakhin SS, Li L, Morez PT, Sweedler JV (1999) Characterization of the *Aplysia californica* cerebral ganglion F cluster. *J. Neurophysiol.* **81**: 1251-1260

Sánchez JAD, Kirk MD (2000) Short-term synaptic enhancement modulates ingestion motor programs of *Aplysia*. *J. Neurosci.* **20**: RC85(1-7)

Sánchez JAD, Li Y, Kirk MD (2000) Regeneration of cerebral-buccal interneurons and recovery of ingestion buccal motor programs in *Aplysia* after CNS lesions. *J. Neurophysiol.* **84**: 2961-2974

Schaffhausen JH, Fischer TM, Carew TJ (2001) Contribution of postsynaptic Ca²⁺ to the induction of posttetanic potentiation in the neural circuit for siphon withdrawal in *Aplysia*. *J. Neurosci.* **21**: 1739-1749

Schild D, Jung A, Schultens HA (1994) Localization of calcium entry through calcium channels in olfactory receptor neurones using a laser scanning microscope and the calcium indicator dyes Fluo-3 and Fura-Red. *Cell Calcium* **15**: 341-348

Scott ML, Govind CK, Kirk MD (1991) Neuromuscular organization of the buccal system in *Aplysia californica*. *J. Comp. Neurology* **312**: 207-222

Singer W (1993) Synchronization of cortical activity and its putative role in information processing and learning. *Annu. Rev. Physiol.* **55**: 349-374

Spruston N, Schiller Y, Stuart G, Sakmann B (1995) Activity-dependent action potential invasion and calcium influx into hippocampal CA1 dendrites. *Science* **268**: 297-300

Stinnakre J, Tauc L (1973) Calcium influx in active *Aplysia* neurons detected by injected aequorin. *Nature New Biol.* **242**: 113-115

Sugimori M, Llinàs RR (1990) Real-time imaging of calcium influx in mammalian cerebellar Purkinje cells *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 5084-5088

Susswein AJ, Schwarz M, Feldman E (1986) Learned changes of feeding behavior in *Aplysia* in response to edible and inedible feeds. *J. Neurosci.* **6**: 1513-1527

Svoboda K, Denk W, Kleinfeld D, Tank DW (1997) In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. *Nature* **385**: 161-165

Tang CM, Presser F, Morad M (1988) Amiloride selectively blocks the low threshold (T) type calcium channel. *Science* **240**: 213-215

Tareilus E, Noë J, Breer H (1995) Calcium signals in olfactory neurons. *Biochem. Biophys. Acta* **1296**: 129-138

Teramoto T, Niidome T, Miyagawa T, Nishizawa Y, Katayama K, Sawada K (1995) Two types of calcium channels sensitive to ω -agatoxin TK in cultured rat hippocampal neurons. *NeuroReport* **6**: 1684-1688

Teyke T, Weiss KR, Kupfermann I (1989) A subpopulation of cerebral B cluster neurons of *Aplysia californica* is involved in defensive head withdrawal but not appetitive head movement. *J. Exp. Biol.* **147**: 1-20

Teyke T, Weiss KR, Kupfermann I (1990) An identified neuron (CPR) evokes neuronal responses reflecting food arousal in *Aplysia*. *Science* **247**:85-87

Todorovic SM, Linge CJ (1998) Pharmacological properties of T-type Ca^{2+} current in adult rat sensory neurons: Effects of anticonvulsant and anesthetic agents. *J. Neurophysiol.* **69**: 2137-2149

Viana F, Bayliss DA, Berger AJ (1993) Calcium conductances and their role in the firing behavior of neonatal rat hypoglossal motoneurons. *J. Neurophysiol.* **69**: 2137-2149

Walters ET, Byrne JH, Carew TJ, Kandel ER (1983) Mechanoafferent neurons innervating tail of *Aplysia*. I. Response properties and synaptic connections. *J. Neurophysiol.* **50**: 1522-1542

Weiss KR, Kupfermann I (1976) Homology of the giant serotonergic neurons (metacerebral cells) in *Aplysia* and pulmonate molluscs. *Brain Res.* **117**: 33-49

Wilson GF, Richardson FC, Fisher TE, Olivera BM, Kaczmarek LK (1996) Identification and characterization of a Ca²⁺-sensitive nonspecific cation channel underlying prolonged repetitive firing in *Aplysia* neurons. *J. Neurosci.* **16**: 3661-3671

Wu J, Cohen LB, Falk CX (1994) Neuronal activity during different behaviors in *Aplysia*: A distributed organization? *Science* **263**: 820-823

Xin Y, Hurwitz I, Perrins R, Evans CG, Alexeeva V, Weiss KR, Kupfermann I (1999) Actions of a pair of identified cerebral-buccal interneurons (CBI-8/9) in *Aplysia* that contain the peptide myomodulin. *J. Neurophysiol.* **81**: 507-520

Xin Y, Kupfermann I (1995) Neural pathway mediating head turning behavior in *Aplysia*. *Neurosci Lett.* **186**: 197-199

Xin Y, Weiss KR, Kupfermann I (1995) Distribution in central nervous system of *Aplysia* from cell bodies located in the periphery. *J. Comp. Neurology* **359**: 627-643

Xin Y, Weiss KR, Kupfermann I (1996) An identified interneuron contributes to aspects of six different behaviors in *Aplysia*. *J. Neurosci.* **16**: 5266-5279

Xin Y, Weiss KR, Kupfermann I (2000) Multifunctional neuron CC6 in *Aplysia* exerts actions opposite to those of multifunctional neuron CC5. *J. Neurophysiol.* **83**: 2473-2481

Yuste R, Denk W (1995) Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature* **375**: 682-684

Zhang JF, Randall AD, Ellinor PT, Horne WA, Sather WA, Tanabe T, Schwarz TL, Tsien RW (1993) Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca^{2+} channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* **32**: 1075-1088

Zochowski M, Cohen LB, Fuhrmann G, Kleinfeld D (2000) Distributed and partially separate pools of neurons are correlated with two different components of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *J. Neurosci.* **20**: 8485-8492

池田沙織 (2001) アメフラシ中枢における海藻味覚情報入力経路の解明 神戸大学大学院自然科学研究科修士学位論文

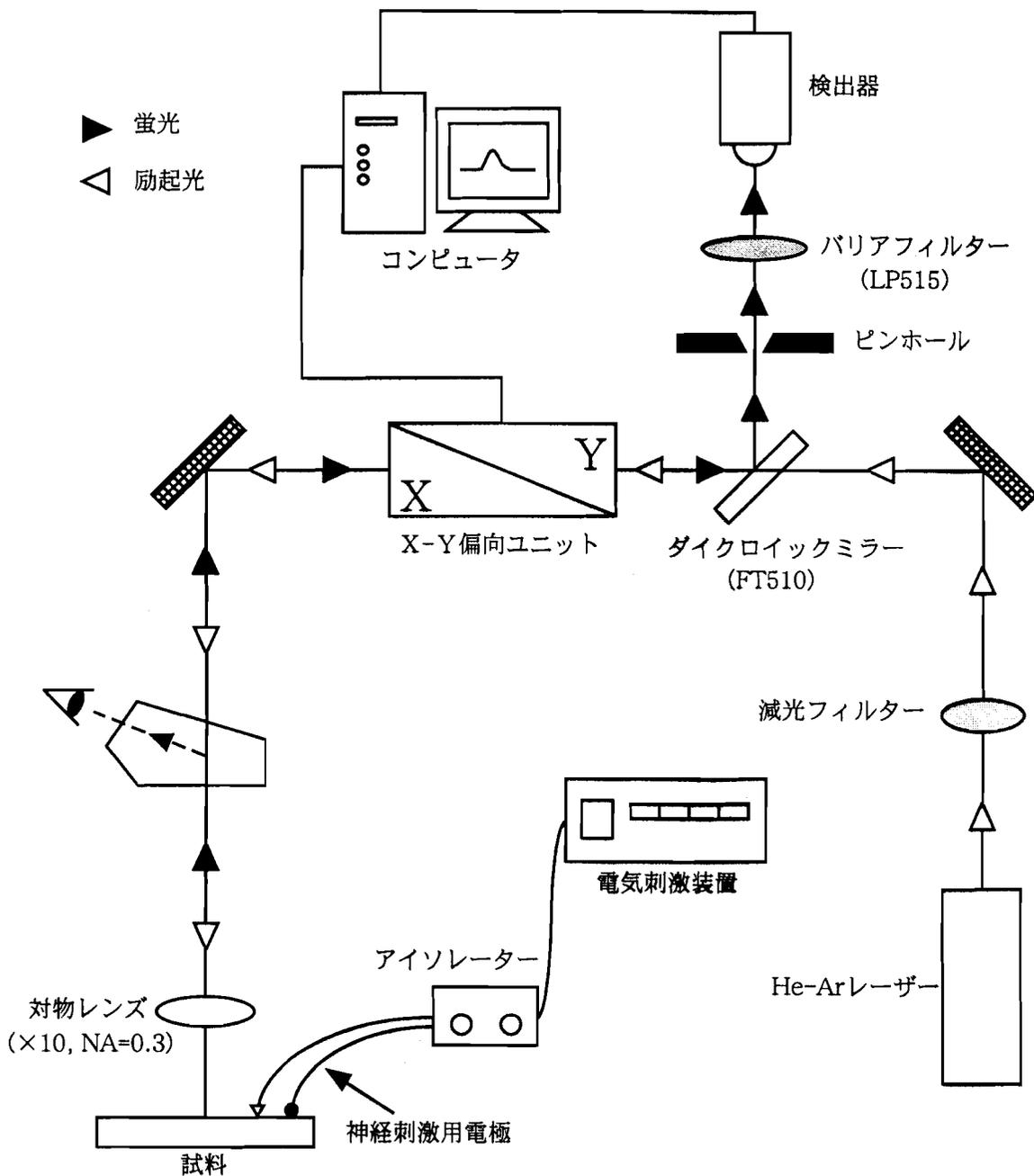


図1. レーザー顕微鏡を用いたカルシウムイメージングシステムの光路系

図中の△は励起光の光路、▲は試料より生じる蛍光の光路を示す。He-Arレーザーにより照射された励起光は減光フィルター、ダイクロイックミラーを通過し、X-Y偏向ユニットにより試料のXY軸方向へ走査する。励起光により生じた蛍光はダイクロイックミラーで反射され、検出器への光路へ入る。神経刺激は電気刺激装置、アイソレーターを用い行われる。

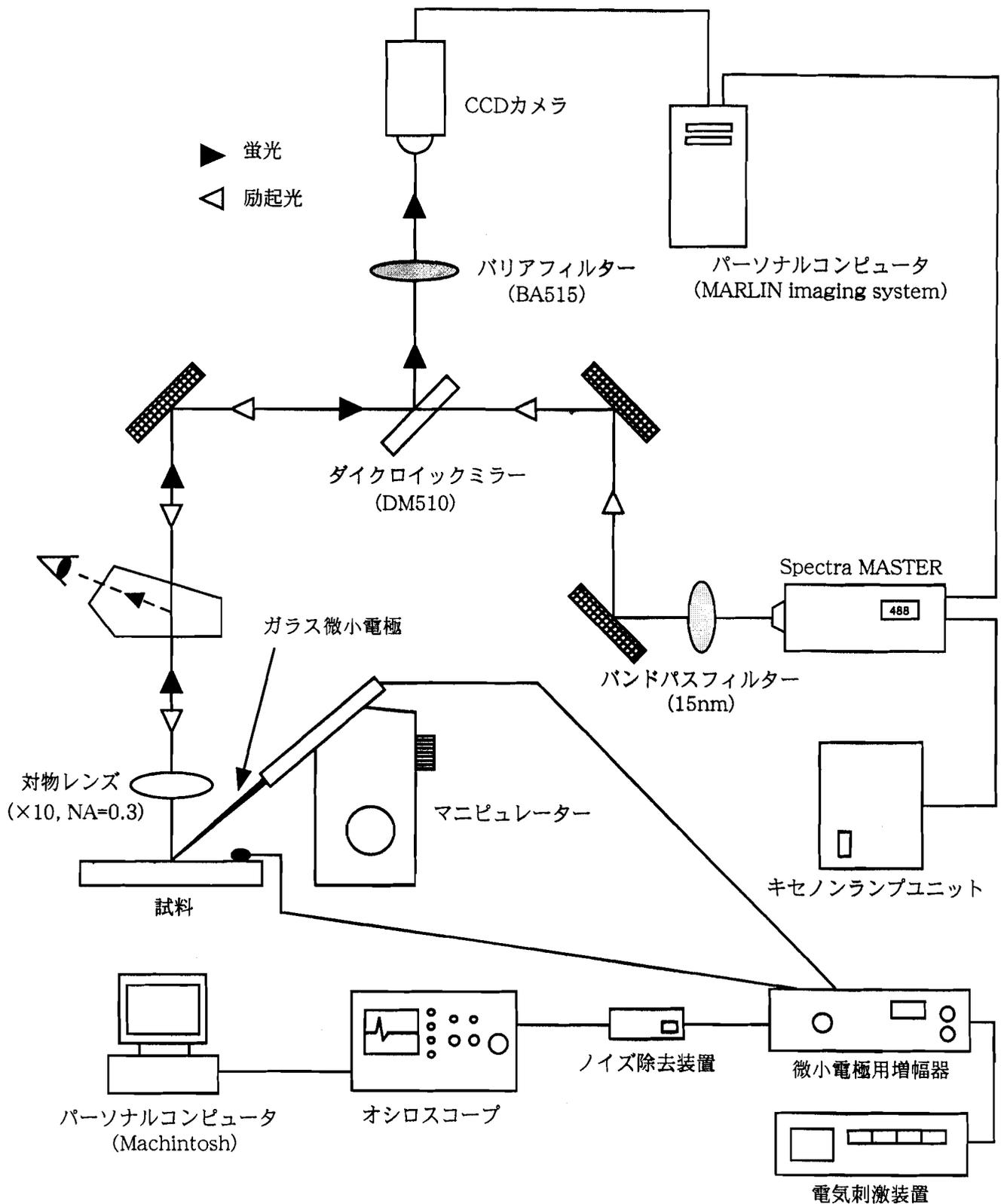


図2. 蛍光顕微鏡観察時のセットとその光路

図中の△は励起光の光路、▲は試料より生じる蛍光の光路を示す。水銀ランプにより生じた光は、Spectra MASTERとバンドパスフィルターにより488nmを中心に15nmの波長幅を持つ励起光となり顕微鏡の光路に入る。この励起光はダイクロイックミラーを通過し試料に当る。生じた蛍光はダイクロイックミラーで反射されパリアフィルターを通過し冷却CCDカメラにより検出され、コンピュータ上にデータが蓄えられる。試料にはマニピュレーターを用いガラス微小電極を挿入し、その膜電位変化をアンプ、オシロスコープで観察し、コンピュータ上にデータを蓄える。細胞内通電には電気刺激装置を用いる。

