

## 学位論文題名

Chemosensory Pathway and Synaptic Enhancement  
in Feeding Circuitry of *Lymnaea stagnalis*(ヨーロッパモノアラガイの咀嚼神経経路における末梢の  
化学受容経路および中枢のシナプス増強機構の解析)

## 学位論文内容の要旨

現在の神経生物学において、動物行動学から分子生物学に至るさまざまなメカニズムが多く動物の神経系を用いて研究されており、中でも神経系が比較的単純で個々の神経細胞が大きく取り扱いやすいという面から、軟体動物腹足類を用いた研究が進んでいる。しかし、この腹足類においてすら、嗅覚や味覚といった末梢神経系における化学受容に関与する神経処理機構は未だ解明されておらず、中枢神経系においても、シナプス伝達機構の解明には問題が山積みとなっている。本研究では、*Lymnaea stagnalis* (ヨーロッパモノアラガイ) の咀嚼応答に関与する神経伝達経路において、末梢での化学受容経路、および中枢におけるシナプス増強機構の解明に従事した。

第 1 章では、味覚嫌悪学習において重要な働きをする唇および触角からの味覚受容に関与する神経伝達経路を、組織学的手法により明らかにした。ヨーロッパモノアラガイを麻酔した後、個体全体をブアン液に 24 時間以上浸して固定することによって、神経束を他の組織と区別できるようにした。その後、解剖顕微鏡下で、唇および触角部分を解剖して、superior lip nerve, median lip nerve および tentacle nerve の分布を調べた。その結果、superior lip nerve は中枢神経系を出るとすぐに 2 つに分かれて、一方は主に口の周辺部分に分布し、もう一方は頭部背側に分布していた。median lip nerve は唇の中でも口から離れた部分に全体的に分布していた。また tentacle nerve は触角に分布しており、触角の伸縮に対応できるように神経束がジグザグ構造を成していることが新たにわかった。次に分子量 457 の lucifer yellow および分子量 10,000 の dextran-lucifer yellow の蛍光色素を用いて、摘出したヨーロッパモノアラガイの中枢神経系を神経束の切り口から染色し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡により観察した。咀嚼に関与する脳神経節と口球神経節において染色された神経細胞の分布を調べた結果、lucifer yellow によって染色された細胞と dextran-lucifer yellow によって染色された細胞とに、ほとんど差異は見られなかった。この結果は、神経束に直接軸索を伸ばす細胞とその細胞に投射する細胞との間には dye coupling がないことを意味し、それらの間にはギャップ結合による神経伝達経路は存在しないことを強く示唆するものであった。さらに 3 本のいずれの神経束から染色しても、咀嚼の調節介在神経細胞 (cerebral giant cell,

CGC) やこれまで同定されている咀嚼に関与する神経細胞は染色されず、味覚刺激は唇から CGC へ polysynaptic に入力されることも明らかになった。

第 2 章では、唇および触角からの味覚受容に関与する神経伝達経路を、電気生理学的に明らかにした。まずヨーロッパモノアラガイの唇、触角およびそれらの神経束からなる標本を用いて、細胞外記録による味覚刺激反応を測定した。味覚刺激には嗜好性刺激シヨ糖溶液 (100 mM) および忌避性刺激 KCl 溶液 (50 mM) を用い、唇および触角部分に灌流投与した。刺激に対する反応は、吸引電極によってそれぞれの神経束から測定した。その結果、シヨ糖刺激は主に唇で感受され、superior lip nerve を通して中枢神経系へ伝達されること、また KCl 刺激は唇および触角で感受され、2 つの lip nerve (superior lip nerve と median lip nerve) および tentacle nerve を通して CGC へ伝達されることが明らかになった。またヨーロッパモノアラガイの中枢神経系を含む頭部と前方腹部との semi-intact 標本を用いて、シヨ糖溶液 (100 mM) および KCl 溶液 (50 mM) を唇および触角に灌流投与したときの CGC の応答を細胞内記録した。その結果、シヨ糖刺激は superior lip nerve を介して CGC のスパイク頻度を上昇させ、KCl 刺激は激しくそのスパイク頻度をあげて発火させた。以上の結果から、superior lip nerve がシヨ糖の応答に最も関与していることが明らかとなり、これは第 1 章の組織学的解析結果とよく一致していた。

