

PDF issue: 2025-01-10

アメフラシの吐き出し行動発現に寄与する神経回路
 網の解明

成末,憲治

<mark>(Degree)</mark> 博士(理学)

(Date of Degree) 2002-09-30

(Date of Publication) 2013-05-27

(Resource Type) doctoral thesis

(Report Number) 甲2655

(URL) https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002655

※ 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 論 文

アメフラシの吐き出し行動発現に寄与する 神経回路網の解明

平成 14 年 8 月

神戸大学大学院自然科学研究科

成末憲治

目次

要旨	1
序論	
1. はじめに	4
2. アメフラシの食物嗜好性について	4
3. 摂食と吐き出し応答で見られる口の運動パターンの違い	5
4. 摂食と吐き出し応答で見られる口球神経節内ニューロンの活動の違い	6
5. カルシウムイメージング法	8
6. 本研究の目的	8
材料と方法	10
1. 実験動物	10
2. 逆行性染色法	10
3. 組織蛍光法および抗体染色法	11
4. 形態観察	12
5. 測定用プレパレーション	12
6. 電気生理測定	13
7. ニューロンの同定	14
8. カルシウムイメージング法	15
9. 海藻味刺激と溶液組成	17
結果	19
1. CB ニューロンの探索	19
2. CBMニューロンの含有する修飾物質	20
3. カルシウムイメージング法を用いたニューロンのスパイク活動の検出	22
4. 摂食や吐き出し味刺激により誘発される СВм ニューロンの応答	23
5. 海藻味刺激により誘発される CBMニューロン応答の同時測定	26
6. 海藻味刺激の濃度変化に対する CBM1 の味覚応答	28

7. CBMニューロンの味覚応答のまとめ	29
8. CBm1 の味覚応答とスパイク発火頻度の関係	30
9. 触刺激に対する CBM1 の応答	32
10. CBM1 の機能解析	32
11. MA-JC 間の抑制性シナプスの伝達効率に対する CBM1 の効果	33
12. MA-JC 間の抑制性シナプスの伝達効率に対するドーパミンの効果	34
考察	36
1. CB ニューロン	36
2. 海藻味刺激に対する CB ニューロンの応答	38
3. CBm1 の修飾効果	40
4. 摂食や吐き出し運動パターン形成に寄与する CB ニューロン	42
謝辞	43
参考文献	44

要旨

アメフラシ (Aplysia kurodai) はアオサ (Ulva) やワカメ (Undaria) などの海 藻を好んで食べるが、マクサ (Gelidium) やサナダグサ (Pachydictyon) などは 嫌って吐き出す。この動物は海藻味刺激により口の開閉運動と同調する歯舌の リズミカルな運動パターンを発現するが、これまでの研究でアオサ味刺激によ る摂食パターンとマクサ味刺激による吐き出しパターンを比較すると、口と歯 舌に異なる運動パターンが発現されることが明らかになった。このような神経 機構を調べると、マクサ吐き出し時には口球神経節内の介在ニューロン (MA, Multi-action) が閉口運動ニューロン (JC, Jaw-closing) に誘発する抑制性シナプ スの大きさが摂食時に比べて減少することがわかった。このことより摂食時に 比べて吐き出し時には、この MA-JC シナプス部位の伝達効率が特異的に抑圧 され、その結果パターン変化が起こると考えられた。そこでこのような口球神 経節内の特定シナプス部位を吐き出し時に特異的に修飾するニューロンを探索 することを本研究の目的とした。

これまでの研究より口球神経節内の MA-JC シナプス部位の修飾に関与する ニューロンは、脳神経節内に細胞体があり口球神経節と連結する神経 (脳-ロ 球連合) に軸索を伸ばすような形態的特徴をもつことが示唆されている。この 神経節間介在ニューロン (CB, Cerebral-buccal interneuron) を探すため、脳-ロ 球連合の神経断端から CB ニューロンを逆行性に染色した。逆行性染色の結果、 同側の脳神経節内に約 10 個、対側に1 個の CB ニューロン細胞体が見つかっ た。アメフラシの脳神経節内にあるニューロン細胞体はいくつかのクラスター に分かれて存在するが、CB ニューロン細胞体は G, M, E クラスターと呼ばれ る領域に数個ずつわかれて存在した。アメリカ西海岸などに棲息するアメフラ シ (Aplysia californica) では摂食や吐き出しに関わる司令様ニューロンや修飾 ニューロンの細胞体は脳神経節内 M クラスターに存在することが報告されて いる。そこで本研究では M クラスターに存在する CB ニューロン (CBM) に焦 点を当て、詳しく調べることにした。複数の CBM ニューロンを含有物質の違いから見分けるため、逆行性染色法と組織蛍光法または抗体染色法を組み合わせた。この結果、脳神経節内 M クラスターの Ventral 面に存在する4個の CBM ニューロンは含有物質の違いから区別することができた。このうちカテコールアミン様物質を含有するニューロンを CBM1、神経ペプチドである Myomodulin 様物質を含有するものを CBM2b、神経伝達物質である GABA 様物質を含有す るものを CBM3 と命名した。また本研究で用いた組織蛍光法と抗体染色法により細胞体が蛍光を発しなかった CBM ニューロンを CBM2a とした。

摂食や吐き出し味刺激に対する CBM ニューロンの応答を調べるため、カル シウムイメージング法を用いた。最近、アメフラシでニューロンのスパイク活 動とそれに伴う蛍光強度変化の関係が詳しく調べられており、蛍光強度増大の 初期の傾きはスパイク発火頻度にほぼ比例して大きくなり、蛍光強度増大の期 間はスパイク発火期間にほぼ対応することが明らかなっている (Yoshida et al., 2001)。これらの関係より、カルシウムイメージング法を用いてニューロンの スパイク発火頻度や発火期間を推測することが可能であった。

カルシウム感受性色素の導入は、微小電極を用いて電気泳動的に導入する手 法と外科的手術により脳神経節と口球神経節を結ぶ脳-ロ球連合の断端から逆 行性に導入する手法の2種類を用いた。しかし色素を逆行性に導入する手法で は動物に外科的手術を施すことから、海藻味刺激に対する CBM ニューロンの 応答が弱くなり、また個々のニューロンの染まり方にばらつきがあった。そこ で海藻味刺激に対する CBM ニューロンの応答は、主に電気泳動的手法を用い て行った。海藻味刺激には摂食応答を誘発するアオサ、吐き出し応答を誘発す るマクサの2種類の海藻からの抽出液を用いた。実験ではカルシウム感受性色 素 Calcium Green-1 を含む微小電極を用い、脳神経節内の CBM ニューロン細 胞体に色素を電気泳動的に導入した。その後、口唇部への摂食や吐き出し味刺 激に対する CBM ニューロンの応答を調べた。海藻味刺激に対する GABA 様物 質を含有する CBM3 の応答を調べたところ、CBM3 は摂食や吐き出し味刺激に よりどちらもスパイク活動が増大したが、摂食味刺激ではより長時間持続する スパイク活動が誘発された。また海藻味刺激に対する CBM2a/b の応答を調べ たところ、CBM2a/b は摂食や吐き出し味刺激によりどちらもリズミカルなスパ

- 2 -

イク活動が誘発されたが、摂食や吐き出し味刺激に対する応答性に明白な差は 見られなかった。海藻味刺激に対するカテコールアミン様物質を含有する CBM1の応答を調べたところ、CBM1は摂食や吐き出し味刺激によりどちらも スパイク活動が増大したが、吐き出し味刺激ではより高頻度のスパイク活動が 誘発された。このことから吐き出し味刺激に対して特異的に応答する CBM1 が、 吐き出し時に見られる口球神経節内の特定シナプス部位の伝達効率抑圧に関与 しているニューロンの候補と考えられ、以下の実験ではこのシナプス部位に対 する CBM1の機能解析を行った。

吐き出し味刺激で見られた CBM1 のスパイク応答と同様に CBM1 を高頻度で 発火させ、口球神経節内の MA-JC 間シナプス伝達に対する CBM1 の効果を調 べた。実験では JC を膜電位固定した状態で MA を繰り返し発火させ JC に抑 制性シナプス電流 (IPSC) を誘発させ、その途中で CBM1 を発火させたときの IPSC サイズの変化を調べた。MA 発火により誘発される JC の IPSC サイズは、 CBM1 を比較的低頻度 (約 20 spikes/s) で発火させるとコントロールに比べて ほとんど変化は見られなかった。しかし CBM1 を高頻度 (約 40 spikes/s) で発 火させると IPSC サイズは発火直後から急激に減少し、その効果は 100 秒以上 持続した。また CBM1 の発火頻度と CBM1 刺激により減少した IPSC サイズと の関係を詳しく調べたところ、CBM1 による IPSC サイズ修飾効果は発火頻度 が25 spikes/s以上になると明白に現れることがわかった。すなわち CBM1 は発 火頻度依存的に MA-JC 間シナプスの伝達効率抑圧に関与していることが示唆 された。さらにカテコールアミンの1つであるドーパミンの作用を調べたとこ ろ、CBM1の高頻度発火時と同様に MA-JC 間シナプスの伝達効率を抑圧させ ることがわかった。またドーパミン D1 receptor のアンタゴニストである SCH23390 によりドーパミンや CBM1 の修飾効果が抑制されることから CBM1 が修飾物質としてドーパミンを放出しており、MA-JC 間シナプス部位に対し て直接的に作用している可能性が示唆された。これらの結果より、カテコール アミンを含有する CBM1 が摂食時から吐き出し時への口の運動パターンのスイ ッチ機構に重要な役割を果たし、マクサ味刺激による吐き出し応答パターン形 成に寄与する中枢ニューロンの1つであることが示唆された。

1. はじめに

動物は食物を摂取するとき、生体にとって有益なものや美味しいと感じるも のを取り込み、有害なものやまずいと感じるものを避けるという嗜好性に基づ いた食物選択を行う。食物の種類や特性などを認知し、動物の記憶や経験に基 づき適切な行動を選択することは、生命を維持していく上で重要である。

動物が食物などの刺激に反応して行動するとき、まず生体のもつ特殊に分化 した受容器が興奮し、その活動は神経情報として中枢神経系に伝えられる。こ れら情報は中枢内で統合処理され、筋肉などの効果器に様々な運動パターンを 発現する。動物が食物の種類に応じて適切な行動を選択するためには、受容器 と効果器との間を媒介する中枢神経系の活動が適切に切り替わる必要がある。 しかし動物は食物に合わせてどのように運動出力を調節しているのだろうか? 本研究では行動が切り替わるときの中枢神経系における運動パターンのスイッ チ機構について、軟体動物腹足類に属するアメフラシ (Aplysia, 図 1) を用い て解明することを主目的とした。

2. アメフラシの食物嗜好性について

アメフラシは潮間帯の岩礁などに棲息し、主に海藻を食べている。またアメ フラシは海藻の違いを識別し、食物嗜好性を形成することが知られている (Carefoot, 1967, 1970; Kupfermann and Carew, 1974; Audesirk, 1975)。例えば、ア メリカ西海岸などに棲息するアメフラシ (Aplysia californica) は、アオサ (Ulva) やソゾ (Laurencia) などの海藻を好んで食べるが、マクサ (Gelidium) などは ほとんど食べないことが報告されている (Kupfermann and Carew, 1974)。また 日本に棲息するアメフラシ (Aplysia kurodai) では6種類の異なる海藻に対し て摂食応答の誘発される割合が調べられており、アオサなどの海藻は好んで食 べるが、ソゾ、マクサ、サナダグサ (Pachydictyon) などはあまり食べず、逆 に嫌って吐き出すことがわかっている (Nagahama and Shin, 1998, 図 2A)。この ようにアメフラシは種により海藻の好みに違いはあるが、食物の種類に応じて 好きな海藻は摂食し、嫌いな海藻は吐き出すという行動を発現する。

食物嗜好性は、味をはじめとするいくつかの食感覚が影響することが知られ ている。食物嗜好性に関する要素として味、匂い、テクスチャー(物理的食感) などがあり、これら感覚特性が食物の美味しさを左右している。しかしアメフ ラシに海藻をそのまま与えたときと、海藻をすりつぶした抽出液を与えたとき で誘発される口の運動パターンにほとんど差が見られないことから、摂食と吐 き出しの選択には味情報が重要であると考えられている(Nagahama and Shin, 1998)。またこれまで摂食応答を誘発する海藻としてアオサ、吐き出し応答を 誘発する海藻としてマクサやサナダグサからの抽出液を用いて、摂食と吐き出 し応答で見られる口の運動パターンや中枢内のニューロン活動の違いが詳しく 調べられている (Nagahama and Takata, 1988, 1990; Nagahama and Shin, 1998; Nagahama et al., 1999)。

3. 摂食と吐き出し応答で見られる口の運動パターンの違い

アメフラシの化学受容器は口唇部と触角部に主に分布すると考えられている。 匂いなどの嗅覚は主に後触角で感じ、味などの味覚は主に口唇部や前触角で感 じる (Preston and Lee, 1973; Audesirk, 1975; Kandel, 1976, 1979, 図 1B)。アメフ ラシは海藻の存在をまず嗅覚で知り、空腹であれば頭部を持ち上げて首振り運 動を伴う独特の"摂食姿勢"をとる (Kupfermann, 1974; Teyke et al., 1990, 1992; Nagahama et al., 1993, 1994)。海藻がアメフラシの口唇部に触れると味を感じ、 口および歯舌 (歯と舌の中間体) ではパターン化された運動がリズミカルに発 現する (Cohen et al., 1978; Nagahama and Takata, 1988; Church and Lloyd, 1994; Evans et al., 1996, 図 2B)。

行動解析用ビデオカメラを用い、好きな海藻であるアオサからの抽出液で口 唇部を刺激して誘発される摂食応答と嫌いなマクサからの抽出液で誘発される 吐き出し応答で口の運動パターンを比較すると、歯舌を突き出すときの口の開 き方 (開口) に差は見られないが、歯舌を引っ込めるときの口の閉じ方 (閉口) に差のあることが明らかになっている (Nagahama and Shin, 1998)。摂食応答の 場合、歯舌を引っ込めるときにすぐ口が閉じず少し開いた状態が維持され (半 開口)、それに続いて口が閉じる (図 3)。これに対して吐き出し応答の場合、 歯舌を引っ込めるのと同調して口がすばやく閉じる (図 4)。すなわち歯舌を引 っ込めるときの閉口の開始時期が摂食に比べ吐き出しでは早くなるのである。 摂食の場合、歯舌を引っ込めるときに閉口が遅れるのは口の中へ海藻を取り込 むために重要であり、吐き出しの場合、閉口が早くなるのはこれが不要である ためと考えられる。

4. 摂食と吐き出し応答で見られる口球神経節内ニューロンの活動の違い

アメフラシの神経系は複数の神経節からなり、個々の神経節はほぼ異なる機 能的役割を担っている (Kandel, 1976, 1979, 図 5)。これらのうち摂食や吐き出 し行動に関与する神経節は、主に脳神経節と口球神経節である。脳神経節は口 唇部や触角部などの頭部組織を主に支配し (図 5B)、口球神経節は口や歯舌を 動かす筋組織である口球や、咽頭、食道などを主に支配している (図 5C)。口 唇部や触角部で受容された嗅や味の情報は神経情報に変えられ、まず上位中枢 である脳神経節に伝えられる (Jahan-Parwar, 1972; Fredman and Jahan-Parwar, 1980, 図 7)。これら情報はそこでの統合処理により認知判断され、適切な行動 選択後、その行動に関わる司令様ニューロンや修飾ニューロンを介して下位中 枢である口球神経節内の中枢パターン発生器 (CPG, Central pattern generator) を駆動させる (Rosen et al., 1991; Church and Lloyd, 1994; Perrins and Weiss, 1998; Xin et al., 1999; Sanchez and Kirk, 2000; Jing and Weiss, 2001; Morgan et al., 2002). CPG では各運動パターンが形成され、その出力は MA (Multi-action) などの CPG 構成ニューロンから下流にある JC (Jaw-closing, 閉口) などの運動ニューロン 群に伝えられ、これらニューロンのパターン活動を誘発する (Susswein and Byrne, 1988; Kirk, 1989; Nagahama and Takata, 1989, 1990)。その結果各々の運動 ニューロンが支配する筋群 (口球筋) にリズミカルな収縮や弛緩が誘発され