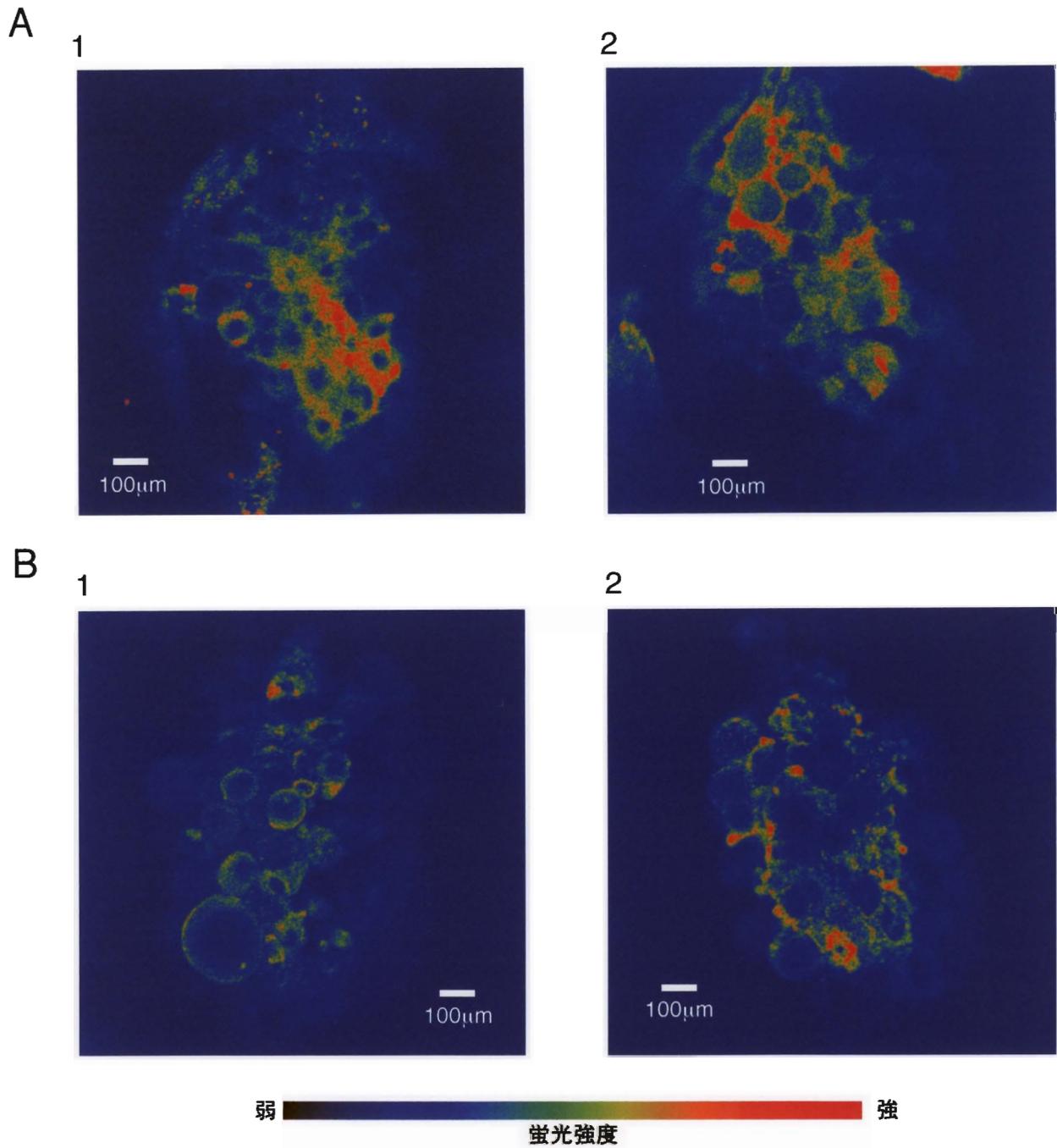


図3. アメフラシ口球神経節内ニューロンをAMタイプの色素で染色した例
 アメフラシ口球神経節内のニューロンを、Calcium Green-1 AM (A) 又はFluo-3 AM (B) で染色した例。A1とA2、B1とB2はそれぞれ異なるプレパレーションで染色した口球神経節である。

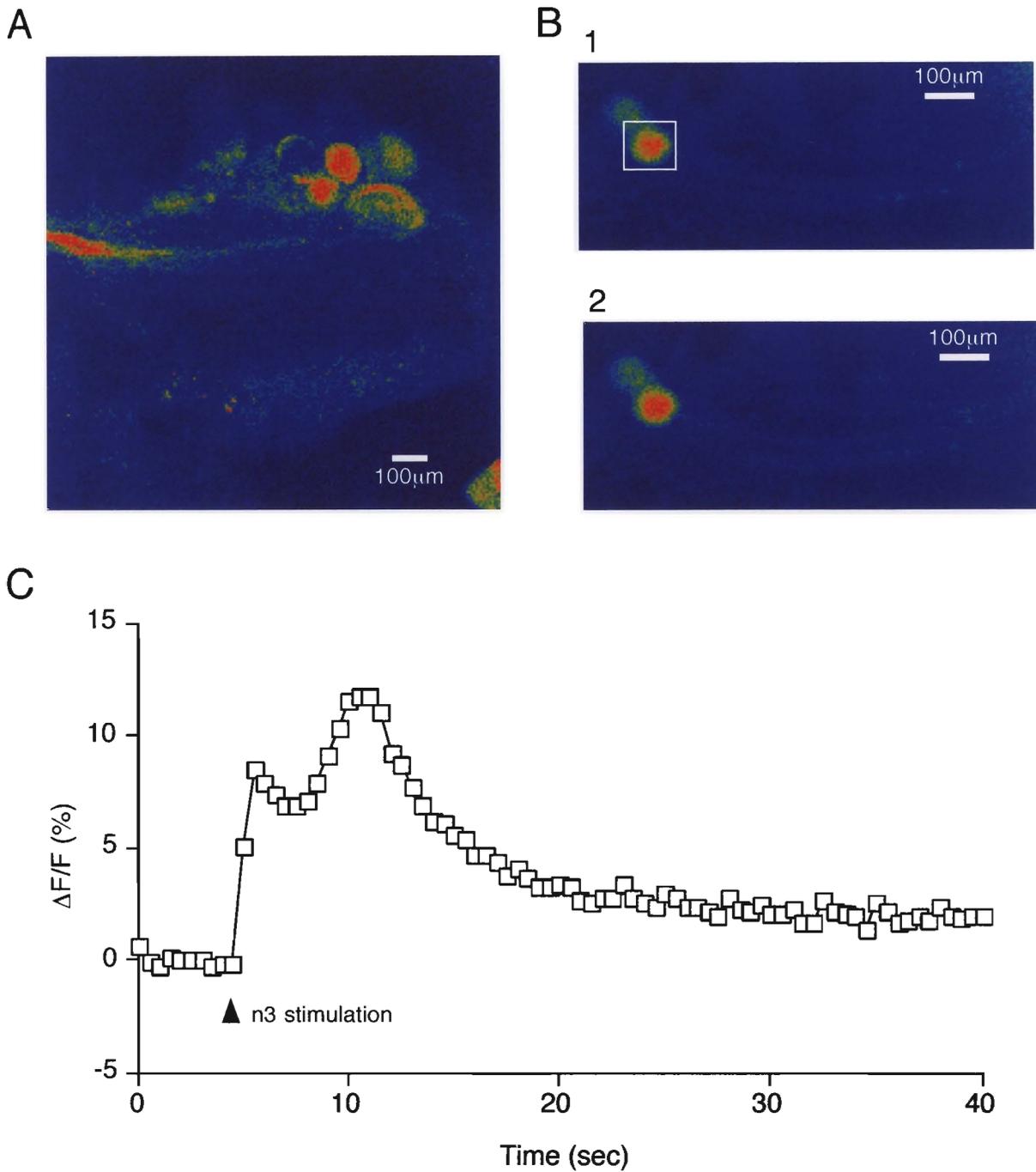
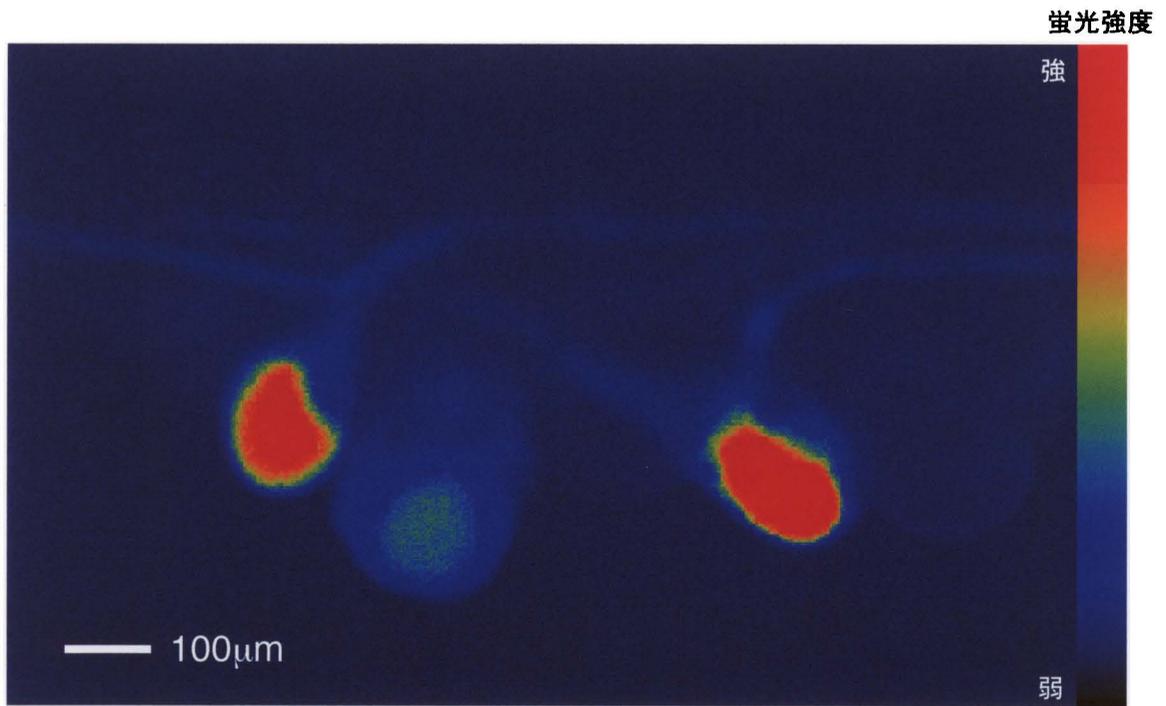


図4. アメフラシ口球神経節内ニューロンを逆行染色により染色した例
 アメフラシ口球神経節内のニューロンを、Calcium Green-1 dextranによりn3神経から逆行的に染色した。A: 染色結果の一例。B: 逆行染色により染色したニューロンに神経刺激を与える前(1)と与えた後(2)の蛍光強度画像。C: Bの白枠に囲われた位置の蛍光強度変化を示すグラフ。約5秒後に33Hz、30回のパルスから成る神経刺激をn3神経に与えた。

A



B

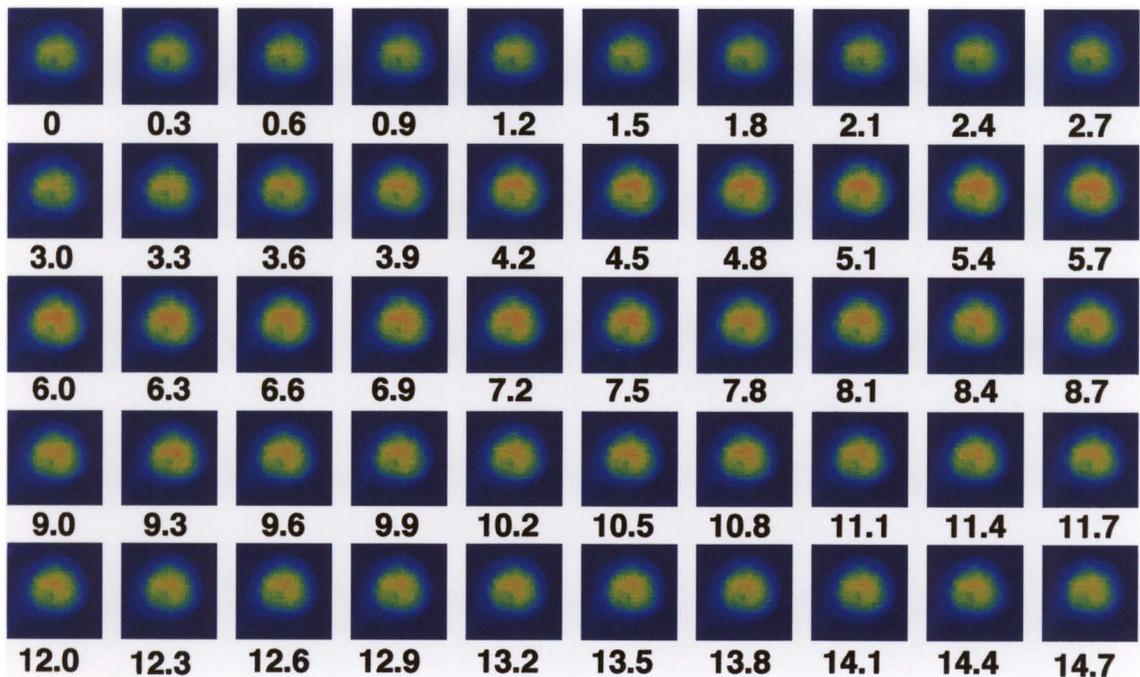


図5. アメフラシ口球神経節内ニューロンをインジェクション法により染色した例
 アメフラシ口球神経節内のニューロンを、インジェクション法によりCalcium Green-1 hexapotassium saltで染色した。A：インジェクション法でMA（左）、JC（中）、JO（右）を染色した例。右のカラーバーは蛍光強度の強さを示す。B：MAニューロンをインジェクション法により染色し、食道神経を測定開始から3秒後に神経刺激（33Hz, 60pulses, 6V）した時の蛍光強度変化。刺激後蛍光強度は増加し、ゆっくりと静止レベルに戻っていく。蛍光像の下の数字は測定開始からの時間（秒）を示す。

