



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

(Degree)

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	4
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. CB _M 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 CB _M ニューロンの応答	23
5. 海藻味刺激により誘発される CB _M 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 CB _{M1} 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 (脳一口球連合) 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、脳一口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 (CB_M) 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になっている (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-口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

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ッ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ップス部位に対する 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 間シナップス伝達に対する 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 に抑制性シナップス電流 (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 間シナッ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 間シナップスの伝達効率を抑圧させることができた。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 間シナッ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。

序論

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は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; Fecho 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; Fecho 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, Cerebral-buccal 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°C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-口球連合(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°C 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°C 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°C 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°C 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°C で静置した。一次抗体として Rabbit anti-myomodulin (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°C 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°C 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 \times /0.13 または 10 \times /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 (三菱化成) 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 (50~100 μ m 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 0.5~0.7 μ l/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、微小電極作製ブラー (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グ (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)、シリング (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グで吸引し、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

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

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 $10\times/0.30$ 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、 $\Delta F/F$ 値を計算しデータを標準化した。ここで $\Delta F/F (\%) = (\text{蛍光強度変化} - \text{刺激前の平均蛍光強度}) \div \text{刺激前の平均蛍光強度} \times 100$ 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。 $\Delta F/F$ 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) とともにビーカー内で攪拌し (室温, 20 分)、高速冷却遠心機 (12000g, 約 4°C, 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 秒後にパストールピペット (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 $3 \times \text{Ca}^{2+}$, $3 \times \text{Mg}^{2+}$ 溶液と $5 \times \text{Ca}^{2+}$, $2 \times \text{Mg}^{2+}$ 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).

$3 \times \text{Ca}^{2+}$, $3 \times \text{Mg}^{2+}$ 溶液: 285mM NaCl, 6mM KCl, 30mM CaCl_2 , 125mM MgCl_2 ,
25mM MgSO_4 , 10mM Tris-HCl (pH 7.8-7.9).

$5 \times \text{Ca}^{2+}$, $2 \times \text{Mg}^{2+}$ 溶液: 330mM NaCl, 11mM KCl, 55mM CaCl_2 , 75mM MgCl_2 ,
25mM MgSO_4 , 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% NaN_3 .

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 (50 μm 前後) と比べ明らかに巨大であり、その大きさは 200 μm 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*) 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* 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. CB_M 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 (CB_M) が確認された。これら CB_M 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 CB_M 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 CB_M 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。

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 CB_M 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、刺激一洗浄後、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すると、測定時間は数時間に及ぶ。ところが、 CB_M 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 (50 μ m 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 CB_M 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はほぼ比例し (図 15C)、蛍光強度増大の期間はスパイク発火期間には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レし、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

口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 ($\Delta F/F$) 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できた。

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 ($\Delta F/F$) 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べ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 ($\Delta F/F$) 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

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 ($\Delta F/F$) 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 ($\Delta F/F$) 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 ($\times 1$) 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 ($\Delta F/F$) 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 $\times 0.01$ 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 $\times 0.1$, $\times 0.2$, $\times 1$ 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, $\times 0.05$) 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 ($\times 0.2$, $\times 0.5$, $\times 1$) 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 $\times 0.01$, $\times 0.02$ 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 $\times 0.1$, $\times 0.2$ 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 $\times 2$ 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 ($\times 1$) 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 ($\times 1$) 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 ($\times 1$) 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 $0.78 \pm 0.13 \text{ %/s}$ と $1.42 \pm 0.21 \text{ %/s}$ であり、両者に有意な差が認められた (図 26A, mean \pm 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 $0.10 \pm 0.02 \text{ %/s}$ 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 $11.94 \pm 0.97 \text{ s}$ で、マクサ味刺激の場合 $11.39 \pm 1.19 \text{ s}$ 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 $0.70 \pm 0.13 \text{ %/s}$ と $0.69 \pm 0.12 \text{ %/s}$ 、蛍光強度増大の期間はそれぞれ $11.56 \pm 1.04 \text{ s}$ と $11.33 \pm 0.93 \text{ s}$ 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 $1.84 \pm 0.29 \text{ %/s}$ と $1.53 \pm 0.27 \text{ %/s}$ 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 $15.07 \pm 1.60 \text{ s}$ と $8.15 \pm 0.86 \text{ s}$ 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、7 Hz 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、両側脳一口球連合 (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 $3\times\text{Ca}^{2+}$, $3\times\text{Mg}^{2+}$ 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 $3\times\text{Ca}^{2+}$, $3\times\text{Mg}^{2+}$ 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40spikes/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つた時の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つた(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 $3 \times \text{Ca}^{2+}, 3 \times \text{Mg}^{2+}$ 溶液下で、黒丸は $5 \times \text{Ca}^{2+}, 2 \times \text{Mg}^{2+}$ 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 間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 5×10^{-5} M 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できた (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 ($10^{-5}M$) 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

CBM2a 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 CBM2b (図 13) と等価である可能性が示唆された。さらに *A. californica* 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つていないことから、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 (50 μ m 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; Fecho 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-口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きる可能性があるが、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 M 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 はマクサに比べアオサ味刺激に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に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す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す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できた (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 periphery 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 catecholamines 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 5,6-dihydroxytryptamine. *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 snail *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 californica*: 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

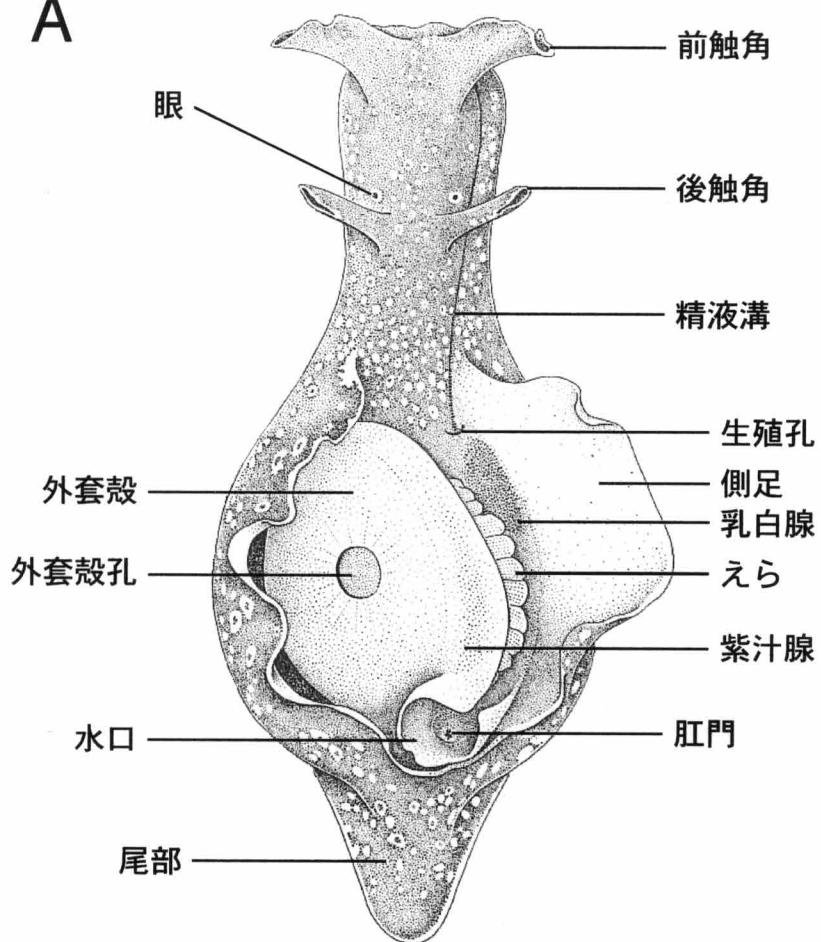
Aplysia and pulmonate molluscs. *Brain Res.* 117: 33-49, 1976.

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.

A



B

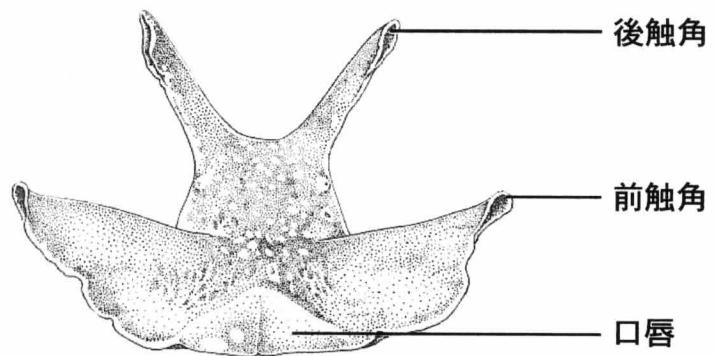
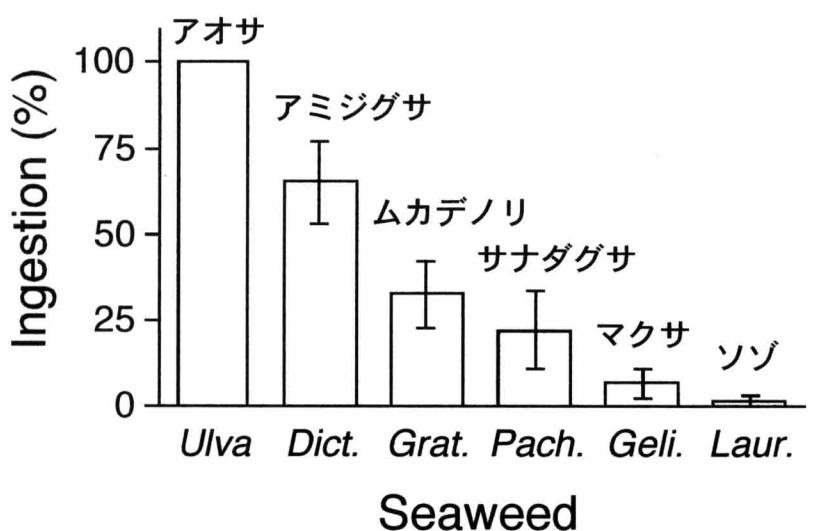


図1 アメフラシを背側 (A)、前側 (B) から見た外観図。アメフラシの化学受容器は口唇部と触角部に分布する (Kandel, 1979)。

A



B

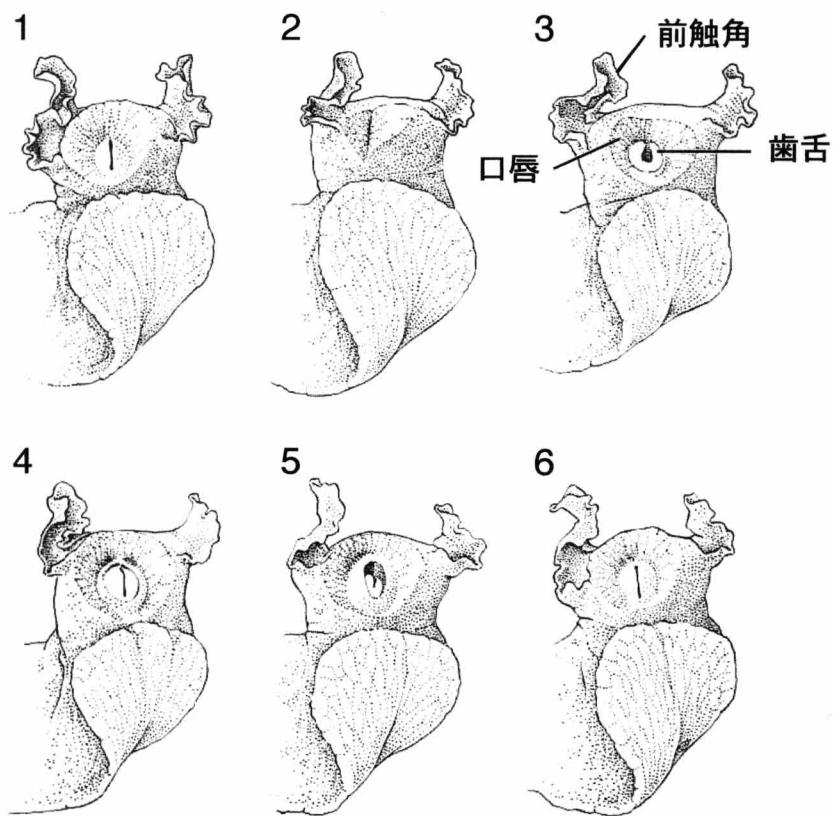


図2 アメフラシの食物嗜好性 (A) と咀嚼運動 (B)。A. 6種類の海藻により誘発される摂食応答の割合 (n=12, Nagahama and Shin, 1998)。B. 海藻が口唇部に触れたときに誘発される口の開閉運動と同調する歯舌のリズミカルな運動パターン。図の番号順に運動が発現する (Kandel, 1979)。Ulva, *Ulva pertusa*; Dict., *Dictyoteras prolifera*; Grat., *Grateloupia filicina*; Pach., *Pachydictyon coriaceum*; Geli., *Gelidium amansii*;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

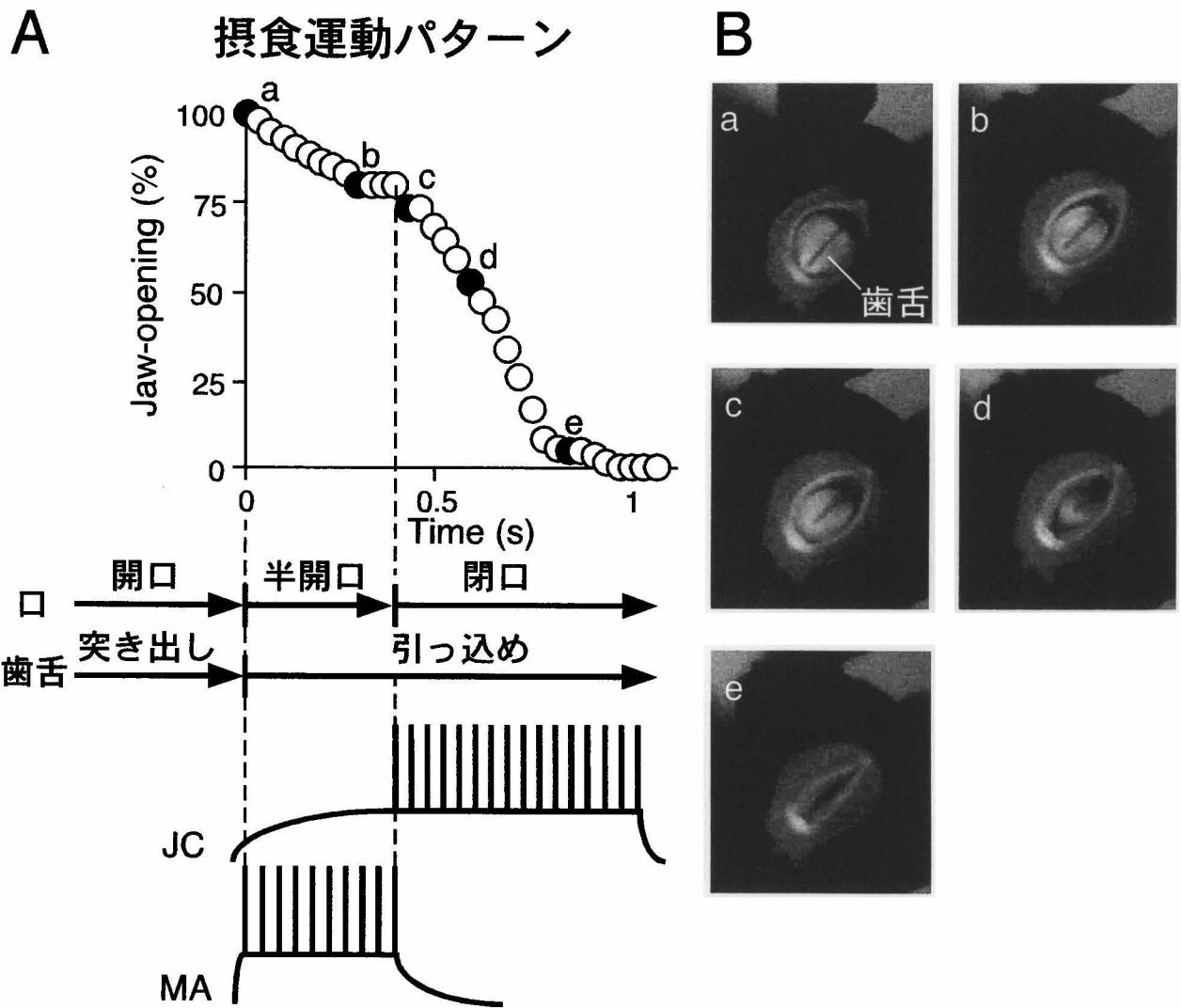
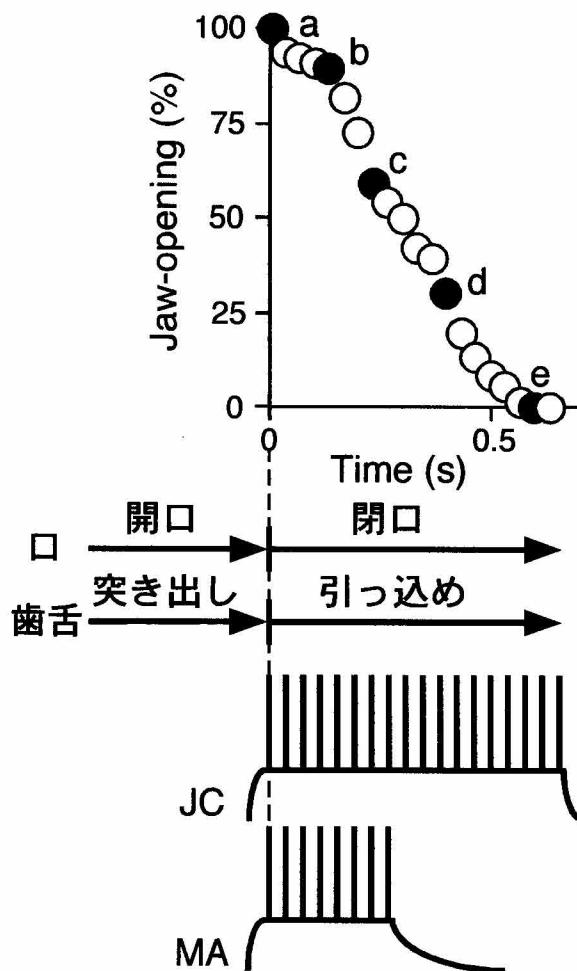