(Cohen et al., 1978; Scott et al., 1991)、最終的な摂食や吐き出しの運動パターン が発生すると考えられている。

これまでアメフラシの摂食や吐き出し応答における口の運動パターン形成に 重要な働きを担う口球神経節内ニューロンがいくつか同定されており、それぞ れのニューロンのスパイク活動のタイミングにより微妙な口の動きが形成され ていることが示唆されている (Nagahama and Takata, 1988, 1989; Nagahama and Inoue, 1999)。その一例として、摂食や吐き出し応答に見られる口と歯舌の運 動パターンとそれに対応する MA, JC ニューロンの放電パターンを図 3A, 4A に示す。摂食応答時 MA は歯舌の引っ込め開始とともに発火を開始し、歯舌 を引っ込める途中 (半開口期) で発火が終わるのに対し、JC は歯舌の引っ込め 開始と同時に脱分極するが半開口期には発火せず、半開口期終了後から歯舌の 引っ込めが完了するまで発火する (図 3A)。一方、吐き出し運動時 MA, JC は ともに歯舌の引っ込め開始とともに発火を始めるが、MA は歯舌を引っ込める 途中に発火が終わるのに対し、JC は歯舌の引っ込めが完了するまで発火する (図 4A)。このように摂食と吐き出し応答では JC のスパイク活動の開始時期が 変化し、この結果として異なる口の運動パターンが発現することが報告されて いる (Nagahama and Shin, 1998)。

JC は MA の活動により単シナプス性に抑制されることがわかっている (Nagahama and Takata, 1989) が、最近になり、摂食と吐き出し応答で見られる JC のスパイク活動の開始時期の違いは、MA-JC 間の抑制性シナプスの伝達効 率の変化によることが示唆されている (Nagahama et al., 1999)。この研究では 口唇部をアオサまたはマクサからの抽出液で刺激し、その刺激前後で MA が JC に誘発する抑制性シナプス電流 (IPSC) のサイズの変化を調べ (図 6)、アオサ 味刺激の場合、MA-JC 間の IPSC サイズはコントロールとほとんど変わらない が (図 6A, C)、マクサ味刺激の場合、IPSC サイズが刺激後急激に減少するこ とを示した (図 6B, C)。すなわち摂食応答の場合、JC を単シナプス性に抑制 する MA の活動により、JC のスパイク活動の開始時期が遅れるが、吐き出し 応答の場合、MA-JC 間の抑制性シナプスの伝達効率が特異的に抑圧されるこ とにより、JC の活動開始時期が早くなるのである。

5. 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と画像解析装置を用いて、 細胞内カルシウム濃度の時空間変化を測定する方法である。この方法は、ニュ ーロンのスパイク発火に伴う細胞内カルシウム濃度変化による蛍光強度の変化 が比較的大きいため、最近スパイク活動のモニターに使われている (O'Donovan et al., 1993; McClellan et al., 1994; Fetcho and O'Malley, 1995; Lev-Tov and O'Donovan, 1995; O'Malley et al., 1996)。またゼブラフィッシュなどでニュ ーロンの軸索からカルシウム感受性色素を逆行性に導入する手法を用いて、ニ ューロンのスパイク活動を測定できることが報告されている (McClellan et al., 1994; Fetcho and O'Malley, 1995, 1997; O'Malley et al., 1996)。

一般にニューロンの膜電位測定には微小電極を用いた電気生理学的手法が行われ、ニューロンの電気的応答が調べられてきた。しかし微小電極法は膜電位変化を正確に測定することができるが、比較的小さなニューロンに微小電極を刺入し、長時間にわたりその活動をモニターすることが困難である。しかしこのカルシウムイメージング法を用いて、アメフラシの比較的小さなニューロンのスパイク活動を測定できることが最近報告されている(Yoshida et al., 2001)。この手法ではカルシウム感受性色素(Calcium Green-1)を微小電極を用いてアメフラシのニューロンに電気泳動的に導入するとき、色素の導入が2~5分と短時間で行うことができ、一度色素を導入すると長時間にわたり安定したスパイク活動を記録することができる。アメフラシで使われている Calcium Green-1は1波長励起1波長蛍光測定用の色素である。この色素は可視光励起のため、UV 光などを用いる色素に比べ生体への害が少ない。また他の色素と比べ蛍光強度変化が大きいため、測定時のノイズ比を比較的小さく抑えることができる。

6. 本研究の目的

これまでの研究より、摂食時に見られる口の運動パターンから吐き出し時の 運動パターンへのスイッチは、口球神経節内の CPG 出力パターン部位で行わ れ、このスイッチは介在ニューロン (MA) が閉口運動ニューロン (JC) に誘発 するシナプス電位のサイズ変化によって起こり、吐き出し時にはこの特定シナ プス部位の情報伝達効率が特異的に抑圧されることが示唆されている (Nagahama et al., 1999, 図 6)。そこでこのような特定シナプス部位での情報伝 達効率を変化させる修飾ニューロンの存在が予想され、このような修飾ニュー ロンを探索することを本研究の目的とした。最近、口球神経節内の特定シナプ ス部位の修飾に関与するニューロンは脳神経節内に細胞体が存在することを示 唆する結果が得られている。そこで脳神経節内に細胞体があり口球神経節に軸 索を伸ばすような形態的特徴をもつ神経節間介在ニューロン (CB, Cerebralbuccal interneuron) をその候補として調べることにした (図 7)。

材料と方法

1. 実験動物

実験材料として、軟体動物腹足類に属するアメフラシ (Aplysia kurodai) を 用いた (図 1)。実験材料は兵庫県洲本市と福井県三方郡周辺で採集し、実験に は 30~400g の成体を用いた。アメフラシは採集後、人工海水 (ASW, アクア マリン S, 八洲薬品)を満たしたエアポンプ、フィルターおよび冷却器付き水 槽に移し約 15℃で飼育した。餌として、アナアオサ (Ulva pertusa) を1日1 回適量与えた。

2. 逆行性染色法

逆行性染色法は、拡散によりニューロンの軸索から色素を逆行性に導入し、 ニューロン細胞体を染色する手法である (Xin et al., 1999, Biocytin backfilling 法)。脳神経節内に細胞体が存在し、口球神経節へ軸索をのばす神経節間介在 ニューロン (CB, Cerebral-buccal interneuron) を探すため、脳-ロ球連合 (C-B conn., Cerebral-buccal connective) の断端から逆行性染色を行った。麻酔として アメフラシ重量の 20~30%の等張性 MgCl₂溶液を動物の腹腔内に注入した。 動物が弛緩した後、背側を上にしてパラフィンプレート解剖台にピンで固定し、 解剖用ハサミで頭部背側を正中線に沿って切開した。胃の内容物が漏れないよ うに食道を糸で結束して切り離し、口球およびそれを取り巻く神経節を取り出 した (図 5, 8A)。脳神経節を単離し、シルガード (ダウコーニング) を敷いた ガラス製シャーレ (IWAKI) に ASW を満たし、脳神経節の Ventral 面を上にし てステンレス製マイクロピン (0.1mm 径, FST) で固定した。脳神経節と口球神 経節を結ぶ C-B conn. の断端に先端が適当な径のポリエチレンチューブ (Igarashi Ika Kogyo, 200~400µm 径, 長さ 4~5cm) を吸引して取り付け、チュ ーブ内には 50mM NaHCO₃溶液で希釈した 3% Biocytin 溶液 (pH 8.0, Molecular Probes) を入れた。シャーレ内に 1mM Probenecid 溶液 (和光純薬) を加え、約 4℃で2日間静置した。 2日後、脳神経節を 4% Paraformaldehyde 溶液 (半井化 学) で室温下2時間固定した。固定後、脳神経節をマイクロチューブ (1.5ml, SARSTEDT) に移し 0.1M PBS 溶液 (Phosphate buffered saline) で数回洗浄し、 続いて 0.1M PTAB 溶液 (Phosphate triton azide buffer) に置き換え約 4℃で一晩 静置した。翌日、脳神経節を蛍光ラベルした Streptavidin に浸し、約 4℃で 6~ 12 時間染色した。ここでは Streptavidin, rhodamine B conjugate (励起 570nm/発 光 590nm, Molecular Probes) を 0.1M PTAB 溶液で 30~50µg/ml に希釈して用い た。最後に脳神経節を 0.1M PTAB 溶液、0.1M PBS 溶液の順にそれぞれ数回ず つ数日かけて洗浄し、0.1M PBS/Glycerol 溶液 (1/6) で透明化を行った後、約 4℃ で保存した。

3. 組織蛍光法および抗体染色法

組織蛍光法はパラホルムアルデヒドとグルタルアルデヒドの混合液に近紫外 光を照射すると、生体アミンが存在する場合、青緑色光 (ドーパミン、アドレ ナリンなど) や黄橙色光 (セロトニン) を発することを利用して、ニューロン や組織がカテコールアミンを含有しているかを調べる手法である (Furness et al., 1977; Goldstein and Schwartz, 1989; Croll 2001, FaGlu 法)。CB ニューロンが カテコールアミンを含有しているかを調べるため、逆行性染色法と組織蛍光法 を同時に行った (図 9)。実験では脳神経節を 4% Paraformaldehyde 溶液の代わ りに 4% Paraformaldehyde と 0.5% Glutaraldehyde (SIGMA) の混合液で固定した。 これ以外の手法は上記の逆行性染色法と同様の手順で行った。

抗体染色法は神経伝達物質や神経ペプチドに対する抗体を用いてニューロン や組織がどのような物質を持っているかを調べる手法である (Miller et al., 1991; Xin et al., 1999; Diaz-Rios et al., 1999, 2002)。本実験では CB ニューロンが 含有する修飾物質を明らかにするため、逆行性染色法に続いて抗体染色法を行 った (図 9)。実験では逆行性染色法の手順後、必要に応じて神経節を覆ってい る結合組織を眼科用微小ハサミで取り除き、脳神経節を 0.1M PTAB 溶液で 20 倍に希釈した Normal goat serum 溶液 (NGS, ヤギ正常血清, Vector Laboratories) に 3~5時間浸した。その後、NGS 溶液で希釈した Primary antibody (一次抗体) 溶 液に置き換え、 2~3日間約 4℃で静置した。一次抗体として Rabbit antimyomodulin (Pro-Met-Ser-Met-Leu-Arg-Leu-NH₂) 抗体 (1:500-1000, polyclonal, affinity isolated, custom-made peptide antibody, Sawady technology) または Rabbit anti-GABA (γ -aminobutyric acid) 抗体 (1:50-100, polyclonal, affinity isolated, Sigma Product No. A2052, SIGMA) を用いた。2~3日後、脳神経節を0.1M PTAB 溶液で数回洗浄し、その翌日 0.1M PTAB 溶液で希釈した Secondary antibody (二 次抗体) 溶液に浸し、約 4℃で 12~24 時間静置した。二次抗体として Goat anti-rabbit IgG (H+L) FITC (Fluorescein-5-isothiocyanate) conjugated Fab fragment (1:100-200, 励起 500nm/発光 520nm, BIOSYS) を用いた。最後に脳神経節を0.1M PTAB 溶液、0.1M PBS 溶液の順にそれぞれ数回ずつ数日かけて洗浄し、0.1M PBS/Glycerol 溶液 (1/6) で透明化を行った後、約 4℃で保存した。

4. 形態観察

逆行性染色法と組織蛍光法または抗体染色法を組み合わせた試料の観察には 落射蛍光顕微鏡 (BX60, Olympus) を用いた。試料は検鏡用チャンバーに入れ、 0.1M PBS/Glycerol 溶液を満たし室温で落射蛍光検鏡した。対物レンズは 4× /0.13 または 10×/0.40 を用いた。光源として水銀ランプを用い、適切なフィル ターにより特定の波長の光を照射した。励起フィルター、ダイクロイックミラ ー、吸収フィルターはカテコールアミンを観察するときは BP400-440, DM455, BA475 を、フルオレセインを観察するときは BP470-490, DM505, BA515-550 を、ローダミンを観察するときは BP520-550, DM565, BA580IF をそれぞれ使用 した。CCD カメラ (SenSys, Photometrics) で撮った蛍光画像は Power Macintosh 7600/200 (Apple Computer) 上の画像解析用ソフト IPLab Spectrum (Signal Analytics) によりハードディスク上に取り込み、その後 MO ディスク (三菱化 学) に保存した。

5. 測定用プレパレーション

ニューロンや神経の活動を測定するため、次のような手順でプレパレーショ ンを作製した。動物を麻酔した後、腹側を上にして解剖台にピンで固定し、解 剖用ハサミで頭部腹側を正中線に沿って切開した。胃の内容物が漏れないよう に食道を糸で結束して切り離し、口唇部と前触角を含む頭部組織へ至る動脈中 に灌流用のポリエチレンチューブ (50~100µm 径)を挿入し糸で固定し、血管 を確保した。次に、頭部組織、脳神経節、口球神経節および口球筋を摘出した。 脳神経節から伸びている神経は、頭部組織から脳神経節へ至る ULAB n., AT n., LLAB n. と脳神経節と口球神経節を結ぶ C-B conn. はそのまま残し、それ以外 の神経は切断した。口球神経節から伸びている神経 (図 8A) は、口球神経節 と口球筋を結ぶ n2, n3 神経はそのまま残し、それ以外の神経は切断した。口 球筋は正中線沿いに左右対称となるように分割した。解剖した試料は、シルガ ードを敷いたアクリル製測定用チャンバーに ASW を満たし、頭部組織と脳神 経節は Ventral 面を上に、口球神経節は Caudal 面を上にしてマイクロピンで固 定し、頭部組織と各神経節の間を溶液が移動しないようにワセリン(半井化学) で塞いだ (図 8B)。微小電極の刺入を容易にするため、脳神経節および口球神 経節を覆っている結合組織を眼科用微小ハサミで取り除き、ニューロン細胞体 を露出させた。上記作業は全て実体顕微鏡 (SMZ, Nikon) 下で行った。ニュー ロンや神経活動測定時、ASW をポリエチレンチューブから動脈内に 0.5~ 0.7µl/min の速さで流し血管を灌流した。

6. 電気生理測定

ニューロンの膜電位測定、刺激および染色をするために細胞内微小電極法を 用いた。ガラス微小電極は、芯入硝子管 (2.0×90mm, GD-2, NARISHIGE) を 材料とし、微小電極作製プラー (PE-2, NARISHIGE) で作製した。微小電極内 部に 2M Potassium acetate, 4% Calcium Green-1 (Molecular Probes), 4% 5(6)-Carboxyfluorescein (EASTMAN KODAK), 3% Lissamine rhodamine B (Molecular Probes) のいずれかを充填した。微小電極はアクリル製の電極ホルダーに固定 し、ペターヒ型マイクロマニピュレーター (MP-1, NARISHIGE) を用いてニュ ーロン細胞体に電極を刺入した。作製直後の微小電極は先端が非常に細く抵抗 が高いため、微小電極の先端を折り抵抗を下げた。測定時の電極抵抗は Potassium acetate の場合、5~7MΩのものを、色素の場合、10~20MΩのもの を使用した。接地用外部電極はシリンジ (2.5ml) 内部に 3M KCl を、ガラス管 塩橋部に 3% Agar (ASW) を充填した Ag-AgCl 電極を用いた。

膜電位の測定および記録には次の実験装置を用いた。微小電極と接地用外部 電極をプローブ (JZ-101J, JZ-802J, 日本光電) に接続し、得られた電気信号を 微小電極増幅器 (MEZ-8201, MEZ-8301, 日本光電) に送った。微小電極増幅器 からの出力をオシロスコープ (VC-10, 日本光電) に付随している前置増幅器 (AVM-10) に入力し、電位変化をオシロスコープでモニターした。また微小電 極増幅器からの出力は A-D コンバータボード (GW Instruments) を介し、Power Macintosh 7300/166 (Apple Computer) 上の計測解析用ソフト Super Scope II (GW Instruments) によりデータファイルとして取り込み MO ディスクに保存した。 細胞内通電には電気刺激装置 (SEN-3301, 日本光電) を用いた。

神経の細胞外活動を記録するために吸引電極法を用いた。吸引電極はクロマ トカラム用チューブコネクター (OMNIFIT)、シリンジ (5ml)、ポリエチレン チューブを組み合わせて作製した。熱で先端を細くしたポリエチレンチューブ 電極内 (100~150µm 径) に ASW を満たし、チューブ内に気泡が入らないよう に注意しながら目的の神経をシリンジで吸引し、三方活栓 (JMS) を閉じて減 圧下固定した。接地用外部電極には Pt 電極を用いた。測定は吸引電極と接地 用外部電極を吸引電極用プローブ (JB-101J,日本光電) に接続し、得られた電 気信号を生体電気用増幅器 (AB-651J,日本光電) に送った。この出力をオシ ロスコープの前置増幅器に入力してモニターした。また生体電気用増幅器から の出力は A-D コンバータボードを介し、微小電極法と同様に処理しデータフ ァイルとして保存した。神経刺激には細胞内通電と同様の電気刺激装置とアイ ソレータ (SS-403J,日本光電) を用いた。

