

学 位 論 文 題 名

Local interneurons and motoneurons involved in the control
of abdominal postural movement in crayfish

（ザリガニの腹部姿勢運動に関与する局在性神経と運動神経）

学位論文内容の要旨

動物は、自己のおかれた環境への適応、自己及び種の保存などのために様々な行動を示す。動物が示すある定型的行動、いわゆる本能行動、を研究対象として、その行動を制御している神経回路の働きを知ることは、行動の研究を行う上で一つの重要な方法である。節足動物は脊椎動物に比べ桁違いに少ない数の神経細胞しか持たないが、非常に多くの行動のレパートリーを持っている。神経系の構成の単純さと、それに反する行動の多様性の点から、節足動物は行動の研究において非常に魅力的な材料の一つとなっている。更に、個々の神経細胞の機能、細胞相互の結合様式から神経回路の働きを調べることも可能である。

本研究では節足動物門に属するアメリカザリガニの腹部姿勢運動に着目し、この運動の発現、制御を行う神経回路中の神経細胞の機能を明らかにすることを試みた。その結果、この運動系において従来知られていなかった種類の細胞を今回新たに発見、同定した。また、樹枝状で複雑な神経細胞の形態を *in situ* で確認し、その細胞全体または一部を破壊する装置を新たに開発した。この装置と細胞内微小電極法とを用いて、腹部姿勢運動神経が中枢内で他の運動神経へ出力を持っていることを明らかにした。最後に、腹部姿勢運動系の特徴を他の運動制御系の特徴と比較し、考察した。

第1章：近年節足動物の中樞神経系において、局在性ノンスパイキング介在神経の運動制御における重要性が注目されるようになってきている。しかし、ザリガニの腹部姿勢運動系においてはこの種の神経細胞の関与はほとんど報告されていない。そこ

で、腹部姿勢運動の制御に関与する局在性ノンスパイキング介在神経の有無を細胞内微小電極法を用いて検索した。

その結果、腹部第4神経節内にのみ細胞突起を持った局在性ノンスパイキング介在神経を新たに発見した。それらの大部分は神経節の両側へ突起を広げた両側型の形態をしており、一部は片側型の形態であった。この両側型の細胞を生理学的、形態学的に同定し、LB細胞と名づけた。LB細胞内への脱分極性の電流注入は、LB細胞にスパイクを生じさせることなく腹部伸展筋の遅抑制性運動神経と屈曲筋の遅興奮性運動神経の自発性スパイク発射を抑制した。この抑制効果は注入した電流の量に依存していた。過分極性の電流注入は運動神経に対し効果を示さなかった。

LB細胞は、神経節内での樹状突起の配置の違いによってLB1とLB2とに区別することができた。LB1の形態は個体間の変異が大きい、LB2の形態には個体差が少なかった。

全体標本による実験によって、ザリガニが“fictive”な腹部伸展運動を起こしている間中LB細胞は持続的に脱分極していることも明らかにした。このことはLB細胞が腹部伸展運動制御系の一部として実際に機能していることを示している。

LB細胞は腹部伸展運動発現に拮抗的に働く運動神経の活動を抑制することで、伸展運動発現を容易にする役割を担っていることを明らかにした。また、片側型のノンスパイキング介在神経も腹部姿勢運動制御に関わっていることも明らかにした。

第2章：ある神経回路の中で特定の細胞が占めている役割を知るためには回路の中からその細胞のみを取り除いた後、その回路の動作をしらべられることが望ましい。また、神経細胞は樹枝状の複雑な形態を持った細胞であり、細胞の各部分が独立して機能している可能性がある。よって、微小電極が細胞上のどのような位置にあるのかを、電気生理学的実験を行いながら確認できることが望ましい。

これらの要求を満たすために実体顕微鏡に照射用光学系を組み込んだ落射式レーザー光照射装置を新たに開発した。神経細胞に蛍光色素を注入し、この装置によってその色素を励起して、電気生理学的実験を行いながら細胞形態の確認、電極刺入位置の確認、細胞全体または一部の破壊ができるようにした。その際に、光路の途中に挿入したフィルター、レンズ系によって照射光強度、照射範囲を調節できるようにした。

自発的にスパイクを発する腹部姿勢運動神経の軸索の一部に、この装置を用いてレ

レーザー光を点照射し、照射部位よりも末梢側へのスパイクの順行性伝導を阻止することができた。しかし、神経節内でこの細胞へ刺入されている微小電極からは依然としてスパイクが記録された。また、反対側にある相同な運動神経への前運動性出力も保たれていた。このことは、破壊は細胞に一部のみに限られており、神経節内に残された細胞部分は正常な機能を維持していることを示している。

第3章：従来の司令神経仮説に従えば、腹部姿勢運動神経は、中枢から筋肉への単なる情報伝達経路であるとみなされがちであった。しかし、第2章で示したように、運動神経は神経節内で他の運動神経に対して前運動性に機能していると考えられる。そこで、腹部姿勢運動神経の神経節内での相互作用についての解析を行った。

一つの運動神経へ微小電極を刺入し、細胞内へ電流を注入すると、電流を注入された神経の活動のみならず、他の運動神経の活動も同時に変化した。脱分極性の電流注入によって興奮が、過分極性電流注入によって抑制がそれぞれ起きた。このような相互作用は姿勢運動発現時に共力的に働く神経の間でのみ観察され、拮抗的に働くもの間にはみられなかった。