図3 アオサ抽出液により誘発される口と歯舌のリズミカルな摂食運動パターン。A. 摂食応答時の開口率の経時変化(上)と口と歯舌の位相関係(中)およびそれに対応するMA, JCニューロンの放電パターン(下)。B. 摂食応答時の口と歯舌のビデオ像。ビデオの各フレーム(A, 上)中にある黒丸a~eにそれぞれ対応する(Nagahama and Shin, 1998)。

A 吐き出し運動パターン



B

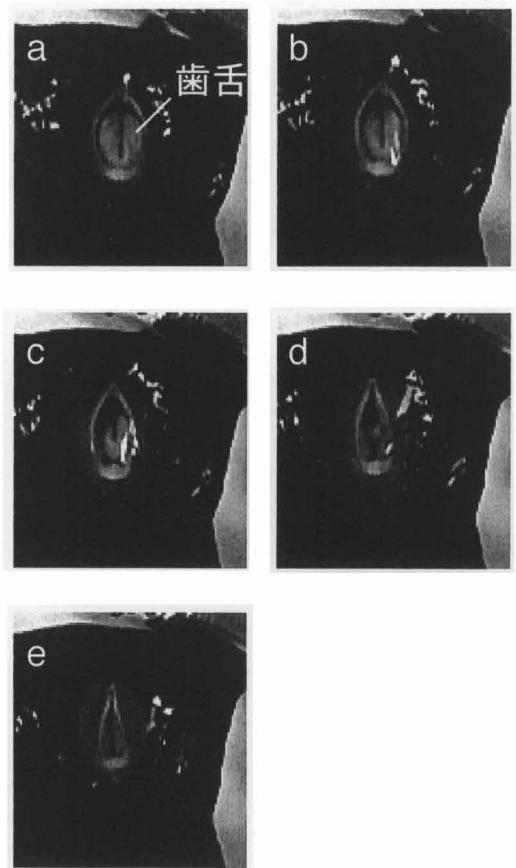
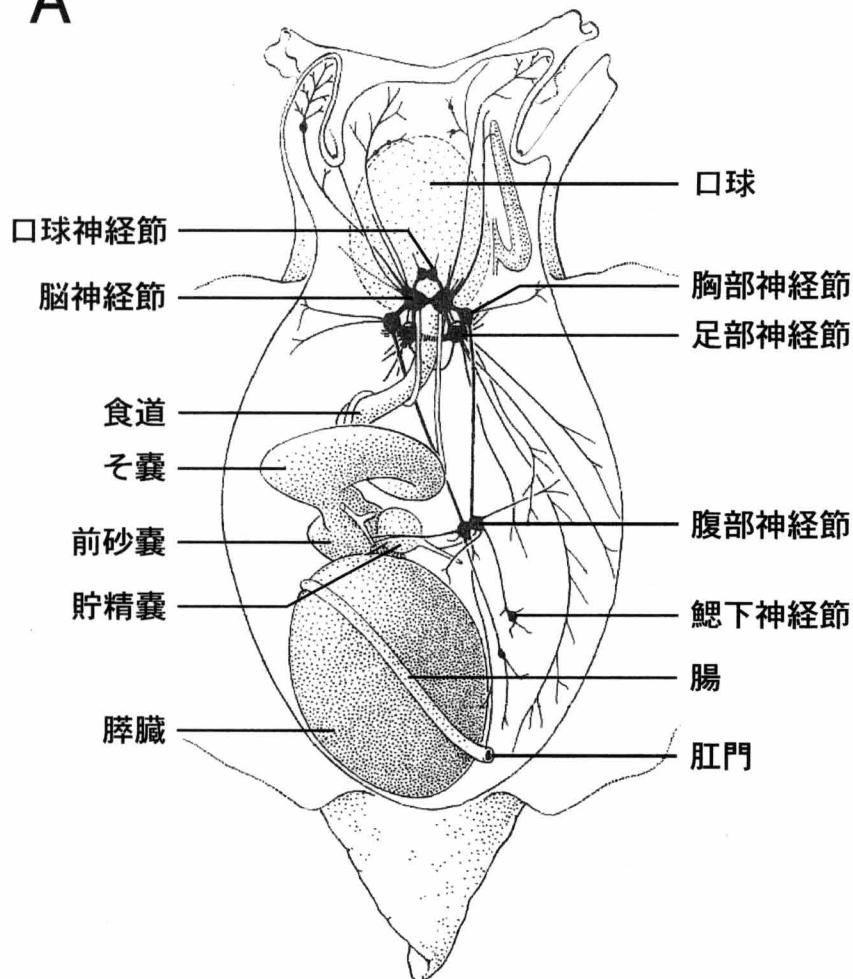
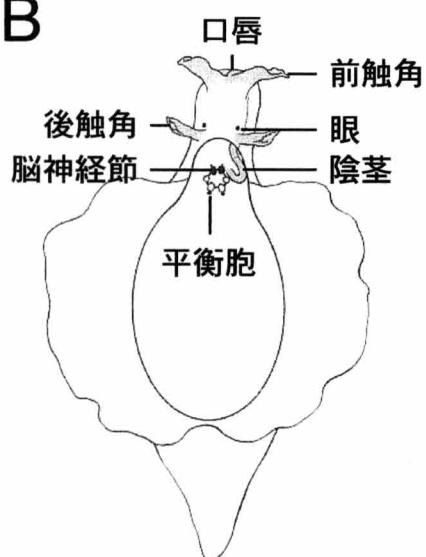


図4 マクサ抽出液により誘発される口と歯舌のリズミカルな吐き出し運動パターン。A. 吐き出し応答時の開口率の経時変化(上)と口と歯舌の位相関係(中)およびそれに対応するMA, JCニューロンの放電パターン(下)。B. 吐き出し応答時の口と歯舌のビデオ像。ビデオの各フレーム(a~e)は、開口率の経時変化のグラフ(A, 上)中にある黒丸a~eにそれぞれ対応する(Nagahama and Shin, 1998)。

A



B



C

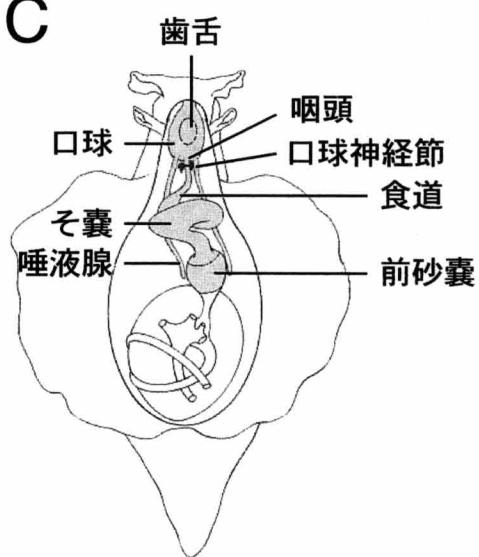


図5 A. アメフラシの神経系と各器官 (Kandel, 1976)。B, C. 脳神経節 (B) および口球神経節 (C) の支配領域 (Kandel, 1979)。

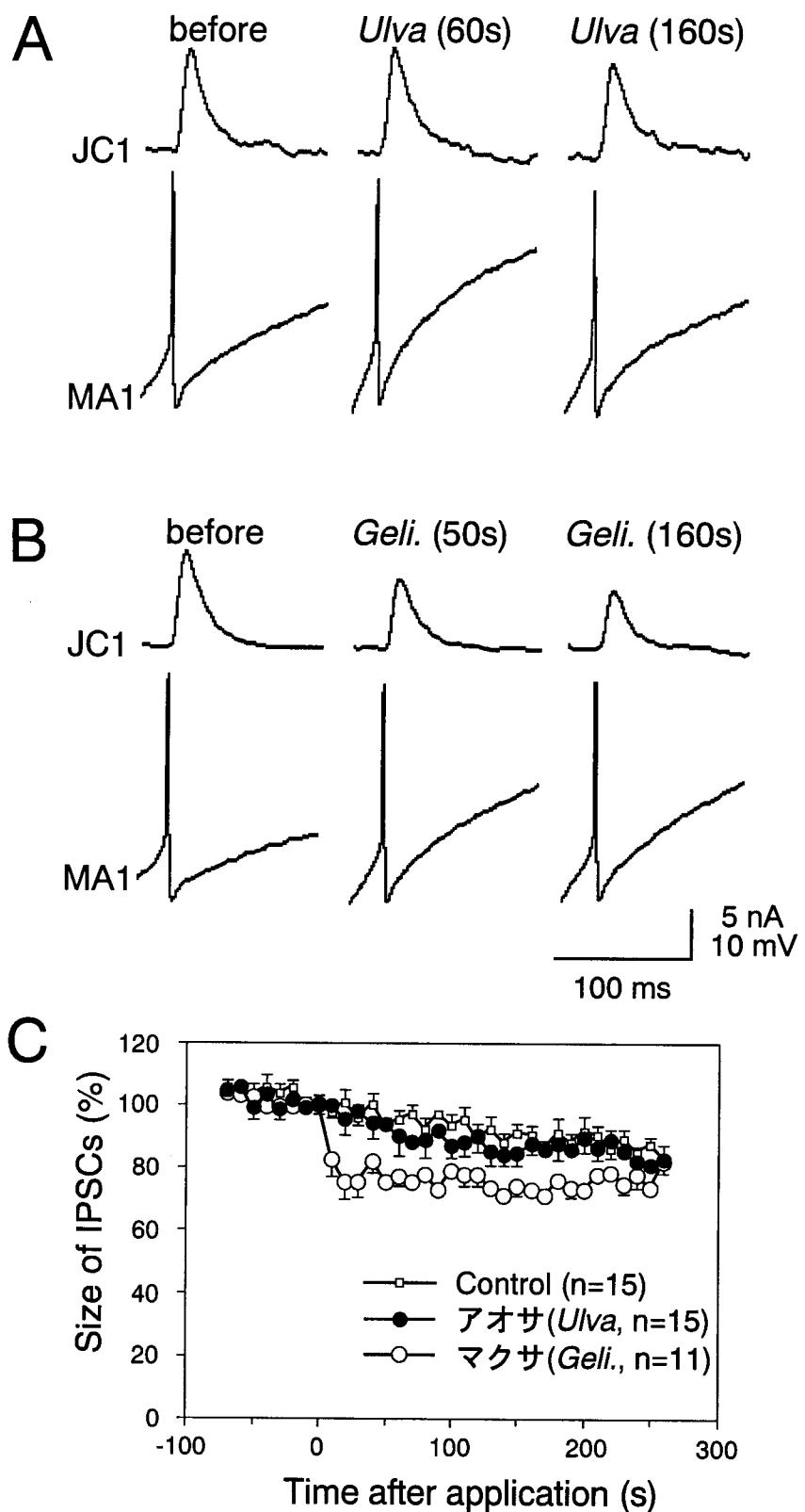


図6 MA-JC間のシナプス伝達に対する海藻味刺激の効果。A, B. MA刺激により誘発されるJCのIPSCサイズに対するアオサ (*Ulva*, A) およびマクサ (*Geli.*, B) 味刺激の効果。C. アオサおよびマクサ味刺激により誘発されるIPSCサイズの経時変化 (Nagahama et al., 1999)。

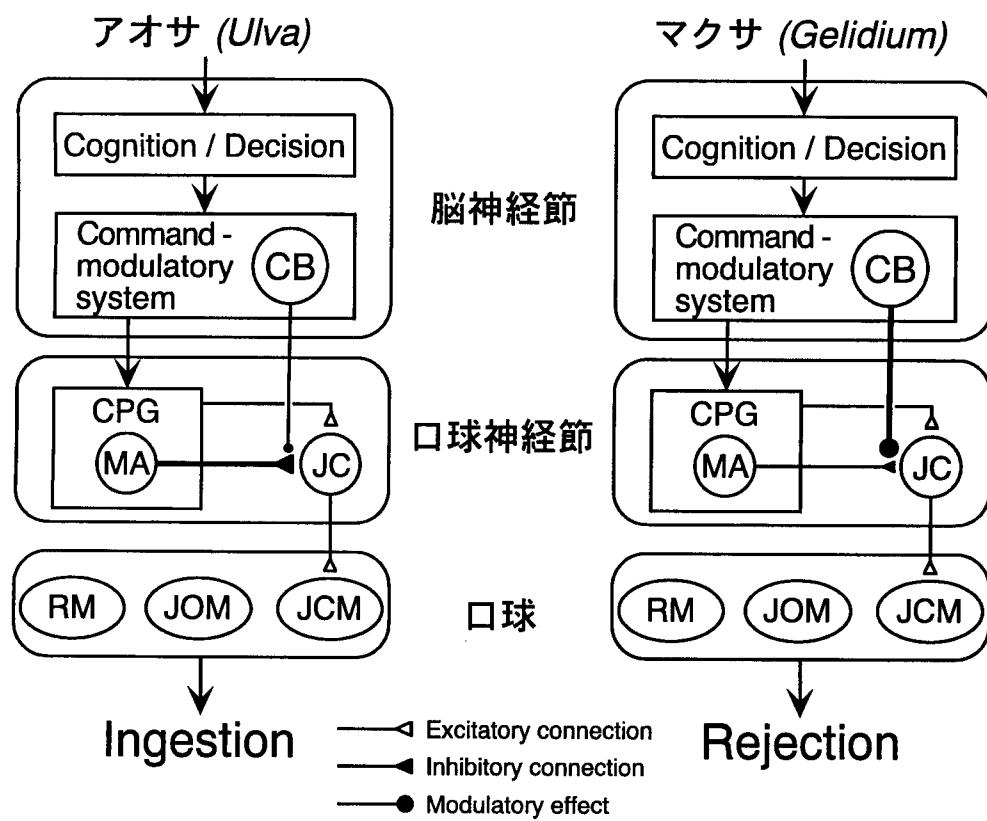


図7 これまでの研究から考えられる摂食から吐き出しへの口の運動パターンスイッチを引きおこす神経機構のモデル。アオサ抽出液により誘発される摂食応答時、JCを単シナプス性に抑制するMAの活動によりJCのスパイク活動の開始時期が遅れる。マクサ抽出液により誘発される吐き出し応答時、MA-JC間の伝達効率が脳神経節内の修飾ニューロンにより特異的に抑圧されJCの活動開始時期が早くなる。そこで本研究ではMA-JC間のシナプス伝達を修飾するニューロン (CBニューロン) を探索した。CB, Cerebral-buccal interneuron; MA, Multi-action neuron; JC, Jaw-closing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