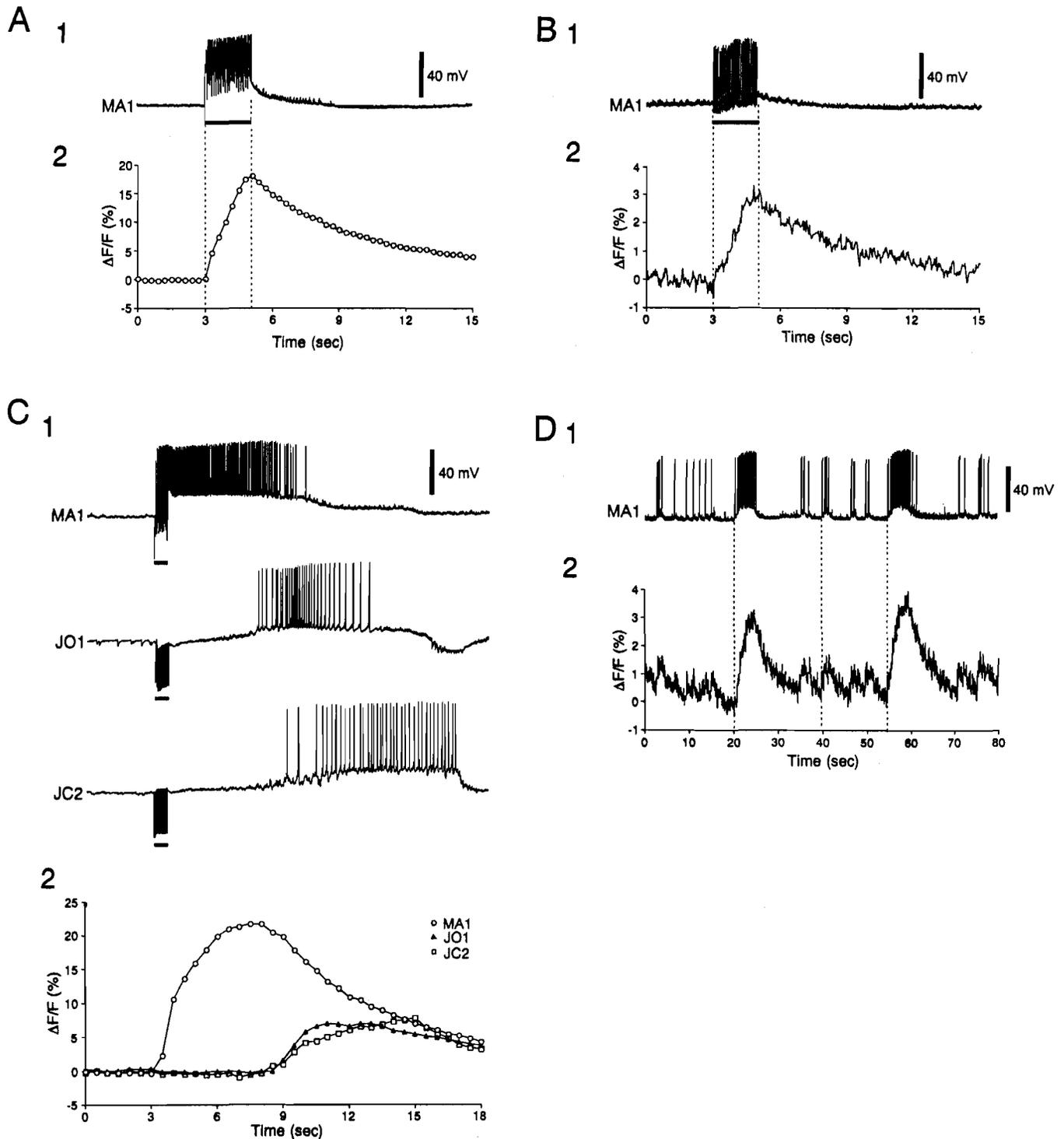


図6. ニューロンのスパイク活動時に生じる蛍光強度変化

A: 同側n3神経刺激 (10Hz、20pulses、1V) により生じる、MAニューロンにおけるスパイク活動 (1) と同じニューロンでの細胞体部位での蛍光強度変化 (2)。蛍光強度変化はレーザー顕微鏡を用い観察し、膜電位と蛍光強度変化はそれぞれ別々に記録されている。B: 同側n3神経刺激 (15Hz、30pulses、0.3V) により生じる、MAニューロンにおけるスパイク活動 (1) と細胞体部位での蛍光強度変化 (2) の同時記録。記録は蛍光顕微鏡を用い行われた。C: MA、JO、JCにおけるスパイク活動 (1) と、細胞体部位での蛍光強度変化 (2)。観察はレーザー顕微鏡を用い行われており、同側食道神経を刺激した (30Hz、20pulses、6V)。D: MAニューロンの自発的な発火 (1) と、そのときの細胞体部位での蛍光強度変化 (2) を蛍光顕微鏡により同時に観察した。スパイク記録の下にあるバーは刺激を行った期間を示している。

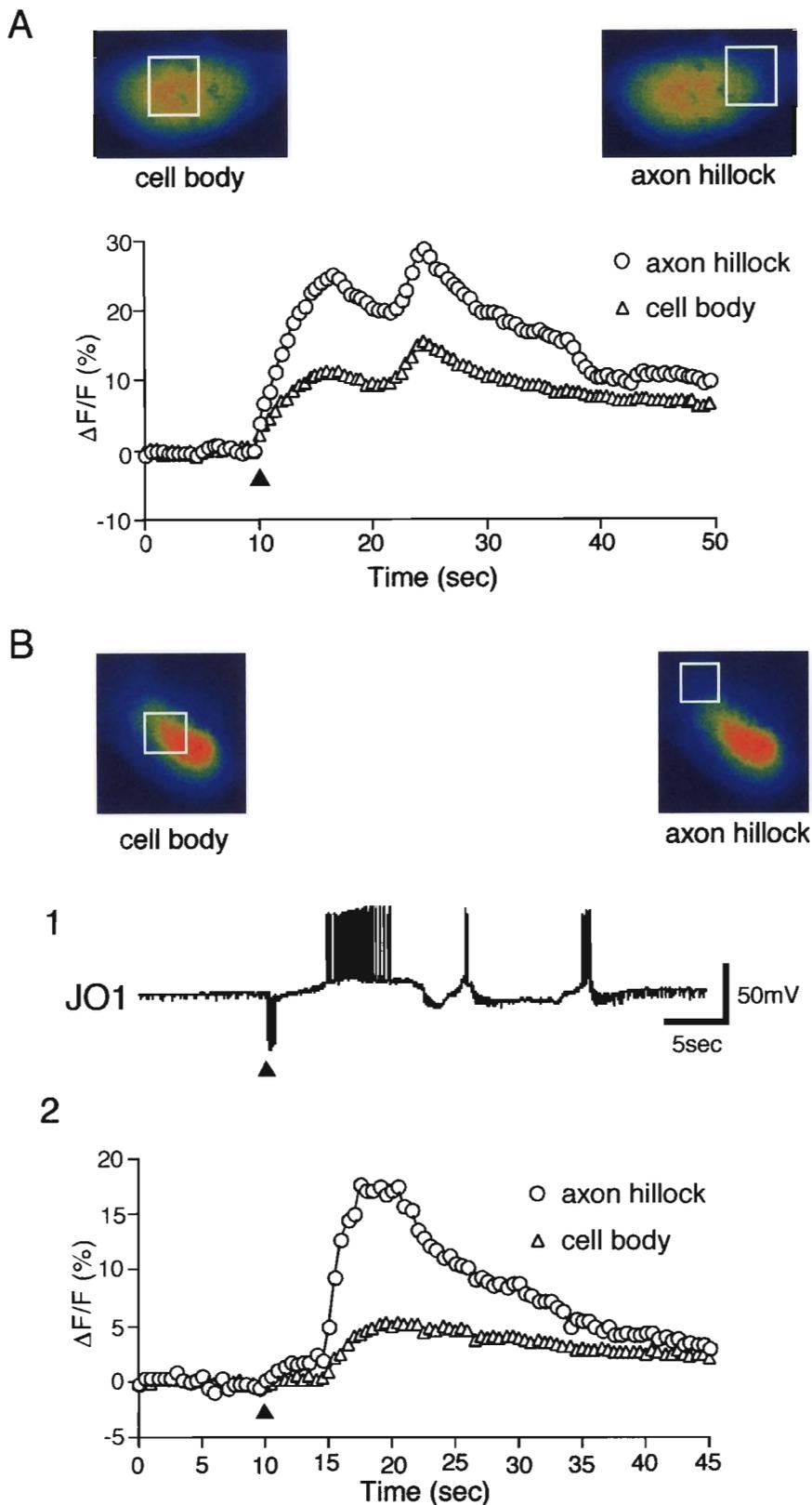


図7. 測定部位による蛍光強度変化の差異

A: 同側n3神経刺激 (33Hz、10pulse、6V) した時に生じる、MAニューロンの細胞体の中心部と軸索小丘部での蛍光強度変化。蛍光強度変化はそれぞれ白枠で囲まれた部位より測定した。刺激は図中の矢頭の所で施されている。**B**: 同側食道神経を神経刺激 (33Hz、20pulses、6V) したときに生じるJOニューロンのスパイク活動 (1) と、細胞体中心部と軸索小丘部より記録された蛍光強度変化 (2)。それぞれ同じニューロンで別々に記録されている。蛍光強度変化はそれぞれ白枠で囲まれた部位より測定した。刺激は矢頭の所で施されている。

