

学位論文題名

Passive Dendritic Properties of Identified Nerve Cells
in the Uropod Motor and Sensory Systems of Crayfish

(ザリガニ尾扇肢運動系および感覚系における
同定細胞樹状突起の受動的膜性質)

学位論文内容の要旨

動物行動の基盤となるのは、筋肉系とこれを制御する神経系である。いずれの系においても、その機能単位は細胞であり、それぞれ、環境の変化に適合した行動を効果的に遂行するために形態的・機能的に分化している。脊椎動物、無脊椎動物いずれにおいても、筋肉細胞は、逃避行動や跳躍・引き込みなどすばやい運動を遂行するための速筋繊維と姿勢維持・制御など持続的運動を遂行するための遅筋繊維とに区別される。中間型の性質を示す筋繊維も多数存在するが、典型的は、これら2種類の筋繊維は、その収縮様式に適合した生理学的、生化学的性質を示す。一方、これら筋繊維を支配する運動神経も、その収縮制御に適合した生理学的、解剖学的性質を示すことが知られている。しかし、脊椎動物では、中枢神経系内の神経細胞(ニューロン)数が非常に多く、かつ、形態的に類似の細胞が多数存在するため、これまで、個々の細胞のレベルで、その生理学的研究を行うのは困難であった。一方、昆虫や甲殻類などの節足動物では、中枢神経系が哺乳類など脊椎動物と比較して少数の神経細胞(ニューロン)から構成されており、また、神経細胞が一般に大型で特徴的な形態を示すため、個々の細胞を同定して、その生理学的性質、解剖学的性質を確定することが出来るとともに、個体間でのそれら性質の変異性を調べ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 を実験動物として用い、その尾扇肢運動系および感覚系における同定細胞の解剖学的特徴を明らかにするとともに、生理学的性質、特に、神経細胞での情報処理が行われる樹状突起膜の受動的性質をガラス管微小電極法を用いて調査した。また、大型の同定細胞を実験系として、同一細胞の樹状突起膜性質の個体間変異および細胞内の領域差を明らかにした。

第1章 アメリカザリガニ尾扇肢運動系の運動神経および前運動性ノンスパイキング介在神経の樹状突起膜性質

尾扇肢運動神経およびその前運動性ノンスパイキング介在神経の樹状突起にガラス管微小電極を刺入し、細胞内定電流注入に対する膜電位応答を測定するとともに、蛍光色素 Lucifer yellow の細胞内注入を行った。色素注入の後、細胞にまだ電極が刺入した状態で、色素の励起光(波長約430nm)を水銀ランプから光学フィルターにより引き出し、実体解剖顕微鏡下で落射照明した。吸収フィルターを介して検鏡することにより、生理活動中の細胞の樹状突起のどの部位に電極が刺入しているかを、直接視覚的に確認することが可能となった。本研究における樹状突起膜性質の生理学的解析は、すべて、

この落射照明法によって細胞内電極刺入部位が確定された細胞で行われた。調査した細胞は、いずれも、腹部最終神経節内の尾扇肢運動系に含まれるものである。

速筋支配の運動神経は、自発性の活動電位（スパイク）発射を示さず、また、シナプス活動も顕著ではない。一方、遅筋支配の運動神経は、活発な自発性活動電位発射とシナプス活動を示す。これら運動神経樹状突起の統合部位に電極を刺入して調べた結果、速運動神経の樹状突起膜が示す入力抵抗 ($5.2 \pm 0.5 \text{ M}\Omega$) と膜時定数 ($7.3 \pm 0.9 \text{ msec}$) の値は、遅運動神経のもの ($10.3 \pm 2.6 \text{ M}\Omega$ 、 $24.3 \pm 2.5 \text{ msec}$) と比べて統計学的に有意に小さいことが判明した (Student's t-test ; $P < 0.001$)。前運動性ノンスパイキング介在神経は、速運動神経と比べて有意に大きな入力抵抗 ($19.5 \pm 2.5 \text{ M}\Omega$) と長い膜時定数 ($38.0 \pm 5.7 \text{ msec}$) を持つ ($P < 0.001$)。これらのうち入力抵抗は、遅運動神経と比較しても有意に長い ($P < 0.001$) が、膜時定数には両者の間で統計学的差異は認められなかった。

