

学 位 論 文 題 名

FUNCTIONAL ROLE OF ASCENDING INTERSEGMENTAL INTERNEURONES
CONTROLLING THE UROPOD MOTOR SYSTEM IN THE CRAYFISH:
THEIR PHYSIOLOGY, MORPHOLOGY AND ULTRASTRUCTURE

（アメリカザリガニ尾扇肢運動系における上行性介在ニューロンの
機能的役割：生理、形態、および、微細構造による解析）

学位論文内容の要旨

動物の行動は、様々な動作及び姿勢の変化として現われる。その多様性は多くの生理学者にとって興味深い研究対象である。近年、動物の行動と、それを裏打ちする神経機構に対して同時に目を向けようとする新たな研究分野、神経行動学が確立の途次にある。動物の行動を神経活動の面から解釈しようとするとき、まず行動の解析が必要となる。そしてそれにかかわる中枢、末梢における神経細胞の同定、さらに、それらの活動様式や接続状態の解析がなされ、最終的には、それらの行動パターンを作り出す神経細胞の特性や相互作用の決定が行われる必要がある。

無脊椎動物、中でもザリガニ類や昆虫などの小型の節足動物は、行動の神経機構を解析する対象としては特に優れている。例えば小型のアメリカザリガニの個体では定形化したいくつかの行動パターンを見ることができる。後方から他の個体が近づくと、尾扇肢を閉じて素早く前方へ歩き出し、刺激源から遠ざかる逃避行動をみせる。この行動は人為刺激でも容易に再現することができ、この行動がどのような神経回路の活動によるものなのか、その行動を形成する動物体各部の動作と神経活動とを直接対応させながら解析することが可能である。さらにこれらの動物では、ニューロンの絶対数が脊椎動物に比べて少ないことで、このような解析にははなはだ有利である。これによってある行動に関わる神経活動を、個々のニューロンのレベルで詳細に解析するこ

とが可能である。

本研究では、アメリカザリガニ Procambarus clarkii (Girard) を材料として用いた。アメリカザリガニ尾扇肢の動きは、腹部最終神経節内の局所的な反射回路によってコントロールされている。この神経節内にはスパイク発射型、非スパイク発射型の局在性ニューロンが存在し、さらにこの節起源の運動ニューロンや体節間上行性介在ニューロンが含まれる。上行性介在ニューロンは、腹側表層に細胞体を持ち、腹部縦連合を通して前方神経節に軸索を伸ばしている。上行性介在ニューロンは尾扇肢表面の感覚毛から入力を受けること、またその一部のものは腹部姿勢制御に関わることなどは報告されてきたが、その機能の体系的な位置づけは行われてこなかった。本研究では尾扇肢運動に着目し、これら上行性介在ニューロンが最終神経節内で感覚情報統合から運動出力形成に至るまでに果たす役割を明らかにすることを試みた。このためこれらニューロンの生理、形態学的解析を行い、電気生理学的接続状態、および微細構造レベルでのシナプス接続を調査した。

研究方法として、標識物質を充填したガラス微小電極を用いて、細胞内記録、染色法を行い、電気生理学的解析の後、細胞内通電により標識物質を細胞内へ注入した。標識物質としてはニューロンの形態の素早く簡便な観察には、蛍光色素ルシファー・イエローを、ニューロンの詳細な形態、構造を光学及び電子顕微鏡レベルで観察するときには、ホースラディッシュ・パーオキシデース (HRP法) か、塩化ニッケル (銀増強法)、あるいはその両者を同時に用いた。

その結果、上行性介在ニューロンの感覚、運動、あるいは他の介在ニューロンとの入出力連関、さらにそれに伴う形態、構造的特徴を総合的に明らかにした。ここではその内容を、形態と運動出力による同定、シナプス分布、感覚情報の入力、直接シナプスを含む運動出力効果の四章としてまとめた。

第一章： 腹部最終神経節起源の上行性介在ニューロンの形態と機能に関して、特に運動出力に重点を置いて、同定を試みた。全体像、細胞体の位置、一次神経突起の走行、軸索の走行と位置、二次神経突起の数と状態、さらに運動ニューロンへの出力効果を調査し、これらをもとに、24種の上行性介在ニューロンを同定し、運動出力様式から六つのグループに大別した。

第二章： 上行性介在ニューロンの中で、運動出力を持つものと持たないものとで

H R P 法を用いて最終神経節内の微細構造を比較し、シナプス分布を解析した。運動出力を持つものは入出力両シナプスを、持たないものは入力シナプスのみしか持たなかった。

第三章： 尾扇肢感覚毛からの刺激が上行性介在ニューロンに伝えられるまでの機構を単一毛刺激によって行い、電気生理学的に追跡した。その結果、多くの上行性介在ニューロンは複数の感覚毛求心性繊維から、直接化学的シナプスを介して収斂性の入力を受け取っていた。さらに、上行性介在ニューロン同士が最終神経節内で直接に抑制性、興奮性の信号伝達を行っていた。

第四章： 上行性介在ニューロンから尾扇肢運動ニューロンへの出力接続に関して同時細胞内記録法を用い、さらに二重標識法による電子顕微鏡レベルでの直接接続の有無を微細構造において調べた。同定ニューロンの一部は、運動ニューロンへの直接接続のみならず、非スパイク発射型局在性介在ニューロンとも同時に直接接続を持っていた。