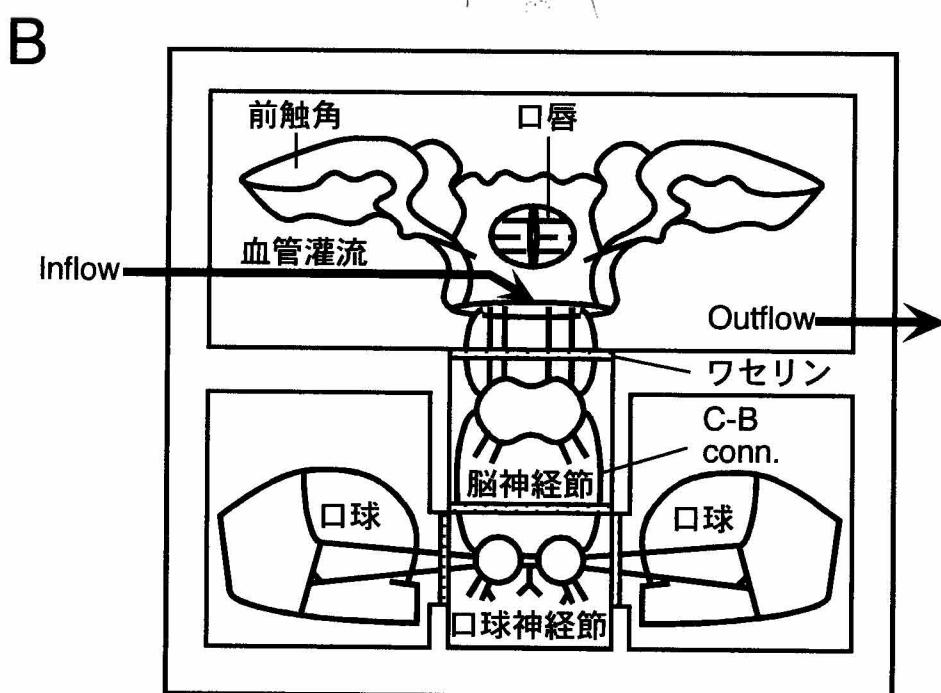
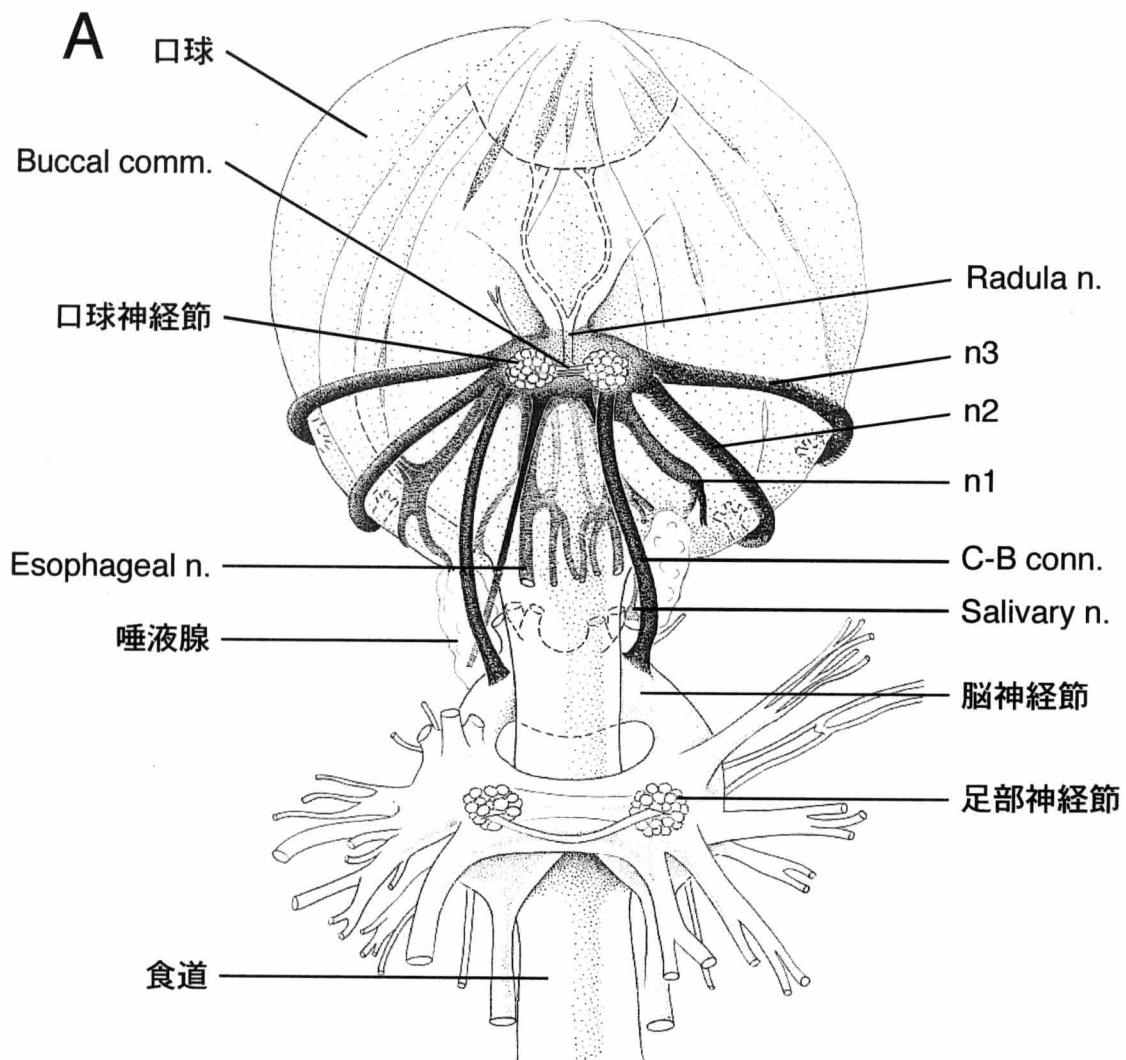


図8 A. アメフラシの口球とそれを取り巻く神経節を腹側から見た図 (Kandel, 1979)。B. 測定用プレパレーションの模式図。口唇、前触角からなる頭部組織、脳神経節、口球神経節、口球を左右対称となるように測定用チャンバーの各区画に配置してピン留めし、それらの間は溶液の行き来を防ぐためワセリンで仕切った。頭部組織へ至る血管は人工海水で灌流した (Nagahama et al., 1999)。C-B conn., Cerebral-buccal connective.

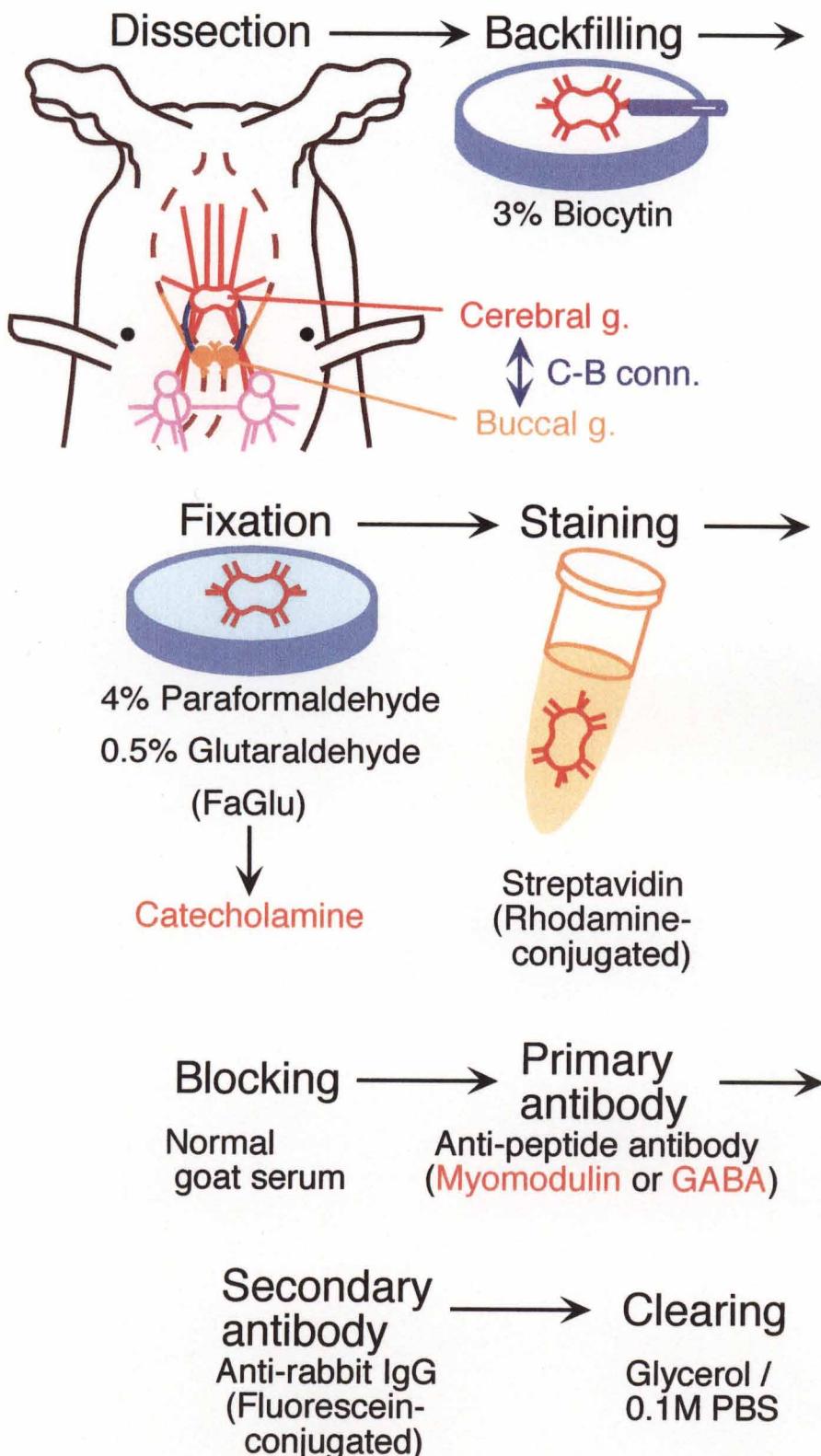
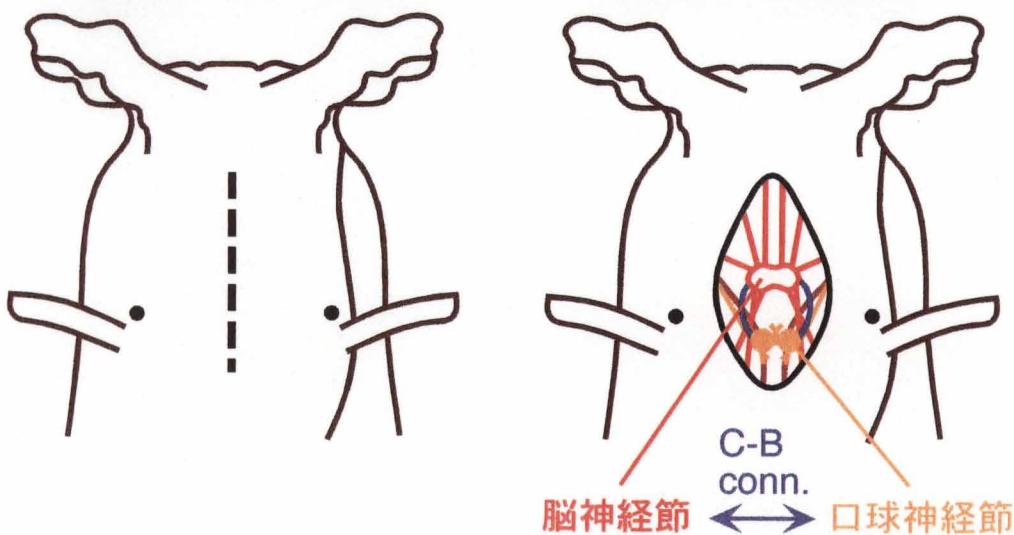
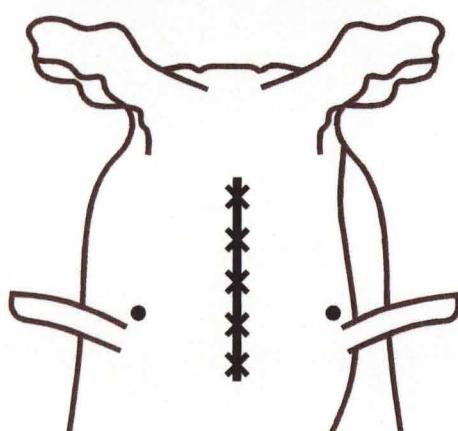


図9 逆行性染色法と組織蛍光法または抗体染色法を組み合わせた手法の概略図。Cerebral g., 脳神経節; Buccal g., 口球神経節; C-B conn., Cerebral-buccal connective.

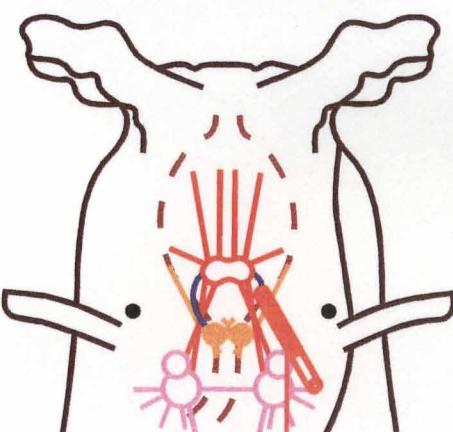
切開前（背面図） → 切開後（背面図） →



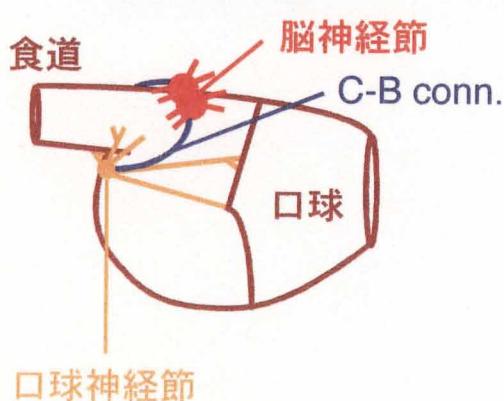
縫合後（背面図）



縫合後（内視図）



手術前（側面図） → 手術後（側面図）



Posterior ← Anterior



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.

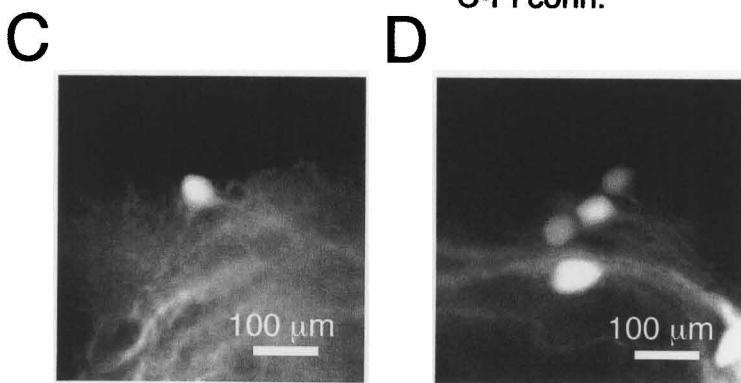
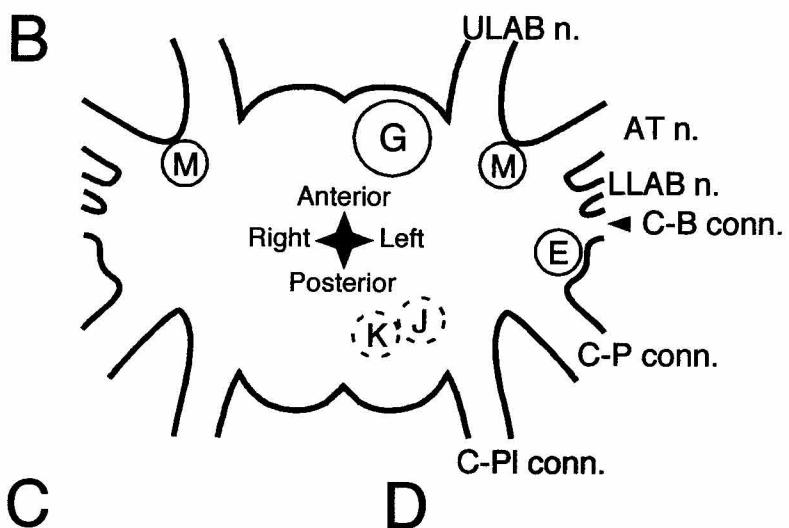
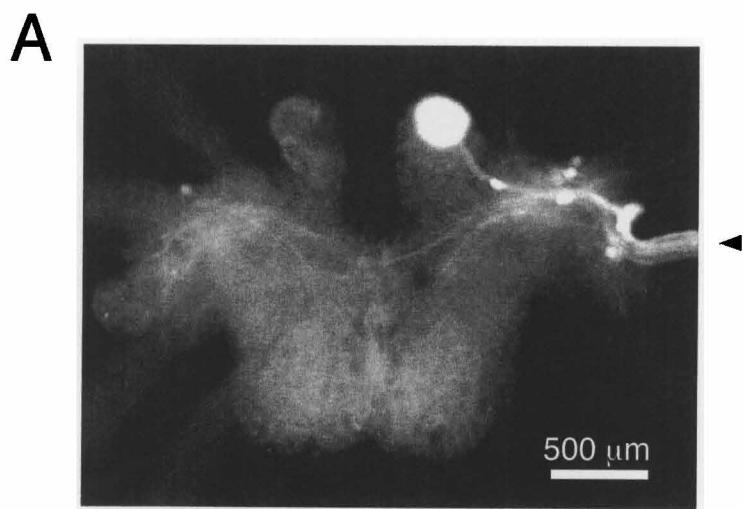


図11 A. CBニューロンの逆行性染色像 (Ventral面)。左側C-B conn. からBiocytinを逆行性に導入した(矢頭)。同側の脳神経節内に約10個、対側に1個のCBニューロン細胞体が見つかった。B. CBニューロン細胞体の分布するクラスター。CBニューロン細胞体はG, M, Eクラスターに数個ずつわかつて存在し、J, Kクラスターには見つからなかった。C, D. 対側 (C)、同側 (D) MクラスターのVentral面を拡大した像。対側Mクラスターに1個、同側Mクラスターに4個のCBニューロン細胞体が見つかった。ULAB n., Upper labial nerve; AT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

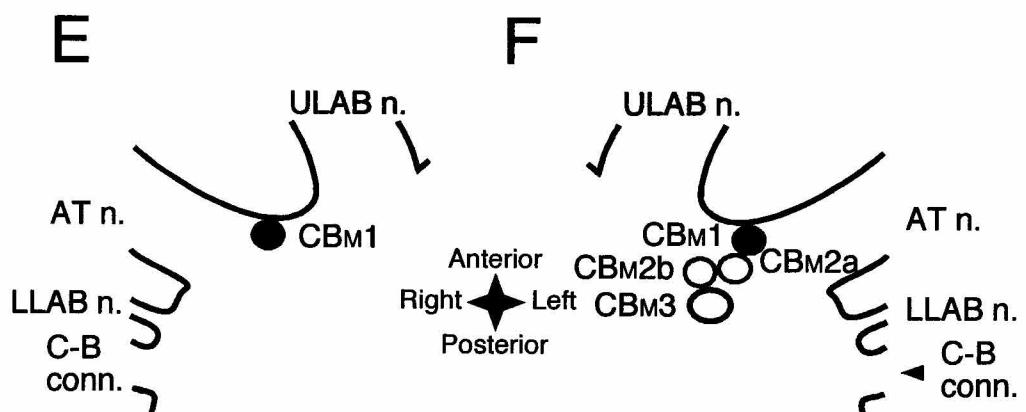
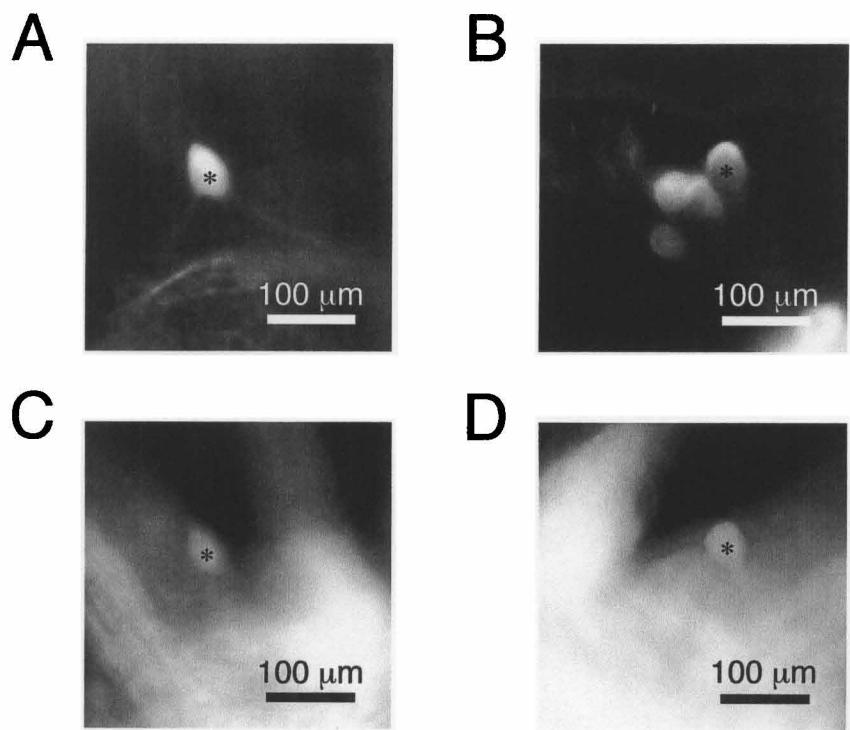