これらの膜性質の差異が、それぞれの細胞のダイナミック応答にどのような意義を持つかについて、異なる周波数 ($0.5 \sim 16 \text{ Hz}$) の正弦波状電流を樹状突起統合部位に細胞内注入して、運動神経のスパイク活動に及ぼす影響を調査した。遅運動神経が $0.5 \sim 8 \text{ Hz}$ の正弦波電流に対してスパイク活動変化を示したのに対し、速運動神経は $1 \sim 16 \text{ Hz}$ の範囲でのみスパイク活動変化を示した。この結果は、遅運動神経樹状突起が、高域周波数遮断フィルターとして機能する可能性を支持する一方、速運動神経における低域周波数遮断機構としての活動電位発生部位膜の速い順応性質を示唆している。ノンスパイキング介在神経は、遅運動神経樹状突起と同様の応答周波数帯域を示し、高域周波数遮断フィルターとしての機能が示唆された。

第2章 アメリカザリガニ尾扇肢感覚系の感覚性同定ノンスパイキング介在神経の樹状突起膜性質の個体間変異と細胞内部域差

樹状突起膜の生理学的性質を細胞形態と直接的に関連づけて明らかにするために、腹部最終神経節内の尾扇肢機械感覚系で同定される大型のノンスパイキング介在神経であるLDS細胞を用いて、その入力抵抗および膜時定数と電流注入部位との関連を39例の実験により調査した。この細胞は、神経節の両側に細い樹状突起を伸ばし、これらは、中心線を横断する1本の太い（直径 $10 \sim 30 \text{ }\mu\text{m}$ 、長さ $180 \sim 220 \text{ }\mu\text{m}$ ）突起によって結合している。電流注入部位を、この横断突起域と周辺域との2種に大別して比較したところ、中心域では入力抵抗と膜時定数はそれぞれ $7.6 \pm 0.7 \text{ M}\Omega$ 、 $16.0 \pm 1.7 \text{ msec}$ であったのに対して、周辺域では $13.9 \pm 1.3 \text{ M}\Omega$ 、 $26.2 \pm 2.9 \text{ msec}$ であり、両者の違いとも統計的に有意であった ($P < 0.01$)。入力抵抗は、電極刺入部位の形態に依存し、理論的には、注入電流が横切る実効膜面積が大きいほど低い値を示す。本研究において、電流注入部位の樹状突起の直径と入力抵抗との間の相関を調べた結果、相関係数は -0.48 で、統計的に有意であった ($P < 0.01$)。一方、膜時定数は、単位面積当たりの膜抵抗および膜容量の積であるので、これらの性質が細胞内全域で一定であれば変わらないはずである。今回の結果は、細胞膜の脂質二重層の物理的性質によって決まる膜容量が細胞全域にわたって一様であると仮定すると、膜抵抗が周辺部ほど横断突起域よりも高いことを示している。これまで理論的な研究により、細胞の部域によって樹状突起膜の受動的性質が異なるという不均一性は予想されていたが、これを実験的に証明したのは、同定細胞という研究戦略にもとづいた本研究が初めてである。

以上の結果から、ザリガニ尾扇肢運動系に含まれる中枢細胞は、それぞれ、その機能的役割に対応して機能的に異なる形態および受動的膜性質を示すことが判明した。これらの差異は、中枢神経系における情報処理の過程でそれぞれの細胞が果たす役割を反映し、樹状突起がもつ様々な電位依存性膜

コンダクタンス（能動的膜性質）とともに、シナプス統合機能の基盤となるものである。また、受動的な膜性質は、細胞全域にわたって均一なものではなく、部域差をもつことが判明した。この部域差は、シナプス電位の時間的・空間的分布に多大の影響を与えるもので、入出力シナプスの分布によって同一の細胞が異なる情報処理を行う可能性を示唆している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 畑 雅 一
副 査 教 授 浦 野 明 央
副 査 助 教 授 鈴 木 教 世
副 査 助 教 授 長 山 俊 樹

学 位 論 文 題 名

Passive Dendritic Properties of Identified Nerve Cells in the Uropod Motor and Sensory Systems of Crayfish

(ザリガニ尾扇肢運動系および感覚系における
同定細胞樹状突起の受動的膜性質)