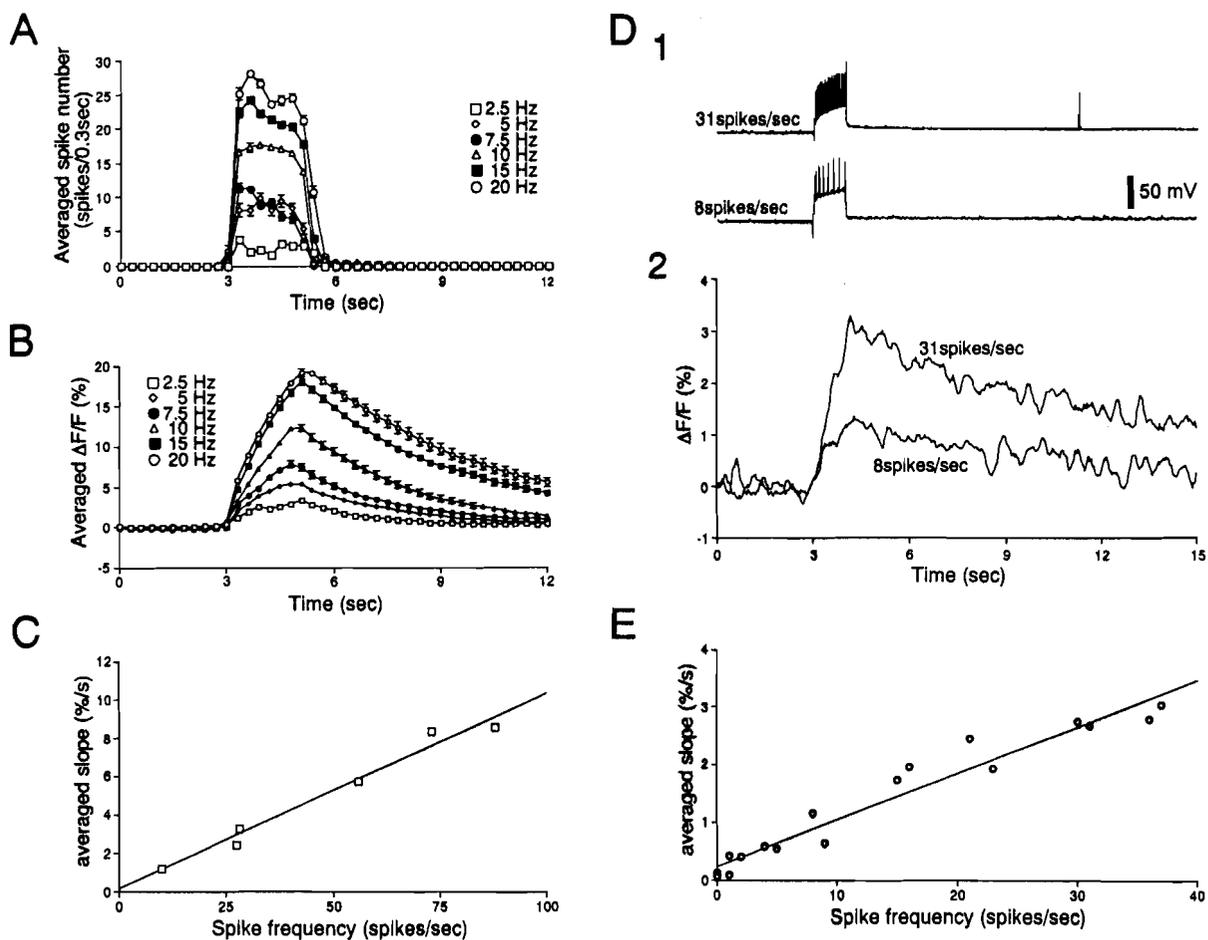


図8. 蛍光強度変化とニューロンのスパイク発火頻度との関係

A - C : レーザー顕微鏡を用い、スパイク活動と蛍光強度変化を別々に記録した結果。**D - E** : 蛍光顕微鏡にてスパイク活動と蛍光強度変化を同時に記録した結果。**A** : MAニューロンにおけるスパイク頻度の時間経過。ニューロンを測定開始3秒後に2.5~20Hzで神経刺激(同側n3神経、1V、2sec)し、それぞれの刺激頻度で膜電位記録を10回行い、0.3秒ごとのスパイク数をカウントし、10試行の平均値をグラフ化している。**B** : 同じMAニューロンで、Aと同様の刺激を行った時の蛍光強度変化。測定はそれぞれの刺激頻度で10回行い、その平均値をグラフ化している。**C** : ニューロンのスパイク頻度と蛍光強度変化率との関係。横軸にニューロンのスパイク頻度を、縦軸に1秒間の蛍光強度増加の大きさ(蛍光強度増加率)を取ると、蛍光強度変化率はニューロンのスパイク頻度にほぼ比例していた。**D₁** : MAニューロンに脱分極通電(1-10nA、1sec)を与えた時に生じる膜電位変化の例。この2つの例では1秒間に31発のスパイク(上)と8発のスパイク(下)を生じた。**D₂** : **D₁**の膜電位変化と同時に観察したニューロンの蛍光強度変化。**E** : ニューロンのスパイク頻度と蛍光強度変化率との関係。横軸にニューロンのスパイク頻度を、縦軸に蛍光強度変化率を取ると、蛍光強度変化率はニューロンのスパイク頻度にほぼ比例していた。**C**と**E**のグラフ中のラインは最小二乗法により計算されている。

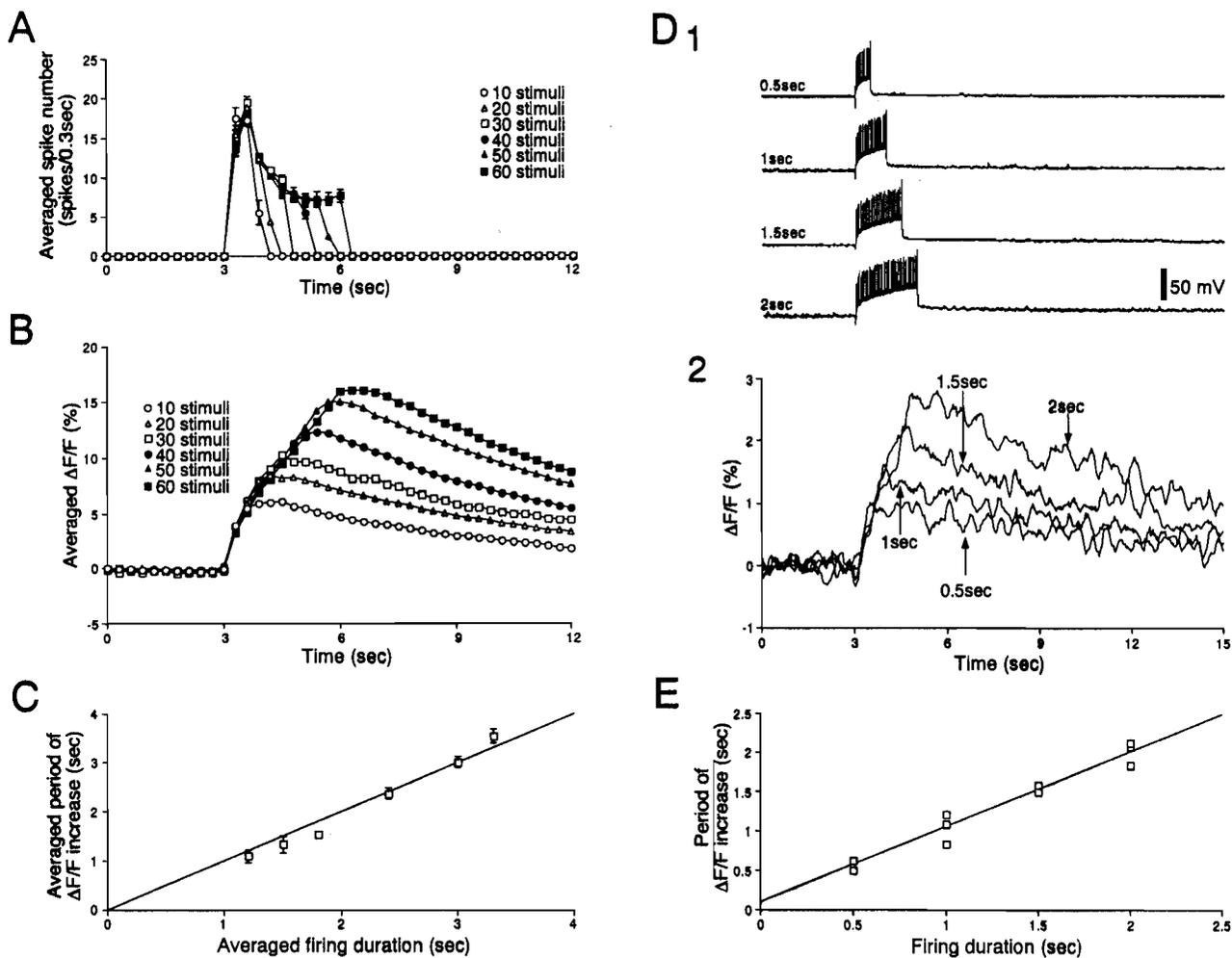


図9：蛍光強度変化とニューロンのスパイク発火期間との関係

A - C：レーザー顕微鏡を用い、スパイク活動と蛍光強度変化を別々に記録した結果。**D - E**：蛍光顕微鏡にてスパイク活動と蛍光強度変化を同時に記録した結果。**A**：MAニューロンにおけるスパイク頻度の時間経過。ニューロンを測定開始3秒後に10~60回神経刺激（n3神経、14.3Hz、0.5V）し、それぞれの刺激回数で膜電位記録を10回行い、0.3秒ごとのスパイク数をカウントし、10試行の平均値をグラフ化している。**B**：同じMAニューロンで、Aと同様の刺激を行った時の蛍光強度変化。測定はそれぞれの刺激回数で10回行い、その平均値をグラフ化している。**C**：ニューロンのスパイク発火期間と蛍光強度増加期間との関係。横軸にニューロンのスパイク発火期間を、縦軸に蛍光強度が増加している時間を取ると、蛍光強度増加期間はニューロンのスパイク発火期間にほぼ対応していた。**D1**：MAニューロンに脱分極通電（7nA、0.5 - 2sec）を与えた時に生じる膜電位変化の例。それぞれ脱分極通電の期間にのみスパイクを生じている。**D2**：**D1**の膜電位変化と同時に観察したニューロンの蛍光強度変化。**E**：ニューロンのスパイク発火期間と蛍光強度増加期間との関係。横軸にニューロンのスパイク発火期間を、縦軸に蛍光強度増加期間を取ると、蛍光強度増加期間はニューロンのスパイク発火期間にほぼ対応していた。CとEのグラフ中のラインは最小二乗法により計算されている。

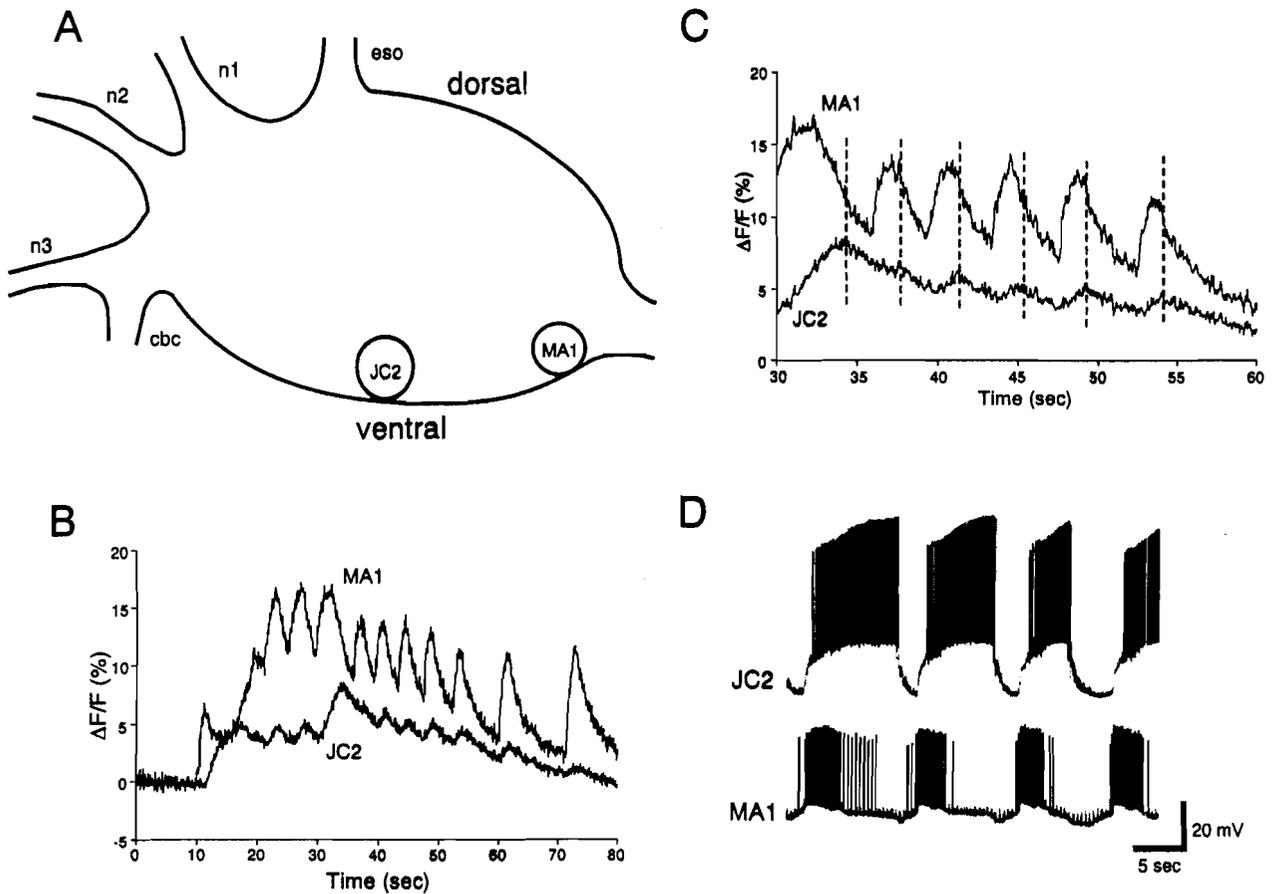


図 10. 摂食様発火パターンを生じている時のMA、JCの蛍光強度変化の同時記録
A : MA、JCニューロンの口球神経節内での位置を模式的に示した図。**B** : CBC神経を連続頻回刺激 (2Hz, 1V) することにより、口球神経節内ニューロンに摂食様発火パターンを生じさせた時に記録した、MA、JCニューロンの蛍光強度変化の同時記録。刺激は測定開始 10 秒後から測定終了まで与えられている。**C** : **B** の記録の 30~60 秒までのところを拡大し表した図。破線は JCニューロンの蛍光がピークに達した時刻を表す。MAニューロンの蛍光のピークはJCニューロンのよりも先に来ていることがわかる。**D** : 別のプレパレーションから記録された、MA、JCニューロンの膜電位変化の同時記録。刺激は同様にCBC神経の頻回刺激により行われている。