図12 C-B conn. からの逆行性染色像と組織蛍光像。A, B. 対側 (A)、同側 (B) Mクラスターに存在するCBニューロンの逆行性染色像 (Ventral面)。左側 C-B conn. からBiocytinを逆行性に導入した。C, D. 対側 (C)、同側 (D) Mクラスターに存在するCBニューロンの組織蛍光像 (Ventral面)。E, F. Mクラスターに存在する4個のCBニューロンのうち最もAnterior側の1個のCBニューロンがカテコールアミン様物質を含有した。そこでこのCBニューロンをCBM1と命名した。ULAB n., Upper labial nerve; AT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

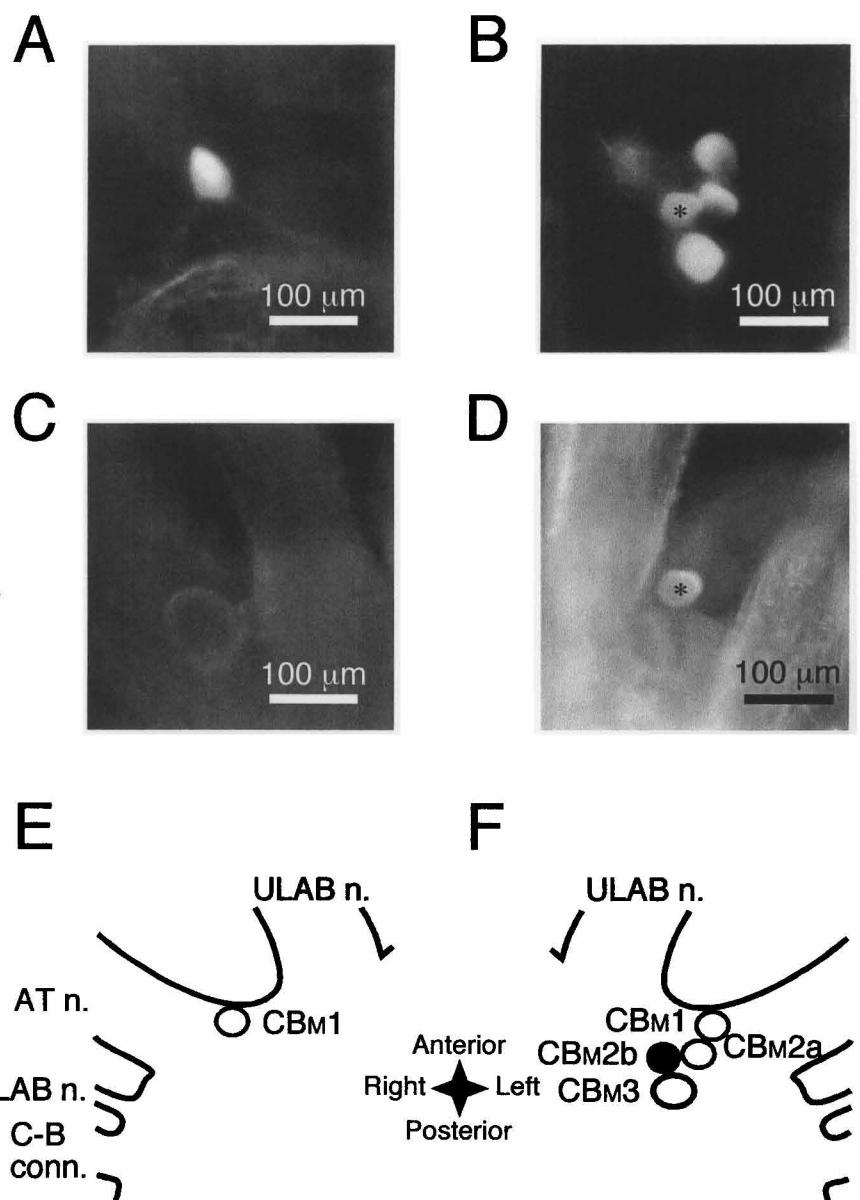


図13 C-B conn. からの逆行性染色像と神経ペプチドであるMyomodulinに対する抗体を一次抗体として用いたときの抗体染色像。A, B. 対側 (A)、同側 (B) Mクラスターに存在するCBニューロンの逆行性染色像 (Ventral面)。左側C-B conn. からBiocytinを逆行性に導入した。C, D. 対側 (C)、同側 (D) Mクラスターに存在するCBニューロンの抗体染色像 (Ventral面)。E, F. Mクラスターに存在する4個のCBニューロンのうち1個のCBニューロンがMyomodulin様物質を含有した。そこでこのCBニューロンをCBM2bと命名した。ULAB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

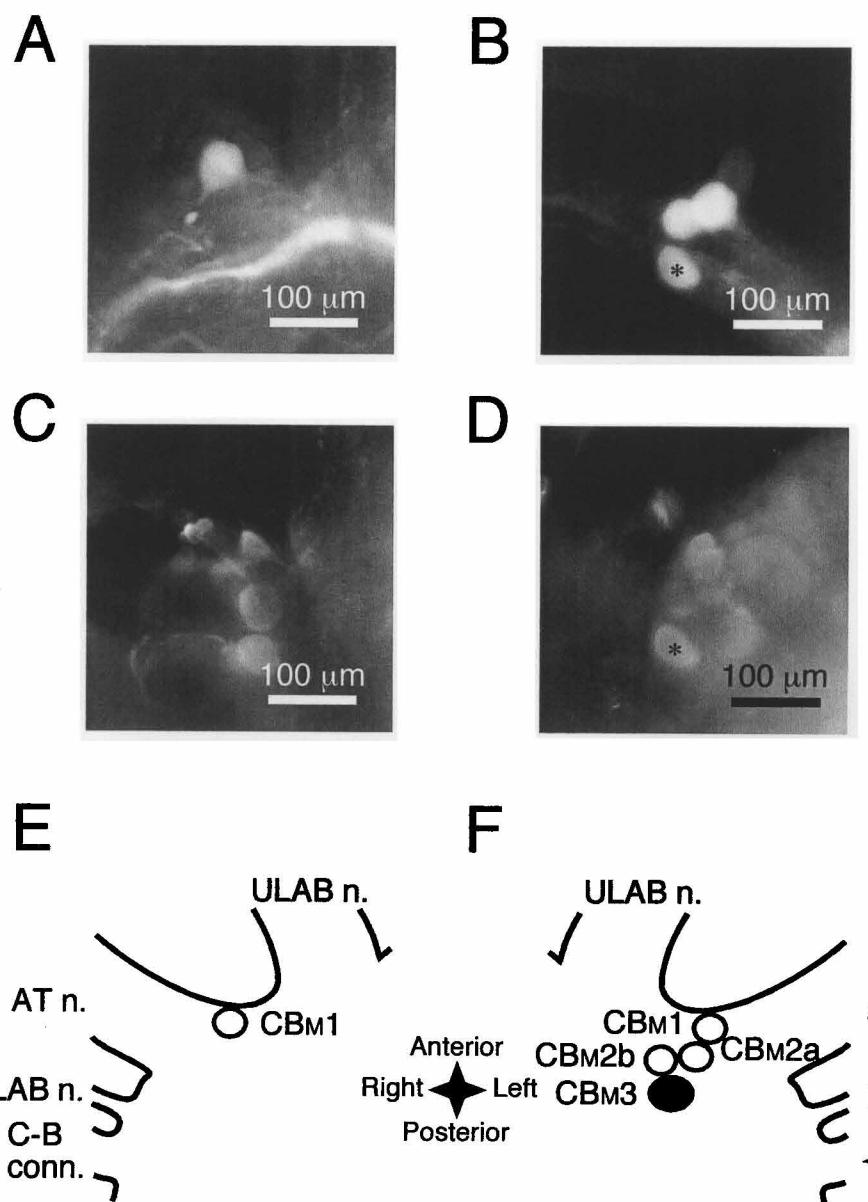


図14 C-B conn. からの逆行性染色像と神経伝達物質であるGABAに対する抗体を一次抗体として用いたときの抗体染色像。A, B. 対側 (A)、同側 (B) Mクラスターに存在するCBニューロンの逆行性染色像 (Ventral面)。左側C-B conn. からBiocytinを逆行性に導入した。C, D. 対側 (C)、同側 (D) Mクラスターに存在するCBニューロンの抗体染色像 (Ventral面)。E, F. Mクラスターに存在する4個のCBニューロンのうち最もPosterior側の1個のCBニューロンがGABA様物質を含有した。そこでこのCBニューロンをCBM3と命名した。ULAB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

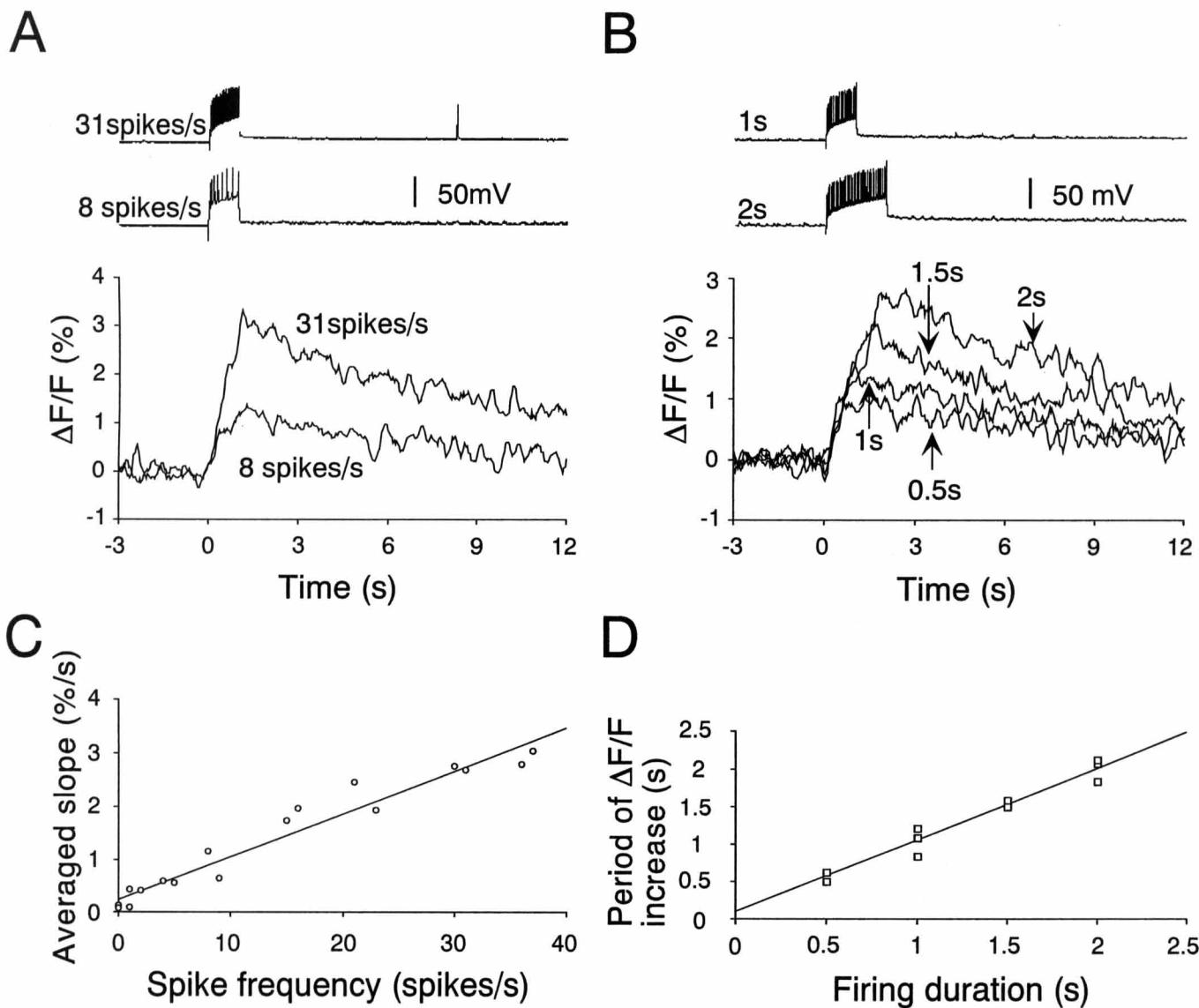
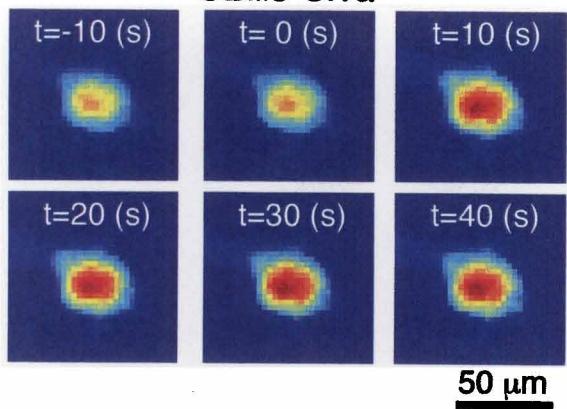
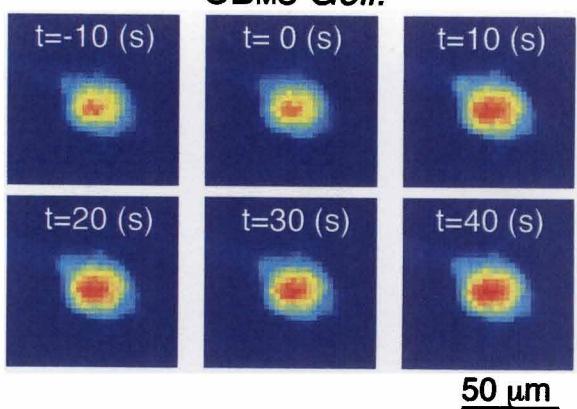


図15 ニューロンのスパイク活動とそれに伴う蛍光強度変化の関係。A, B. 脱分極性通電の通電量 (A) あるいは通電時間 (B) を変えたとき、MAニューロンに誘発されたスパイク活動とそれに伴う蛍光強度変化の同時記録。C. ニューロンのスパイク発火頻度と蛍光強度増大の初期の傾きとの関係。D. ニューロンのスパイク発火期間と蛍光強度変化の立ち上がりからピークまでの期間との関係 (Yoshida et al., 2001)。

A**CBM3 *Ulva*****B****CBM3 *Geli.***

Low High

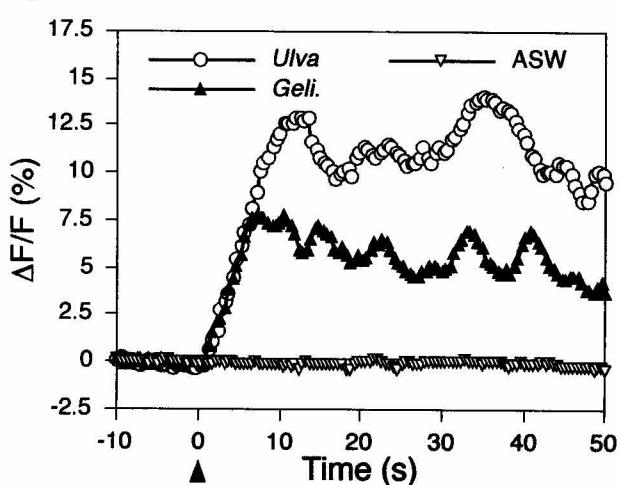
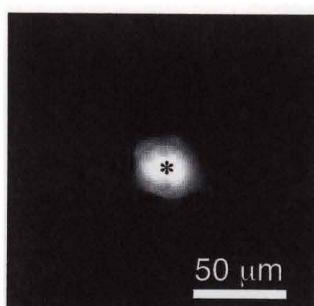
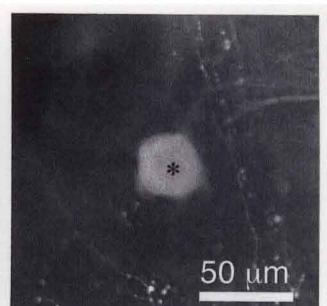
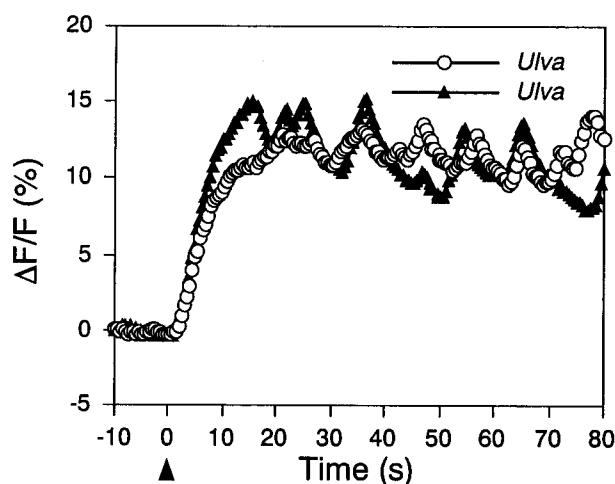
C**D****E**