以上、上行性介在ニューロンは、感覚ニューロンの投射部域と局在性介在ニューロンの分枝領域の中間部にそれ自体分枝していること、感覚ニューロンからの直接の収斂性入力を持ち、さらに局在性介在ニューロンへ直接出力を持つことの両面から、感覚介在性ニューロンとして機能すると同時に、その情報を局在性介在ニューロンへ伝達していることが明かになった。またその一部は運動ニューロンへ直接接続を有しているが、その出力は局在性介在ニューロンのそれに比較してかなり弱いことが示された。したがって上行性介在ニューロンは、直接運動ニューロンをコントロールするとともに、その主たる機能としては感覚情報を加算増幅して前運動性ニューロンである局在性ニューロンへ伝達することにあると結論された。

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)

副 査 講 師 長 山 俊 樹

学 位 論 文 題 名

FUNCTIONAL ROLE OF ASCENDING INTERSEGMENTAL INTERNEURONES CONTROLLING THE UROPOD MOTOR SYSTEM IN THE CRAYFISH: THEIR PHYSIOLOGY, MORPHOLOGY AND ULTRASTRUCTURE

(アメリカザリガニ尾扇肢運動系における上行性介在ニューロンの機能的役割：生理、形態、および、微細構造による解析)

動物の行動の多様性は多くの生物学者にとって興味深い研究対象である。特に行動の神経基盤を明らかにしようとする研究は、最近神経行動学と呼ばれる新しい研究分野を形成しつつある。

無脊椎動物、特に甲殻類、昆虫などの節足動物は、行動の神経機構を解析する対象としていくつかの利点を持っている。例えばアメリカザリガニは幾つかのいわゆる定型化された行動パターンを示す。後方から他の個体が接近すると、尾扇肢を閉じて素早く前方に歩きだし、刺激源となるものから遠ざかろうとする。このような逃避行動は容易に人為的な刺激で再現させることが出来るので、この行動パターンがどのような神経回路の活動によって実現されるものなのかを、動物各部の運動動作と、神経活動を直接対応させて解析することが可能である。また、このような動物では中枢を形成するニューロン数も脊椎動物一般に比べて極端に少なく、この点でも有利である。

このような理由で本研究では、アメリカザリガニ *Procambarus clarkii* (Girard) を材料として用いている。この動物の尾扇肢の動きは、腹部最終神経節内の局所的な反射

回路によってコントロールされている。この神経節内にはスパイク発射型、非スパイク発射型の局在性ニューロンが存在し、更に此の節に起源を持つ運動ニューロンや体節間上行性介在ニューロンが含まれている。上行性介在ニューロンは表面の感覚毛から入力を受けること、またその一部のものは腹部姿勢制御に関わる事などが報告されているが、その機能の体系的な位置付けは行われていない。本研究はこれら上行性介在ニューロンが最終神経節で感覚情報統合から運動出力形成に至るまでの過程で果たす役割を明らかにすることを試みている。

申請者はこの解析を、ニューロンの生理、形態学的同定、電気生理学的な接続状態調査、さらに微細構造レベルでのシナプス接続検出の各手法を結合させて行っている。その結果、上行性介在ニューロンの感覚、運動ニューロン、あるいは他の介在ニューロンとの入出力、連関、更にそれに伴う形態、構造的特徴を総合的に明らかにしている。

まず、1) 腹部最終神経節起源の上行性介在ニューロンの同定を試みている。その判断基準として、全体像、細胞体位置、一時神経突起および軸索走行、二次突起分枝数と走行等の形態特徴と運動ニューロンへの出力効果を取り上げ、これらをもとに、24種の上行性介在ニューロンを同定することに成功した。また、運動出力様式を基準にこれらを6つのグループに大別している。

さらに2) 上行性介在ニューロンのうち、運動ニューロンへの出力を持つものと、持たないものの微細構造をHRP法を用いて比較している。シナプス分析の結果、出力を有するものは入出力両シナプス構造を持っていたが、運動出力に関係しないものには入力シナプスのみを観察している。

3) 上行性介在ニューロンの感覚入力統合機構を明らかにするため、尾扇肢感覚毛からの感覚刺激の入力接続を追跡している。単一の感覚毛を刺激しての仔細な実験を行い、多くの上行性介在ニューロンは複数の感覚毛求心神経繊維から、直接化学シナプスを介して収斂性の入力を受け取っていることを示した。さらに、上行性介在ニューロン相互の間にも、抑制性、興奮性両接続による直接の信号授受が行われていることを明らかにした。

4) 運動出力統合機能との関わりを明らかにするため、介在ニューロンと尾扇肢運動ニューロンの接続を、両ニューロンからの同時細胞内記録、さらに二重染色法による電子顕微鏡レベルでの接続形態確認の両面から調査した。その結果、上行性介在ニューロンの一部は、運動ニューロンに直接接続を持つとともに、非スパイク型局在性介在ニューロンとも直接接続を持っていること、また、一般には後者の接続が強いことも見いだした。

以上申請者は、上行性介在ニューロンの同定、機能解析から、これらのニューロンの機能は感覚情報の加算統合を行い、これを前運動ニューロンであるノンスパイク型局在ニューロンへ伝達して運動出力形成の一翼を担うと同時に、直接的にも運動ニューロンを制御していわゆる並列制御を行っていることにあると結論した。この成果は、これまで上行性介在ニューロンは前方神経節への感覚情報伝達経路としてのみ理解されてきたことに対し、その起源神経節内でも局所回路を経て運動系を制御しているという新しい知見をもたらしたものとして高く評価される。参考論文3編はいずれもこの分野の優れた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)の学位を得るのに十分な資格があると認めた。