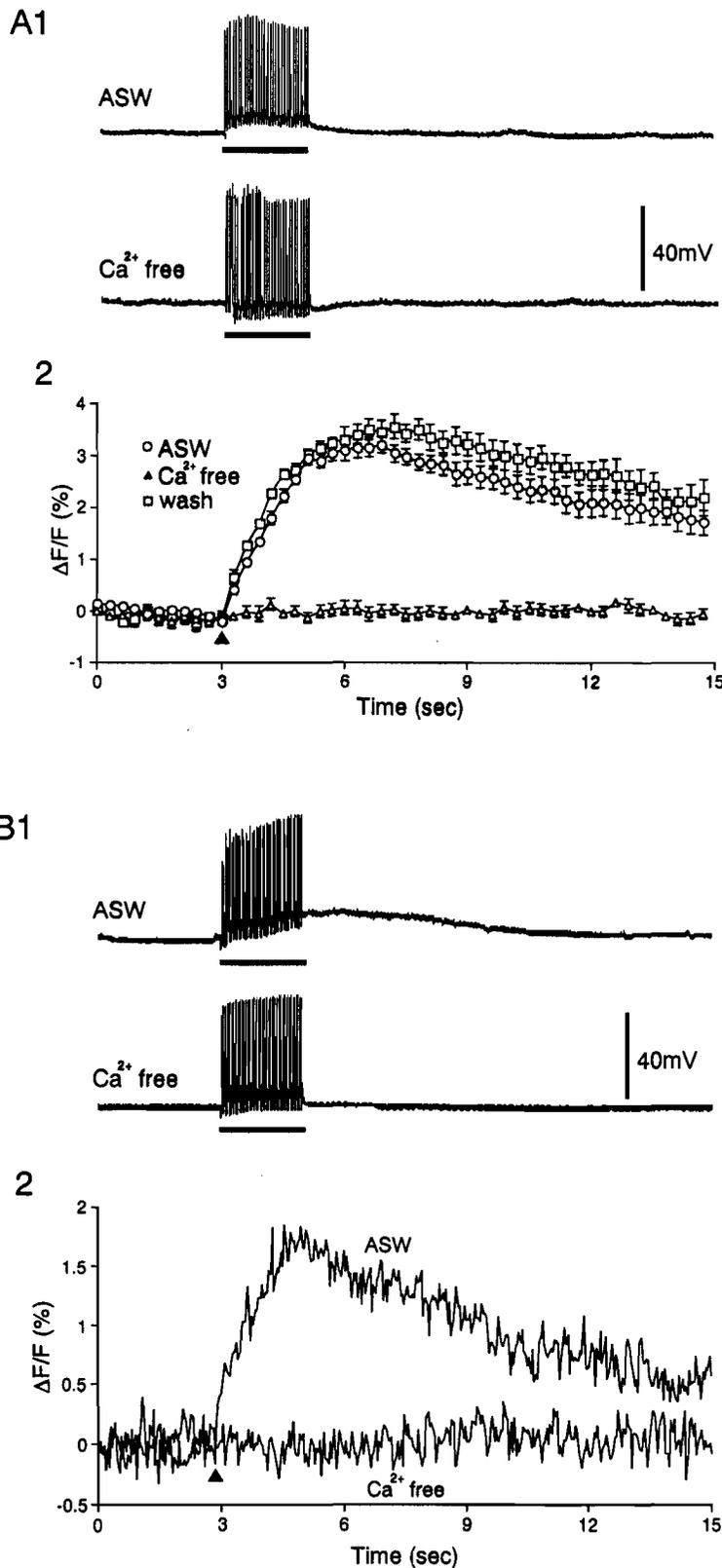


図1 1. ニューロンのスパイク発火により生じる蛍光強度変化に対する細胞外カルシウムイオンの影響
A1: 人工海水中とカルシウムフリー溶液中でのMAニューロンのスパイク活動。刺激は同側n3神経を神経刺激(14.3Hz、30pulses、0.3V)した。**A2**: A1と同じニューロンで同じ刺激を施した時の、人工海水中とカルシウムフリー溶液中での蛍光強度変化をレーザー顕微鏡で観察した結果。**B1**: 人工海水中とカルシウムフリー溶液中でのJOmニューロンのスパイク活動。刺激は同側n2神経を神経刺激(20Hz、40pulses、0.4V)した。**B2**: 蛍光顕微鏡を用い**B1**のスパイク活動と同時に観察された蛍光強度変化。

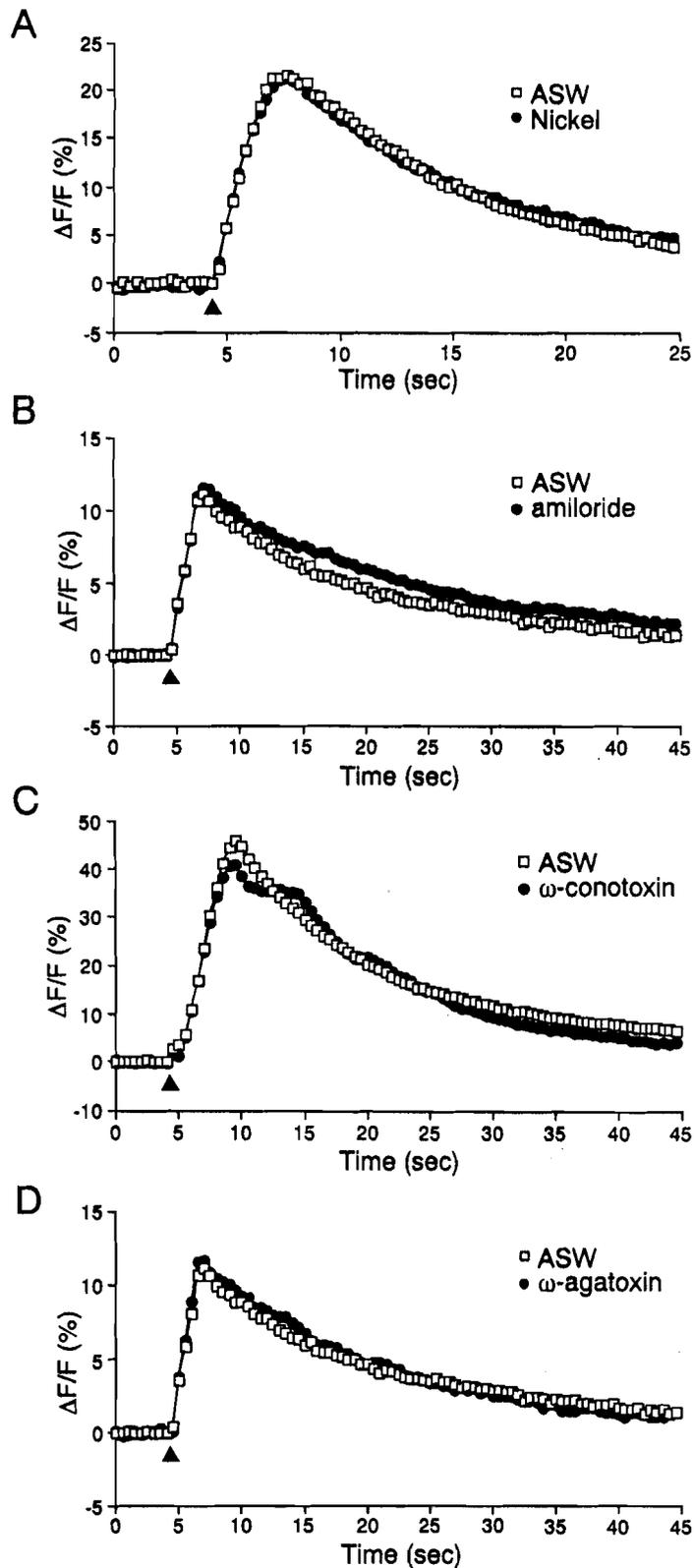


図12. ニューロンのスパイク発火により生じる蛍光強度変化に対する電位依存性カルシウムチャンネル阻害剤の効果

A: Tタイプ電位依存性カルシウムチャンネル阻害剤のニッケルイオン (100 μ M) を細胞外溶液中に加えた結果。B: Tタイプ電位依存性カルシウムチャンネル阻害剤amiloride (500 μ M) を細胞外溶液中に加えた結果。C: Nタイプ電位依存性カルシウムチャンネル阻害剤 ω -conotoxin-GVIA (5 μ M) を加えた結果。D: P/Qタイプ電位依存性カルシウムチャンネル阻害剤 ω -agatoxin-TK (300nM) を加えた結果。いずれの薬剤もスパイク発火に伴う蛍光強度増加に対しあまり影響がなかった。

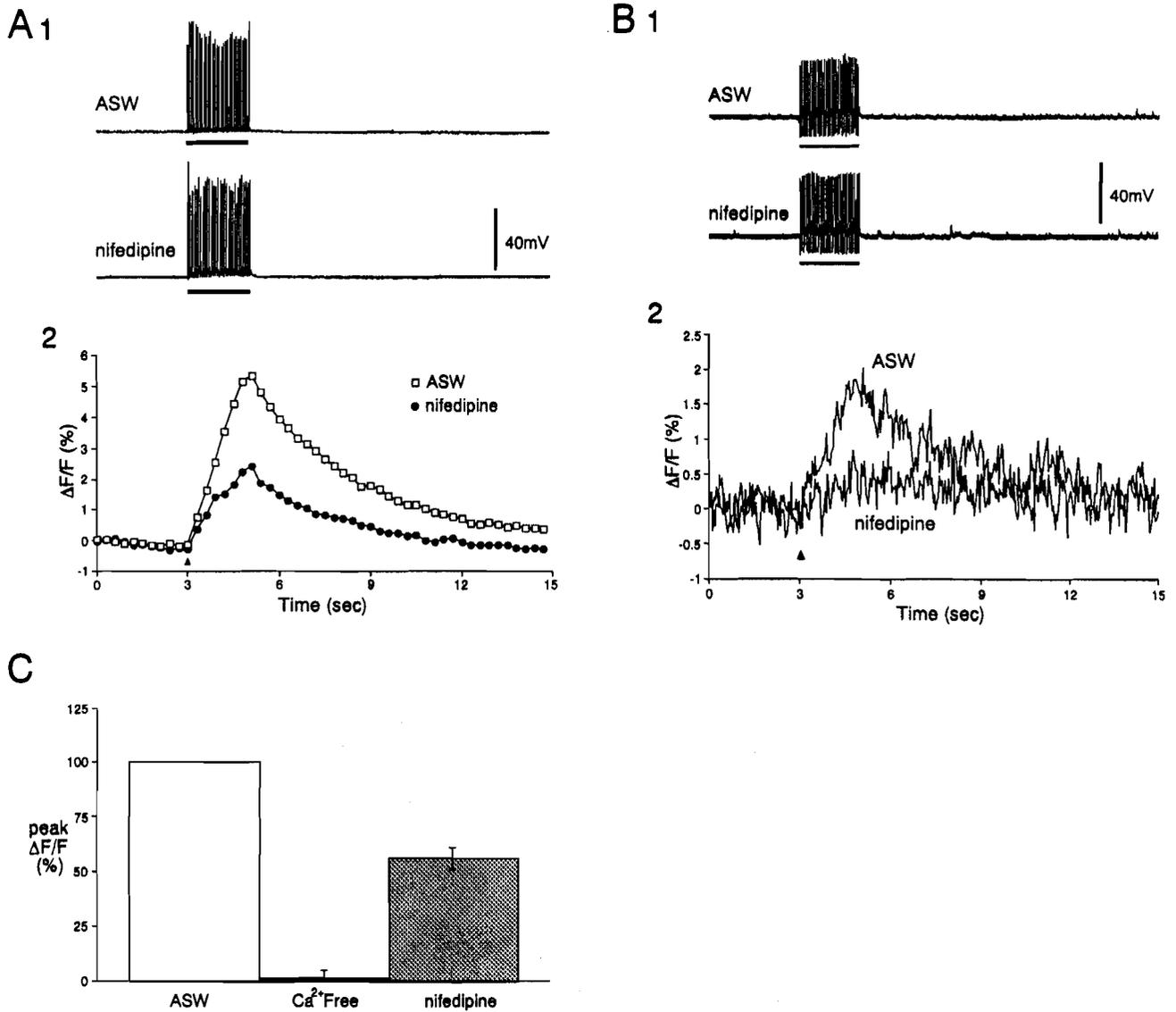


図 13. Lタイプ電位依存性カルシウムチャンネル阻害剤nifedipineのニューロンスパイク発火に伴う蛍光強度変化に対する影響

A1: 人工海水中とnifedipine (10 μ M) を加えた時のMAニューロンのスパイク発火。刺激は同側n3神経を神経刺激 (14.3Hz、30pulses、0.3V) した。**A2**: **A1**と同じ刺激を与えた時に生じる、人工海水中とnifedipine (10 μ M) を加えた時の蛍光強度変化をレーザー顕微鏡により記録した。Nifedipineの効果はほぼ不可逆であったため、**A1**と**A2**の記録は別のプレパレーションから得た。**B**: 人工海水中とnifedipineを加えた溶液中で、スパイク活動 (1) と蛍光強度変化 (2) をMAニューロンで同時に記録した結果。実験では蛍光顕微鏡を用い、同側n3神経を神経刺激 (15Hz、30pulses、0.3V) した。**C**: カルシウムフリー溶液とnifedipineがスパイク発火により生じるMAニューロンの蛍光強度変化に及ぼす影響のまとめ。カルシウムフリー溶液中、又はnifedipineを加えた溶液中での蛍光強度変化のピーク値を人工海水中での蛍光強度変化のピーク値と比較し、全試行の平均値として表す。縦線はSEMを示す。(カルシウムフリーはn=5、nifedipineはn=8)

