



アメフラシ口球神経節内における摂食CPG(中枢パターン発生器) に関するニューロン群の同定

衣川, 亜衣子

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2006-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3707

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003707>

※ 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。



【 2 7 3 】

氏 名・（本 籍） 衣川 亜衣子 （ 長崎県 ）

博士の専攻分野の名称 博士（理学）

学 位 記 番 号 博い第317号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成18年3月25日

【 学位論文題目 】

アメフラシ口球神経節内における摂食CPG (中枢パターン発生器)
に關与するニューロン群の同定

審 査 委 員

主 査 教 授 土屋 禎三

教 授 尼川 大作

教 授 林 文夫

東邦大学教授 長濱 辰文

(氏名：衣川亜衣子 NO. 1)

動物にはパターン化した運動が多くみられる。特に歩行、飛翔、遊泳、摂食などは、感覚入力がなくても中枢パターン発生器(CPG)と定義される特定の神経回路によって発現すると思われる。CPG では多数のニューロンがリズムカルな発火を繰り返し、そのパターンが運動ニューロン群に伝わる事で、パターン化した運動を誘発する。

日本産アメフラシ (*Aplysia kurodai*) は、アオサ、ワカメなどの海藻を好んで食べるが、マクサ、サナダグサなどは嫌って吐き出す。この時、口と歯舌では行動によって異なるパターン運動が発現するが、このような差は関与するニューロン群の発火パターンの違いから生じる。またこれらの応答は海藻の味のみでも発現し、閉口に関与する JC 運動ニューロンやそれを単シナプス性に抑制する MA ニューロンなどにリズムカルなバースト発火パターンが発現する。アオサの味刺激では、MA の個々のバースト活動の後に JC の活動が続くような摂食応答パターンが生じる。一方、吐き出し応答を誘発するサナダグサ味刺激では、摂食時に比べ MA の発火頻度や発火時間が減少し、結果として JC の発火時期が早められる。この為、サナダグサの吐き出し応答形成では MA のスパイク頻度、バースト時間を変化させるプレニューロンが重要であると考えられ、本研究はその候補ニューロンの探索を主な目的とした。

これまでアメリカ産アメフラシ (*Aplysia californica*) では、MA と等価なニューロン B4/B5 のプレニューロンがいくつか見つかった。そこでそれらと等価なニューロンを探すため、それらの軸索が伸びている神経に対し、日本産アメフラシでバックフィル染色を行った。しかしながら、アメリカ産プレニューロンと相同な細胞体はこの方法から確認できなかった。

そこで微小電極を直接用いてプレニューロンを探索した。プレニューロンには電気生理学実験用の K-acetate と染色用の Lucifer Yellow という 2 種類の溶液を充填できる θ 型電極を用いた。まず、口球神経節内の MA に微小電極を刺入し、次に別の微小電極を任意のニューロンに刺入し、MA との間にコネクションがあるかどうかを調べた。更に外部溶液を交換してそのコネクションを詳しく調べた。また、食道神経の電気刺激により擬似摂食応答を誘発し、プレニューロンが MA の摂食発火パターンの形成に関わっているかを調べた。また、抗体染色法でプレニューロン含有の伝達物質の特定も進めた。今回の研究で見つかったニューロンを電気生理学の性質、形態学的性質で分類すると 21 タイプに分けられた。

そのうち 19 タイプが MA に対し興奮性シナプス電位、1 タイプが興奮—抑制性シナプス電位、1 タイプが抑制性シナプス電位を誘発した。また、plateau potential 様後電位を発現するニューロンは 6 タイプあった。本論文では、21 タイプのうち 4 タイプのプレニューロンについてその性質を詳しく報告する。

(氏名：衣川亜衣子 NO. 2)

(1) LE タイプニューロン

細胞体は口球神経節 rostral 面の中央から少し ventral 側に位置した。Plateau potentials を発現し、アメリカ産 B51 と等価である可能性が高い。この plateau potentials は入力の時間や大きさに関わらず、継続時間と大きさが一定であった。また、MA と LE 間には電気的なカップリングが存在し、さらに LE は MA に単シナプス性の興奮性シナプス結合を、MA は LE に単シナプス性の抑制性シナプス結合をしていると考えられる。擬似摂食応答で LE は MA が最大脱分極相で高頻度発火をした後に発火した。LE の発火抑制実験より、LE は MA で高頻度発火後に持続する脱分極を生成していると思われる。LE は一定の plateau potentials を持つという事と MA 脱分極相に関与しているという事からこのニューロンは CPG で脱分極相の安定化を担うニューロンであるという事が示唆された。パターン運動時の筋収縮の持続時間が一定であるのは、この plateau potentials が作り出す脱分極相が一定であるからと考えられる。

