



# 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。



【270】

氏名・(本籍) 吉田 竜介 (大阪府)

博士の専攻分野の名称 博士 (理学)

学位記番号 博い第187号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の日付 平成14年3月31日

【学位論文題目】

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

審査委員

主査 教授 土屋 禎三

教授 尼川 大作                      教授 竹田 真木生

助教授 長濱 辰文

本研究では、神経生理学の分野でよく用いられる実験動物、アメフラシ (*Aplysia kuroda*) の神経節のうち、摂食行動に特に関連すると考えられる口球神経節及び脳神経節を材料とし、ニューロン活動を検出するための新たな手法として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詳細に調べ、その後、実際にこの方法を用いてアメフラシ脳神経節内で海藻味刺激に反応するニューロンを探索し、それらのニューロンの一部について同定を行った。

カルシウムイメージングを行うためには細胞内にカルシウム感受性色素を負荷しなければならない。この方法として、3種類の方法がよく知られている。1つはAM型色素を用いた bulk 染色法、もうひとつは神経断端から逆行的に細胞体を染色するバックフィル法、最後に細胞内へ直接色素を注入するインジェクション法である。AM型色素を用いた bulk 染色は最も容易な染色法であるが、これを用いたアメフラシのニューロンへの色素導入を試みたが成功しなかった。バックフィル法を用いた場合、アメフラシでは一部ニューロンを染色できたが期待したほど多くの細胞を染色することができなかった。インジェクション法では個々のニューロンに短時間で色素を導入でき、多数ニューロンの染色も容易であった。以上の結果から、アメフラシではインジェクション法によりニューロンを染色することが最適であると判断された。

次にアメフラシニューロンにおいて、実際のスパイク活動に伴い細胞内カルシウムイオン濃度が増加するか、すなわち蛍光強度が増加するかを調べた。口球神経節内ですでに同定済みのニューロンのみならず、その他の未同定ニューロンにおいても、スパイク活動に応じ蛍光強度が増加した。さらに、多機能介在ニューロン、MAを用いて蛍光強度変化とニューロンのスパイク活動との関連を詳しく調べた。この結果、ニューロンのスパイク頻度は蛍光強度増加時の傾きに対応し、その発火期間は蛍光強度増加期間に一致することがわかり、カルシウムイメージングによりアメフラシのニューロン活動をかなり定量的に推測できることがわかった。カルシウムイメージングでは多くの細胞をカルシウム感受性色素で染色し、それらの蛍光強度変化を同時に観察できることから、多数ニューロンのスパイク活動を同時に検出することが可能であると予想された。そこで、口球神経節内のMA、JCニューロンを用い、摂食様パターン活動時に生じるスパイク活動の位相差をカルシウムイメージングにより検出できるかを調査した。カルシウムイメージングでこれらのニューロンにおける蛍光強度変化の時間経過を調べると、微小電極による膜電位測定の結果とよく一致し、この方法がこのような目的で利用できることがわかった。

次に、ニューロンのスパイク活動時に細胞内カルシウムイオン濃度を増加させる機構についてMAニューロンを用いて研究を行った。細胞外液からカルシウムイオンを除くと、ニューロン活動に伴う蛍光強度変化が完全に消失することから、外部からのカルシウムイオンの流入が必須であることが示唆された。また、この細胞内カルシウムイオン濃度の増加はニューロンのスパイク活動、すなわち電位変化に伴い生じることから、カルシウムイオンは電位感受性カルシウムチャンネルを通り

細胞内に流入すると予想された。そこで、種々の電位依存性カルシウムチャンネルの特異的阻害剤を用いそれらの効果を確かめた。この実験において、Tタイプ、Nタイプ、P/Qタイプカルシウムチャンネルの阻害剤は効果を示さなかったが、Lタイプカルシウムチャンネルの阻害剤、ニフェジピンを用いるとニューロン活動に伴う蛍光強度変化が半減した。しかし、Lタイプカルシウムチャンネルを阻害するだけでは、ニューロン活動時の細胞内カルシウムイオン濃度増加を完全にはなくせないため、他のメカニズムが関与する可能性がある。

さらに本研究では、この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反応を示すニューロン群の探索を試みた。アメフラシ脳神経節内では多数のニューロンが幾つかのクラスターに分類されており、それらの中でも特にG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研究を行った。これまでの研究から、これらのニューロンは摂食行動、特に味覚情報処理に関与する可能性が示唆されているが、これらに関わるといってはっきりとした証拠は無い。そこで、これらのニューロンを多数、カルシウム感受性色素で染色し、口唇部への海藻味刺激に対し反応を示すニューロンをカルシウムイメージング法により探索した。

口唇部へ海藻味刺激を行った時のGクラスターとその周辺領域のニューロンをカルシウムイメージング法で観察すると、確かに多数のニューロンが反応していることが判明した。Gクラスターでは一過的な反応を示すものやリズムカルな反応を示すもの、全く何の反応を示さないもの等、様々な反応が観察された。特にGクラスター辺側部にあるニューロンが海藻味刺激に対し多数反応し、中央部にある大きなニューロンではほとんど反応が見られなかった。Gクラスターから見て後側方側にある領域では、幾つかのニューロンが海藻味刺激に対しリズムカルな反応を示したが、それより神経節中央側の領域に存在するニューロンではほとんど反応が見られなかった。