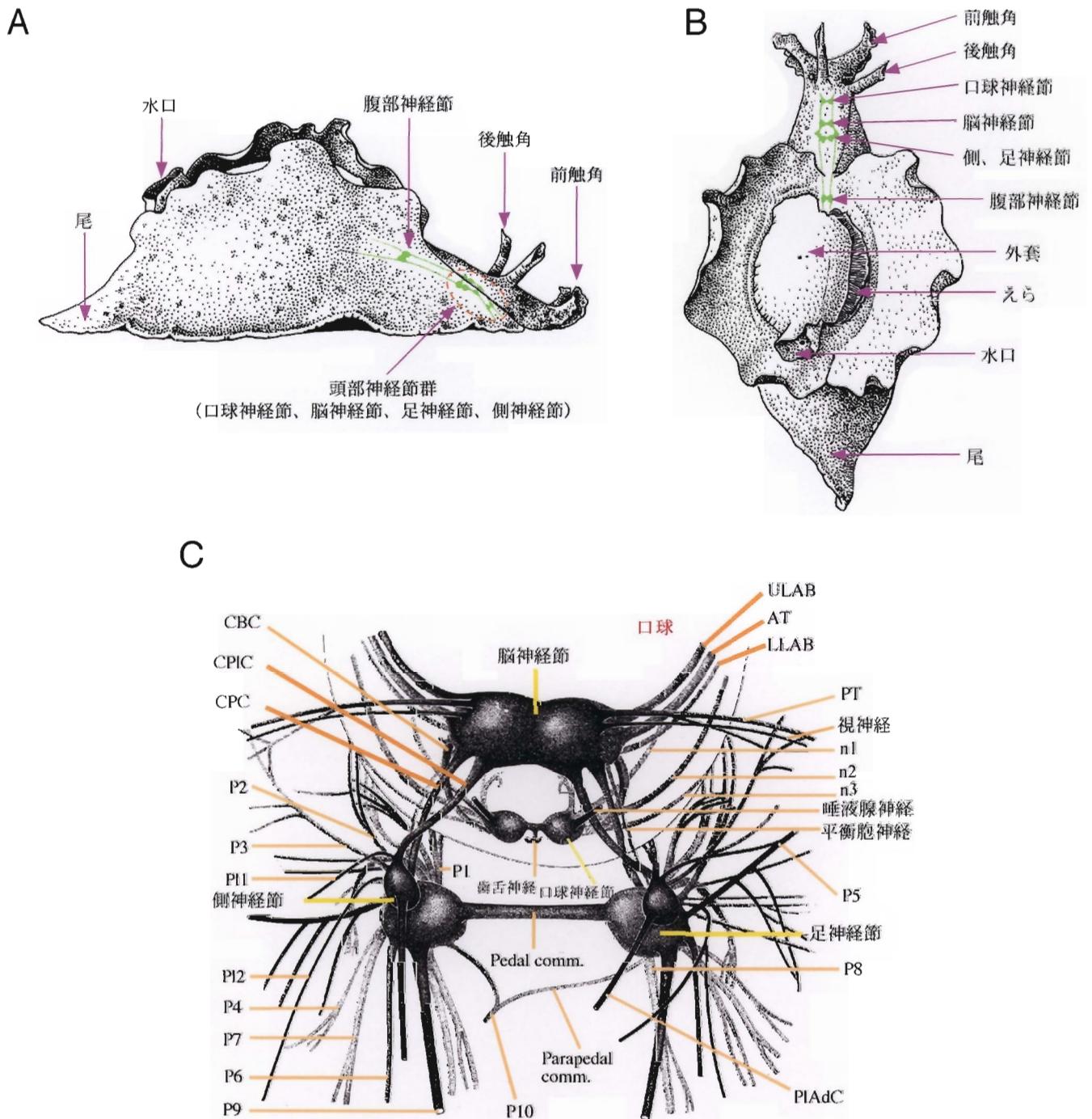


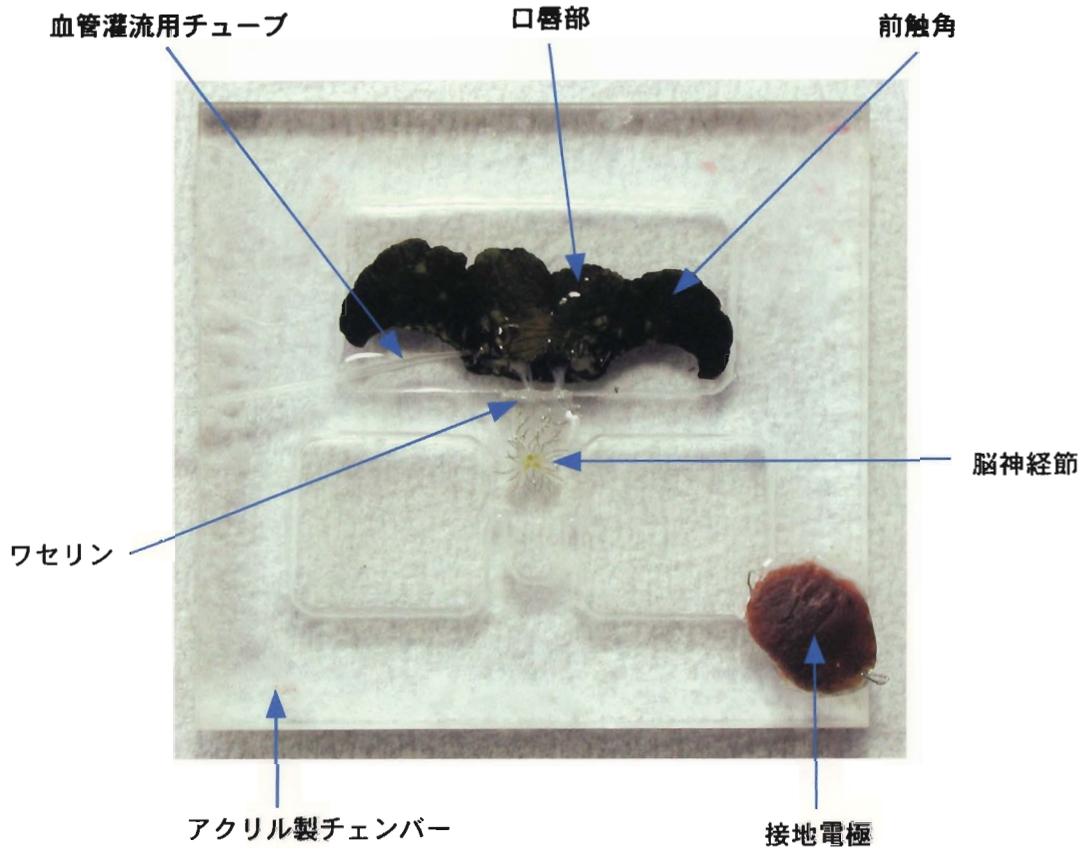
図14. アメフラシの外観と神経節

A : アメフラシを側面から見た図。 **B** : アメフラシを背側から見た図。 **C** : アメフラシ頭部神経節群の詳細図。 **A**と**B**の図では、体内での各神経節の位置が緑で示されている。

PT=Posterior tentacular nerve, PIAbC=Pleural-abdominal connective, Pedal comm.=Pedal commissure, Parapedal comm.=Parapedal commissure

Kandel (1976) より改編。

A



B



図15. 記録用チェンバーと脳神経節概観

A : 今回使用したプレパレーションの概観。チェンバーは大きく2つに分けられており、その1つに口唇、前触角部が、もう1つに脳神経節が虫ピンにより固定されている。その間は溶液が混ざり合わない様、ワセリンにて遮っている。口唇部への血管はポリエチレン製チューブにより血管灌流が出来る様、確保されている。**B** : 右背側脳神経節概観。チェンバーにピン止めし、上皮組織を眼科手術用ハサミで取り除くと、この様にオレンジ色のニューロン細胞体の塊が見られる。

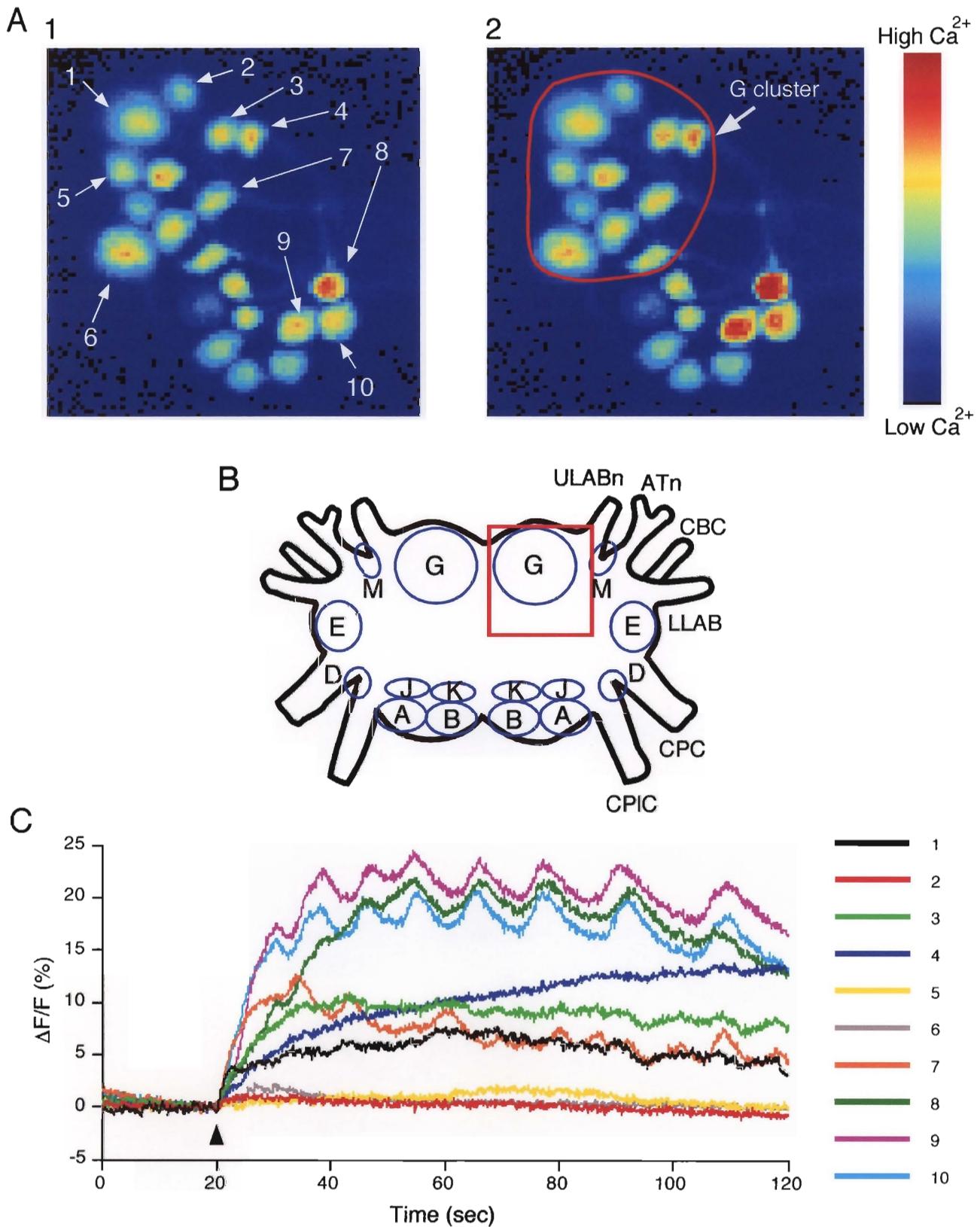


図16. 脳神経節内で海藻味刺激により応答を示したニューロン群

A: 脳神経節腹側のGクラスターとその周辺領域に存在するニューロンをカルシウム感受性色素、Calcium Green-1で染色し、口唇部への海藻味刺激前後の蛍光画像を取得した。**A1**: 口唇部へ海藻味刺激を行う前の蛍光画像。**A2**: 海藻味刺激から約10秒後の蛍光画像。蛍光画像はどちらも擬似カラーで表示され、赤い所ほど蛍光強度が強く、青い所ほど蛍光強度が弱い。**A1**で数字が示されているニューロンが蛍光強度変化を示す。**A2**の赤枠内のニューロンはGクラスターニューロンである。**B**: アメフラシ脳神経節の模式図。青丸はそれぞれのクラスターを表す。赤枠はAで蛍光画像を取得している範囲を示す。**C**: この実験で、口唇部へアオサ抽出液を与えたときの蛍光強度変化をグラフ化した図。1~10までの数字はそれぞれ**A1**中の1~10番のニューロンの蛍光強度変化に対応する。これ以外のニューロンは蛍光強度変化を示さなかったため、蛍光強度変化をグラフ化していない。刺激開始点を矢頭で示す。

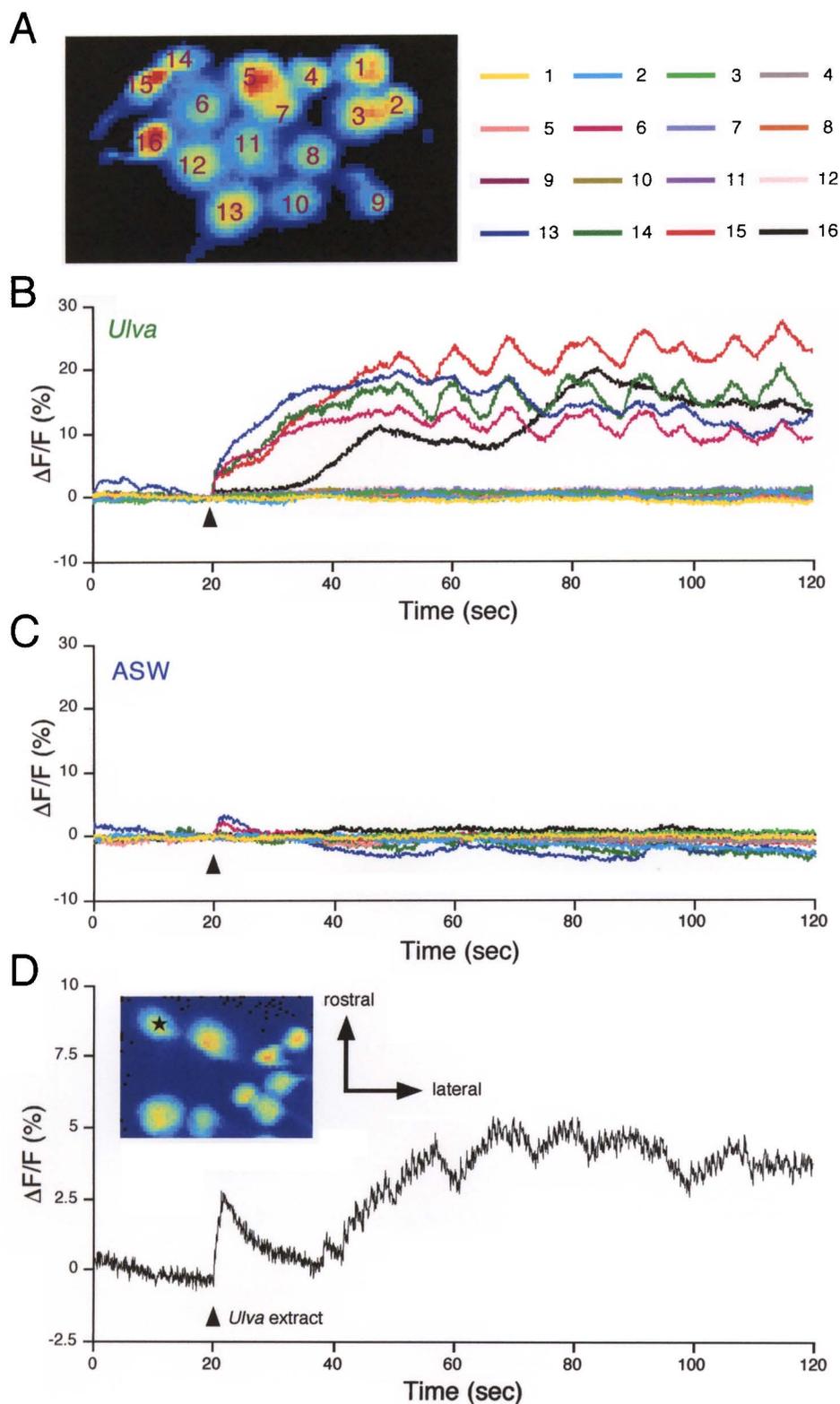


図17. 海藻味刺激に対するGクラスターニューロンの反応

A: 多数のGクラスターニューロンをカルシウム感受性色素で染色したときの蛍光画像。それぞれの番号はB~Cのグラフ線の色に対応する。**B**: 測定開始約20秒後にアオサ抽出液を口唇部へ与えたときの蛍光強度変化。6、13~16番のニューロンが大きな蛍光強度変化を生じた。**C**: 測定開始約20秒後に人工海水を口唇部へ与えたときの蛍光強度変化。6、13番のニューロンが一時的な蛍光強度の増加を示す。**D**: Gクラスター内で口唇部への海藻味刺激により、速いリズムカルな応答を示すニューロンの反応。挿入図では、このニューロンの左Gクラスター内での位置を★印で示す。**B**~**D**のグラフにおいて、刺激開始点を矢頭で示す。