近年、動物行動の神経機構に関する研究が盛んに行われている。しかし、その多くは、神経回路網のシナプス接続様式および伝達特性の解明を目的としており、個々の神経細胞（ニューロン）がもつシナプス統合機能については、その解明が今後の課題として残されている。シナプス統合機能を規定する主要要因の一つは、樹状突起膜の受動的な電気的性質である。比較的少数の神経細胞からなる無脊椎動物の神経系は、個々の細胞を同定して、その膜性質を生理学的に解析することが可能であるという長所をもち、中枢細胞の樹状突起膜性質とそれぞれの行動制御での機能的役割との関連を明らかにするための有力な実験系を提供する。

本論文は、アメリカザリガニ *Procambarus clarkii* Girard の尾扇肢運動系・感覚系で機能が明らかにされている中枢細胞の樹状突起膜性質を生理学的、解剖学的に解析し、その行動制御での役割との関連を解明することを目的として行われた一連の研究結果をまとめたものである。ザリガニの尾扇肢は姿勢制御、歩行・遊泳、回避行動など多くの行動パターンで用いられ、すばやい運動のための速筋と持続的運動のための遅筋とを備えている。これら筋肉は、それぞれ異なる運動神経によって支配され、さらにこれら運動神経の活動は前運動性のノンスパイキング介在神経（NSI）によって制御される。本論文は、これら運動神経および介在神経の樹状突起が、それぞれ固有の膜性質を持つことを明らかにした。

実験には主として腹部神経系を単離して作製した *in vitro* 標本を用いた。ガラス管微小電極には蛍光色素 Lucifer Yellow を充填し、細胞に刺入して定電流注入実験を行った後に色素を電気泳動的に細胞内に注入し、その励起光を標本に落射照明することによって電極刺入部位を *in situ* の状態で確認した。細胞の入力抵抗および膜時定数の測定は、ステップ電流注入に対する細胞の電位応答の解析により行った。尾扇肢速筋を支配する相動性運動神経、遅筋を支配する緊張性運動神経のそれぞれ樹状突起統合部位で調べた結果、入力抵抗、膜時定数ともに、緊張性運動神経の方が相動性運動神経よりも統計的に有意に大きな値を示した。NSI は、相動性運動神経よりも有意に大きな入力抵抗と長い膜時定数を示した。また、NSI は、緊張性運動神経よりも有意に大きな入力抵抗を示したが、膜時定数については、両者の間で有意な差がみられなかった。異なる周波数の正弦波電流の注入実験により、相動性運動神経の樹状突起が低周波数の膜電位変動に対して低い興奮性を示すのに対し、緊張性運動神経は高周波変動に対して低い興奮性を示すことが判明した。NSI 樹

状突起の動特性は、緊張性運動神経と共通であった。

次に、尾扇肢機械感覚系に属する大型のNSIであるLDS細胞を用いて、樹状突起膜の受動的性質が細胞全域にわたって均一であるか否かを、各部位に電極を刺入して実験的に調べた。LDS細胞は、腹部最終神経節内で両側性に樹状突起を広げ、これらが中心線を横切る1本の太い横断突起によって結合されている。横断突起で測定される入力抵抗と時定数は、いずれも、両側の樹状突起周辺部で測定される値よりも統計的に有意に小さいことが判明した。入力抵抗は、注入部位から広がる電流が横切る膜面積に依存するので、注入部位近辺の膜面積が大きいほど小さくなると期待される。39例の実験における電極刺入部位の突起直径と入力抵抗との相関を調べた結果、統計的に有意な負の相関が認められた。一方、時定数は、膜の単位面積当たりの抵抗および容量によって決まり、膜面積には依存しない。樹状突起部位による時定数の差異は、これらのいずれかまたは両者の細胞部域による不均一性を示している。

以上の結果は、ザリガニ中枢神経細胞の樹状突起では、部域によって膜の受動的性質が異なるが、シナプス入力を取りまとめて出力を形成する統合部位からみると、細胞の樹状突起膜がそれぞれの機能的役割に応じた受動的性質をもつことを示している。これらの違いは、細胞活動の動特性に反映され、それぞれの細胞に固有の情報処理の基盤となると結論される。

これを要するに、著者は、これまで理論的研究で予測されていた樹状突起膜の受動的性質の細胞内不均一性を実験的に証明し、樹状突起の周辺部が統合部位よりも大きな入力抵抗と長い膜時定数をもつという新知見を得た。動物行動の制御にかかわる神経回路網の情報処理機構において、個々の細胞がその機能的役割に対応した固有の受動的膜性質をもつということを、同定細胞レベルではじめて明らかにした本研究は、動物行動の神経機構の解明を目指す神経行動学研究の発展に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。