これらの神経を異なった色の色素によって弁別染色し、光学顕微鏡下で二つの神経細胞間に樹状突起相互の接触があることを観察した。このことは、運動神経が相互にシナプスを介して接続していることの形態学的傍証である。このように、腹部姿勢運動神経は中枢からの神経情報の受動的な通り道であるだけではなく、中枢内においても統合要素の一部として機能していることを生理学的形態学的に明らかにした。

ザリガニ腹部姿勢運動は Kennedyら（1966）の研究以来、司令神経仮説の好適なモデルの一つとされてきており、研究者の関心はもっぱら縦連合内を走行する介在神経に向けられてきた。しかし腹部姿勢運動の制御には従来強調されてきた interganglionic interneurons ばかりではなく、局在性介在神経（intraganglionic interneurons）や運動神経も重要であることを明らかにした。また、ザリガニでは局在性ノンスパイキング介在神経の研究はもっぱら遊泳肢運動系と尾扇肢開閉系においてなされてきたが、この種の神経細胞によって媒介される運動制御系の範囲を更に腹部姿勢運動系にまで押し広げることができた。このことは、動物の行動制御におけるノンスパイキング介在神経の役割の普遍性、重要性を更に大きくしたといえる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 久 田 光 彦

副 査 教 授 片 桐 千 明

副 査 助 教 授 高 畑 雅 一 (電子科学研究所)

学 位 論 文 題 名

Local interneurons and motoneurons involved in the control
of abdominal postural movement in crayfish
(ザリガニの腹部姿勢運動に關与する局在神経と運動神経)

動物は、環境への適応と個体の保全、繁殖のために、驚くほどの合目的性を持つ行動を示す。このような行動を実現させる動物の内部機構の主体は神経系にあるとすることができる。多くの種類の動物が、一定の状況にあり、必要な感覚刺激にさらされたとき、ほぼ決まった行動、いわゆる定型的行動を示すことは、行動の神経機構を明らかにしようとする試みに大きな手掛かりを与える。このような研究は、現在神経行動学という新しい分野を形成しつつある。霊長類から下等無脊椎動物までの広い動物種を対象として行われている研究の中でも、明白な定型的行動を中心とし、さらに脊椎動物と比較すると桁違いに単純な神経系を持っている節足動物は、まだ萌芽的な段階にある神経行動学の研究対象として極めて魅力的な対象である。申請者は、アメリカザリガニを研究対象に選び、行動の基本要素を構成する運動系を支配する神経要素について解析を行った。

申請者は運動系の例として、腹部の姿勢制御系に注目し、その中枢である腹部神経節の神経回路とその機能を調査する研究を行った。特にこれまで詳細な知見をえられていなかった第4神経節をモデルとして選んで調査した。調査は電気生理学的手法と、形態学的方法を結び合わせ、局在性神経を中心に、運動神経への結合、運動神経自体の特性について行われた。また、神経回路要素の機能を明らかにするため、細胞内蛍光染色とレーザ光照射を併用する記録位置の *in vivo* 確定手段と、細胞の部分破壊装置とを新たに開発し、これによって、細胞機能について新しい知見を獲得する手法を得た。

その結果、1) 伸展運動を補助する特別なノンスパイキング局在神経群を発見し、これをLB神経群と名付けた。さらにその構造と機能を解析した結果LBはLB₁とLB₂の2種からなることも明らかにした。LB細胞群はその樹状突起を神経節内で両側に広げている。腹部伸展運動が起こっているとき、このLBニューロンは持続的な脱分極を示し、腹部、腹髄内を縦走する節間神経から入力を受けていることが示された。この脱分極は伸展筋の遅抑制性運動神経と、屈曲筋の遅興奮性運動神経の自発性スパイク発射を抑制し、腹部伸展系の副次的な回路を形成していることが明らかになった。近年、節足動物の中枢に発見されるノンスパイキング神経が、感覚情報、運動情報の統合に関与して運動、行動の発現を修飾することが明らかになっている。この発見は、このような見解に新しい支持を与えるものである。

申請者はさらに、2) 運動神経自体が相互に結合され、運動出力情報形成に積極的に関与している証拠を見いだした。運動神経は、従来一般に単純に最終出力経路としてのみ機能していると理解されていたが、運動神経も中枢統合作用の一部を分担していることを示した点で極めて注目される発見である。腹部運動に際して協調的に働く筋群を支配する運動神経群は、微弱ではあるが相互に結合され、筋動作が確実に起こるよう保証されていると見ることができる。

この研究を行うに当たって、申請者は、3) 細胞内記録電極を通じて微量の蛍光色素を注入し、その細胞内拡散によって神経細胞の形態、電極の記録部位を確認する装置を開発する試みに参画し、さらにこれを用いて細胞分枝の一部を破壊する方法を試みて、運動神経間の機能接続が細胞のどの部分で起こっているかを明らかにした。また、2つの運動神経細胞間の接続を形態的に確認するため、ホースラディッシュスーパーオキシデースとルシファーイエローの2種の異なる色素を2つの運動神経に注入する弁別染色を用いて、両者の樹状突起が神経節内で極めて接近して分布し、間接的にこの間の形態的接続の存在を支持する証拠を入手することにも成功している。

このように申請者は、神経系の微細構造と局所回路機能の両面を確認しながら、比較的単純な節足動物の中枢の特徴を活かして精細な解析を行い、行動の神経基盤を理解するための重要な基礎的知識の集積に寄与すると同時に、神経系の基本的な構築についても、これまでのわれわれの把握を超えた新しい知識を明らかにした点で、評価される。また、申請者は、これまでに参考論文3編をいずれも申請者を第一著者として発表している。これらのうち、2編は代表的な国際誌に掲載されている。よって審査員一同は申請者が博士(理学)の学位に十分な資格有りとした。