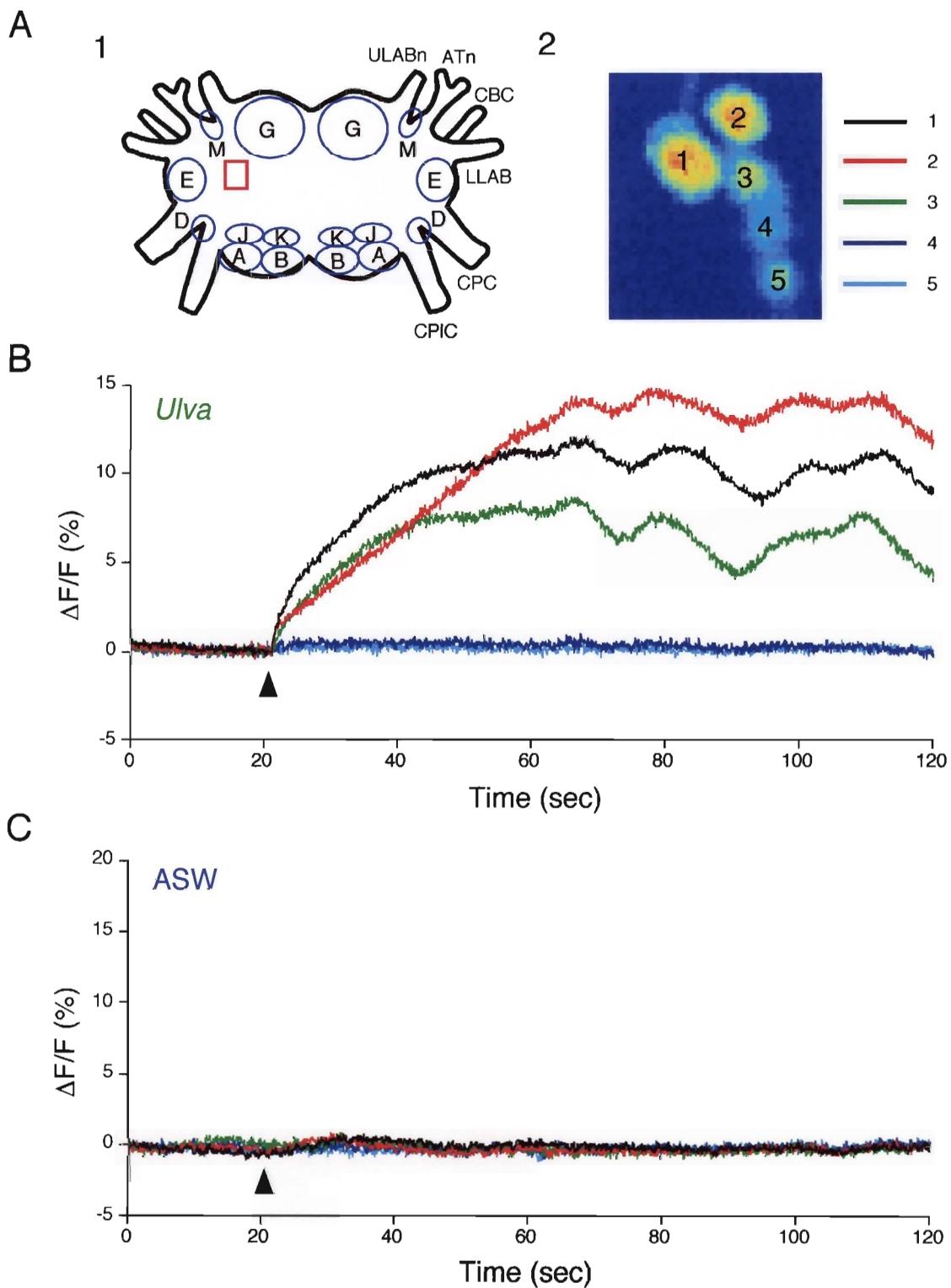


図18. 海藻味刺激に対するGクラスター近隣領域内ニューロンの応答1

Gクラスターから見て後外側の領域内に存在するニューロンの海藻味刺激に対する応答を観察した。**A1**: 脳神経節内でのこの領域の位置を赤枠で示す。**A2**: この領域のニューロンをカルシウム感受性色素で染色した時の蛍光画像。ニューロンの番号はそれぞれ**B**~**C**のグラフの線に対応する。**B**: 測定開始から約20秒後に口唇部へアオサ抽出液を与えた時のニューロンの応答。1~3番までのニューロンが大きな蛍光強度変化を示した。**C**: 測定開始後から約20秒後に口唇部へ人工海水を与えたときのニューロンの応答。刺激開始点をそれぞれ矢頭で示す。

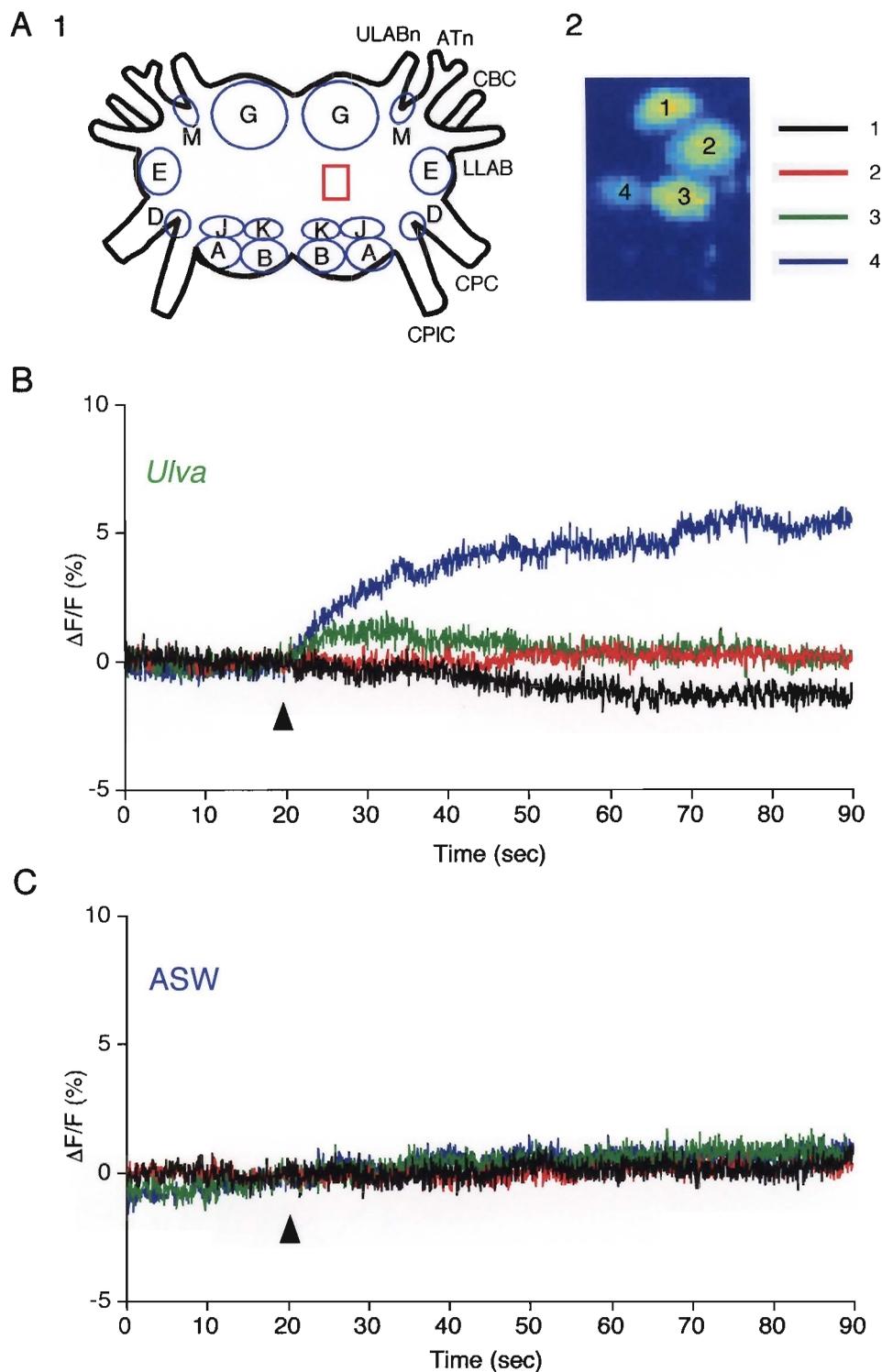


図 19：海藻味刺激に対するGクラスター近隣領域内ニューロンの応答 2

Gクラスターから見て後内側の領域内に存在するニューロンの海藻味刺激に対する応答を観察した。**A1**：脳神経節内でのこの領域の位置を赤枠で示す。**A2**：この領域のニューロンをカルシウム感受性色素で染色した時の蛍光画像。ニューロンの番号はそれぞれ**B**~**C**のグラフの線に対応する。**B**：測定開始から約20秒後に口唇部へアオサ抽出液を与えた時のニューロンの応答。**C**：測定開始後から約20秒後に口唇部へ人工海水を与えたときのニューロンの応答。刺激開始点をそれぞれ矢頭で示す。

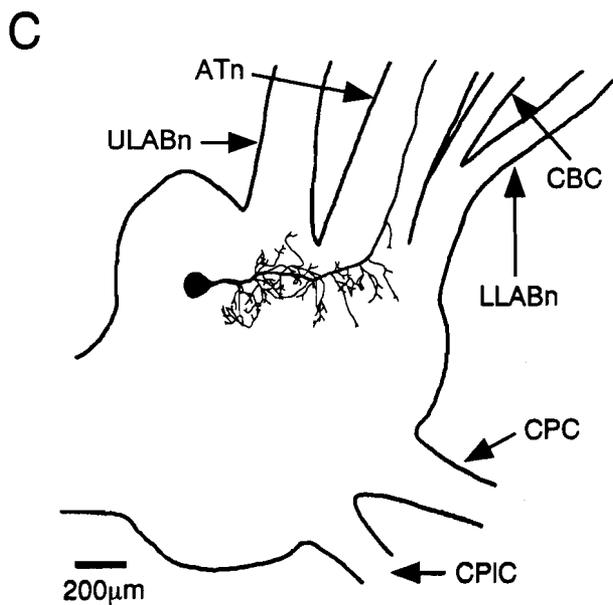
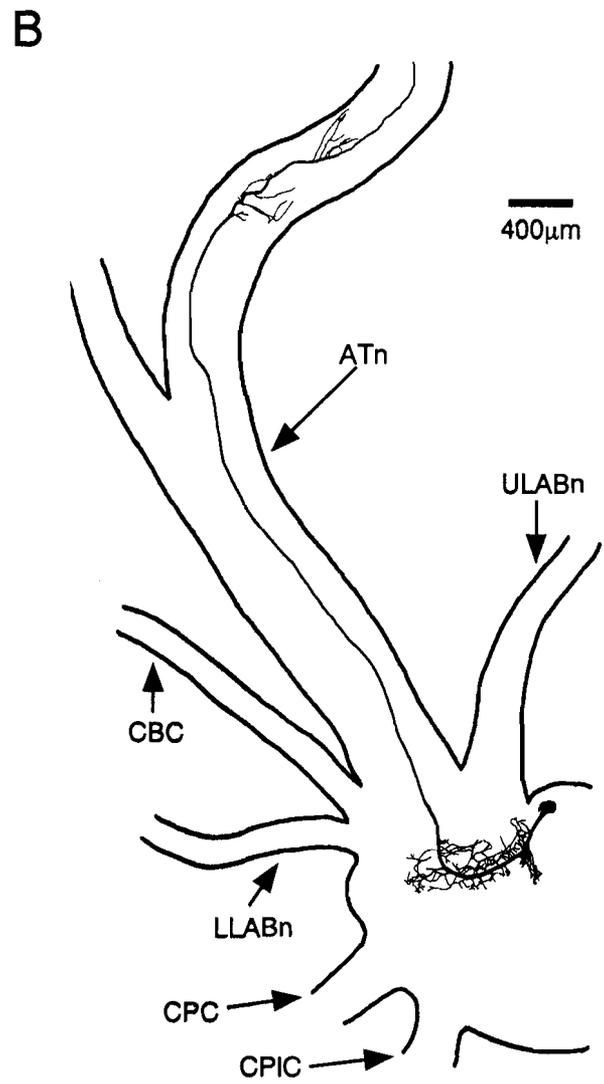
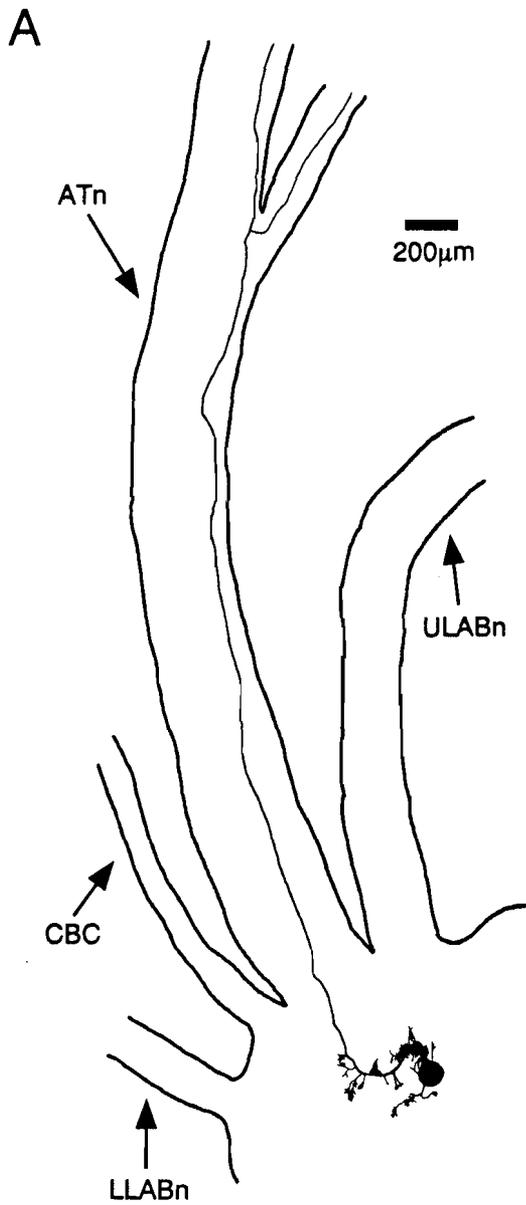