7. ニューロンの同定

目的のニューロンの同定はまず電気生理学的手法を用いて行い、続いて形態

- 14 -

学的手法によりさらに確認するという手順で行った。そのため主に色素を充填 したガラス微小電極をニューロン細胞体に刺入した。

CBニューロン細胞体は逆行性染色の結果、脳神経節内の G, M, Eクラスターに存在した。そこでこの領域のニューロンに微小電極を刺入し CBニューロンを探索した。CBニューロンは C-B conn. に軸索を伸ばしていることから、 C-B conn. の神経活動を吸引電極を用いてモニターし、CB ニューロンを細胞 内通電 (1~5nA, 0.5~3s) したときに誘発されるスパイク活動と C-B conn. の 応答が1対1に対応することを確認し同定した。また口球神経節内に存在する MA (Multi-action), JC (Jaw-closing) ニューロンとのシナプス結合も同定の指標 とした。MA, JC ニューロンの同定は口球神経節内における細胞体の存在領域、 自発性の放電パターン、活動電位の形状および口球筋の動きなどを調べること により行った (Nagahama and Takata, 1988, 1989)。

ニューロンの形態的特徴を調べるための色素として、5(6)-Carboxyfluorescein (励起492nm/発光517nm)またはLissamine rhodamine B(励起568nm/発光583nm) を用いた。ニューロンの染色は上記の手順でニューロンを同定した後、過分極 性通電を周期的に行い(3~10nA, 20s通電, 30s周期, 3~20回)、色素を電気泳 動的に導入することで行った。またニューロン染色後、組織蛍光法や抗体染色 法を用いてニューロンの含有物質を調べることで同定をより確かなものとした。

8. カルシウムイメージング法

ロ唇部への海藻味刺激に対する CB ニューロンのスパイク応答をカルシウム イメージング法を用いて測定するため、CB ニューロンにカルシウム感受性色 素を導入した。色素の導入には、個々のニューロン細胞体に刺入した微小電極 から色素を電気泳動的に導入する手法と CB ニューロンが軸索を伸ばす C-B conn. の断端から色素を逆行性に導入する手法の2種類を用いた。

色素を微小電極から電気泳動的に導入する手法は、微小電極内にカルシウム 感受性色素、4% Calcium Green-1, hexapotassium salt (励起 506nm/発光 531nm) 水 溶液を充填し、ニューロンを同定するときの染色手順と同様に行った。色素を 電気泳動的に導入したプレパレーションの測定には、MERLIN Imaging System (Olympus)を用いた。プレパレーションを蛍光顕微鏡 (BX50WI, Olympus)の ステージに載せ、室温で蛍光強度変化を測定した。対物レンズは 10×/0.30 を 用いた。キセノンランプを光源とした Spectra MASTER (Olympus) より取り出 した 488nm の単色光 (半値幅 20nm)を励起光として用い、蛍光はダイクロイ ックミラー (DM510) とバリアフィルター (BA515) により低波長側の光を除 去した。蛍光画像は冷却 CCD カメラ (Olympix FE250) を介して1秒間に 20 フレーム前後で、128×128 pixel の大きさで取り込み、必要な画像は Power Macintosh G4 (Apple Computer) 上で処理し MO ディスクに保存した。蛍光強度 (細胞内カルシウム濃度)変化は、CB ニューロン細胞体に ROI (Region of interests) 領域を設定し、数値化した平均蛍光強度の時間変化を測定した。こ のデータを Power Macintosh G4 上の表計算用ソフト Microsoft Excel (Microsoft) を用いて、 Δ F/F 値を計算しデータを標準化した。ここで Δ F/F (%) = (蛍光強度 変化–刺激前の平均蛍光強度) ÷ 刺激前の平均蛍光強度×100 である。その 後、得られたデータをグラフ作成用ソフト CA-Cricket Graph III (Computer Associates) を用いてグラフ化した。

色素を逆行性に導入する手法は次のような外科的手術により行った(図10)。 動物を麻酔した後、背側を上にして解剖台にピンで固定し、解剖用ハサミで頭 部背側を正中線に沿って切開した。片側 C-B conn. を切断し、その神経断端に カルシウム感受性色素 10% Calcium Green-1, dextran 3000MW (励起 510nm/発光 535nm, Molecular Probes)を充填したポリエチレンチューブ製の導入器を接着 剤 (アロンアルファ, 東亜合成)を用いて取り付け、切開部を糸で縫合した。 手術 3~4 日後に再び解剖して測定用プレパレーションを作製し、口唇部への 海藻味刺激に対する CB ニューロンのスパイク応答(蛍光強度変化)を調べた。

色素を逆行性に導入したプレパレーションの測定には、レーザースキャン顕 微鏡 (LSM-310, Carl Zeiss) を用いた。プレパレーションを顕微鏡のステージ に載せ、室温でレーザービームスキャン検鏡をした。対物レンズは $10 \times /0.30$ を用いた。励起光として 488nm のアルゴンレーザーを用い、蛍光フィルター (LP515) により低波長側の光を除去した。レーザースキャン画像 (静止画像) は 800ms~1s 間に 1 フレームで、512×512 pixel の大きさで取り込み、必要な画 像は Power Macintosh G4 上の画像解析用ソフト Adobe Photoshop (Adobe Systems) に移しデータ処理をして、MO ディスクに保存した。蛍光強度変化 は、CB ニューロン細胞体に ROI 領域を設定し、数値化した平均蛍光強度の時 間変化を測定した。 Δ F/F 値の計算およびグラフ化は、色素を電気泳動的に導 入する手法と同様の手順で行った。なおこれらカルシウムイメージング測定後 に組織蛍光法や抗体染色法を用いて CB ニューロンの含有物質を調べることで 同定をより確かなものとした。この時、二次抗体として Goat anti-rabbit IgG (H+L) TRITC (Tetramethylrhodamine-5-isothiocyanate) conjugated (1:10-20, 励起 544nm/発光 572 nm, Kirkegaard & Perry Laboratories) を 0.1M PTAB 溶液で希釈 したものを用いた。

9. 海藻味刺激と溶液組成

海藻味刺激として摂食応答を誘発するアオサ (Ulva) と吐き出し応答を誘発 するマクサ (Gelidium) の2種類の海藻からの抽出液を用いた。海藻 (Ulva 10g, Gelidium 10g) はそれぞれ専用の乳鉢ですりつぶし、ASW (Ulva 15ml, Gelidium 20ml) とともにビーカー中で撹拌し (室温, 20分)、高速冷却遠心機 (12000g,約 4℃,20分,久保田製作所) にかけ、その上清を海藻味刺激として用いた。海藻 味刺激はカルシウムイメージング測定の場合、測定開始約 10 秒後に、電気生 理測定の場合、測定開始約 30 秒後にパスツールピペット (約 1~2ml,岩城硝 子)を用いて口唇部に与えた。測定終了後、即座に口唇部をASW で洗浄した。 海藻味刺激は 20~30 分間隔で行い、2 種類の海藻味刺激に対する CB ニュー ロンのスパイク応答 (蛍光強度変化)を測定した。CB ニューロンのスパイク 応答の解析は、味刺激に対する慣れや不活性化、また味刺激の拡散によって起 こるスパイク応答の減衰を考慮し、味刺激直後の初期応答を比較して行った。

実験に用いた各溶液の組成は次のようであった。なお 3×Ca²⁺, 3×Mg²⁺溶液 と 5×Ca²⁺, 2×Mg²⁺溶液はニューロンの発火閾値をあげて多シナプス経路を遮 断する目的で用いた。

人工海水 (ASW): 470mM NaCl, 11mM KCl, 11mM CaCl₂, 25mM MgCl₂, 25mM MgSO₄, 10mM Tris-HCl (pH 7.8-7.9).

- 3×Ca²⁺, 3×Mg²⁺溶液: 285mM NaCl, 6mM KCl, 30mM CaCl₂, 125mM MgCl₂, 25mM MgSO₄, 10mM Tris-HCl (pH 7.8-7.9).
- 5×Ca²⁺, 2×Mg²⁺溶液: 330mM NaCl, 11mM KCl, 55mM CaCl₂, 75mM MgCl₂, 25mM MgSO₄, 10mM Tris-HCl (pH 7.8-7.9).
- PBS (Phosphate buffered saline): 10mM K_2HPO_4 , 20mM KH_2PO_4 , 70mM Na_2HPO_4 (pH 7.4).

PTAB (Phosphate triton azide buffer): 100mM PBS, 2% Triton X-100, 0.1% NaN₃.

結果

1. CB ニューロンの探索

これまでの研究より、摂食と吐き出しという2種類の口の運動パターンのス イッチは、口球神経節内の介在ニューロン (MA, Multi-action)が閉口運動ニュ ーロン (JC, Jaw-closing) に誘発するシナプス電位のサイズ変化によって起こ り、吐き出し時にはこの特定シナプス部位の情報伝達効率が特異的に抑圧され ることが示唆されている (Nagahama et al., 1999, 図 6)。またこのような情報伝 達効率を変化させる修飾ニューロンは、脳神経節内に細胞体が存在することを 示唆する結果も得られている。そこでまず脳神経節内に細胞体があり口球神経 節に軸索を伸ばすような形態的特徴をもつ神経節間介在ニューロン (CB, Cerebral-buccal interneuron)を探すことにした (図 7)。

CB ニューロンが軸索を伸ばしている脳神経節と口球神経節を結ぶ脳-口球 連合 (C-B conn., Cerebral-buccal connective) の断端から Biocytin を逆行性に導 入し CB ニューロンを染色したところ、同側の脳神経節内に約 10 個、対側に 1個の CB ニューロン細胞体が見つかった。逆行性染色の結果の一例を図 11A に示す。アメフラシの脳神経節はいくつかのクラスターが集まり形作られてお り、1つのクラスターは数十から百前後のニューロンから成り立っている (Jahan-Parwar and Fredman, 1976)。CB ニューロン細胞体は頭部組織に近い G クラスター、口唇部や前触角から脳神経節へ伸びる ULAB n., AT n. の間に存 在する M クラスター、C-B conn. の付け根に存在する E クラスターに分かれ て存在した(図 11B)。G クラスターには2 個のニューロン細胞体が存在して おり、このうち1つは他の細胞体 (50µm 前後) と比べ明らかに巨大であり、 その大きさは 200µm 以上であった。このニューロンはセロトニンを含有して おり (未発表)、アメリカ産アメフラシ (*Aplysia californica*) ですでに同定され ている MCC (Metacerebral cell, Weiss and Kupfermann, 1976; Weiss et al., 1978) と 等価であると考えられる。また M クラスターには Ventral 面に 4 個 (図 11D)、 Dorsal 面に 1 個の CB ニューロン細胞体が存在した。さらに E クラスターには Ventral 面に 4 個 (図 11A)、Dorsal 面に 2 ~ 3 個の CB ニューロン細胞体が見 つかった。一方、対側に染まった CB ニューロン細胞体は M クラスターの Ventral 面に存在した (図 11C)。この CB ニューロン細胞体からは 2 本の軸索が伸びて いることから両側 C-B conn. に軸索を伸ばしていると考えられた。逆行性染色 は動物 25 個体に対して行い、左右 C-B conn. からの染色結果に差は見られな かった (左側 10 個体、右側 15 個体)。

CB ニューロンは形態的特徴から *Aplysia californica* ですでに同定されている CBIs (Cerebral-to-buccal interneurons, Rosen et al., 1991; Perrins and Weiss, 1998; Hurwitz et al., 1999; Xin et al., 1999) と等価であると考えられる。これらのうち 摂食や吐き出しに関わる司令様ニューロンや修飾ニューロンの細胞体は脳神経 節内 M クラスターに存在することが報告されている (Rosen et al., 1991; Hurwitz et al., 1999; Jing et al., 2001; Morgan et al., 2002)。そこで本研究では M クラスタ ーに存在する CB ニューロンに着目し研究を進めることにした。

2. CBM ニューロンの含有する修飾物質

逆行性染色により脳神経節内 M クラスターに複数の CB ニューロン細胞体 (CBM) が確認された。これら CBM ニューロンの含有する修飾物質を明らかに するため、逆行性染色法と組織蛍光法または抗体染色法を組み合わせた。

逆行性染色法と組織蛍光法を組み合わせたときの結果の一例を図 12 に示す (n=24)。組織蛍光法ではパラホルムアルデヒドとグルタルアルデヒドの混合液 で固定した試料に近紫外光を照射すると、カテコールアミンが存在する場合、 青緑色光 (ドーパミン、アドレナリンなど)や黄橙色光 (セロトニン)を発す る。まず左側 C-B conn. 断端から Biocytin を逆行性に導入し CBM ニューロン 細胞体を染色したところ、対側 M クラスターの Ventral 面に1 個と同側 M ク ラスターの Ventral 面に4 個の CBMニューロン細胞体が染色された (図 12A, B)。 続いて組織蛍光の結果、これらのうち対側と同側 M クラスターの Ventral 面に それぞれ1 個ずつ、青緑色光を発するニューロン細胞体が見つかった (図 12C, D)。このことから同側、対側 M クラスターの Ventral 面に存在する 4 個の CBM ニューロンのうち最も Anterior 側の 1 個がカテコールアミン様物質を含有する ことが示唆された (図 12E, F)。そこでこのカテコールアミン含有ニューロン を CBM1 と命名した (図 12E, F)。なお CBM1 以外にカテコールアミン様物質 を含有する CB ニューロンはどのクラスターにも存在しなかった。

逆行性染色に続いて、一次抗体として神経ペプチドである Myomodulin に対 する抗体を用いて抗体染色を行ったときの結果の一例を図 13 に示す (n=10)。 逆行性染色の結果、同様に対側に1個と同側に4個の CBM ニューロン細胞体 が染色された (図 13A, B)。続く抗体染色の結果、これらのうち同側 M クラス ターの Ventral 面に1 個の Myomodulin 陽性細胞体が見つかった (図 13C, D)。 このことから同側 M クラスターの Ventral 面に存在する4個の CBM ニューロ ンのうち1 個が Myomodulin 様物質を含有することが示唆された (図 13E, F)。 そこでこの Myomodulin 様物質含有ニューロンを CBM2b と命名した (図 13F)。 なお CBM2b 以外にも E クラスターの Dorsal 面に存在する CB ニューロンのう ち1~2 個が Myomodulin 抗体に対して陽性反応を示した。

逆行性染色に続いて、一次抗体として神経伝達物質である GABA に対する 抗体を用いて抗体染色を行ったときの結果の一例を図 14 に示す (n=9)。逆行 性染色の結果、同様に対側に1個と同側に4個の CBM ニューロン細胞体が染 色された (図 14A, B)。続く抗体染色の結果、これらのうち同側 M クラスター の Ventral 面に1 個の GABA 陽性細胞体が見つかった (図 14C, D)。このこと から同側 M クラスターの Ventral 面に存在する4 個の CBM ニューロンのうち 最も Posterior 側の1 個が GABA 様物質を含有することが示唆された (図 14E, F)。 そこでこの GABA 様物質含有ニューロンを CBM3 と命名した (図 14F)。なお CBM3 以外にも G クラスターに存在する CB ニューロンが GABA 抗体に対し て陽性反応を示した。

以上の結果、脳神経節内 M クラスターの Ventral 面に存在する4個の CBM ニューロンは含有物質の違いから区別することが可能であった。すなわち CBM1 はカテコールアミン様物質を、CBM2b は Myomodulin 様物質を、CBM3 は GABA 様物質を含有する。なお本研究で用いた組織蛍光法と抗体染色法に より細胞体が蛍光を発しなかった CBMニューロンを CBM2a とした。

- 21 -

3. カルシウムイメージング法を用いたニューロンのスパイク活動の検出

次に、口唇部への海藻味刺激に対する CBM ニューロンの応答を調べる必要 があった。この場合、味刺激に対する慣れや不活性化を防ぐため、刺激-洗 浄後、一般に次の刺激まで 20~30 分くらいあける必要があり、2種類の海藻 味刺激について繰り返しニューロンの応答を調べようとすると、測定時間は 数時間に及ぶ。ところが、CBM ニューロンの細胞体は口球神経節内に存在す る MA, JCニューロンに比べ小さく (50µm 前後) かつニューロパイル内に埋も れているため、電気生理学的手法で微小電極を長時間にわたり維持し続ける ことが難しいことがわかった。一方、最近になってアメフラシニューロンの スパイク活動を定量的に検出するのにカルシウムイメージング法がたいへん 有効であることが示された (Yoshida et al., 2001)。この手法は、カルシウム感 受性色素 (Calcium Green-1) を微小電極を用いてアメフラシのニューロンに電 気泳動的に導入するが、ニューロン1 個あたり2~5分と短時間で行うこと ができ、一度色素を導入すると長時間にわたり安定したスパイク活動を検出 することができる。そこでこの手法を用いて個々の CBM ニューロンの味覚応 答を長時間にわたり追跡することにした。