(2) RN-1 タイプニューロン

細胞体は、口球神経節の中央付近に位置し、radula 神経に伸びる太い軸索に加えて細い軸索を持っていた。LE の形態と良く似ているが、細い軸索の存在や電気生理学的特徴の違いにより別のニューロンとして分類した。また、radula 神経からのバックフィル染色により LE と RN-1 は同時に存在する事がわかった。RN-1 と MA 間には電気的なカップリングが存在し、さらに RN-1 は MA に単シナプス性の興奮性シナプス結合をしていると考えられる。擬似摂食応答中、RN-1 では MA バースト発火の最大頻度をもたす脱分極の部分と同期するような脱分極応答が見られ、そこでは小さな脱分極電位が頻繁に発現した。この脱分極電位は RN-1 の細胞体から遠く離れた軸索部におけるスパイク活動を記録している可能性がある。このニューロンではさらに MA の擬似摂食発火パターン形成への寄与を調べる必要がある。

(3) BL タイプニューロン

細胞体は MA 細胞体の近傍にあり、2 本の軸索が出て、1 本は同側の n1 神経に至り、もう一方は対側の神経節へと伸びていた。BL と MA 間に電気的なカップリングが存在し、さらに BL は MA に単シナプス性の興奮性シナプス結合をしていると考えられる。擬似摂食応答では、BL は MA の脱分極とほぼ同期して脱分極し、そこでは低頻度の発火を伴う小さな脱分極性電位が頻繁に発現した。これらも軸索部におけるスパイク活動を記録している可能性がある。擬似摂食パターン産出中に過分極通電で BL を抑制すると MA のバースト時間が有意に短くなった。これらの結果、MA の摂食発火パターンにおいて BL は MA のバースト発火時間の調節に寄与していることが示唆された。

(氏名：衣川亜衣子 NO. 3)

(4) EI タイプニューロン

細胞体は MA 細胞体の近傍にあり、2 本の軸索が出て、1 本は lateral 側へ、もう 1 本は対側神経節へと伸びていたがどちらも末梢の神経には至っていなかった。EI は MA に対し興奮－抑制性シナプス後電位 (EIPSP) を、MA は LE に IPSP を誘発し、これらはいずれも単シナプス性であることが示唆された。また、EI は対側 MA にも EIPSP を誘発したが、単シナプス性か多シナプス性かは確認できていない。摂食応答発現時、EI は、MA 発火の終了直前から発火した。このニューロンの活動を抑制しても MA の発火頻度、バースト時間には影響がなく、MA の発火パターン形成にはほとんど寄与していないと思われる。

以上の結果、LE と BL は擬似摂食リズム発現中に MA のバースト時間や脱分極を長くすることに寄与していると考えられる。そこで、これらのニューロンがアオサの摂食応答からサナダグサの吐き出し応答への MA の発火パターンの変化に大きく関与している可能性が高いことが明らかになった。今後、実際にアオサやサナダグサの味刺激に対しこれらニューロンがどのように応答するか調べる必要がある。また、抗体染色を行った結果 Small Cardioactive PeptideB (SCPb) と Myomodulin (mm) 抗体に陽性反応を示すニューロンが見つかった。今後、細胞内染色法との二重染色を行いそのニューロンを同定すべきである。