これらの反応を示したニューロンの一部、特に海藻味刺激に対しリズムカルな反応を示したニューロンについて電気生理学的に同定を試みた。この結果、3種類の運動ニューロンが同定できた。1つは前触角を縮めるような動きを生じさせる前触覚運動ニューロン (ATS)、もう1つは口唇を開けるような動きを生じさせる開口唇運動ニューロン ( $LO_c$ )、更にもうひとつは口唇を閉じるような動きを生じさせる閉口唇運動ニューロン ( $LC_c$ ) であった。これらのニューロンは実際に口唇部への味刺激に対し反応を示し、特に $LO_c$ 、 $LC_c$ の発火パターンは非常にリズムカルで、これまで口球神経節内で同定されている運動ニューロンの発火パターンに非常によく似ていた。

このように、イメージング法はこれまでの電気生理学的手法と組み合わせることによってニューロン同定のための強力なツールとなり、また、多くのニューロンから活動を記録できることから、ニューロンの発火パターンの解析などに用いることが出来ると考えられる。

氏名	吉田 竜介		
論文 題目	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		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	土屋 禎三 印
	副査	教授	尼川 大作 印
	副査	教授	竹田 真木生 印
	副査	助教授	長濱 辰文 印

## 要 旨

本研究は、海産の軟体動物アメフラシを用い、この動物の摂食行動、特に味覚受容に伴う中枢ニューロンの活動を調べることを主な目的としている。アメフラシ中枢の神経細胞（ニューロン）の数は脊椎動物に比べて非常に少なく、またニューロン細胞体を顕微鏡下で観察でき同定がしやすいことから、神経回路網を個々のニューロンレベルから調べていくことが可能である。そこでこれまでは、ニューロンの電気的活動を検出するため細胞内微小電極を用いて数多くの研究が行われてきた。しかしながら、本研究が目指すような中枢における感覚情報処理機構の研究では、刺激に伴う多数のニューロン群の活動を調べる必要がある。このような場合、微小電極法では限界があり新しい手法の導入が望まれる。まず第一章では、このような方法として最近脊椎動物ニューロンのスパイク検出に使われはじめたカルシウムイメージング法により、アメフラシニューロンでもスパイク活動を定量的に検出できるかどうかを詳細に調べてその有効性を示し、第二章では、この方法を用いて味覚受容に伴う多数の中枢ニューロンの活動を検出し新たな知見を得た。

蛍光強度変化の定量的解析では、蛍光強度変化の傾きがスパイク発火頻度に比例すること、蛍光強度の増大期間がスパイク発火の期間にほぼ一致することを見いだした。これらの結果はカルシウムイメージングの実験のみからニューロンのスパイク発火の様子を定量化できることを意味しており、この方法の有効性を証明した。さらに、スパイク発火に伴う細胞内カルシウムイオン濃度の増大のメカニズムを調べ、電位依存性カルシウムチャンネルのうち L タイプが関与していることを示した。L タイプのカルシウムチャンネルは広く動物細胞全体に存在することから、アメフラシ中枢のどのニューロンにもこの方法が適用できることを証明した。以上の結果、カルシウムイメージング法がアメフラシ中枢におけるニューロンのスパイク活動の検出に非常に有効であることを示し、またこれらの実験結果に基づき他の研究者がこの方法を利用するための詳細なデータを提供した。

また第二章では、カルシウムイメージング法を用い、海藻の味刺激に反応するアメフラシ中枢ニューロンの探索を行っている。これまでの研究においては少数の中枢ニューロンの味覚応答を微小電極を用いて調べているが、本実験のように多数のニューロンの応答を同時に調べた例はまだない。ここではこれまでニューロンの同定がまだほとんどなされていない脳神経節内の G クラスタとその周辺ニューロンに焦点をあて、これらニューロンの応答を調べた。このうち、G クラスタ周辺領域のニューロンは壊れ易く、もともと電極の保持が非常に難しい場所であるが、一度色素を導入すれば後は長時間応答が測定できるというカルシウムイメージングの利点を用い実験を行った。この結果、染色可能な G クラスタ、およびその周辺領域ニューロンの半数近くが口唇への味刺激により応答することを見いだした。この中には刺激によりリズムカルなスパイク発火が誘発されると思われるものも存在した。また、今回の色素導入法ではその初期に微小電極を細胞内に刺入することからニューロンの機能をその段階で知ることができる。本研究ではこのようにして3種類の運動ニューロンを新たに同定した。すなわち、前触角を短縮させるもの (ATS)、口唇を開かせるもの (LOG)、口唇を閉じさせるもの (LCG) である。口唇への海藻の味刺激により、これら運動ニューロンには、長時間持続するリズムカルな発火が誘発され、これらが摂食時の前触角、口唇の動きに関与している可能性が示唆された。また口唇運動に関わる LOG、LCG ニューロンからの同時記録により、味刺激で両者に誘発される発火パターンに差があることも見いだした。これらニューロンのリズムカルな応答は脳神経節のみの試料でも発現したが、摂食時の口などのパターン運動は下位中枢である口球神経節で形成されると考えられている。そこで、脳神経節と口球神経節の間でリズムカルなパターンを連携するメカニズムが存在することも示唆した。

氏名	吉田 竜介
----	-------

このように、カルシウムイメージングを用いることにより、味受容に伴う中枢ニューロン活動に対する多くの新しい知見が得られ、今後の味覚受容に伴う中枢情報処理機構の研究に新たな方向性を示した。

本研究はアメフラシ摂食行動発現機構について、新たにカルシウムイメージング法を用いて中枢神経回路網を研究したものであり、この方法の有用性と摂食関与ニューロン群について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

よって、学位申請者の吉田竜介は、博士（理学）の学位を得る資格があると認める。