吉田ら (2001) は、アメフラシニューロンのスパイク活動とそれに伴う蛍光 強度変化の関係を詳しく調べた (Yoshida et al., 2001)。それによると、蛍光強 度変化はニューロンの発火頻度や発火期間をよく反映する。図 15A, B は口球 神経節内の介在ニューロン (MA)の膜電位変化と蛍光強度変化を同時記録し た例である。MAニューロンを細胞内通電すると、MA にスパイク活動が誘発 され、それに伴い蛍光強度が増大した。この時、一定の通電時間で通電量の みを変化させると (1s, 4~10nA)、ニューロンの発火頻度の増大につれて蛍光 強度増大の初期の傾きが徐々に大きくなった (図 15A)。一方、一定の通電量 で通電時間を変化させると (7nA, 0.5~2s)、ニューロンの発火期間が長くなる につれて蛍光強度変化の立ち上がりからピークまでの時間が長くなった (図 15B)。ピークまでの時間が長くなるにつれてピーク値は大きくなるが、蛍光 強度増大の初期の傾きは変化していない。これらの結果、蛍光強度増大の初 期の傾きはスパイク発火頻度にほぼ比例し (図 15C)、蛍光強度増大の期間は スパイク発火期間にほぼ対応することがわかった (図 15D)。そこでカルシウ ムイメージング法を用いた蛍光強度変化の測定からニューロンのスパイク発 火頻度や発火期間を推測することが可能である。

4. 摂食や吐き出し味刺激により誘発される CBM ニューロンの応答

本研究の目的は、摂食時に見られる口の運動パターンを吐き出し時の運動 パターンへスイッチする機構に関わる修飾ニューロンを探索することである。 これまでの研究により、スイッチが起こるとき、口球神経節内の介在ニュー ロンが運動ニューロンに誘発するシナプス電位の大きさが特異的に抑圧され ることが示唆されており (Nagahama et al., 1999, 図 6)、このような機構に関わ る修飾ニューロンは吐き出し応答時に特異的に活動することが予想される。 そこで吐き出し行動を誘発するマクサ味刺激に対して特異的に応答する CBM ニューロンを探索することにした (図 7)。

CBM ニューロンの味覚応答を調べるために図 8B のような測定用プレパレー ションを用いて実験を行った。CBM ニューロンは、これらが C-B conn. に軸 索を伸ばしていることから、C-B conn. の神経活動を吸引電極を用いてモニタ ーし、CBM ニューロンを細胞内通電したときに誘発されるスパイク活動と C-B conn. の応答が1対1に対応することを確認して見つけた。続いて CBM ニ ューロンにカルシウム感受性色素を電気泳動的に導入した。ただ、この段階 では4個の CBM ニューロンのいずれかはわからない。そこでカルシウムイメ ージング実験後に組織蛍光法や抗体染色法を行い、ニューロンが含有する修 飾物質を調べ、見分けるための指標とした。また各 CBM ニューロンの電気生 理学的性質も同定の目安となった (後述)。

I) CBM3 の味覚応答

ロ唇部への摂食や吐き出し味刺激に対する CBM3 の応答の一例を図 16, 17 に示す (n=13)。この CBM ニューロンはカルシウムイメージング実験後の抗体 染色により、GABA 抗体に対して陽性反応を示したことから CBM3 であるこ とを確認した (図 16D, E)。摂食応答を誘発するアオサまたは吐き出し応答を 誘発するマクサからの抽出液で口唇部を刺激すると (t=0)、CBM3 細胞体では ともに蛍光強度が増大したが、その変化量はマクサ味刺激に比べアオサ味刺 激の方が大きかった (図 16A, B)。なお図 16A, B は擬似カラー像であり、蛍光 強度との関係は下図のスケールバーに対応する。この時の CBM3 細胞体の蛍 光強度変化 (ΔF/F) の時間経過を図 16C に示す。CBM3 はアオサ味刺激の場合、 初期の増大後リズミカルな変化が数十秒以上持続したのに対し、マクサ味刺 激の場合、増大後徐々に減衰した。なお人工海水で刺激した場合、CBM3 細胞 体の蛍光強度は変化しなかった。また別の動物でアオサとマクサからの抽出 液で口唇部を交互に繰り返し刺激して CBM3 の応答を調べたところ、両味刺 激によりどちらもリズミカルな活動が誘発された (図 17)。これら応答を比較 すると、アオサ味刺激では大きなリズム性の蛍光強度変化が誘発された (図 17A) のに対し、マクサ味刺激ではより小さなリズム性の変化が誘発された (図 17B)。前述のように、カルシウムイメージングでは蛍光強度増大の初期の傾 きはスパイク発火頻度にほぼ比例し、増大の期間はスパイク発火期間にほぼ 対応する (図 15)。この性質を今回の結果と比較すると、アオサとマクサの両 味刺激により誘発される蛍光強度変化の初期の傾きはほぼ等しく、増大の期 間はアオサ味刺激の方が長いことから、CBM3は両味刺激により最初、ほぼ等 しい頻度のスパイク活動が誘発されたが、マクサ味刺激に比べアオサ味刺激 の方が CBM3 の活動を長時間持続させることが示唆された。

これらの結果、摂食や吐き出し味刺激により CBM3 は最初ともにほぼ等頻 度のリズム性スパイク活動が誘発されるが、この活動は吐き出し味刺激に比 べ摂食味刺激でより長時間持続することが示唆された。そこで CBM3 は吐き 出し行動よりは摂食行動に関与するニューロンであると考えられた。

II) CBM2a/b の味覚応答

口唇部への摂食や吐き出し味刺激に対する CBM2a の応答の一例を図 18 に示す (n=8)。この CBM ニューロンは細胞体の位置や形態的特徴、カルシウムイ

メージング実験後の組織蛍光法や抗体染色法により、細胞体が蛍光を発しな かったことから CBM2a であることを確認した。アオサやマクサからの抽出液 で口唇部を刺激すると (t=0)、CBM2a 細胞体ではほぼ同様に蛍光強度が増大し た (図 18A, B, 擬似カラー像)。この時の CBM2a 細胞体の蛍光強度変化 (ΔF/F) の時間経過を図 18C, D に示す。CBM2a は両味刺激によりどちらも数十秒以上 続くリズミカルな蛍光強度変化が誘発された。両味刺激に対する応答を比較 しても、明白な差は見られなかった。またアオサやマクサ味刺激に対する CBM2b の応答については一例しか調べていないが、両味刺激により誘発され る応答に明白な差は見られなかった。これらの結果、CBM2 の a と b (CBM2a/b) は共に吐き出し味刺激に対して特異的に応答するニューロンではないと考え られた。

III) CBM1 の味覚応答

口唇部への摂食や吐き出し味刺激に対する CBM1 の応答の一例を図 19,20 に示す (n=13)。この CBM ニューロンはカルシウムイメージング実験後の組織 蛍光法により、青緑色光を発したことから CBM1 であることを確認した (図 19D, E)。アオサやマクサからの抽出液で口唇部を刺激すると (t=0)、CBM1 細胞体 ではともに蛍光強度が増大したが、その変化量はアオサ味刺激に比ベマクサ 味刺激の方が大きかった (図 19A, B, 擬似カラー像)。この時の CBM1 細胞体 の蛍光強度変化 (ΔF/F) の時間経過を図 19C に示す。CBM1 はアオサ味刺激の 場合、小さな一過性の蛍光強度の増大が誘発されたのに対し、マクサ味刺激 ではアオサに比べ大きな一過性の増大が誘発された。なお人工海水で刺激し た場合、CBM1 細胞体にわずかだが蛍光強度の変化が誘発された。アオサとマ クサの両味刺激に対する蛍光強度変化を比較すると、立ち上がりからピーク までの時間はほとんど変わらなかったが、増大の初期の傾きはアオサ味刺激 に比べマクサ味刺激の方が大きかった。また別の動物で、アオサとマクサか らの抽出液で口唇部を交互に繰り返し刺激して CBM1 の味覚応答を調べても、 常に同様の結果が得られた (図 20)。

以上の結果、CBM1 は摂食や吐き出し味刺激によりともにスパイク活動が誘

- 25 -

発されるが、摂食味刺激に比べ吐き出し味刺激でより高頻度のスパイク活動 が誘発されることが示唆された。このことから CBM1 はマクサ味刺激に対し て応答性が高いニューロンであり、吐き出し行動発現に関与する可能性があ ると考えられた。

5. 海藻味刺激により誘発される CBM ニューロン応答の同時測定

これまでの研究より CBM1, CBM2a/b, CBM3 は2 種類の海藻味刺激によりそ れぞれ異なる応答が誘発されることが示唆された。これらは海藻味刺激に対 する複数の CBM ニューロンの応答を同時測定して同様の結果が得られればよ り確かなものとなる。同時測定をするにはカルシウム感受性色素を複数個の CBM ニューロンに導入する必要があるが、微小電極を用いた電気泳動的手法 ではニューロンを探している時に他のニューロンを傷つけることがあった。 そこで C-B conn. 断端からカルシウム感受性色素を逆行性に導入して複数の CBM ニューロンを染色し、これらの応答を同時に調べることにした。

実験では動物の背側を切開して、片側 C-B conn. を切断した。続いて C-B conn. 断端にカルシウム感受性色素を充填した導入器を取り付け、その後、切開部 を縫合する外科的手術を行った (図 10)。手術3~6時間後に動物は麻酔から 回復し、再び行動を開始した。3~4日後に再び解剖して測定用プレパレー ションを作製し (図 8B)、口唇部への海藻味刺激に対する CBM ニューロンの 応答を調べた。なお施術に成功した 78 個体のうち 46 個体が摂食行動を示し、 このうち 24 個体でニューロン細胞体が染色された。ただ時間をかけた割には 電気泳動的手法に比べてニューロンの染まりが悪く、個々の染まり方にもば らつきがみられた。この 24 個体を用いて以下の実験を行った。

まずこの手法により CBM ニューロンのスパイク活動が検出できるかを確か めるため、アオサからの抽出液のみで口唇部を刺激し、それに対する CBM ニ ューロンの応答を調べた。図 21 はその一例を示す。ここでは逆行性導入の結 果、脳神経節内 M クラスターに3個のニューロン細胞体が染色された (図 21A)。 このうち1個のニューロン細胞体はカルシウムイメージング実験後の抗体染 色により神経ペプチドである Myomodulin 抗体に対して陽性反応を示したこと から、CBM2b であることを確認した (図 21B)。またこれまでの Biocytin によ る逆行性染色の結果と比較して、CBM2b に隣接するニューロン細胞体はそれ ぞれ CBM2a, CBM3 であることが推測できた (図 21A, C)。口唇部をアオサから の抽出液で刺激すると (t=0)、蛍光強度は CBM2b, CBM3 で増大し、CBM2a で もわずかだが増大した (図 21C, 擬似カラー像)。この時、繰り返しアオサ味刺 激を与えて CBM2a, CBM2b, CBM3 細胞体に誘発された蛍光強度変化 (ΔF/F) の 時間経過を図 22 にまとめた。各ニューロンにおける蛍光強度変化の測定部位 は図 21C の丸で囲んだ領域であった。アオサ味刺激により CBM2b には大きな 一過性の増大が誘発されたのに対し、CBM2a では刺激直後に小さな増大が見 られただけであった (図 22A, B)。一方、CBM3 はアオサ味刺激により 80 秒以 上継続する持続性の蛍光強度の増大が誘発された (図 22C)。これらの結果、 色素の逆行性導入を用いて、海藻味刺激により誘発される CB ニューロンのス パイク活動をモニターできることがわかった。

また別の結果では、脳神経節内 M クラスターに3個のニューロン細胞体が 染色された (図 23A)。この場合、1個のニューロン細胞体はカルシウムイメ ージング実験後の組織蛍光法により青緑色光を発したことから CBM1 である ことを確認した (図 23B)。またこれまでの Biocytin による逆行性染色の結果 と比較して、隣接するニューロン細胞体はそれぞれ CBM2 の a, b いずれかと CBM3 であることが推測できた (図 23A, C)。口唇部をマクサからの抽出液で 刺激すると (t=0)、蛍光強度は CBM1, CBM3 でともに増大したが、CBM2 (a ま たは b) ではほとんど変化しなかった (図 23C, 疑似カラー像)。この時、アオ サあるいはマクサ味刺激を与えて CBM1, CBM3 細胞体に誘発された蛍光強度 変化 (ΔF/F) の時間経過を図 24 にまとめた。CBM1, CBM3 の蛍光強度変化の測 定部位は図 23C の丸で囲んだ領域であった。アオサやマクサ味刺激により CBM1, CBM3 はどちらも蛍光強度が増大したが、CBM1 はアオサに比べマクサ 味刺激でより大きく変化したのに対し、CBM3 はマクサに比べアオサ味刺激で わずかだが変化が大きかった。これらの結果は、CBM1 ではアオサに比べマク サ味刺激で高頻度のスパイク活動が誘発されること、CBM3ではマクサに比べ アオサ味刺激でわずかだが長時間のスパイク活動が誘発されることを示唆し、 微小電極から色素を電気泳動的に導入する手法を用いたときの結果と良く一

致した。以上の結果、CBM ニューロンは摂食や吐き出し味刺激に対してそれ ぞれ異なる応答性を示し、CBM1 が目的とする修飾ニューロンの候補であるこ とが確認された。

6. 海藻味刺激の濃度変化に対する CBM1 の味覚応答

本研究の初期段階では、摂食から吐き出しへ口の運動パターンをスイッチ させる機構に関わる修飾ニューロンは、吐き出し味刺激に対してのみ特異的 に応答すると考えていた。しかし CBM1 は吐き出し味刺激により高頻度のス パイク活動が誘発されたものの、摂食味刺激でも低頻度のスパイク活動が誘 発された。今回の実験では味刺激として海藻からの抽出液を用いており、こ のような場合、2種類の味刺激に対する CBM1 のスパイク応答の差が溶液の 濃度に依存している可能性もある。そこで2種類の抽出液の濃度を変えて CBM1 の味覚応答を調べることにした。海藻抽出液は、海藻 10g をアオサは 15ml、 マクサは 20ml の人工海水 (ASW) とともにすりつぶして作成したものをオリ ジナルの濃度 (×1) とし、これ以外の濃度の抽出液はオリジナルの海藻抽出 液を希釈して用いた。

様々な濃度のアオサやマクサ抽出液により誘発された CBM1 細胞体の蛍光 強度変化 (ΔF/F) の時間経過を図 25A, C に示す (n=7 for Ulva, n=5 for Gelidium)。 口唇部を ASW や×0.01 濃度のアオサからの抽出液で刺激した場合、CBM1 細 胞体の蛍光強度はほとんど変化しなかったが、口唇部を×0.1, ×0.2, ×1 濃度 のアオサからの抽出液で刺激すると、CBM1 細胞体の蛍光強度は一過性に増大 した (図 25A)。また口唇部をマクサからの抽出液で刺激した場合も同様に、 抽出液の濃度が低いと (ASW, ×0.05) CBM1 細胞体の蛍光強度はほとんど変化 しなかったが、高くなるにつれて (×0.2, ×0.5, ×1) 蛍光強度は一過性に増 大した (図 25C)。アオサやマクサ抽出液の濃度変化とそれに伴う CBM1 細胞 体の蛍光強度変化の相対的な初期傾き (5 秒間) との関係を図 25B, D に示す。 アオサとマクサ味刺激のどちらの場合でも、海藻抽出液の濃度が×0.01, ×0.02 と低いと CBM1 細胞体の相対的な初期傾きの値は小さいが、海藻抽出液の濃 度が×0.1, ×0.2 になるとその値は急激に大きくなり、それ以上の濃度になる と最大応答を示し一定となった。また×2 濃度のアオサ抽出液で刺激した場合の相対初期傾きの値はオリジナルの濃度 (×1) と比較して差のないことがわかった (図 25B, n=4, P>0.1)。このことからオリジナルの濃度 (×1) の海藻味刺激はそれぞれ CBM1 に最大応答のスパイク活動を誘発することができると考えられた。

7. CBMニューロンの味覚応答のまとめ

そこでオリジナルの濃度 (×1) の海藻味刺激を用いて、CBM ニューロンの 味覚応答の差を複数の個体で調べることにした。アオサとマクサ味刺激に対 する CBM1 細胞体の蛍光強度変化の初期傾き値はそれぞれ 0.78 ± 0.13 %/s と 1.42 ± 0.21 %/sであり、両者に有意な差が認められた (図 26A, mean ± SEM, n=13, P<0.001)。なお人工海水 (ASW) に対する CBM1 の初期傾き値は 0.10 ± 0.02 %/s であり、アオサとマクサ味刺激に比べその値は有意に小さかった (P<0.001 for *Ulva*, P<0.001 for *Geli*., n=12)。また CBM1 の蛍光強度変化の開始からピークま での期間はアオサ味刺激の場合 11.94 ± 0.97 s で、マクサ味刺激の場合 11.39 ± 1.19 s であり、両者はほぼ同じ値を示した (図 26B, n=13, P>0.1)。このことか ら CBM1 は摂食や吐き出し味刺激により最初、約 10 秒間のスパイク活動が誘 発されるが、吐き出し味刺激ではより高頻度のスパイク活動が誘発されるこ とが示唆された。