氏名	衣川 亜衣子		
論文 題目	アメフラシ口球神経節内における摂食 CPG (中枢パターン発生器) に関与するニューロン群の同定		
審査 委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	土屋 禎三
	副 査	教授	尼川 大作
	副 査	教授	林 文夫
	副 査	他大学教授	長濱 辰文
	副 査		
要 旨			
動物の行動では、歩行、飛翔、遊泳など様々なリズムカルなパターン運動が見られるが、これらは脳内に存在する中枢パターン発生器 (CPG) と呼ばれる複雑な神経回路網によって形成されることが知られている。これまでの研究から、摂食と吐き出しのような同種の筋群を使う運動では、同一の CPG が存在し、行動の種類に応じて適時この回路網が調節を受け、みかけ上異なる回路網が形成されることが明らかになってきた。そこで、このような調節メカニズムを明らかにすることは、今後の神経回路網研究の上でたいへん重要なテーマであるが、そのためにはまず調節を受ける CPG 回路網内ニューロンを同定する必要がある。 海産の軟体動物であるアメフラシは、海藻のアオサを好んで食べるが、マクサやサナダグサは嫌って吐き出す。これら応答は味のみでも発現し、口や歯舌で摂食、または吐き出しの異なるリズムカルなパターン運動が発現する。最近の研究から、マクサ味とサナダグサ味では同じ吐き出しが発現するものの、それらは異なる中枢経路によると考えられるようになった。摂食時、閉口運動ニューロン (JC) はリズムカルな脱分極の後期に発火するが、吐き出し時には発火時期が早まる。摂食時の発火の遅れは、JC を単シナプス性に抑制する MA ニューロンの発火によるが、吐き出し時はマクサ味とサナダグサ味で MA の活動が異なることがわかった。マクサ味では MA 活動は変化せず MA-JC 間のシナプス伝達効率が減少するが、サナダグサ味では MA 発火活動が減少する。最近、MA-JC 間のシナプス伝達を抑制する修飾ニューロンがマクサ味吐き出しに寄与することが明らかになった。そこで、本研究は、サナダグサ味で MA の発火活動を減少させる機構に関与する MA のプレニューロンを同定することを当初の目的とした。実験では、電気生理学測定後、細胞内染色して形態を調べるという方法で 19 タイプのプレニューロンを見いだし、さらにそれらのうち興味ある 4 タイプについて性質を詳しく調べて同定した。この時、ニューロン間のシナプス結合は、外液を様々なイオン組成の等張溶液に置換して詳細に調べている。 外液交換実験により、LE と名付けたニューロンは MA と JC に単シナプス性の EPSP を誘発し、逆に MA は LE に単シナプス性 IPSP を誘発することがわかった。さらにこれら 3 つのニューロン間には互いに電気的なカブリングも存在した。LE ニューロンの特徴としては、短い興奮性入力でも数秒間脱分極が継続し、その間発火を続けるようなプラトー電位を発現した。さらに外液交換により、このプラトー電位の発現について、細胞外カルシウムが不要であることや LE の膜固有の性質であることなども見出した。また、LE への脱分極通電の時間や強度を様々に変えて形成されるプラトー電位を調べたところ、それらの大小によらず、ほぼ一定の継続時間と一定の大きさのプラトー電位が誘発されることを見出した。そこで、摂食応答時の口部のリズムカルなパターン運動形成への LE ニューロンの寄与を調べた。摂食応答は普通海藻抽出液の味刺激で誘発するが、ここでは食道神経を電氣的に頻回刺激して誘発される疑似摂食応答を調べた。応答時、MA、JC、LE はほぼ同位相で脱分極したが、JC の発火、および LE のプラトー電位は、MA の高頻度発火の後に誘発された。次に、応答時の MA と JC の発火パターン形成への LE の効果を調べるため、疑似摂食応答の途中で LE に過分極通電を行い、プラトー電位の発現を抑制した。この時、MA では高頻度発火に続く後期脱分極相が			

氏名	衣川 亜衣子
消失し、JC では摂食時発火が見られる後期脱分極相およびそれに伴う発火が消失した。これらの結果、MA の高頻度発火をもたらす脱分極相への LE の影響は見られないことから、LE はサナダグサ吐き出しで見られる MA 発火活動の変化には貢献しないと考えられる。しかしながら、LE のプラトー電位に伴う発火は摂食時見られる JC の脱分極発火に大きく貢献していることが示唆された。この時、LE に誘発される一定の継続時間と一定の大きさのプラトー電位は、摂食時の JC の安定な脱分極発火を誘発していると考えられる。 外液交換実験により、BL と名付けたニューロンは MA に単シナプス性の EPSP を誘発し、両ニューロン間には電気的カプリングが存在することがわかった。また BL は JC に多シナプス性の IPSP を誘発したが、一部は MA を介するものと考えられる。神経の電気刺激により疑似摂食応答を誘発すると、MA の高頻度発火がおこる脱分極と同位相、または少し先立って BL で小さな脱分極相が見られ、その時期に低頻度発火がおこった。さらにその脱分極相では小さなスパイク状の電位変化が数多く見られ、これらは BL の細胞体から離れた部位でのスパイク発火と考えられた。次に、疑似摂食応答の途中で BL に過分極通電を行い発火活動を抑制すると、MA の高頻度発火の時間が有意に減少した。しかし、BL と MA 間には電気的カプリングが存在することから、BL への過分極通電により MA も同時に過分極し発火が抑制されている可能性がある。そこで、MA を短い脱分極通電により発火させ、その発火頻度への BL 過分極の影響をさらに調べている。その結果、疑似摂食応答実験と同程度の BL 過分極による MA 発火頻度への影響は無視できることがわかった。今回の結果は、摂食応答時の BL の発火が MA の高頻度発火を誘発する脱分極相の形成に部分的に関わっており、サナダグサ吐き出しにおける MA 発火パターンの変化に貢献する可能性を示唆し、今後の BL に関する詳細な研究の必要性を提示した。 これらの他、論文では RN-1、EI と名付けたニューロンについても MA とのシナプス結合、疑似摂食応答時の発火活動などを報告しているが、それらの機能については調べられておらず、今後のさらなる研究が待たれる。 以上のように、本研究は摂食運動パターン形成について、その形成に関わる中枢の CPG 回路網内のニューロンを研究したものであり、複数の重要なニューロンの同定とそれらのパターン形成への寄与について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、学位申請者の衣川亜衣子は、博士（理学）の学位を得る資格があると認める。	