図16 口唇部への海藻味刺激に対するCBM3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。

A



B

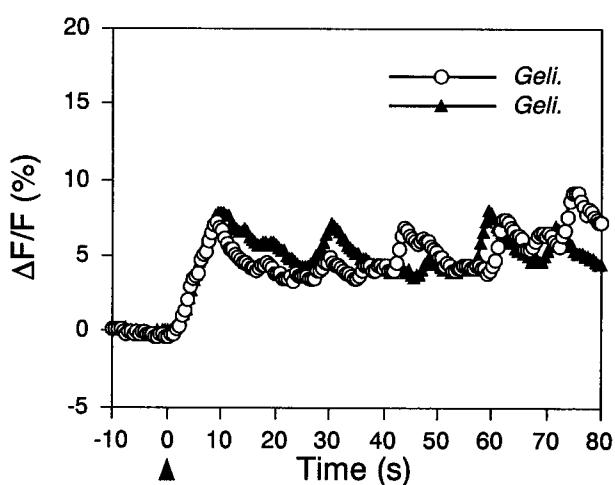


図17 アオサ (*Ulva*, A) とマクサ (*Geli.*, B) 味刺激を交互に繰り返し与えたときにCBM3細胞体に誘発された蛍光強度変化の時間経過。この結果、CBM3はマクサ味刺激に比べアオサ味刺激でより長時間持続するリズム性のスパイク活動が誘発されたと考えられる。

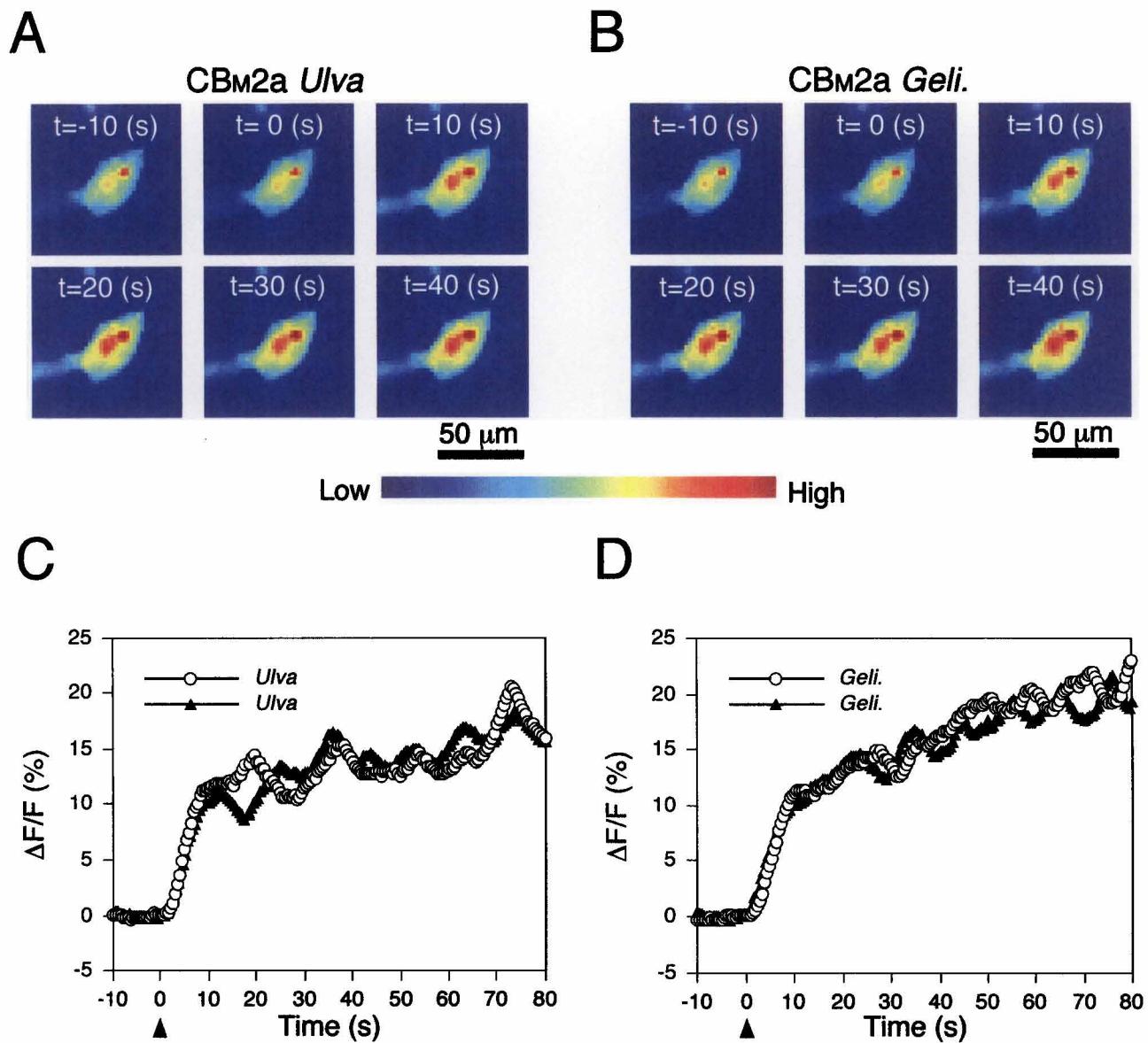
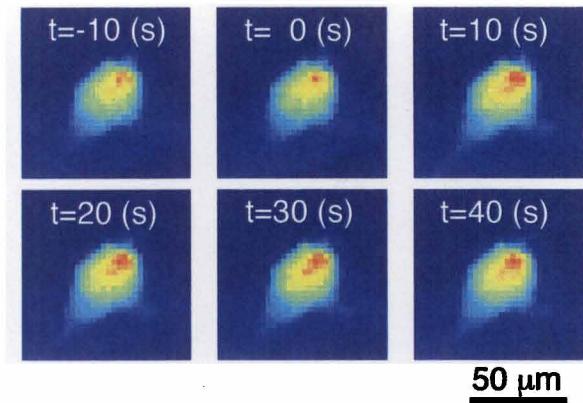
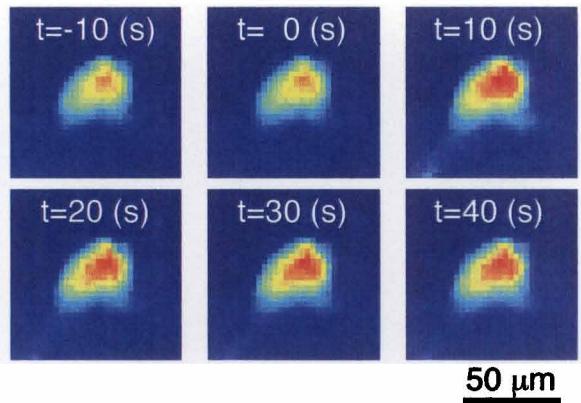


図18 口唇部への海藻味刺激に対するCBM2aの応答。A, B. 口唇部をアオサ (*Ulva*, A) またはマクサ (*Geli.*, B) 抽出液で刺激したときにCBM2a細胞体に誘発された蛍光強度変化の擬似カラー像。C, D. アオサ (*Ulva*, C) とマクサ (*Geli.*, D) 味刺激を交互に繰り返し与えたときに誘発されたCBM2a細胞体の蛍光強度変化の時間経過。この結果、CBM2aは両味刺激により長時間持続するリズム性のスパイク活動が誘発されたが、両応答に明白な差はないと考えられる。

A

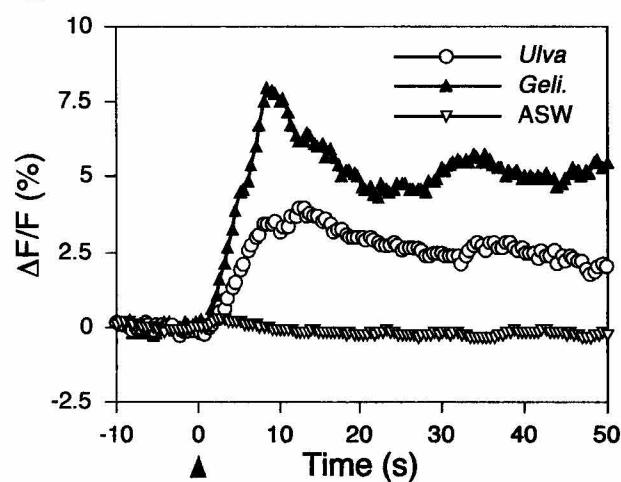
CBM1 *Ulva*

B

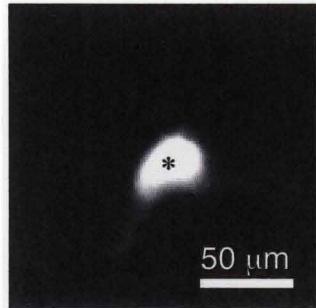
CBM1 *Geli.*

Low High

C



D



E

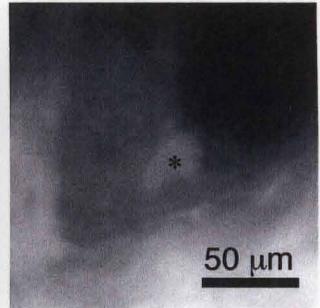
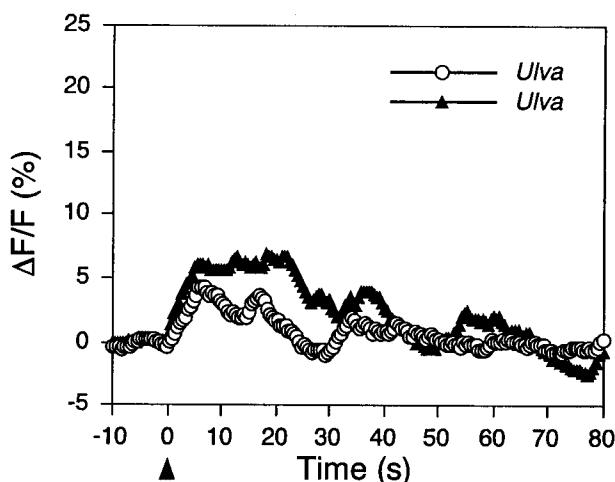


図19 口唇部への海藻味刺激に対するCBM1の応答。A, B. 口唇部をアオサ (*Ulva*, A) またはマクサ (*Geli.*, B) 抽出液で刺激したときに誘発されたCBM1細胞体の蛍光強度変化の擬似カラー像。C. 人工海水 (ASW)、アオサ (*Ulva*) またはマクサ (*Geli.*) 味刺激により誘発されたCBM1細胞体の蛍光強度変化の時間経過。D. Calcium Green-1で染色したCBM1の蛍光像。E. 組織蛍光法により観察されたCBM1の蛍光像。図Eのニューロン細胞体は図A, B, Dと同じニューロンである。

A



B

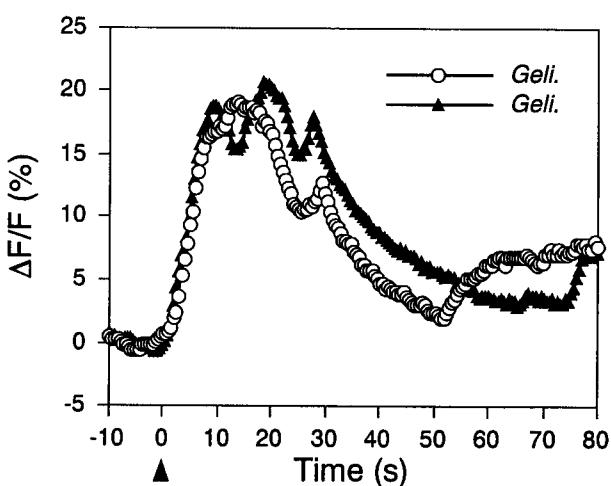


図20 A, B. アオサ (*Ulva*, A) とマクサ (*Geli.*, B) 味刺激を交互に繰り返し与えたときに誘発されたCBM1細胞体の蛍光強度変化の時間経過。この結果、CBM1はアオサ味刺激に比べマクサ味刺激でより高頻度のスパイク活動が誘発されたと考えられる。

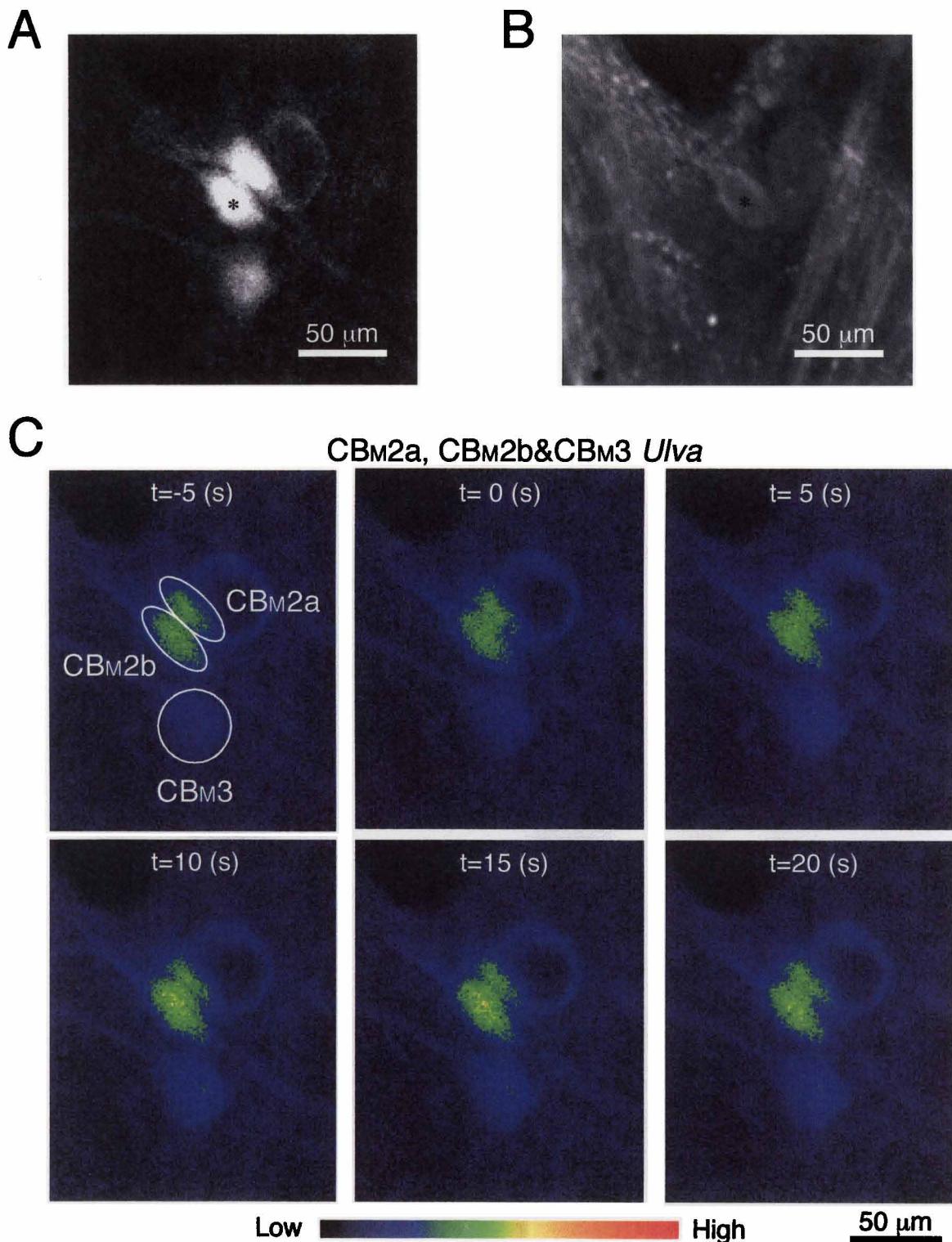


図21 A. カルシウム感受性色素を逆行性導入したときに染色された脳神経節内MクラスターのCBMニューロン (CBM) 像。B. 神経ペプチドであるMyomodulinに対する抗体を一次抗体として用いたときの抗体染色法により観察されたCBMニューロンの蛍光像。逆行性導入により染色された3個のCBMニューロン (A) のうち1個がMyomodulin様物質を含有した (*). C. 口唇部をアオサ抽出液 (*Ulva*) で刺激したときに誘発されたCBMニューロン (CBM2a, CBM2b, CBM3) 細胞体の蛍光強度変化の擬似カラー像。CBM2a, CBM2b, CBM3とともにアオサ味刺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