アオサとマクサ味刺激に対する CBM2a/b の応答を同様に調べてみたところ、 初期傾きの値はそれぞれ 0.70 ± 0.13 %/s と 0.69 ± 0.12 %/s、蛍光強度増大の期 間はそれぞれ 11.56 ± 1.04 s と 11.33 ± 0.93 s の値を示し、両者に明白な差は認 められなかった (図 26C, D, n=9, P>0.1)。このことから CBM2a/b は摂食や吐き 出し味刺激により長時間持続するリズミカルなスパイク活動が誘発されるが、 両応答に明白な差のないことが示唆された。さらにアオサとマクサ味刺激に 対する CBM3 の応答を調べたところ、初期傾きの値はそれぞれ 1.84 ± 0.29 %/s と 1.53 ± 0.27 %/s であり、両者にほとんど差が見られなかった (図 26E, n=13, P<0.05)。これに対して、蛍光強度増大の期間はそれぞれ 15.07 ± 1.60 s と 8.15 ± 0.86 s の値を示し、両者に有意な差が認められた (図 26F, n=13, P<0.001)。こ のことから CBM3 は摂食や吐き出し味刺激により最初、ほぼ等しい頻度のス パイク活動が誘発されるが、摂食味刺激ではより長時間活動が持続すること が示唆された。

すなわち2種類の海藻味刺激に対する CBM ニューロンのスパイク応答の差 は、海藻味刺激の濃度変化によるものではなく、2種類の海藻味刺激の味質 の違いに起因するものと考えられた。

8. CBM1 の味覚応答とスパイク発火頻度の関係

これまでの研究より、CBM1 は摂食味刺激に比べ吐き出し味刺激でより高頻 度のスパイク活動が誘発されることが示唆された。しかしカルシウムイメー ジング法を用いて海藻味刺激に対する CBM1 の応答のみを測定しても、CBM1 に実際にどれくらいの頻度のスパイク活動が誘発されているのかわからない。 そこで海藻味刺激で誘発される CBM1 の蛍光強度変化からスパイク発火頻度 を推定するため、CBM1 が軸索を伸ばす脳一口球連合 (C-B conn.) を一定頻度 の電気パルスで刺激し、CBM1 に既知の頻度の逆行性スパイクを誘発したとき の蛍光強度変化と海藻味刺激により誘発される蛍光強度変化を同一ニューロ ンで比較することにした。その一例を図 27A~Cに示す。口唇部への2種類の 海藻味刺激により誘発された CBM1 細胞体の蛍光強度変化の時間経過を図 27A に示す。また同一ニューロンで C-B conn. を一定頻度の短い電気パルスで刺激 したときに誘発された CBM1 細胞体の蛍光強度変化を図 27B に示す。実験で は1個の刺激パルスで1個の逆行性スパイクが発現するようにパルスの時間 幅、強度を調節した (5~10ms, 0.7~1.0V)。発火頻度が 10Hz と比較的小さい ときは蛍光強度変化が小さいが、発火頻度が 20Hz. 30Hz と大きくなるにつれ て蛍光強度変化も増大した。スパイク発火頻度と蛍光強度変化の初期傾き値 (5秒間) との関係をグラフにしたものを図 27C に示す。初期傾きの値は CBM1 のスパイク発火頻度が大きくなるにつれて、ほぼ直線的に増大することがわ かった (図 27C, ▽)。これらの結果を図 27A で示した CBM1 の海藻味刺激に 対する応答と比較すると、アオサ味刺激の場合、初期傾き値が 1.662 %/s であ ったことから CBM1 に 11.8 spikes/sのスパイク活動が誘発され (図 27C, ← Ulva)、 マクサ味刺激の場合、初期傾き値が 3.172 %/s であったことから CBM1 に 28.2 spikes/s のスパイク活動が誘発されていることがわかった (図 27C, *Geli.→*)。 これらの関係を用いて、2種類の海藻味刺激により誘発される CBM1 のスパ イク発火頻度を複数の個体で見積もったところ、アオサとマクサ味刺激に対 する CBM1 の推定発火頻度はそれぞれ 19.65 ± 2.43 spikes/s と 31.81 ± 3.41 spikes/s であり、両者に有意な差が認められた (図 27D, n=8, P<0.001)。

さらに海藻味刺激により誘発される CBM1 のスパイク発火頻度を直接的に 調べるため、電気生理学的手法を用いて CBM1 の味覚応答を測定した。前述 のとおり電気生理学的手法を用いて2種類の海藻味刺激に対する CBM1 の応 答を繰り返し測定することは難しいため、ここでは1種類の海藻味刺激に対 する応答のみをそれぞれ調べた。その一例を図 28A, B に示す。CBM1 のアオ サ味刺激に対する応答を調べたところ、CBM1は刺激直後の5秒間、19.6 spikes/s の頻度で発火した (図 28A)。これに対して、CBM1 はマクサ味刺激により刺激 直後の5秒間、34.4 spikes/sの高頻度で発火した (図 28B)。2種類の海藻味刺 激により誘発される CBM1 のスパイク発火頻度を複数の個体で調べてみたと ころ、アオサとマクサ味刺激に対する CBM1 のスパイク発火頻度はそれぞれ 20.16 ± 1.50 spikes/s と 30.37 ± 1.11 spikes/s であり、両者に有意な差が認められ た (図 28C, n=6, P<0.001)。なお人工海水 (ASW) により誘発される CBM1 のス パイク発火頻度は 3.92 ± 0.45 spikes/s であり、アオサとマクサ味刺激に比べそ の頻度は明らかに低かった (P<0.001 for Ulva, P<0.001 for Geli., n=6)。これらの 結果はカルシウムイメージングから推定されたスパイク発火頻度の結果 (図 27D) と良く一致し、CBM1 は摂食味刺激により 20 spikes/s 前後のスパイク活 動が誘発され、吐き出し味刺激により約 30 spikes/s の高頻度のスパイク活動が 誘発されることが明らかになった。

一方、カルシウムイメージングの結果から、CBM3 は吐き出し味刺激に比べ 摂食味刺激でより長時間持続するスパイク活動が誘発されることが示唆され た。そこで CBM3 についても電気生理学的手法を用いて海藻味刺激に対する 応答を調べた。図 29A, B はその一例であるが、ここではアオサ味刺激とマク サ味刺激に対する応答を同一ニューロンで記録することができた。その結果、 CBM3 は摂食味刺激により最初、8 Hz 弱、13~14 秒の放電からなるスパイク 活動が誘発されたのに対し、吐き出し味刺激により最初、7Hz 弱、約5秒間 の放電からなるスパイク活動が誘発された。この結果もカルシウムイメージ ングによる結果 (図 26E, F) と良く一致し、CBM3 は吐き出しよりは摂食応答 の発現に何らかの寄与をしているニューロンであると考えられた。

9. 触刺激に対する CBM1 の応答

食物嗜好性に関する要素として味以外にテクスチャー(物理的食感)がある。 そこで口唇部への触刺激に対する CBM1 の応答を調べることにした (n=6)。実 験では口唇部に動きが誘発されない程度の強さで、口唇部をポリエチレンチ ューブの先端で約1秒間刺激した。触刺激により誘発される CBM1 細胞体の 蛍光強度変化はマクサ味刺激に比べ刺激時間が短いためピーク値は小さいが、 初期傾きの値はほぼ同じであった (図 29D)。このことから触刺激の直後、CBM1 はマクサ味刺激と同様に高頻度で発火することが示唆された。

10. CBM1 の機能解析

摂食と吐き出しという2種類の口の運動パターンのスイッチは、口球神経 節内のMAニューロンが閉口運動ニューロン (JC) に誘発するシナプス電位の サイズ変化によって起こり、吐き出し時には MA-JC 間の抑制性シナプスの伝 達効率が特異的に抑圧されることが示唆されている (Nagahama et al., 1999, 図 6)。本実験のこれまでの結果により、CBM1 がこのような特定シナプス部位で の情報伝達効率を抑圧する修飾ニューロンの候補であることが明らかになっ た (図 7)。そこで次に CBM1 の機能を詳しく調べることにした。

実験は電気生理学的手法を用いて行うことから、この手法による CBM1 の 同定基準を確立する必要があった。CBM1 は逆行性染色法と組織蛍光法の結果、 両側脳-口球連合 (C-B conn.) に軸索を伸ばしていることが明らかになってい る (図 12)。一方、その他の CB ニューロンは同側のみに軸索を伸ばしている。 そこで CBM1 の同定は、両側 C-B conn. の神経活動を吸引電極を用いてモニタ ーし、CBM1 を細胞内通電したときに誘発されるスパイク活動と両側 C-B conn.
の応答が1対1に対応することを調べて行うことができた(図 30A)。また CBM1のスパイク活動により同側 MA1 に興奮性シナプス後電位(EPSPs)が誘 発されることがわかった。多シナプス経路を遮断する3×Ca²⁺,3×Mg²⁺溶液下 で調べても同様の結果が得られ、CBM1 が同側の MA1 に単シナプス性 EPSPs を誘発することが明らかになった(図 30B)。さらに CBM1 は JC2 に対しても 小さな単シナプス性の EPSPs を誘発した。そこで電気生理学的手法により CBM1 と MA, JC とのシナプス結合を調べることでも CBM1 を同定することが 可能であった。また同定をより確かなものとするため、電気生理学的測定後 Carboxyfluorescein で染色して、測定に用いたニューロンが両側 C-B conn. に 軸索を伸ばしていることを形態学的に確認したり(図 30C)、Lissamine rhodamine でマーキング染色し、その後、組織蛍光法によりカテコールアミン 含有の有無を確認したりした(図 30D, E)。

11. MA-JC 間の抑制性シナプスの伝達効率に対する CBM1 の効果

CBM1 が口球神経節内の MA-JC 間の抑制性シナプスの伝達効率を抑圧する かを調べた。実験では多シナプス経路を遮断する 3×Ca²⁺, 3×Mg²⁺溶液下、シ ナプス電位の大きさの膜電位依存性を考慮し JC2 を-40mV に電位固定した。 この条件下、MA1を10秒間隔で繰り返し発火させて JC2 に抑制性シナプス電 流 (IPSC) を誘発し、その途中で CBM1 を平均 40 spikes/s の高頻度で 30 秒間 発火し、その前後で MA-JC 間の IPSC サイズの変化を調べた (図 31A, n=19)。 CBM1 を刺激しないコントロールのときと高頻度で発火させたときの MA1 に より JC2 に誘発された個々の IPSC の例を図 32 に示す。IPSC サイズは、コン トロールではほとんど変化しなかった (図 32A) が、CBM1 を高頻度で発火さ せると IPSC サイズは刺激後減少した (図 32B)。なお CBM1 の高頻度発火時、 MA1 ニューロンに2 個以上のスパイクが誘発されることがあった (図 31B)。 このような場合、一番最初に誘発されたスパイクを解析に用いた。また CBM1 を高頻度で発火させた時とさせなかった時の IPSC サイズの経時変化を図 33A に示す。IPSC サイズは CBM1 を刺激しないときは徐々に減少したが、急激な 減少は見られなかった (図 33A, control)。一方、CBM1 を高頻度で刺激した場 合、刺激後 40 秒以内に刺激前の約 70%まで小さくなり、100 秒以上経過して もとのレベルにもどった (図 33A, CBM1)。このことより CBM1 は MA-JC 間シ ナプスの伝達効率を抑圧することが示唆された。

これまでの味応答の実験から、CBM1 は摂食味刺激に対して 20 spikes/s 前後 のスパイク活動が誘発され、吐き出し味刺激に対して約 30 spikes/s の高頻度の スパイク活動が誘発されることがわかった。そこで CBM1 による MA-JC 間シ ナプスの修飾効果における CBM1 の発火頻度依存性を調べることにした。その 一例として、CBM1 を低頻度 (19.0 spikes/s) または高頻度 (44.3 spikes/s) でそ れぞれ 30 秒間発火させたときの IPSC サイズの時間経過を図 33B に示す。CBM1 を低頻度で発火させた場合、IPSC サイズはほとんど変化しなかったが、CBM1 を高頻度で発火させた場合、刺激直後から IPSC サイズが大きく減少し、その 効果は 150 秒以上持続した。IPSC サイズに対する CBM1 の発火頻度依存的効 果を複数の個体で調べ平均したところ、CBM1 を低頻度 (18.9 ± 1.3 spikes/s) で 発火させた場合、IPSC サイズはコントロール値の 94.0 ± 2.1 %、CBM1 を高頻 度 (40.1 ± 1.1 spikes/s) で発火させた場合、IPSC サイズは 68.0 ± 2.6 %の大きさ であった (図 33C, n=7)。また CBM1 の発火頻度と CBM1 刺激により減少した IPSC サイズとの関係を詳しく調べたところ、CBM1 による IPSC サイズ修飾効 果は発火頻度が15~25 spikes/s ではほとんど見られないが、25 spikes/s 以上に なるとその効果が明白に現れることがわかった (図 33D)。なお図 33D の白丸 は 3×Ca²⁺, 3×Mg²⁺溶液下で、黒丸は 5×Ca²⁺, 2×Mg²⁺溶液下で得られた結果で ある。このことより CBM1 は発火頻度依存的に口球神経節内の MA-JC シナプ ス部位の伝達効率抑圧に寄与しており、摂食から吐き出しへの運動パターンの スイッチに関わる修飾ニューロンであることが示唆された。

12. MA-JC 間の抑制性シナプスの伝達効率に対するドーパミンの効果

CBM1 は組織蛍光法によりカテコールアミン様物質を含むことが示唆された (図 12)。そこで口球神経節内の特定シナプス部位である MA-JC 間に対してカ テコールアミンの1つであるドーパミンの作用を調べてみることにした(図 34)。実験では5×10⁵Mのドーパミンを外液添加し、添加10分後と洗浄後にIPSC サイズを測定し、ドーパミン添加前後の個々の IPSC サイズを比較した。この 結果、ドーパミンは CBM1 の高頻度発火による効果と同様に IPSC サイズを減 少させることがわかった (図 34A)。ドーパミンの外液添加により減少した IPSC サイズを複数の個体で平均したところ、IPSC サイズはコントロール値の 73.5 ± 1.5 %の大きさであった (図 34C, DA, n=10)。また MA-JC 間の抑制性シナプス の伝達効率に対するドーパミンの修飾効果は、ドーパミン D1 receptor のアン タゴニストである SCH23390 添加 (10⁻⁵M) により抑制されることがわかった (図 34B)。この時、減少した IPSC サイズを複数の個体で平均すると、コント ロール値の 95.3 ± 1.7 %の大きさであり (図 34C, SCH23390+DA)、ドーパミン (DA) のみを添加したときと比較して有意な差があった (図 34C, P<0.001)。こ れらのことは CBM1 が神経伝達物質としてドーパミンを放出しており、口球神 経節内の特定シナプス部位に対して直接的に作用している可能性を示唆してい る。

以上の結果、アオサからの抽出液で口唇部を刺激した場合、CBM1の発火頻 度は比較的低いため MA-JC間の抑制性シナプスの伝達効率に影響を与えず、JC を単シナプス性に抑制する MA の活動により JC のスパイク活動の開始時期が 遅れ、摂食行動で見られる口の運動パターンが発現すると考えられる。一方、 マクサからの抽出液で刺激した場合、CBM1の発火頻度が高いため MA-JC 間 の抑制性シナプスの伝達効率が特異的に抑圧されることにより JC の活動開始 時期が早くなり、吐き出し行動で見られる口の運動パターンが発現すると考 えられる (図 35)。 考察

1. CB ニューロン

アメフラシは海藻の種類に応じて好きな海藻は摂食し、嫌いな海藻は吐き出 すという行動をそれぞれ選択すること、また摂食時と吐き出し時では口の運動 パターンが変化することが知られている (Nagahama and Shin, 1998)。これまで の研究より摂食時に見られる口の運動パターンから吐き出し時の運動パターン へのスイッチは、口球神経節内の介在ニューロン (MA, Multi-action) が閉口運 動ニューロン (JC, Jaw-closing) に誘発するシナプス電位の大きさの変化によ って起こり、吐き出し時にはこの特定シナプス部位での情報伝達効率が特異的 に抑圧されることが示唆されている (Nagahama et al., 1999, 図 6)。そこで本研 究ではまずこのような特定シナプス部位での伝達効率を変化させる修飾ニュー ロンの候補である神経節間介在ニューロン (CB, Cerebral-buccal interneuron) を 探索し、次に口唇部への摂食や吐き出し味刺激に対する CB ニューロンの応答 を調べ、最後に CB ニューロンの MA-JC 間のシナプス伝達に対する機能を調 べた。

脳神経節内に細胞体があり、口球神経節に軸索を伸ばす神経節間介在ニュー ロンを探索するため、脳一口球連合から逆行性染色を行った(図 11)。この結 果、これらニューロンは G, M, E と呼ばれる 3 つのクラスターに数個ずつわか れて存在することが明らかになり、これらを CB ニューロンと呼ぶことにした。 このうち M クラスターの Ventral 面に存在する CB ニューロン (CBM) は組織 蛍光法や抗体染色法により含有物質の違いから見分けることができた。そこで カテコールアミン様物質を含有するニューロンを CBM1、神経ペプチドである Myomodulin 様物質を含有するものを CBM2b、神経伝達物質である GABA 様 物質を含有するものを CBM3 と命名した (図 12-14)。なお本研究で用いた組織 蛍光法と抗体染色法により細胞体が蛍光を発しなかった CBM ニューロンを СВм2а とした。