図20. 運動ニューロンの形態
 A: 前触覚運動ニューロンの形態。B: 口唇開運動ニューロンの形態。C: 口唇閉運動ニューロンの形態。すべて5(6)-carboxyfluoresceinを細胞内に注入することにより染色し、レーザー顕微鏡により形態を観察した。

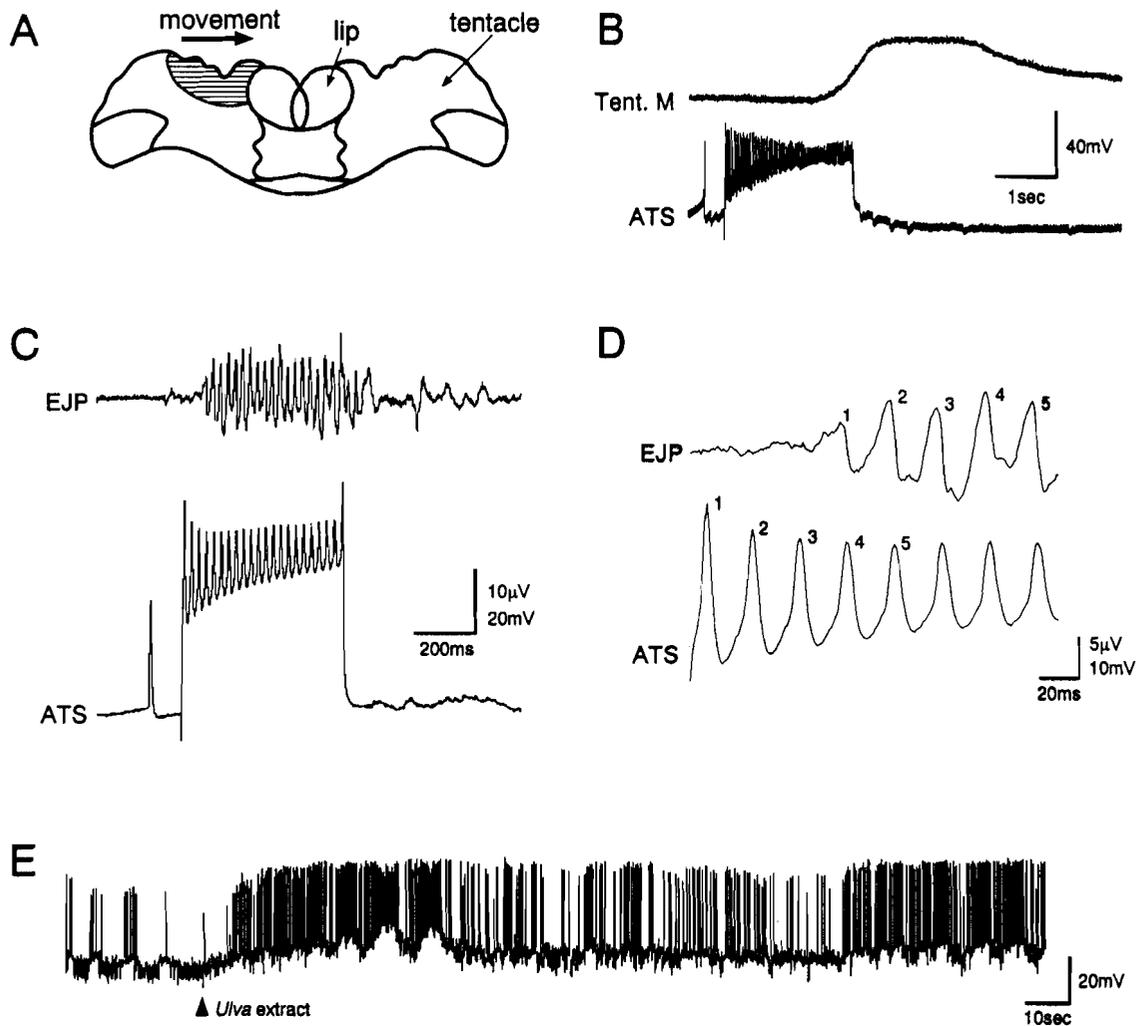


図 21. 前触角短縮運動ニューロン (ATS) の同定

A: 前触角運動ニューロンに脱分極通電を与えた時に生じる前触角での運動。このニューロンを興奮させると、図中の縞模様の部位で矢印の方向への動きが生じる。B: ATSに脱分極通電を与え興奮させた時に、Aの縞模様の位置で生じる動きを測定した。上: 前触角的動き。下: ATSの膜電位変化。C: ATSを脱分極通電により興奮させた時に生じる膜電位変化 (下) と前触角で測定した筋電位 (上) の同時記録。D: Cの記録の一部を拡大したもの。ATSのスパイクと筋電位との間の遅延は 65.8 ± 1.1 ms (mean \pm SD for 20 spikes)。E: 口唇部へアオサ抽出液を与えた時に生じるATSの膜電位変化。

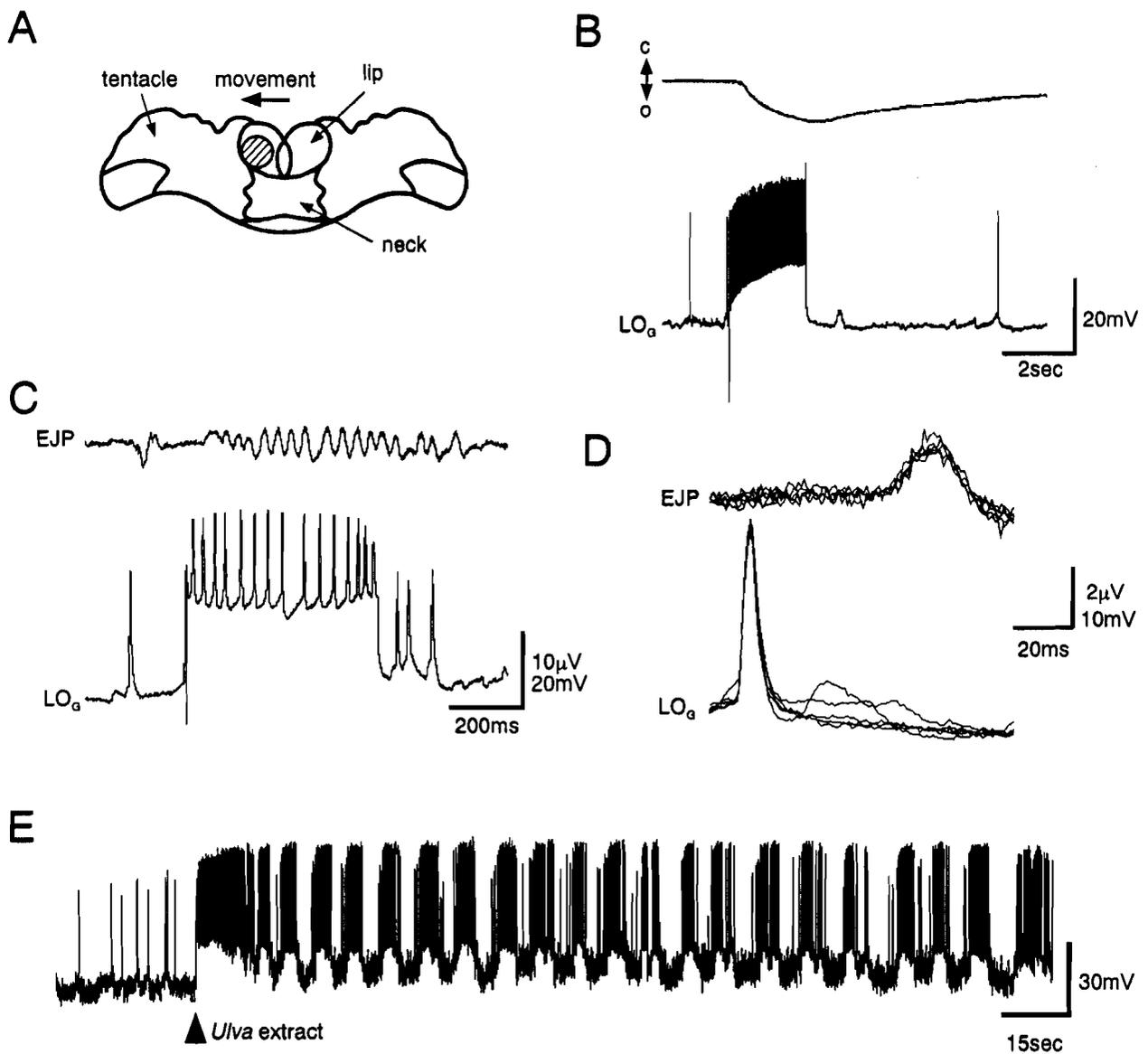
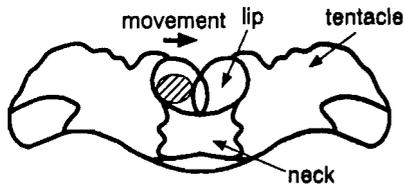


図 2 2. 口唇開運動ニューロン (LO_o) の同定

A: 口唇開運動ニューロンに脱分極通電を与えた時に生じる口唇部での運動。このニューロンを興奮させると、図中の縞模様の部位で矢印の方向への動きが生じる。B: LO_o に脱分極通電を与え興奮させた時に、Aの縞模様の位置で生じる動きを測定した。上: 口唇の動き。下: LO_o の膜電位変化。C: LO_o を脱分極通電により興奮させた時に生じる膜電位変化 (下) と口唇部で測定した筋電位 (上) の同時記録。D: LO_o のスパイクとそれにより生じる筋電位を重ね合わせた。その間の遅延は 60.6 ± 0.7 ms (mean \pm SD for 15 spikes) である。E: 口唇部へアオサ抽出液を与えた時に生じる LO_o の膜電位変化。

A



B

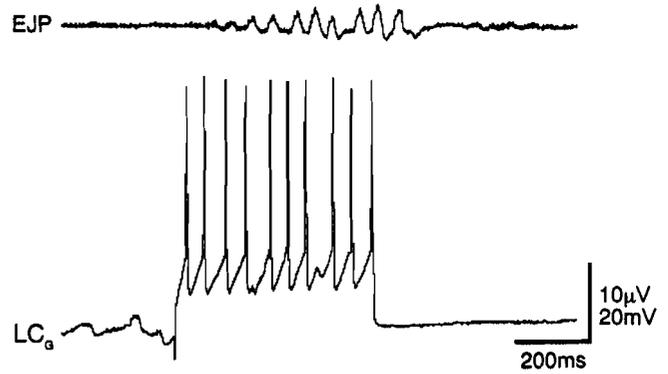


図 2 3. 口唇閉運動ニューロン (LC₀) の同定

A: 口唇閉運動ニューロンに脱分極通電を与えた時に生じる口唇部での運動。このニューロンを興奮させると、図中の縞模様の部位で矢印の方向への動きが生じる。B: LC₀に脱分極通電を与え興奮させた時に生じる膜電位変化と、Aの縞模様の位置で生じる筋電位を同時に測定した。上: 筋電位。下: LC₀の膜電位変化。この間の遅延は $68.2 \pm 0.8 \text{sec}$ (mean \pm SD for 17 spikes) であった。



図 2 4. 口唇部への海藻味刺激により生じる口唇開運動ニューロンと口唇閉運動ニューロンで生じる膜電位変化の同時記録

測定開始から約 3 0 秒後に口唇部へアオサ抽出液を与えた (矢頭)。このときに生じた LO₀、LC₀ の膜電位変化を同時に記録した。どちらのニューロンにもリズムカルなバーストが生じた。