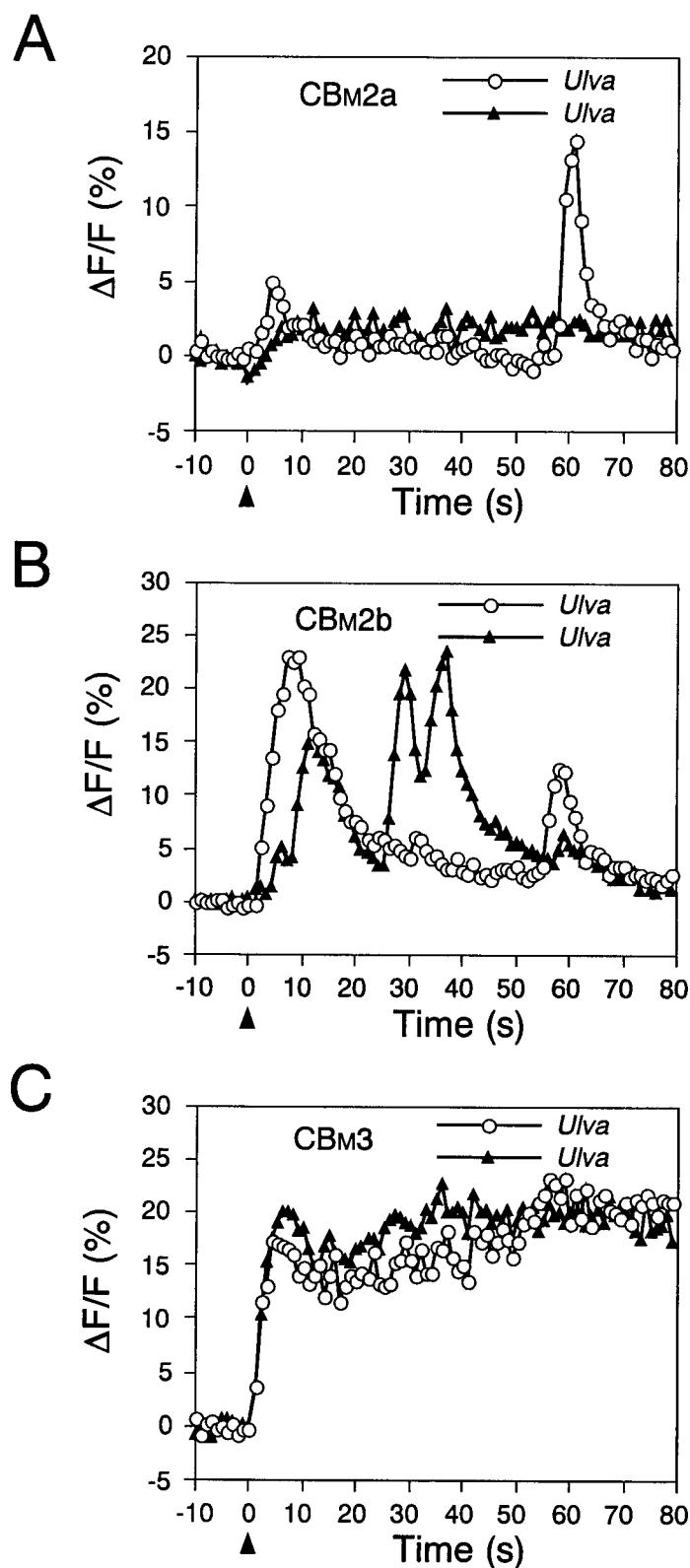


図22 繰り返しアオサ味刺激 (*Ulva*) により誘発されたCBMニューロン細胞体の蛍光強度変化の時間経過。これらの結果、アオサ味刺激によりCBM2a, CBM2bに一過性のスパイク活動が誘発され (A, B)、CBM3に持続性のスパイク活動が誘発された (C) と考えられる。

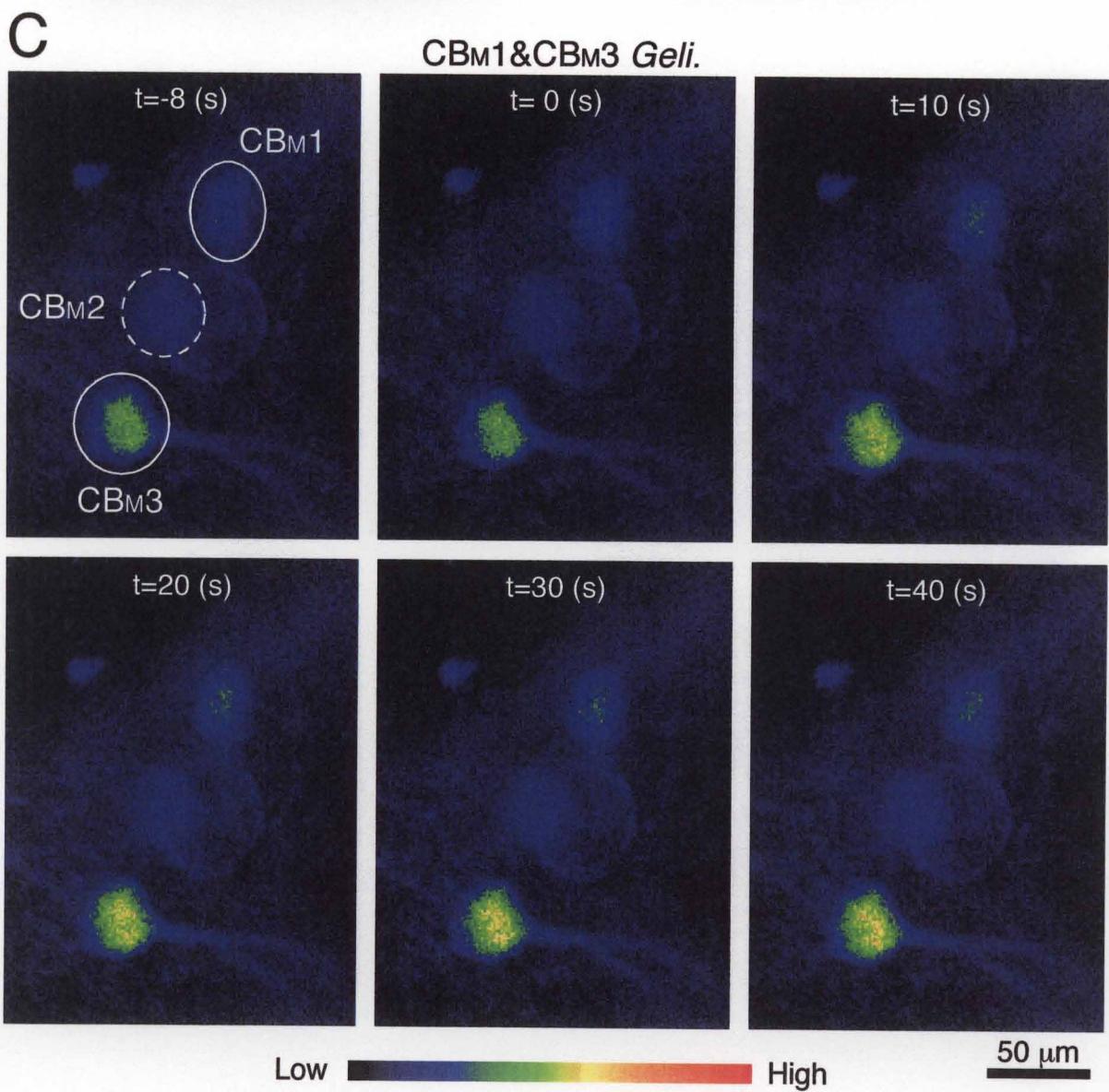
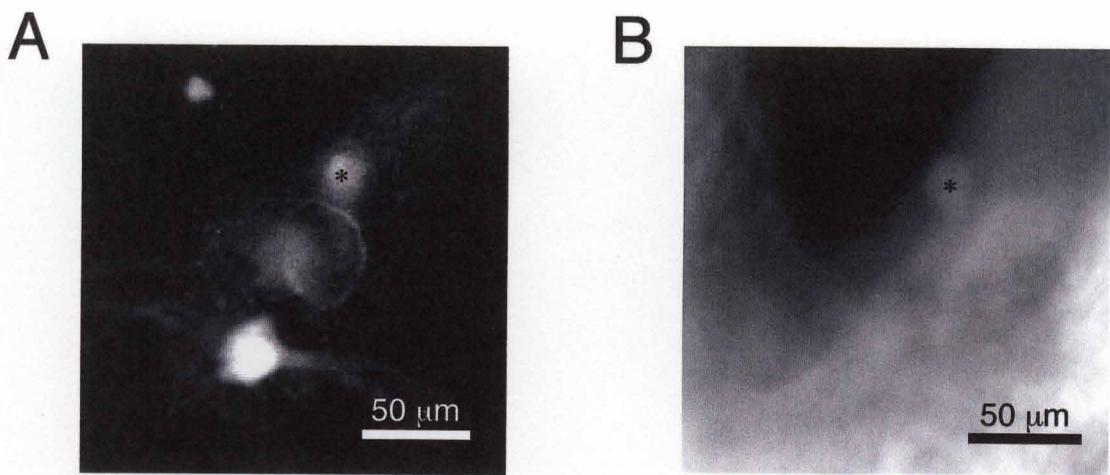
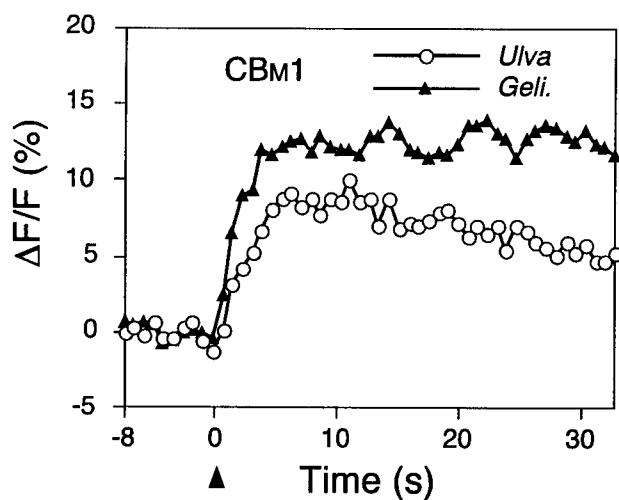


図23 A. カルシウム感受性色素を逆行性導入したときに染色された脳神経節内MクラスターのCBニューロン(CBM)像。B. 組織蛍光法により観察されたCBMニューロンの蛍光像。逆行性導入により染色された3個のCBMニューロン(A)のうち1個がカテコールアミン様物質を含有した(*). C. 口唇部をマクサ抽出液(Geli.)で刺激したときに誘発されたCBMニューロン(CBM1, CBM2a or 2b, CBM3)細胞体の蛍光強度変化の擬似カラー像。CBM1, CBM3はマクサ味刺激で蛍光強度が増大したが、CBM2はほとんど変化しなかった。

A



B

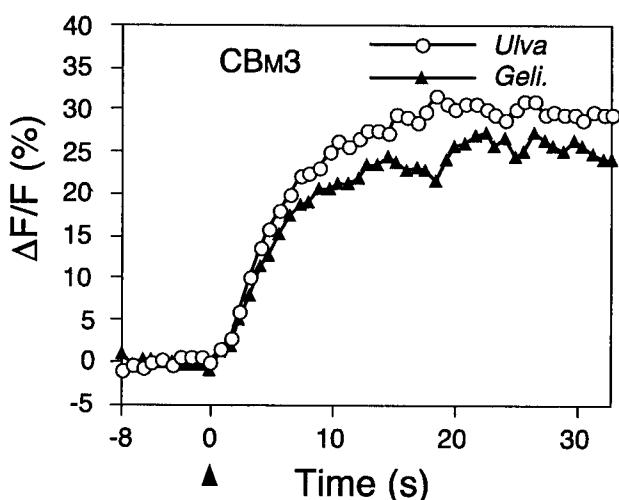
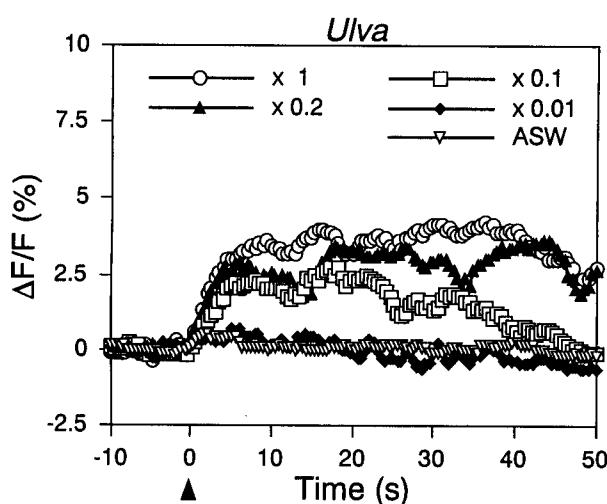
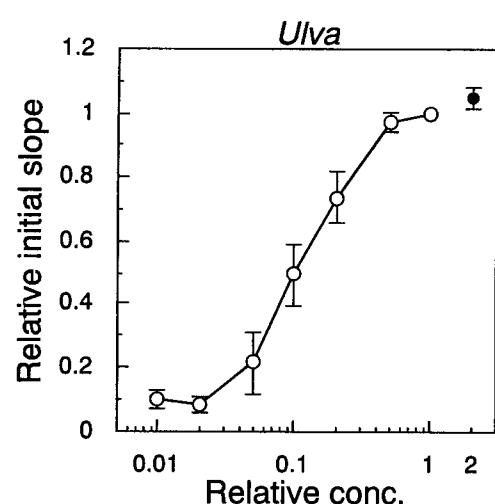


図24 アオサ (*Ulva*) またはマクサ (*Geli.*) 味刺激により誘発されたCBMニューロン細胞体の蛍光強度変化の時間経過。これらの結果、アオサやマクサ味刺激によりCBM1, CBM3とともにスパイク活動が誘発されたが、CBM1はアオサ味刺激に比べマクサ味刺激により大きな活動が誘発された(A)、CBM3はマクサ味刺激に比べアオサ味刺激でわずかだが大きな活動が誘発された(B)と考えられる。

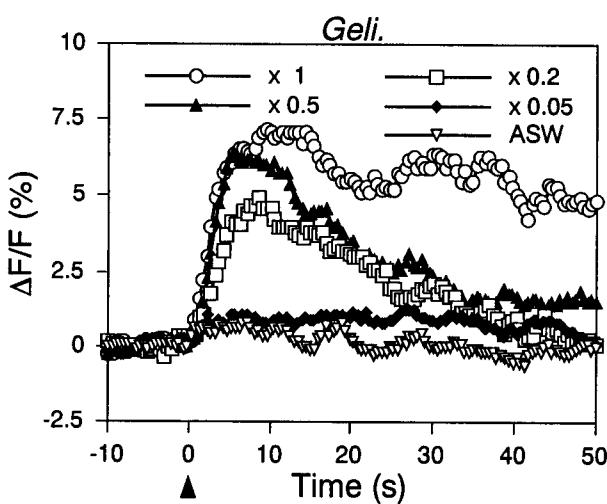
A



B



C



D

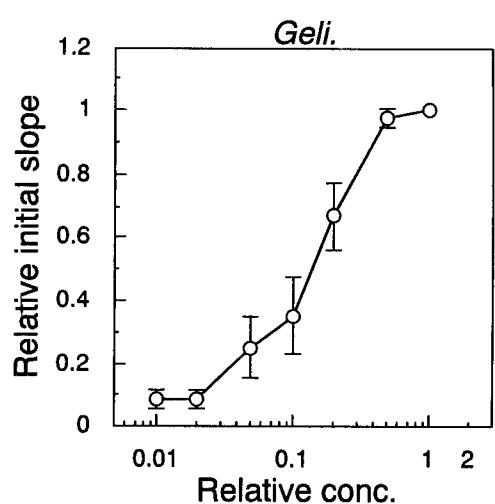


図25 A, C. 口唇部を異なる濃度のアオサ (*Ulva*, A) またはマクサ (*Geli.*, C) 抽出液で刺激したときに誘発されたCBM1細胞体の蛍光強度変化の時間経過。B, D. アオサ (*Ulva*, B) またはマクサ (*Geli.*, D) 抽出液の濃度変化とそれに伴うCBM1細胞体の蛍光強度変化の相対的な初期傾き (5秒間) との関係。

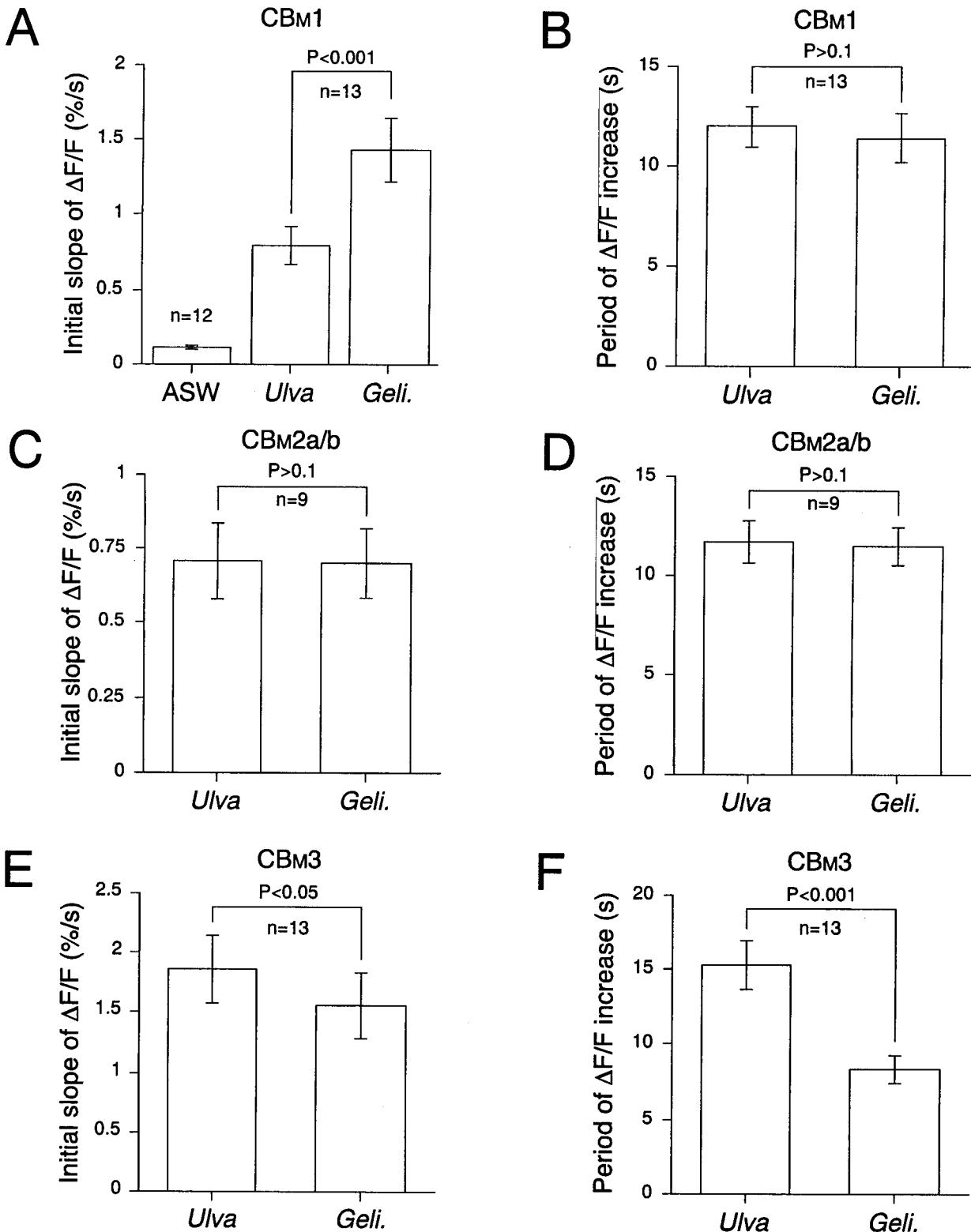


図26 CBMニューロンの味覚応答のまとめ。A, B. 人工海水 (ASW)、アオサ (*Ulva*) またはマクサ (*Geli.*) 味刺激に対するCBM1の応答。C, D. アオサ (*Ulva*) またはマクサ (*Geli.*) 味刺激に対するCBM2a/bの応答。E, F. アオサ (*Ulva*) またはマクサ (*Geli.*) 味刺激に対するCBM3の応答。蛍光強度増大の初期の傾き (5秒間, A, C, E) と蛍光強度変化の開始からピークまでの期間 (B, D, F) を複数の個体で平均したものを示す。これらの結果、CBM1はアオサとマクサ両味刺激により約10秒間のスパイ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。