CB ニューロンのように、脳神経節内に細胞体があって口球神経節に軸索を 伸ばすような形態的特徴をもつ神経節間介在ニューロンは、多くの軟体動物で 見つかっている。例えば、アメリカ西海岸に棲息するアメフラシ (Aplysia californica)の Cerebral-to-buccal interneurons (CBIs, Rosen et al., 1991; Perrins and Weiss, 1998; Hurwitz et al., 1999; Xin et al., 1999; Jing et al., 2001; Morgan et al., 2002)、ヨーロッパモノアラ貝 (Lymnaea stagnalis)の Cerebral ventral interneurons (CVs, McCrohan, 1984a, b; McCrohan and Kyriakides, 1989; Kemenes et al., 2001)、 キイロナメクジ (Limax maximus)の Cerebral to buccal interneurons (CBs, Delaney and Gelperin, 1990a, b, c)などで報告されている。これらニューロンは動物の口 唇部や触角部から直接的や間接的に感覚情報を受け取り活動し、その活動によ り口球神経節内の CPG (Central pattern generator)回路網を駆動させたり、口球 神経節内の様々なニューロン活動を修飾することで適切な運動パターンの形成 に寄与していることが知られている。そこで本研究で見つかった Aplysia kurodai の CB ニューロンとこの動物の近縁種である Aplysia californica の CBI ニュー ロンを比較してみることにした。

*Aplysia californica*には、脳神経節内に細胞体があり口球神経節に軸索を伸ば すようなニューロン群に CBI, MCC, ICBM の3つのグループがある。*A. californica*の CBI (Cerebral-to-buccal interneuron)は、Mクラスターに CBI-1, -2, -12, -3 (Rosen et al., 1991; Hurwitz et al., 1999; Jing et al., 2001; Morgan et al., 2002)、 Eクラスターに CBI-4 (Rosen et al., 1991), -5/6 (Perrins and Weiss, 1998), -8/9 (Xin et al., 1999)が同定されている。*A. californica*の CBI-1 は両側脳一口球連合に 軸索を伸ばし、カテコールアミンを含有し、MA と等価のニューロンである B4/5 (Gardner, 1971)に単シナプス性の EPSP を誘発することから (Rosen et al., 1991)、 *A. kurodai*の CBM1 (図 12, 30) と等価であると考えられた。また *A. californica* の CBI-12, -8/9 は神経ペプチドである Myomodulin を含有することが報告され ていることから (Xin et al., 1999)、Mクラスターに存在する CBI-12 は*A. kurodai* の CBI-3 は神経伝達物質である GABA に対する抗体に陽性反応を示すことが報 告されていることから (Diaz-Rios et al., 1999)、CBI-3 は*A. kurodai*の CBM3 (図 14) と等価である可能性が示唆された。しかし *A. kurodai* の CBM2b, CBM3 で は口球神経節内のニューロンとのシナプス結合などがわかっていないことから、 今後さらに検討を重ねる必要がある。*A. californica* の MCC (Metacerebral cell, Weiss and Kupfermann, 1976; Weiss et al., 1978) は、細胞体の位置や大きさ、軸 索分枝の仕方、修飾物質、末梢筋への修飾効果が *A. kurodai* の MCC ニューロ ンとほぼ同じことから等価であると考えられた。一方、*A. californica* の ICBM (Interganglionic cerebral-to-buccal mechanoafferent neuron, Rosen et al., 1979, 1982) は、脳神経節内の Posterior 側に位置する J, K クラスターに存在する触感覚ニ ューロンであるが、*A. kurodai* ではその領域にニューロン細胞体は見つからな かった (図 11)。このことから *A. californica* と *A. kurodai* のニューロンには種 間による若干の違いがあることが示唆された。

2. 海藻味刺激に対する CB ニューロンの応答

CB ニューロン細胞体は口球神経節内の MA, JC ニューロンに比べ比較的小 さく (50µm 前後) ニューロパイル内に埋まっていることから、電気生理学的 手法を用いて口唇部への繰り返し海藻味刺激に対する CB ニューロンの応答を 測定しようとしても、微小電極を長時間にわたり維持し続けることが困難であ った。これまでいくつかの動物でカルシウムイメージング法を用いてニューロ ンのスパイク活動をモニターできることが報告されている (O'Donovan et al., 1993; McClellan et al., 1994; Fetcho and O'Malley, 1995; Lev-Tov and O'Donovan, 1995; O'Malley et al., 1996)。また最近、アメフラシでもカルシウムイメージン グ法を用いて比較的小さなニューロンの活動をモニターできることが示されて いる (Yoshida et al., 2001)。この研究ではニューロンのスパイク活動とそれに 伴う蛍光強度変化の関係が詳しく調べられており、蛍光強度増大の初期の傾き はスパイク発火頻度にほぼ比例して大きくなり、蛍光強度増大の期間はスパイ ク発火期間にほぼ対応することが明らかにされている (Yoshida et al., 2001, 図 15)。これらの関係より、カルシウムイメージング法を用いてニューロンのス パイク発火頻度や発火期間を推測することが可能であった。

そこでカルシウムイメージング法を用いて、口唇部への海藻味刺激に対する

CB ニューロンの応答を調べることにした。カルシウム感受性色素 (Calcium Green-1) の導入は、微小電極を用いて色素を電気泳動的に導入する手法と外科的手術により脳-ロ球連合の断端から色素を逆行性に導入する手法 (図 10) の2種類を用いた。2種類の手法ともに海藻味刺激に対する CB ニューロンの応答を測定することができたが、色素を逆行性に導入する手法では外科的手術を行うことからニューロンの応答が弱くなる傾向があり、また個々のニューロンの染まり方にばらつきがあった。そこで外科的手術が不要な色素を電気泳動的に導入する手法を主に用いて、海藻味刺激に対する CB ニューロンの応答を詳しく調べた。

海藻味刺激には、摂食応答を誘発するアオサと吐き出し応答を誘発するマク サからの2種類の抽出液を用いた。なおアメフラシに海藻をそのまま与えたと きと海藻をすりつぶした抽出液を与えたときで得られる実験結果に差のでる可 能性があるが、両手法より誘発される口の運動パターンにほとんど差が見られ ないことが確認されている (Nagahama and Shin, 1998)。実験では口唇部に2種 類の海藻味刺激を交互に与え、ニューロン活動を反映する蛍光強度変化をカル シウムイメージング法を用いて調べた。この結果、脳神経節内 м クラスター の Ventral 面に存在する4個の CB ニューロンはアオサとマクサ味刺激に対す る応答性に違いのあることが明らかになった。すなわち、CBM3 はマクサに比 ベアオサ味刺激でより長時間の応答が誘発され (図 16, 17, 26E, F)、CBM2a/b はアオサとマクサ味刺激によりともにリズム性の活動が誘発されるが、両味刺 激で明白な差が見られず (図 18, 26C, D)、CBM1 はアオサに比べマクサ味刺激 でより高頻度のスパイク活動が誘発された (図 19, 20, 26A, B)。海藻味刺激の 種類により CBM ニューロンの応答に違いが見られることから、これらニュー ロンは摂食や吐き出し運動パターン形成時にそれぞれ異なる役割を果たしてい ることが示唆された。

アメフラシは栄養物となる海藻などは摂取するが、海藻以外の異物など"食べられないもの"を吐き出すことが知られている (Kupfermann, 1974)。吐き出し行動は海藻味刺激などの化学刺激により発現するだけでなく、異物であるポリエチレンチューブなどの触刺激によっても発現し (Kupfermann, 1974; Chiel et al. 1986; Morton and Chiel, 1993a, b; Hurwitz et al., 1996)、このような触 刺激による吐き出し行動発現に関わる中枢神経機構の研究が A. californica で すでに行われている (Chiel et al., 1986; Weiss et al., 1986; Rosen et al., 1991, 2000a, b; Morton and Chiel, 1993a, b; Church and Lloyd, 1994; Hurwitz et al., 1996)。 そこで口唇部への触刺激に対する CBM1 の応答を調べたところ、触刺激の直 後、CBM1 はマクサ味刺激と同様に高頻度で発火することが示唆された (図 29C)。触刺激の時間が長くなるとマクサ味刺激と同様の蛍光強度変化を示す と考えられることから、CBM1 は海藻味刺激と触刺激の両者により誘発される 吐き出し行動発現に寄与している可能性が示唆された。

3. CBM1 の修飾効果

海藻味刺激に対する CB ニューロンの応答をカルシウムイメージング法や電 気生理学的手法を用いて調べた結果、CBM1 が吐き出し味刺激に対して特異的 に応答し高頻度で発火することが示唆された (図 27,28)。そこで吐き出し応答 時に誘発される MA-JC 間のシナプス伝達効率抑圧に CBM1 が関与しているか を調べることにした。CBM1 を吐き出し味刺激に伴う CBM1 の応答と同程度に 高頻度で発火させた場合、MA-JC 間の伝達効率が大きく抑圧された (図 33)。 CBM1 を比較的低頻度で発火させた場合はこの効果が見られないことから、 CBM1 は発火頻度依存的に MA-JC 間の伝達効率抑圧に寄与しており、摂食と 吐き出し運動パターンのスイッチ機構に関わる修飾ニューロンであることが示 唆された。

CBM1 を高頻度で発火させると MA-JC 間の抑制性シナプスの伝達効率が抑 圧される (図 33)。一方、CBM1 は MA に対して単シナプス性の興奮性シナプ ス後電位 (EPSP) を誘発することから (図 30)、CBM1 が高頻度で発火したと きには MA にスパイク活動が誘発され、より JC を抑制することになる。これ ら2つの現象は一見矛盾しているように思われるが、これら効果の現れる時期 の違いにより説明することができる。CBM1 の MA-JC 間の伝達効率に対する 効果は 100 秒以上持続するような長時間の修飾効果である (図 33)。これに対 して CBM1 による MA の興奮は短時間で起こる。これまでの研究より MA は 海藻味刺激により最初高頻度に発火し、それに続いてリズム性の活動が誘発さ れること、またマクサなどを吐き出す運動パターンは海藻味刺激後、数秒以上 経過してから誘発されることが報告されている (Nagahama and Takata, 1990; Nagahama and Shin, 1999)。このことから CBM1 による MA へのシナプス効果は 最初に起こる MA の短時間の高頻度発火に関係し、CBM1 の長時間の修飾効果 は引き続いて起こるリズム性の吐き出し運動パターンに関係していると考えら れた。

CBM1 は組織蛍光法の結果、カテコールアミン様物質を含有することが示唆 された (図 12)。MA-JC 間の抑制性シナプスの伝達効率に対してカテコールア ミンの1つであるドーパミンの作用を調べたところ、ドーパミンは CBM1 によ る効果と同様に MA-JC 間のシナプス伝達効率を抑圧させることがわかった (図 34)。またドーパミン D1 receptor のアンタゴニストである SCH23390 によ りドーパミンや CBM1 の修飾効果が抑制されることから CBM1 が修飾物質とし てドーパミンを放出しており、MA-JC 間シナプス部位に対して直接的に作用 している可能性が示唆された。シナプス伝達効率に対するドーパミンの修飾機 構は甲殻類の口胃神経節などで調べられており、ドーパミンにより幽門運動パ ターンが変わることや幽門運動ニューロン間の伝達効率が減少することなどが 報告されている (Anderson and Barker, 1981; Eisen and Marder, 1984; Flamm and Harris-Warrick, 1986; Johnson and Harris-Warrick, 1997; Ayali et al., 1998)。アメフ ラシでも同様の機構が考えられ、今後ドーパミンによる修飾機構をさらに解明 していく必要がある。

これまで多くの軟体動物の中枢神経系を用いてドーパミンが関係する運動パ ターンの発現が調べられている。これらの研究によるとドーパミンを中枢神経 系に直接添加したときや口球神経節内のドーパミン含有ニューロンの活動によ り摂食運動パターンが発現されることが報告されている(Wieland and Gelperin, 1983; Trimble and Barker, 1984; Kyriakides and McCrohan, 1989; Kemenes et al., 1990; Teyke et al., 1993; Quinlan et al., 1997; Kabotyanski et al., 1998, 2000)。しか し一方では、*A. californica*の口球神経節内に存在するカテコールアミン含有ニ ューロン B20 や脳神経節内に存在するカテコールアミン含有ニューロン CBI-1 は、吐き出し運動パターン形成に寄与していることが報告されている(Rosen et al., 1991, 2000a; Jing et al., 2001)。このことから CBI-1 と等価の CBM1 は、同様 に吐き出し運動パターン形成に寄与するニューロンであると考えられる。

4. 摂食や吐き出し運動パターン形成に寄与する CB ニューロン

海藻味刺激に対する CB ニューロンの応答を調べた結果、CBM1 は吐き出し 味刺激に対して特異的に応答し、高頻度で発火することが示唆された (図 27, 28)。しかし CBM1 は摂食味刺激に対しても、頻度は低いが発火することがわ かった。それでは吐き出し味刺激の濃度が低い場合、摂食と吐き出しのどちら の運動パターンが誘発されるのであろうか?海藻味刺激に対する CBM1 の応答 のみで考えると、吐き出し味刺激の濃度が低いときは CBM1 の発火頻度が低い ため摂食運動パターンが誘発されると考えられる。しかし動物の行動を実際に 観察すると、吐き出し味刺激の濃度が低い場合、摂食と吐き出し運動パターン のどちらも誘発されない。これは摂食や吐き出し運動パターンの形成には CBM1 以外の CB ニューロンも関わっているからである。

CB ニューロンには CBM1 のような口球神経節内の特定シナプス部位の伝達 効率に影響を与えるような修飾ニューロンと口球神経節内の CPG (Central pattern generator) 回路網を駆動させ、種々の運動ニューロンにリズミカルな活 動を誘発することで摂食や吐き出し運動パターンを形成する司令様ニューロン の2種類がある。CBM2a/b は細胞内通電をすると CPG を駆動し、口球神経節 内のニューロン群にリズミカルな活動を誘発することから司令様ニューロンで あると考えられている。吐き出し味刺激の濃度が低い場合、CBM1 の発火頻度 も低くなるが、CBM2a/b の発火も抑えられるため CPG 回路網自体が駆動せず、 結果として摂食や吐き出し運動パターンのどちらも誘発されないと考えられる。 すなわち摂食や吐き出し運動パターンの形成には、複数の CB ニューロンの活 動が協調することが必要であり、外界からの刺激に応じてこれらニューロンの 活動が切り替わることにより、適切な行動選択が行われると考えられる。 謝辞

本研究を行うにあたり、長年にわたりあらゆる面においてご指導・ご助言い ただいた神戸大学理学部長濱辰文助教授に深く感謝し、厚くお礼申し上げます。 またご多忙の折、本論文を審査していただいた神戸大学理学部土屋禎三教授、 神戸大学発達科学部尼川大作教授、神戸大学農学部竹田真木生教授に厚くお礼 申し上げます。最後に、研究室の諸先輩方、同輩ならびに後輩たちに感謝いた します。

参考文献

- ANDERSON WW AND BARKER DL. Synaptic mechanisms that generate network oscillations in the absence of discrete synaptic potentials. J. Exp. Zool. 216: 187-191, 1981.
- AUDESIRK TE. Chemoreception in *Aplysia californica*. I. Behavioral localization of distance chemoreceptors used in food-finding. *Behav. Biol.* 15: 45-55, 1975.
- AYALI A, JOHNSON BR, AND HARRIS-WARRICK RM. Dopamine modulates graded and spike-evoked synaptic inhibition independently at single synapses in the pyloric network of lobster. J. Neurophysiol. 79: 2063-2069, 1998.
- CAREFOOT TH. Growth and nutrition of three species of opisthobranch molluscs. Comp. Biochem. Physiol. 21: 627-652, 1967.
- CAREFOOT TH. A comparison of absorption and utilization of food energy in two species of tropical *Aplysia*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 5: 47-62, 1970.
- CHIEL HJ, WEISS KR, AND KUPFERMANN I. An identified histaminergic neuron modulates feeding motor circuitry in *Aplysia*. J. Neurosci. 6: 2427-2450, 1986.
- CHURCH PJ AND LLOYD PE. Activity of multiple identified motor neurons recorded intracellularly during evoked feedinglike motor programs in *Aplysia*. J. Neurophysiol. 72: 1794-1809, 1994.
- COHEN JL, WEISS KR, AND KUPFERMANN I. Motor control of buccal muscles in *Aplysia*. J. *Neurophysiol*. 41: 157-180, 1978.
- CROLL RP. Catecholamine-containing cells in the central nervous system and peripery of Aplysia californica. J. Comp. Neurol. 441: 91-105, 2001.
- DELANEY K AND GELPERIN A. Cerebral interneurons controlling fictive feeding in *Limax maximus*. I. Anatomy and criteria for re-identification. J. Comp. Physiol. [A] 166: 297-310, 1990a.
- DELANEY K AND GELPERIN A. Cerebral interneurons controlling fictive feeding in *Limax maximus*. II. Initiation and modulation of fictive feeding. J. Comp. Physiol. [A] 166: 311-326, 1990b.
- DELANEY K AND GELPERIN A. Cerebral interneurons controlling fictive feeding in *Limax maximus*. III. Integration of sensory inputs. J. Comp. Physiol. [A] 166: 327-343, 1990c.

- DIAZ-RIOS M, OYOLA E, AND MILLER MW. Colocalization of γ-aminobutyric acid-like immunoreactivity and catecholanines in the feeding network of *Aplysia californica*. J. Comp. Neurol. 445: 29-46, 2002.
- DIAZ-RIOS M, SUESS E, AND MILLER MW. Localization of GABA-like immunoreactivity in the central nervous system of Aplysia californica. J. Comp. Neurol. 413: 255-270, 1999.
- EISEN JS AND MARDER EA. A mechanism for production of phase shifts in a pattern generator. J. Neurophysiol. 51: 1375-1393, 1984.
- EVANS CG, ROSEN S, KUPFERMANN I, WEISS KR, AND CROPPER EC. Characterization of radula opener neuromuscular system in *Aplysia*. J. Neurophysiol. 76: 1267-1281, 1996.
- FETCHO JR AND O'MALLEY DM. Visualization of active neural circuitry in the spinal cord of intact zebrafish. J. Neurophysiol. 73: 399-406, 1995.
- FETCHO JR AND O'MALLEY DM. Imaging neuronal networks in behaving animals. Curr. Opin. Neurobiol. 7: 832-838, 1997.
- FLAMM RE AND HARRIS-WARRICK RM. Aminergic modulation in lobster stomatogastric ganglion. I. Effects on motor pattern and activity of neurons within the pyloric circuit. *J. Neurophysiol.* 55: 847-865, 1986.
- FREDMAN SM AND JAHAN-PARWAR B. Processing of chemosensory and mechanosensory information in identifiable *Aplysia* neurons. *Comp. Biochem. Physiol.* 66A: 25-34, 1980.
- FURNESS JB, COSTA M, AND WILSON AJ. Water-stable fluorophores, produced by reaction with aldehyde solutions, for the histochemical localization of catechol- and indolethylamines. *Histochemistry* 52: 159-170, 1977.
- GARDNER D. Bilateral symmetry and interneuronal organization in the buccal ganglia of *Aplysia*.*Science* 173: 550-553, 1971.
- GOLDSTEIN RS AND SCHWARTZ JH. Catecholamine neurons in *Aplysia*: improved light-microscopic resolution and ultrastructural study using paraformaldehyde and glutaraldehyde (FaGlu) cytochemistry. *J. Neurobiol.* 20: 203-218, 1989.
- HURWITZ I, NEUSTADTER D, MORTON DW, CHIEL HJ, AND SUSSWEIN AJ. Activity patterns of the B31/B32 pattern initiators innervating the I2 muscle of the buccal mass during normal feeding movements in *Aplysia californica*. J. Neurophysiol. 75: 1309-1326, 1996.

HURWITZ I, PERRINS R, XIN Y, WEISS KR, AND KUPFERMANN I. C-PR neuron of Aplysia has

differential effects on "feeding" cerebral interneurons, including myomodulin-positive CBI-12. J. Neurophysiol. 81: 521-534, 1999.

- JAHAN-PARWAR B. Behavioral and electrophysiological studies on chemoreception in Aplysia. Am. Zool. 12: 525-537, 1972.
- JAHAN-PARWAR B AND FREDMAN SM. Cerebral ganglion of *Aplysia*: cellular organization and origin of nerves. *Comp. Biochem. Physiol.* 54A: 347-357, 1976.
- JING J AND WEISS KR. Neural mechanisms of motor program switching in *Aplysia*. J. Neurosci. 21: 7349-7362, 2001.
- JOHNSON BR AND HARRIS-WARRICK RM. Amine modulation of glutamate responses from pyloric motor neurons in lobster stomatogastric ganglion. J. Neurophysiol. 78: 3210-3221, 1997.
- KANDEL ER. Cellular basis of behavior: an introduction to behavioral neurobiology. San Francisco:W. H. Freeman & Co., 1976.
- KANDEL ER. Behavioral biology of *Aplysia*: a contribution to the comparative study of opisthobranch molluscs. San Francisco: W. H. Freeman & Co., 1979.
- KABOTYANSKI EA, BAXTER DA, AND BYRNE JH. Identification and characterization of catecholaminergic neuron B65, which initiates and modifies patterned activity in the buccal ganglia of *Aplysia*. J. Neurophysiol. 79: 605-621, 1998.
- KABOTYANSKI EA, BAXTER DA, CUSHMAN SJ, AND BYRNE JH. Modulation of fictive feeding by dopamine and serotonin in *Aplysia*. J. Neurophysiol. 83: 374-392, 2000.
- KEMENES G, HIRIPI L, AND BENJAMIN PR. Behavioural and biochemical changes in the feeding system of *Lymnaea* induced by the dopamine and serotonin neurotoxins 6-hydroxydopamine and 5,6dihydroxytryptamine. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 329: 243-255, 1990.
- KEMENES G, STARAS K, AND BENJAMIN PR. Multiple types of control by identified interneurons in a sensory-activated rhythmic motor pattern. J. Neurosci. 15: 2903-2911, 2001.
- KIRK MD. Premotor neurons in the feeding system of Aplysia californica. J. Neurobiol. 20: 497-512, 1989.
- KUPFERMANN I. Feeding behavior in *Aplysia*: a simple system for the study of motivation. *Behav.Biol.* 10: 1-26, 1974.
- KUPFERMANN I AND CAREW TJ. Behavior patterns of *Aplysia californica* in its natural environment. Behav. Biol. 12: 317-337, 1974.

- KYRIAKIDES MA AND MCCROHAN CR. Effect of putative neuromodulators on rhythmic buccal motor output in Lymnaea stagnalis. J. Neurobiol. 20: 635-650, 1989.
- LEV-TOV A AND O'DONOVAN MJ. Calcium imaging of motoneuron activity in the en-bloc spinal cord preparation of the neonatal rat. J. Neurophysiol. 74: 1324-1334, 1995.
- MCCLELLAN AD, MCPHERSON D, AND O'DONOVAN MJ. Combined retrograde labeling and calcium imaging in spinal cord and brainstem neurons of the lamprey. *Brain Res.* 663: 61-68, 1994.
- MCCROHAN CR. Properties of ventral cerebral neurones involved in the feeding system of the snail, Lymnaea stagnalis. J. Exp. Biol. 108: 257-272, 1984a.
- MCCROHAN CR. Initiation of feeding motor output by an identified interneurone in the snail Lymnaea stagnalis. J. Exp. Biol. 113: 351-366, 1984b.
- MCCROHAN CR AND KYRIAKIDES MA. Cerebral interneurones controlling feeding motor output in the snali Lymnaea stagnalis. J. Exp. Biol. 147: 361-374, 1989.
- MILLER MW, ALEVIZOS A, CROPPER EC, VILIM FS, KARAGOGEOS D, KUPFERMANN I, AND WEISS KR. Localization of myomodulin-like immunoreactivity in the central nervous system and peripheral tissues of *Aplysia californica*. J. Comp. Neurol. 314: 627-644, 1991.
- MORGAN PT, JING J, VILIM FS, AND WEISS KR. Interneuronal and peptidergic control of motor pattern switching in *Aplysia*. J. Neurophysiol. 87: 49-61, 2002.
- MORTON DW AND CHIEL HJ. In vivo buccal nerve activity that distinguishes ingestion from rejection can be used to predict behavioral transitions in *Aplysia*. J. Comp. Physiol. [A] 172: 17-32, 1993a.
- MORTON DW AND CHIEL HJ. The timing of activity in motor neurons that produce radula movements distinguishes ingestion from rejection in *Aplysia*. J. Comp. Physiol. [A] 173: 519-536, 1993b.
- NAGAHAMA T AND INOUE M. Diverse motor neurons produce jaw-opening at radula-protraction phase during the consummatory feeding response in *Aplysia kurodai*. Soc. Neurosci. Abstr. 25: 1646, 1999.
- NAGAHAMA T, NARUSUYE K, AND ARAI H. Synaptic modulation contributes to firing pattern generation in jaw motor neurons during rejection of seaweed in *Aplysia kurodai*. J. Neurophysiol. 82: 2579-2589, 1999.
- NAGAHAMA T AND SHIN N. Patterned jaw movements and the motor neuron activity during rejection of seaweed in *Aplysia kurodai*. J. Comp. Physiol. [A] 182: 551-562, 1998.

- NAGAHAMA T AND TAKATA M. Food-induced firing patterns in motoneurons producing jaw movements in *Aplysia kurodai*. J. Comp. Physiol. [A] 162: 729-738, 1988.
- NAGAHAMA T AND TAKATA M. 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, 1989.
- NAGAHAMA T AND TAKATA M. 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, 1990.
- NAGAHAMA T, WEISS KR, AND KUPFERMANN I. Effects of cerebral neuron C-PR on body postural muscles associated with a food-induced arousal state in *Aplysia*. J. Neurophysiol. 70: 1231-1243, 1993.
- NAGAHAMA T, WEISS KR, AND KUPFERMANN I. Body postural muscles active during food arousal in *Aplysia* are modulated by diverse neurons that receive monosynaptic excitation from the neuron C-PR. J. Neurophysiol. 72: 314-325, 1994.
- O'DONOVAN MJ, HO S, SHOLOMENKO G, AND YEE W. Real-time imaging of neurons retrogradely and anterogradely labelled with calcium-sensitive dyes. J. Neurosci. Methods 46: 91-106, 1993.
- O'MALLEY DM, KAO Y, AND FETCHO JR. Imaging the functional organization of zebrafish hindbrain segments during escape behaviors. *Neuron* 17: 1145-1155, 1996.
- PERRINS R AND WEISS KR. Compartmentalization of information processing in an Aplysia feeding circuit interneuron through membrane properties and synaptic interactions. J. Neurosci. 18: 3977-3989, 1998.
- PRESTON RJ AND LEE RM. Feeding behavior in *Aplysia cakifornica*: Role of chemical and tactile stimuli. J. Comp. Physiol. Psychol. 82: 368-381, 1973.
- QUINLAN EM, ARNETT BC, AND MURPHY AD. Feeding stimulants activate an identified dopaminergic interneuron that induces the feeding motor program in *Helisoma*. J. Neurophysiol. 78: 812-824, 1997.
- ROSEN SC, MILLER MW, CROPPER EC, AND KUPFERMANN I. Outputs of radula mechanoafferent neurons in *Aplysia* are modulated by motor neurons, interneurons, and sensory neurons. J. *Neurophysiol.* 83: 1621-1636, 2000a.
- ROSEN SC, MILLER MW, EVANS CG, CROPPER EC, AND KUPFERMANN I. Diverse synaptic

connections between peptidergic radula mechanoafferent neurons and neurons in the feeding system of *Aplysia*. J. Neurophysiol. 83: 1605-1620, 2000b.

- ROSEN SC, TEYKE T, MILLER MW, WEISS KR, AND KUPFERMANN I. 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, 1991.
- ROSEN SC, WEISS KR, COHEN JL, AND KUPFERMANN I. Interganglionic cerebra-buccal mechanoafferents of *Aplysia*: receptive fields and synaptic connections to different classes of neurons involved in feeding behavior. *J. Neurophysiol.* 48: 271-288, 1982.
- ROSEN SC, WEISS KR, AND KUPFERMANN I. Response properties and synaptic connections mechanoafferent neurons in cerebral ganglion of *Aplysia*. J. Neurophysiol. 42: 954-974, 1979.
- SANCHEZ JAD AND KIRK MD. Short-term synaptic enhancement modulates ingestion motor programs of *Aplysia*. J. Neurosci. 20: RC85: 1-7, 2000.
- SCOTT ML, GOVIND CK, AND KIRK MD. Neuromuscular organization of the buccal system in Aplysia californica. J. Comp. Neurol. 312: 207-222, 1991.
- SUSSWEIN AJ AND BYRNE JH. Identification and characterization of neurons initiating patterned neural activity in the buccal ganglia of *Aplysia*. J. Neurosci. 8: 2049-2061, 1988.
- TEYKE T, ROSEN SC, WEISS KR, AND KUPFERMANN I. Dopaminergic neuron B20 generates rhythmic neuronal activity in the feeding motor circuitry of *Aplysia*. *Brain Res.* 630: 226-237, 1993.
- TEYKE T, WEISS KR, AND KUPFERMANN I. An identified neuron (CPR) evokes neuronal responses reflecting food arousal in *Aplysia*. *Science* 247: 85-87, 1990.
- TEYKE T, WEISS KR, AND KUPFERMANN I. Orientation of *Aplysia californica* to distant food sources. J. Comp. Physiol. [A] 170: 281-289, 1992.
- TRIMBLE DL AND BARKER DL. Activation by dopamine of patterned motor output from the buccal ganglia of *Helisoma trivolvis*. J. Neurobiol. 15: 37-48, 1984.
- WEISS KR, CHIEL HJ, KOCH U, AND KUPFERMANN I. Activity of an identified histaminergic neuron, and its possible role in arousal of feeding behavior in semi-intact *Aplysia*. J. Neurosci. 6: 2403-2415, 1986.
- WEISS KR, COHEN JL, AND KUPFERMANN I. Modulatory control of buccal musculature by a serotonergic neuron (metacerebral cell) in *Aplysia*. J. Neurophysiol. 41: 181-203, 1978.
- WEISS KR AND KUPFERMANN I. Homology of the giant serotonergic neurons (metacerebral cells) in

Aplysia and pulmonate molluscs. Brain Res. 117: 33-49, 1976.

- WIELAND SJ AND GELPERIN A. Dopamine elicits feeding motor program in *Limax maximus*. J. Neurosci. 3: 1735-1745, 1983.
- Xin Y, Hurwitz I, Perrins R, Evans CG, Alexeeva V, Weiss KR, and Kupfermann I. Actions of a pair of identified cerebral-buccal interneurons (CBI-8/9) in *Aplysia* that contain the peptide myomodulin. *J. Neurophysiol.* 81: 507-520, 1999.
- Yoshida R, Iwamoto A, and Nagahama T. Calcium imaging for detection and estimation of spike activities in *Aplysia* neurons. *Zool. Sci.* 18: 631-643, 2001.



図1 アメフラシを背側 (A)、前側 (B) から見た外観図。アメフラ シの化学受容器は口唇部と触角部に分布する (Kandel, 1979)。



図2 アメフラシの食物嗜好性 (A) と咀嚼運動 (B)。A. 6 種類の海 藻により誘発される摂食応答の割合 (n=12, Nagahama and Shin, 1998)。B. 海藻が口唇部に触れたときに誘発される口の開閉運動と 同調する歯舌のリズミカルな運動パターン。図の番号順に運動が 発現する (Kandel, 1979)。Ulva, Ulva pertusa; Dict., Dictyoteris prolifera; Grat., Grateloupia filicina; Pach., Pachydictyon coriaceum; Geli., Gelidium amansii; Laur., Laurencia okamurai.



図3 アオサ抽出液により誘発される口と歯舌のリズミカルな摂食運動パターン。A. 摂食応答時の開口率の経時変化(上)と口と歯舌の位相関係(中)およびそれに対応するMA, JCニューロンの放電パターン(下)。B. 摂食応答時の口と歯舌のビデオ像。ビデオの各フレーム(a~e)は、開口率の経時変化のグラフ(A,上)中にある黒丸a~eにそれぞれ対応する(Nagahama and Shin, 1998)。



図4 マクサ抽出液により誘発される口と歯舌のリズミカルな吐き出し運動パターン。A. 吐き出し応答時の開口率の経時変化(上)と口と歯舌の位相関係(中)およびそれに対応す るMA, JCニューロンの放電パターン(下)。B. 吐き出し応答時の口と歯舌のビデオ像。ビ デオの各フレーム(a~e)は、開口率の経時変化のグラフ(A,上)中にある黒丸a~eにそ れぞれ対応する(Nagahama and Shin, 1998)。



図5 A. アメフラシの神経系と各器官 (Kandel, 1976)。B, C. 脳神 経節 (B) および口球神経節 (C) の支配領域 (Kandel, 1979)。



図6 MA-JC間のシナプス伝達に対する海藻味刺激の効果。A, B. MA刺激により誘発されるJCのIPSCサイズに対するアオサ (Ulva, A) およびマクサ (Geli., B) 味刺激の効果。C. アオサおよびマクサ 味刺激により誘発されるIPSCサイズの経時変化 (Nagahama et al., 1999)。



図7 これまでの研究から考えられる摂食から吐き出しへの口の運動パターン スイッチを引きおこす神経機構のモデル。アオサ抽出液により誘発される摂食 応答時、JCを単シナプス性に抑制するMAの活動によりJCのスパイク活動の開 始時期が遅れる。マクサ抽出液により誘発される吐き出し応答時、MA-JC間の 伝達効率が脳神経節内の修飾ニューロンにより特異的に抑圧されJCの活動開始 時期が早くなる。そこで本研究ではMA-JC間のシナプス伝達を修飾するニュー ロン (CBニューロン) を探索した。CB, Cerebral-buccal interneuron; MA, Multiaction neuron; JC, Jaw-closing neuron; CPG, Central pattern generator; RM, Radula muscles; JOM, Jaw-opening muscles; JCM, Jaw-closing muscles.