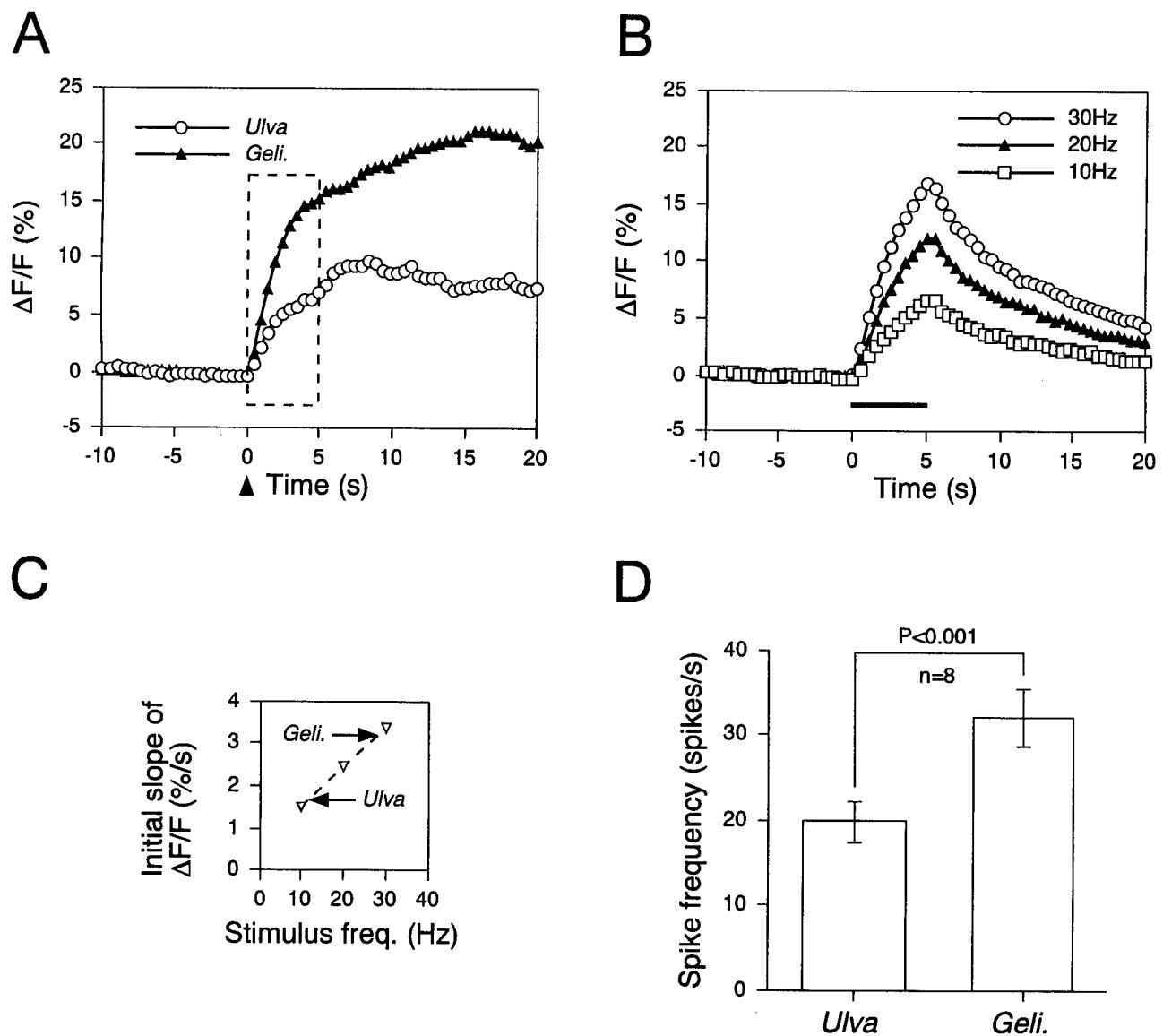


図27 A. 海藻味刺激により誘発されたCBM1細胞体の蛍光強度変化の時間経過。B. 脳-口球連合を様々な頻度の電気パルスで一定時間(5秒間, bar)刺激したときに誘発されたCBM1細胞体の蛍光強度変化の時間経過。C. スパイク発火頻度とそれに伴う蛍光強度増大の初期傾き(5秒間)との関係。発火頻度が大きくなるにつれて蛍光強度増大の初期傾きはほぼ直線的に大きくなつた(∇)。図Aのアオサ(*Ulva*)またはマクサ(*Gelli.*)味刺激により誘発されたCBM1細胞体の蛍光強度増大の初期傾き(5秒間, rectangle)を矢印で示す。D. カルシウムイメージング法の結果から見積もった海藻味刺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

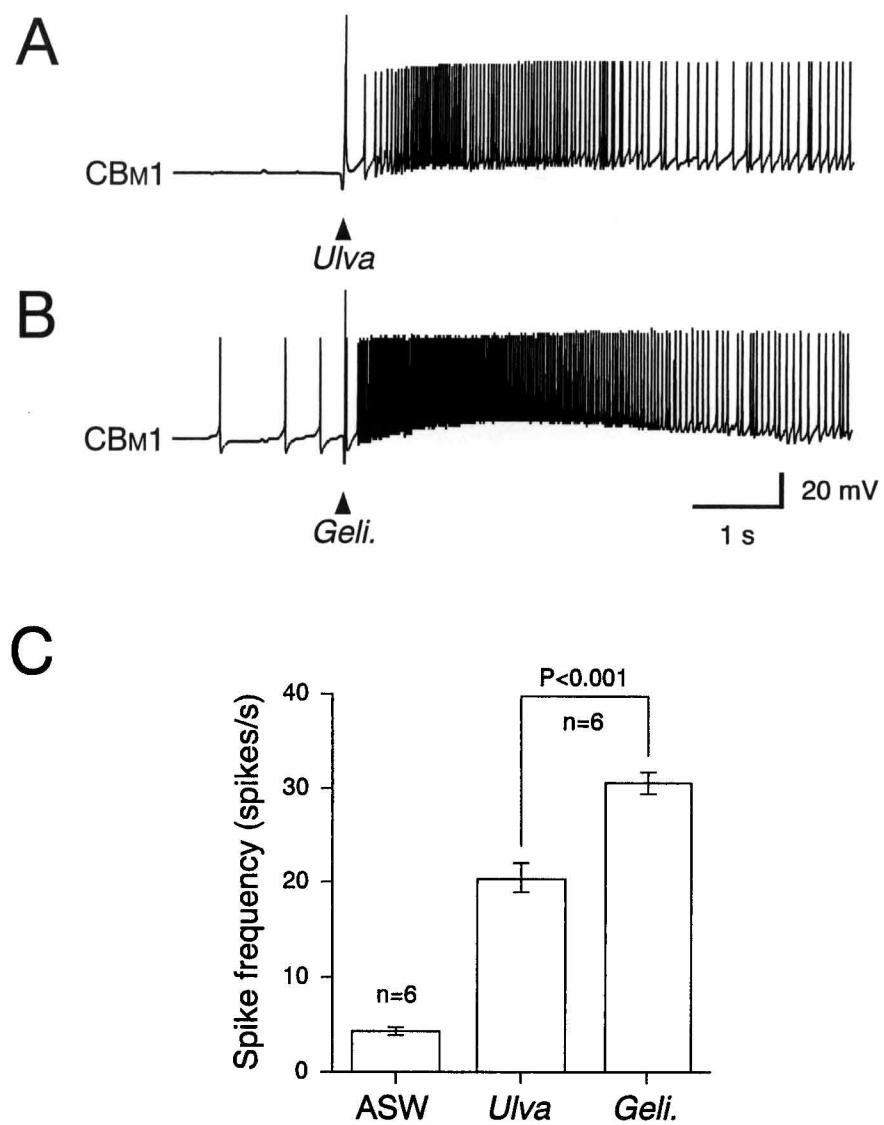


図28 A, B. アオサ (*Ulva*, A) またはマクサ (*Gelli*, B) 味刺激により誘発されたCBM1のスパイク活動の細胞内記録。C. 電気生理学的手法で測定した人工海水 (ASW) および海藻味刺激に対するCBM1のスパイク応答のまとめ。刺激後 5 秒間の発火頻度を複数の個体で平均したものを示す。マクサ味刺激によりCBM1に高頻度のスパイク活動が誘発された。

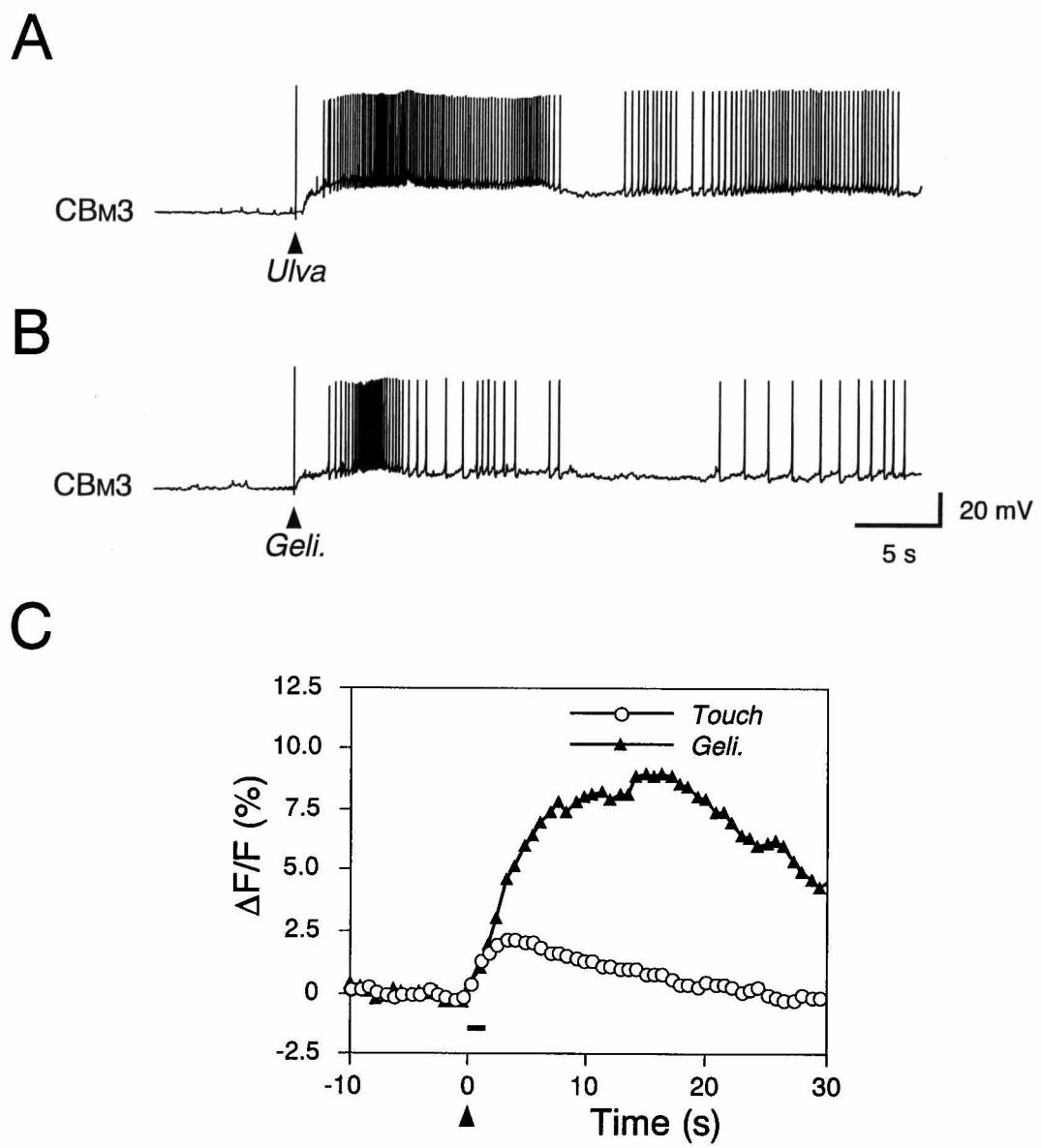


図29 A, B. アオサ (*Ulva*, A) またはマクサ (*Geli.*, B) 味刺激により誘発されたCBM3のスパイク活動の細胞内記録。C. 触刺激 (Touch) とマクサ味刺激 (Geli.) により誘発されたCBM1細胞体の蛍光強度変化の時間経過。この結果、触刺激とマクサ味刺激ともに刺激直後、CBM1に高頻度のスパイク活動が誘発されたと考えられる。

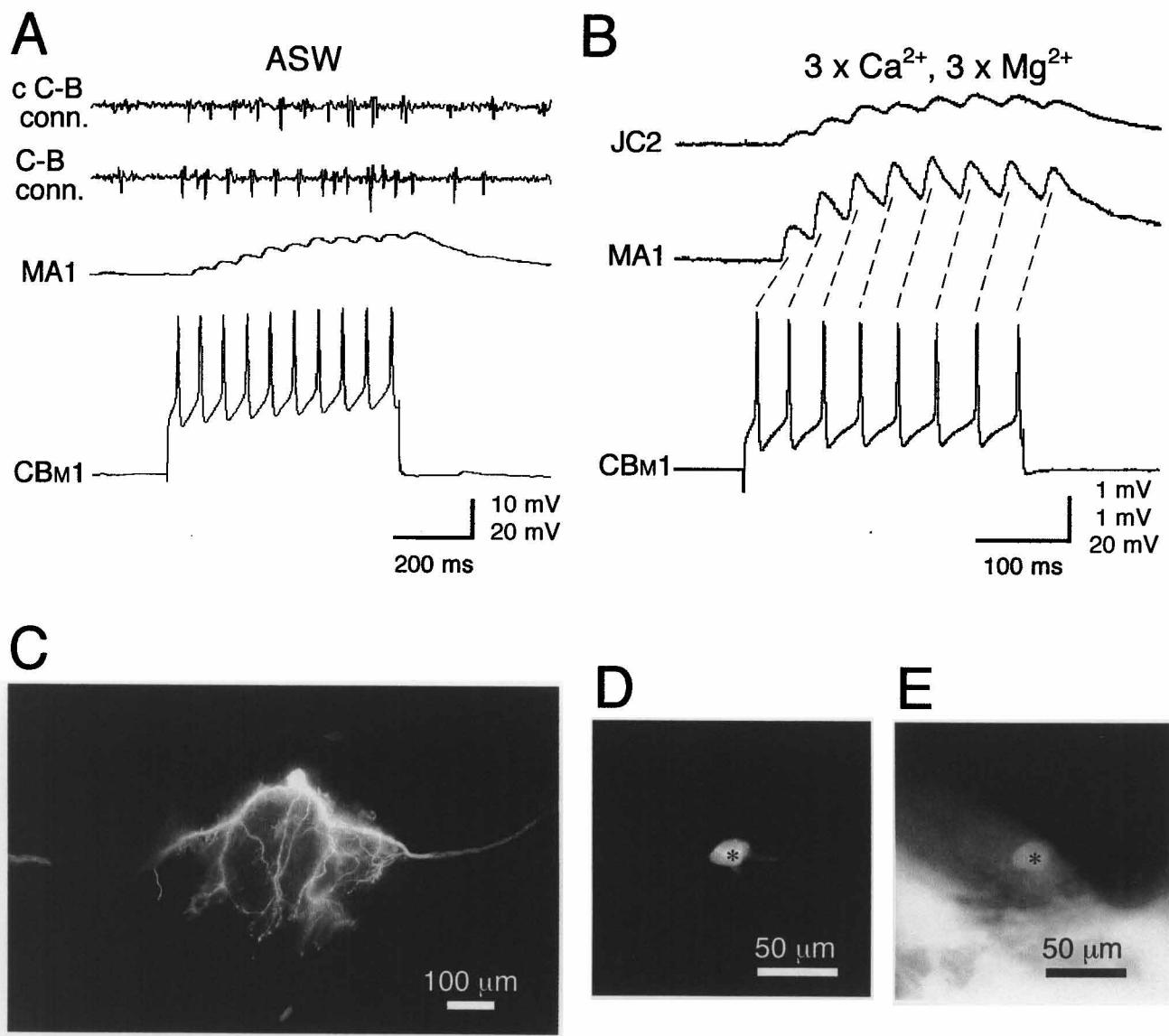


図30 CBM1の同定方法と形態的特徴。A. CBM1を細胞内通電すると両側脳-口球連合 (C-B conn.) にCBM1のスパイク活動と1対1に対応する神経応答が誘発された。またCBM1のスパイク活動により同側MA1に興奮性シナプス後電位 (EPSPs) が誘発された。B. 多シナプス経路を遮断する $3 \times \text{Ca}^{2+}, 3 \times \text{Mg}^{2+}$ 溶液下においても、CBM1の脱分極性通電によりMA1, JC2に単シナプス性のEPSPsが誘発された。C. Carboxyfluoresceinで染色したCBM1の蛍光像。D. Lissamine 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.