図8 A. アメフラシの口球とそれを取り巻く神経節を腹側から見た図 (Kandel, 1979)。B. 測定用プレパレーションの模式図。口唇、前触角からなる頭部組織、 脳神経節、口球神経節、口球を左右対称となるように測定用チャンバーの各区 画に配置してピン留めし、それらの間は溶液の行き来を防ぐためワセリンで仕 切った。頭部組織へ至る血管は人工海水で灌流した (Nagahama et al., 1999)。 C-B conn., Cerebral-buccal connective.



図9 逆行性染色法と組織蛍光法または抗体染色法を組み合わせた 手法の概略図。Cerebral g., 脳神経節; Buccal g., ロ球神経節; C-B conn., Cerebral-buccal connective.



図10 カルシウム感受性色素を逆行性に導入する手法の概略図。 外科的手術によりC-B conn. 断端に色素を充填した導入器を取り付 けた。C-B conn., Cerebral-buccal connective.



図11 A. CBニューロンの逆行性染色像 (Ventral面)。左側C-B conn. からBiocytinを逆行性に導入した (矢頭)。同側の脳神経節内 に約10個、対側に1個のCBニューロン細胞体が見つかった。B. CBニューロン細胞体の分布するクラスター。CBニューロン細胞体 はG, M, Eクラスターに数個ずつわかれて存在し、J, Kクラスター には見つからなかった。C, D. 対側 (C)、同側 (D) Mクラスターの Ventral面を拡大した像。対側Mクラスターに1個、同側Mクラス ターに4個のCBニューロン細胞体が見つかった。ULAB n., Upper labial nerve; AT n., Anterior tentacular nerve; LLAB n., Lower labial nerve; C-B conn., Cerebral-buccal connective; C-P conn., Cerebralpedal connective; C-Pl conn., Cerebral-pleural connective.



図12 C-B conn. からの逆行性染色像と組織蛍光像。A, B. 対側 (A)、同側 (B) Mクラスターに存在するCBニューロンの逆行性染色像 (Ventral面)。左側 C-B conn. からBiocytinを逆行性に導入した。C, D. 対側 (C)、同側 (D) Mクラ スターに存在するCBニューロンの組織蛍光像 (Ventral面)。E, F. Mクラス ターに存在する4個のCBニューロンのうち最もAnterior側の1個のCBニュー ロンがカテコールアミン様物質を含有した。そこでこのCBニューロンを CBM1と命名した。ULAB n., Upper labial nerve; AT n., Anterior tentacular nerve; LLAB n., Lower labial nerve; C-B conn., Cerebral-buccal connective.



図13 C-B conn. からの逆行性染色像と神経ペプチドであるMyomodulinに 対する抗体を一次抗体として用いたときの抗体染色像。A, B. 対側 (A)、同 側 (B) Mクラスターに存在するCBニューロンの逆行性染色像 (Ventral面)。 左側C-B conn. からBiocytinを逆行性に導入した。C, D. 対側 (C)、同側 (D) Mクラスターに存在するCBニューロンの抗体染色像 (Ventral面)。E, F. Mク ラスターに存在する4個のCBニューロンのうち1個のCBニューロンが Myomodulin様物質を含有した。そこでこのCBニューロンをCBM2bと命名し た。ULAB n., Upper labial nerve; AT n., Anterior tentacular nerve; LLAB n., Lower labial nerve; C-B conn., Cerebral-buccal connective.



図14 C-B conn. からの逆行性染色像と神経伝達物質であるGABAに対する 抗体を一次抗体として用いたときの抗体染色像。A, B. 対側 (A)、同側 (B) Mクラスターに存在するCBニューロンの逆行性染色像 (Ventral面)。左側C-B conn. からBiocytinを逆行性に導入した。C, D. 対側 (C)、同側 (D) Mクラス ターに存在するCBニューロンの抗体染色像 (Ventral面)。E, F. Mクラスター に存在する4個のCBニューロンのうち最もPosterior側の1個のCBニューロ ンがGABA様物質を含有した。そこでこのCBニューロンをCBM3と命名し た。ULAB n., Upper labial nerve; AT n., Anterior tentacular nerve; LLAB n., Lower labial nerve; C-B conn., Cerebral-buccal connective.



図15 ニューロンのスパイク活動とそれに伴う蛍光強度変化の関係。A, B. 脱分極性通電の通電量 (A) あるいは通電時間 (B) を変えたとき、MAニューロンに誘発されたスパイク活動とそれに伴う蛍光強度 変化の同時記録。C. ニューロンのスパイク発火頻度と蛍光強度増大の初期の傾きとの関係。D. ニューロンのスパイク発火期間と蛍光強度変化の立ち上がりからピークまでの期間との関係 (Yoshida et al., 2001)。



図16 ロ唇部への海藻味刺激に対するCBM3の応答。A, B. ロ唇部をアオサ (Ulva, A) またはマクサ (Geli., B) 抽出液で刺激したときに誘発されたCBM3細胞体の蛍光強度変化の擬似カラー像。C. 人工海水 (ASW)、アオサ (Ulva) またはマクサ (Geli.) 味刺激により誘発されたCBM3細胞体の蛍光強度変化の時間経過。D. Calcium Green-1で染色したCBM3の蛍光像。E. 神経伝達物質であるGABAに対する抗体を一次抗体として用いたときの抗体染色法により観察されたCBM3の蛍光像。図Eのニューロン細胞体は図A, B, Dと同じニューロンである。



図17 アオサ (Ulva, A) とマクサ (Geli., B) 味刺激を交互に繰り返 し与えたときにCBM3細胞体に誘発された蛍光強度変化の時間経 過。この結果、CBM3はマクサ味刺激に比べアオサ味刺激でより長 時間持続するリズム性のスパイク活動が誘発されたと考えられ る。



図18 ロ唇部への海藻味刺激に対するCBM2aの応答。A, B. ロ唇部をアオサ (Ulva, A) またはマクサ (Geli., B) 抽出液で刺激したときにCBM2a細胞体に誘発された蛍光強度変化の擬似カラー像。C, D. アオサ (Ulva, C) とマクサ (Geli., D) 味刺激を交互に繰り返し与えたときに誘発されたCBM2a細胞体の蛍光強度変化の時間 経過。この結果、CBM2aは両味刺激により長時間持続するリズム性のスパイク活動が誘発されたが、両応答 に明白な差はないと考えられる。


図19 ロ唇部への海藻味刺激に対するCBM1の応答。A, B. 口唇部をアオサ (Ulva, A) またはマクサ (Geli., B) 抽出液で刺激したときに誘発されたCBM1細胞体の蛍光強度変化の擬似カラー像。C. 人工海水 (ASW)、アオ サ (Ulva) またはマクサ (Geli.) 味刺激により誘発されたCBM1細胞体の蛍光強度変化の時間経過。D. Calcium Green-1で染色したCBM1の蛍光像。E. 組織蛍光法により観察されたCBM1の蛍光像。図Eのニューロン細胞 体は図A, B, Dと同じニューロンである。



図20 A, B. アオサ (Ulva, A) とマクサ (Geli., B) 味刺激を交互に繰り返し与えたときに誘発されたCBM1細胞体の蛍光強度変化の時間 経過。この結果、CBM1はアオサ味刺激に比べマクサ味刺激でより 高頻度のスパイク活動が誘発されたと考えられる。



図21 A. カルシウム感受性色素を逆行性導入したときに染色された脳神経節内Mクラス ターのCBニューロン (CBM) 像。B. 神経ペプチドであるMyomodulinに対する抗体を一次 抗体として用いたときの抗体染色法により観察されたCBMニューロンの蛍光像。逆行性 導入により染色された3個のCBMニューロン (A) のうち1個がMyomodulin様物質を含有 した (*)。C. ロ唇部をアオサ抽出液 (Ulva) で刺激したときに誘発されたCBMニューロン (CBM2a, CBM2b, CBM3) 細胞体の蛍光強度変化の擬似カラー像。CBM2a, CBM2b, CBM3ともにアオサ味刺激で蛍光強度が増大した。



図22 繰り返しアオサ味刺激 (Ulva) により誘発されたCBMニュー ロン細胞体の蛍光強度変化の時間経過。これらの結果、アオサ味 刺激によりCBM2a, CBM2bに一過性のスパイク活動が誘発され (A, B)、CBM3に持続性のスパイク活動が誘発された (C) と考えられ る。



図23 A. カルシウム感受性色素を逆行性導入したときに染色された脳神経節内Mクラスターの CBニューロン (CBM) 像。B. 組織蛍光法により観察されたCBMニューロンの蛍光像。逆行性導 入により染色された3個のCBMニューロン (A) のうち1個がカテコールアミン様物質を含有し た (*)。C. 口唇部をマクサ抽出液 (Geli.) で刺激したときに誘発されたCBMニューロン (CBM1, CBM2a or 2b, CBM3) 細胞体の蛍光強度変化の擬似カラー像。CBM1, CBM3はマクサ味刺激で蛍 光強度が増大したが、CBM2はほとんど変化しなかった。



図24 アオサ (Ulva) またはマクサ (Geli.) 味刺激により誘発された CBMニューロン細胞体の蛍光強度変化の時間経過。これらの結 果、アオサやマクサ味刺激によりCBM1, CBM3ともにスパイク活動 が誘発されたが、CBM1はアオサ味刺激に比ベマクサ味刺激でより 大きな活動が誘発され (A)、CBM3はマクサ味刺激に比ベアオサ味 刺激でわずかだが大きな活動が誘発された (B) と考えられる。



図25 A, C. 口唇部を異なる濃度のアオサ (Ulva, A) またはマクサ (Geli., C) 抽出液で刺激したときに 誘発されたCBM1細胞体の蛍光強度変化の時間経過。B, D. アオサ (Ulva, B) またはマクサ (Geli., D) 抽 出液の濃度変化とそれに伴うCBM1細胞体の蛍光強度変化の相対的な初期傾き (5 秒間) との関係。



図26 CBMニューロンの味覚応答のまとめ。A, B. 人工海水 (ASW)、アオサ (Ulva) またはマクサ (Geli.)味 刺激に対するCBM1の応答。C, D. アオサ (Ulva) またはマクサ (Geli.)味刺激に対するCBM2a/bの応答。E, F. アオサ (Ulva) またはマクサ (Geli.)味刺激に対するCBM3の応答。蛍光強度増大の初期の傾き (5秒間, A, C, E) と蛍光強度変化の開始からピークまでの期間 (B, D, F) を複数の個体で平均したものを示す。これらの結 果、CBM1はアオサとマクサ両味刺激により約10秒間のスパイク活動が誘発されたが、マクサ味刺激ではよ り高頻度のスパイク活動が誘発されたと考えられる。CBM3はアオサとマクサ両味刺激によりほぼ等しい頻 度のスパイク活動が誘発されたが、アオサ味刺激ではより長時間スパイク活動が持続したと考えられる。ま た、アオサとマクサ両味刺激により誘発されるCBM2a/bのスパイク活動には明白な差がないと考えられる。



図27 A. 海藻味刺激により誘発されたCBM1細胞体の蛍光強度変化の時間経過。B. 脳一口球連合を 様々な頻度の電気パルスで一定時間(5秒間, bar)刺激したときに誘発されたCBM1細胞体の蛍光強度 変化の時間経過。C. スパイク発火頻度とそれに伴う蛍光強度増大の初期傾き(5秒間)との関係。発 火頻度が大きくなるにつれて蛍光強度増大の初期傾きはほぼ直線的に大きくなった(▽)。図Aのアオ サ(Ulva)またはマクサ(Geli.)味刺激により誘発されたCBM1細胞体の蛍光強度増大の初期傾き(5秒 間, rectangle)を矢印で示す。D.カルシウムイメージング法の結果から見積もった海藻味刺激により誘 発されたCBM1のスパイク応答のまとめ。刺激後5秒間の推定発火頻度を複数の個体で平均したもの を示す。



図28 A, B. アオサ (Ulva, A) またはマクサ (Geli., B) 味刺激により誘発 されたCBM1のスパイク活動の細胞内記録。C. 電気生理学的手法で測定 した人工海水 (ASW) および海藻味刺激に対するCBM1のスパイク応答の まとめ。刺激後5秒間の発火頻度を複数の個体で平均したものを示す。 マクサ味刺激によりCBM1に高頻度のスパイク活動が誘発された。



図29 A, B. アオサ (Ulva, A) またはマクサ (Geli., B) 味刺激により誘発されたCBM3のス パイク活動の細胞内記録。C. 触刺激 (Touch) とマクサ味刺激 (Geli.) により誘発された CBM1細胞体の蛍光強度変化の時間経過。この結果、触刺激とマクサ味刺激ともに刺激直 後、CBM1に高頻度のスパイク活動が誘発されたと考えられる。



図30 CBM1の同定方法と形態的特徴。A. CBM1を細胞内通電すると両側脳-ロ球連合 (C-B conn.) にCBM1の スパイク活動と1対1に対応する神経応答が誘発された。またCBM1のスパイク活動により同側MA1に興奮性 シナプス後電位 (EPSPs) が誘発された。B. 多シナプス経路を遮断する3×Ca²⁺, 3×Mg²⁺溶液下においても、 CBM1の脱分種性通電によりMA1, JC2に単シナプス性のEPSPsが誘発された。C. Carboxyfluoresceinで染色し たCBM1の蛍光像。D. Lissamine rhodamineで染色したCBM1の蛍光像。E. Lissamine rhodamine染色後の組織 蛍光法により観察されたCBM1の蛍光像。図Eのニューロン細胞体は図Dと同じニューロンである。C-B conn., Cerebral-buccal connective; c C-B conn., Contralateral cerebral-buccal connective.





図31 MA-JC間のシナプス伝達に対するCBM1の修飾効 果。A. MA1を10秒間隔で繰り返し刺激しJC2に抑制性 シナプス電流 (IPSCs) を誘発し、その途中でCBM1を 30秒間発火させたときの効果。B. 図A中の1, 2における 時間軸を拡大したものをそれぞれB1, B2に示す。





図32 A, B. CBM1を刺激しないとき (A) と高頻度で発火さ せたとき (B) の個々のIPSCサイズに対するCBM1の効果。 図31と同じプレパレーションで得られた結果である。



図33 A. CBM1刺激前後のMA刺激によりJCに誘発されたIPSCサイズの経時変化。図 31,32と同じプレパレーションで得られた結果である。B, C. CBM1によるIPSCサイズ 修飾への発火頻度依存性。CBM1を低頻度 (19.0 spikes/s) または高頻度 (44.3 spikes/s) で発火したときのIPSCサイズの経時変化を図Bに、CBM1の低頻度または高頻度刺激に より減少したIPSCサイズを複数の個体で平均したものを図Cに示す (Low freq., 18.9±1.3 spikes/s; High freq., 40.1±1.1 spikes/s)。D. CBM1の発火頻度とCBM1刺激によ り減少したIPSCサイズとの関係。CBM1を約25 spikes/s以上の高頻度で発火させるとマ クサ吐き出し時と同様にIPSCサイズが減少した。



図34 A. MA刺激によりJCに誘発された個々 のIPSCサイズに対するドーパミン(5x10-5M) 外液添加の効果。B. ドーパミンD1 receptorの アンタゴニストであるSCH23390を添加したと きの個々のIPSCサイズに対するドーパミン修 飾効果の阻害。C. SCH23390を添加したとき (SCH23390+DA) と添加しなかったとき (DA) のMA-JC間のIPSCサイズに対するドーパミン 修飾効果のまとめ。



図35 本研究で明らかになったCBM1のシナプス修飾効果のまとめ。アオサ抽出液 により誘発される摂食応答時、CBM1の発火頻度は比較的低いためMA-JC間の抑制 性シナプスの伝達効率に影響を与えず、JCを単シナプス性に抑制するMAの活動に よりJCのスパイク活動開始時期が遅れる。マクサ抽出液により誘発される吐き出 し応答時、CBM1の発火頻度が高いためMA-JC間の伝達効率が特異的に抑圧される ことによりJCの活動開始時期が早くなる。このことからCBM1は摂食から吐き出し への口の運動パターンスイッチ機構に関わる修飾ニューロンであることが示唆さ れた。CB, Cerebral-buccal interneuron; MA, Multi-action neuron; JC, Jaw-closing neuron; CPG, Central pattern generator; RM, Radula muscles; JOM, Jawopening muscles; JCM, Jaw-closing muscles.