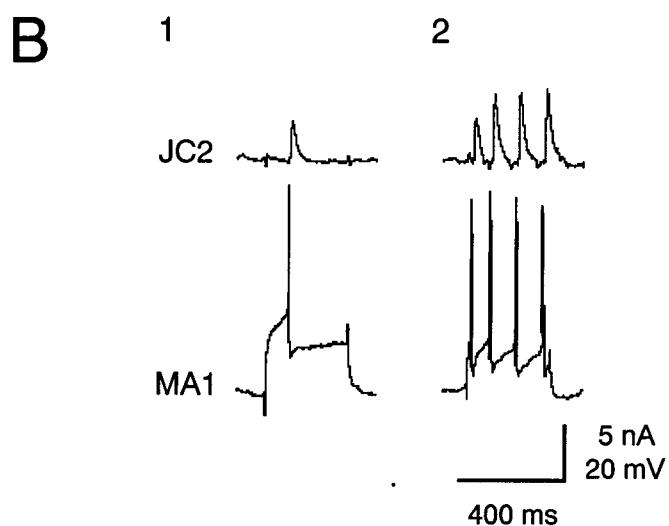
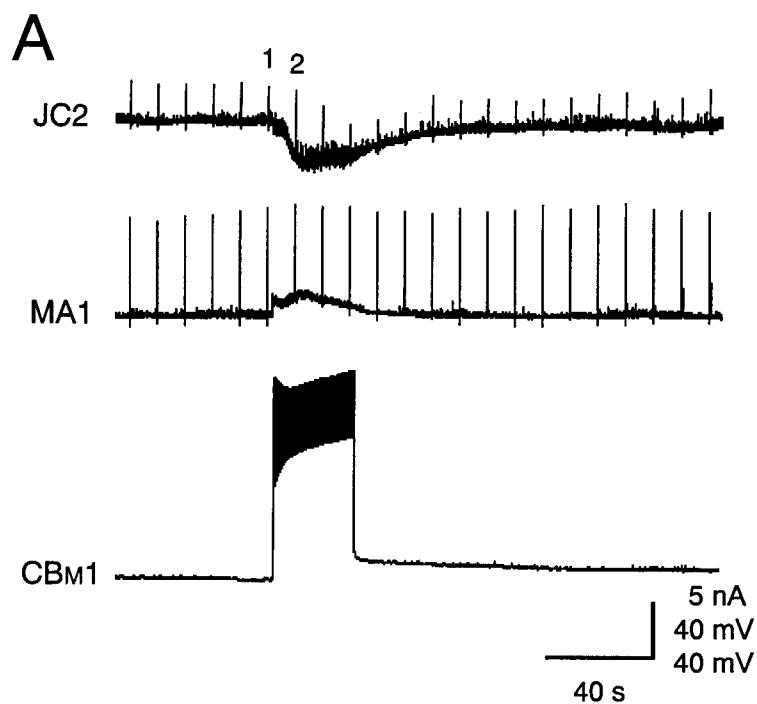


図31 MA-JC間のシナプス伝達に対するCBM1の修飾効果。A. MA1を10秒間隔で繰り返し刺激しJC2に抑制性シナプス電流(IPSCs)を誘発し、その途中でCBM1を30秒間発火させたときの効果。B. 図A中の1, 2における時間軸を拡大したものをそれぞれB1, B2に示す。

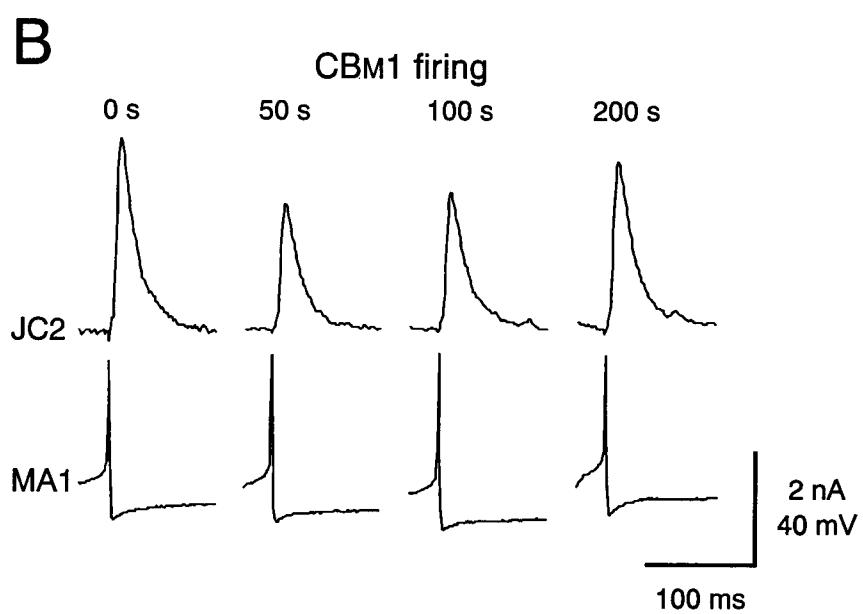
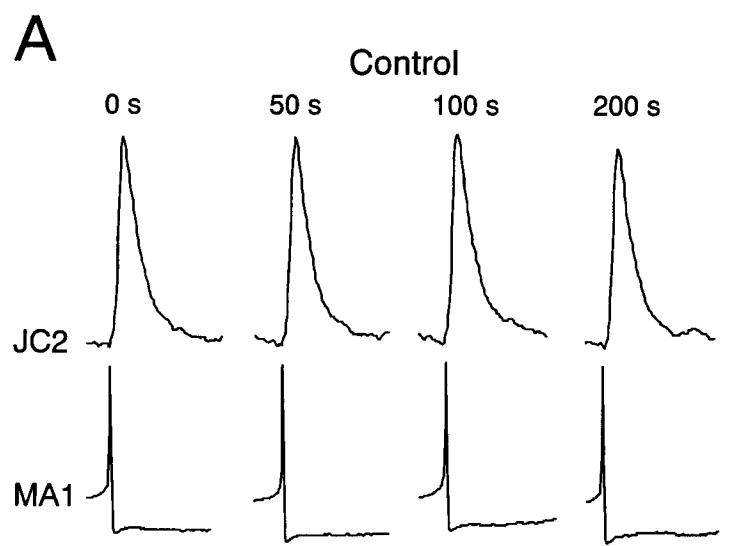
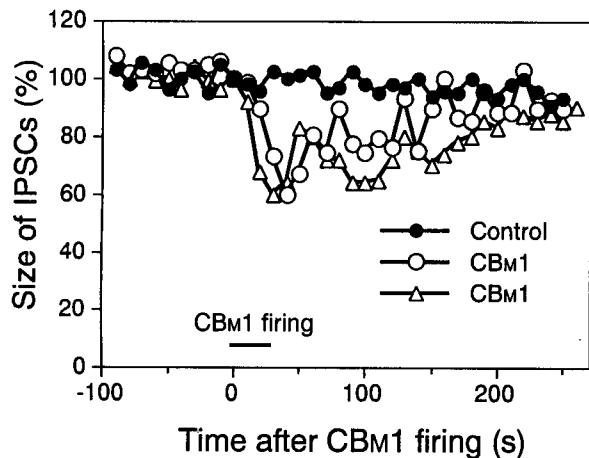
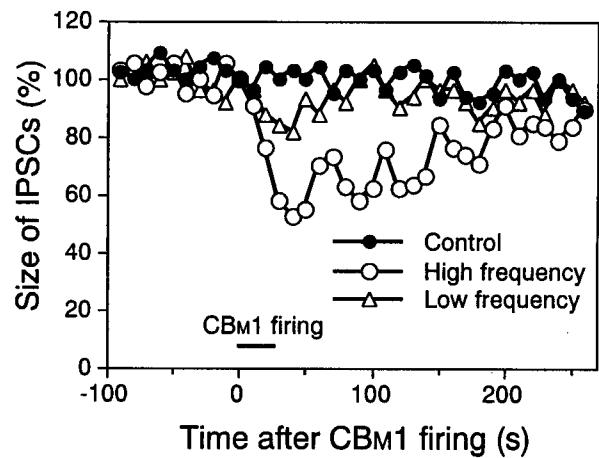


図32 A, B. CBM1を刺激しないとき (A) と高頻度で発火させたとき (B) の個々のIPSCサイズに対するCBM1の効果。
図31と同じプレパレーションで得られた結果である。

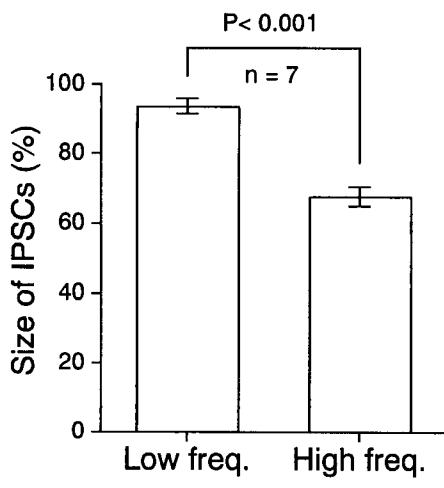
A



B



C



D

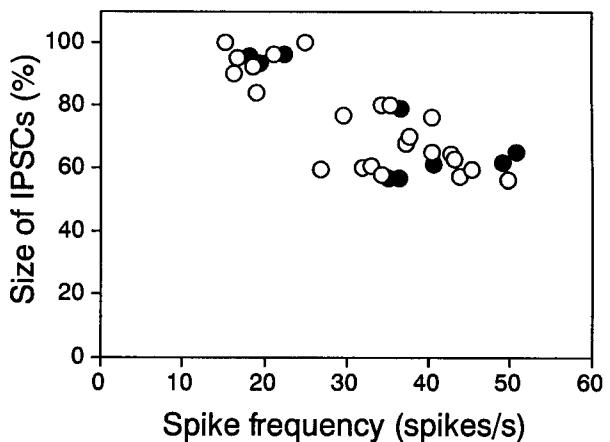


図33 A. CBM1刺激前後のMA刺激によりJCに誘発されたIPSCサイズの経時変化。図31, 32と同じプレバレーションで得られた結果である。B, C. CBM1によるIPSCサイズ修飾への発火頻度依存性。CBM1を低頻度 (19.0 spikes/s) または高頻度 (44.3 spikes/s) で発火したときのIPSCサイズの経時変化を図Bに、CBM1の低頻度または高頻度刺激により減少したIPSCサイズを複数の個体で平均したものを図Cに示す (Low freq., 18.9 ± 1.3 spikes/s; High freq., 40.1 ± 1.1 spikes/s)。D. CBM1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。

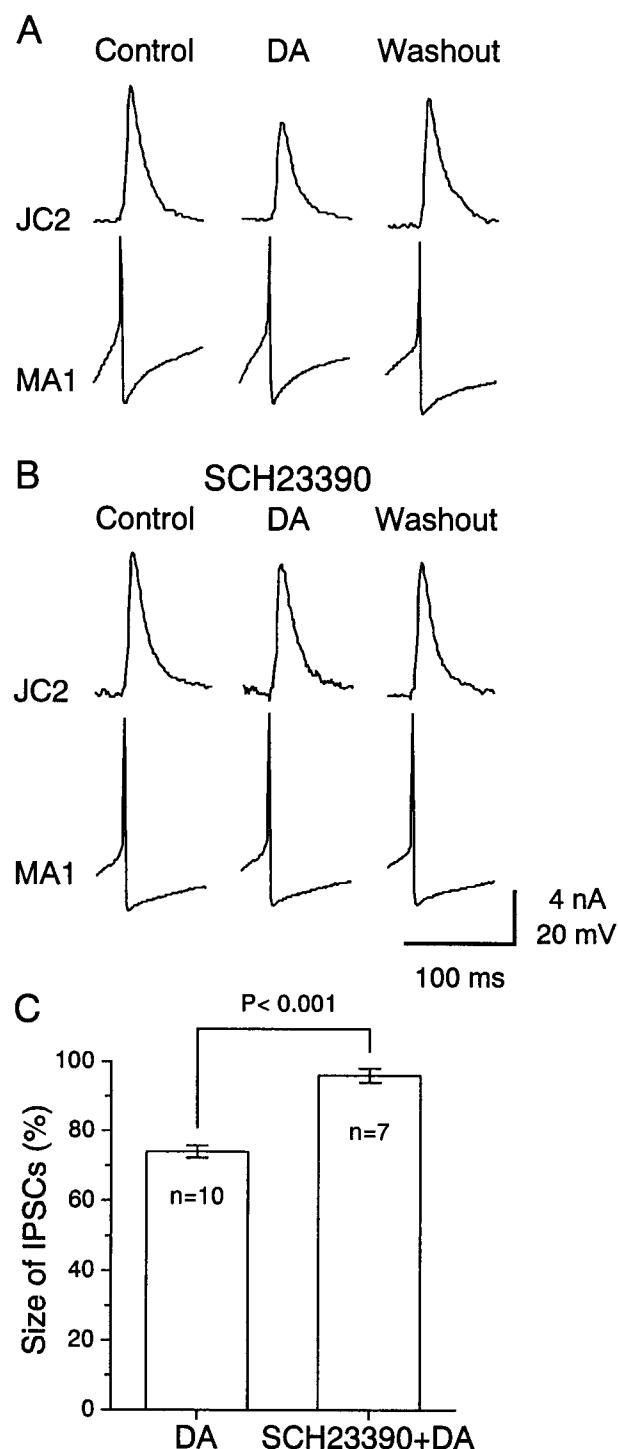


図34 A. MA刺激によりJCに誘発された個々のIPSCサイズに対するドーパミン ($5 \times 10^{-5} M$) 外液添加の効果。B. ドーパミンD1 receptorのアンタゴニストであるSCH23390を添加したときの個々のIPSCサイズに対するドーパミン修飾効果の阻害。C. SCH23390を添加したとき (SCH23390+DA) と添加しなかったとき (DA) のMA-JC間のIPSCサイズに対するドーパミン修飾効果のまとめ。

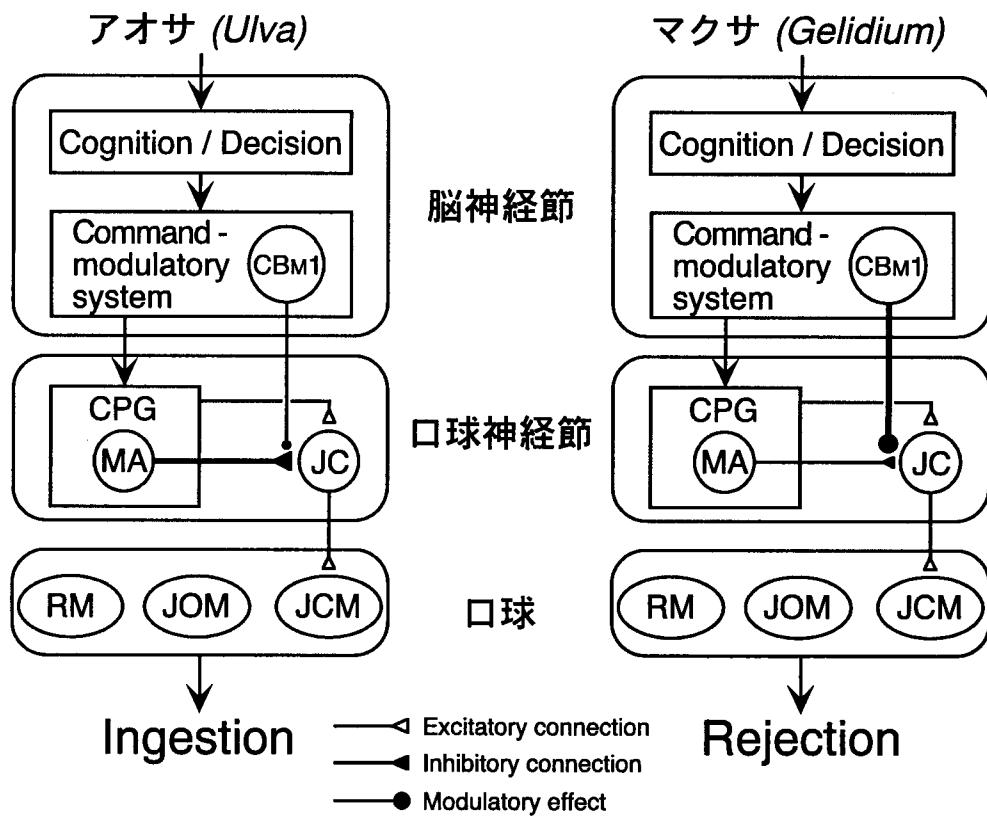


図35 本研究で明らかになったCBM1のシナプス修飾効果のまとめ。アオサ抽出液により誘発される摂食応答時、CBM1の発火頻度は比較的低いためMA-JC間の抑制性シナプスの伝達効率に影響を与えず、JCを単シナプス性に抑制するMAの活動によりJCのスパイク活動開始時期が遅れる。マクサ抽出液により誘発される吐き出し応答時、CBM1の発火頻度が高いためMA-JC間の伝達効率が特異的に抑圧されることによりJCの活動開始時期が早くなる。このことからCBM1は摂食から吐き出しへの口の運動パターンスイッチ機構に関わる修飾ニューロンであることが示唆された。CB, Cerebral-buccal interneuron;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