第 3 章では、中枢でのシナプス増強機構を調べるために、味覚入力を受ける介在神経細胞 (CGC) と、唾液分泌に関与する運動神経細胞 (B1 cell) との間のシナプス伝達効率変化について調べた。唾液腺に軸索を伸ばしている B1 cell は、CGC から monosynaptic な興奮性の入力を受けており、歯舌を伸ばす時期に同期して発火することが知られている。そこで、CGC へ電流注入することによってスパイクを 1 sec に 10 発誘起させ、これにより B1 cell で生じる複合 EPSP を CGC への cAMP 注入前後で測定した。その結果、注入後 3 時間後、有意に EPSP の振幅が増大することを見出した。この cAMP の効果は PKA の阻害剤である Rp-cAMPS によってコントロールレベル以下に抑えられたが、タンパク質合成阻害剤であるアニソマイシンやシクロヘキシミドによっては抑制されなかった。また cAMP を注入された CGC でのスパイク幅および静止電位などの電気生理学的特性には変化が見られなかった。さらに cAMP によって増強された複合 EPSP は、イオントロピック型のセロトニンレセプターの競合的拮抗剤である MDL 72222 によって濃度依存的に抑制されたことから、増強された EPSP は神経伝達物質の放出量が増加したためと考えられた。以上の結果から、cAMP による PKA の活性化によって、シナプス前細胞である CGC のシナプス末端からシナプス後細胞である B1 cell への神経伝達物質の放出量の増大が、シナプス増強を引き起こすことが明らかになった。

以上の研究結果は、軟体動物腹足類のみならず、多くの動物における味覚・嗅覚刺激に対する神経処理機構の解明に役立つものと期待される。さらに、咀嚼リズムの生成や味覚嫌悪学習の成立などを研究する上で、基礎的かつ重要な知見を与えるのみならず、もっと幅広く、脳の高次機能に関与する神経伝達経路におけるシナプス可塑性ならびにそれを素過程とする学習記憶機構全体の解明に、大きく貢献するものである。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浦 野 明 央  
副 査 教 授 高 畑 雅 一  
副 査 助 教 授 伊 藤 悦 朗

学 位 論 文 題 名

## Chemosensory Pathway and Synaptic Enhancement in Feeding Circuitry of *Lymnaea stagnalis*

(ヨーロッパモノアラガイの咀嚼神経経路における末梢の  
化学受容経路および中枢のシナプス増強機構の解析)

現在の神経生物学において、神経系が比較的単純で個々の神経細胞が大きく取り扱いやすいという面から、軟体動物腹足類を用いた研究が進んでいる。しかし、この腹足類においてすら、嗅覚や味覚といった末梢神経系における化学受容に関与する神経処理機構は未だ解明されておらず、中枢神経系においても、シナプス伝達機構の解明には問題が山積みとなっている。本論文は、*Lymnaea stagnalis* (ヨーロッパモノアラガイ) の咀嚼応答に関与する神経伝達経路において、末梢の化学受容経路および中枢のシナプス増強機構の解明を目的とした。

第 1 章では、ヨーロッパモノアラガイの唇および触角からの味覚受容に関与する神経伝達経路を、組織学的手法により明らかにした。唇と触角を解剖顕微鏡下で解剖した結果、superior lip nerve は主に口の周辺部分に分布し、median lip nerve は口から離れた部分に分布していることが明らかになった。また収縮した触角では、tentacle nerve はジグザグ構造を成すことが示された。次に、分子量 457 の lucifer yellow および分子量 10,000 の糖鎖付 lucifer yellow という蛍光色素を用いて、摘出した中枢神経系の 3 つの神経束 (superior lip nerve, median lip および tentacle nerve) の切り口から中枢神経系における神経細胞を back-fill 染色した。その結果、それぞれの神経束に直接軸索を伸ばす細胞と、その細胞に投射する細胞間には dye coupling がなく、ギャップ結合による神経伝達経路は存在しないことが強く示唆された。また、咀嚼に関与する調節介在神経細胞 cerebral giant cell (CGC) を含めて、同定されている咀嚼に関与する神経細胞は全く染色されず、味覚刺激は唇および触角から CGC へ polysynaptic に入力されることが明らかになった。

第 2 章では、唇および触角からの味覚受容に関与する神経伝達経路を、電気

生理学的に明らかにした。唇と触角に 3 つの神経束が接続している標本を用いて、嗜好性刺激であるシヨ糖溶液または忌避性刺激である KCl 溶液を唇と触角へ投与し、それぞれの神経束の切り口から細胞外記録によって応答を測定した。その結果、シヨ糖刺激は唇で感受され、主に superior lip nerve を通して中枢神経系へ伝達され、KCl 刺激は唇と触角で感受され、3 つの神経束すべてを通して中枢神経系へ伝達されることが明らかになった。また中枢神経系と前方腹部から成る semi-intact 標本を用いて、シヨ糖溶液および KCl 溶液を唇と触角に投与したときの CGC の応答を、細胞内記録によって測定した。その結果、シヨ糖刺激は主に superior lip nerve を介して CGC のスパイク頻度を上昇させ、KCl 刺激はすべての神経束を介して CGC を発火させることを見出した。以上の結果から、主に superior lip nerve が嗜好性の刺激に関与していることが明らかになった。

第 3 章では、中枢神経系におけるシナプス増強機構を調べるために、味覚入力を受ける調節介在神経細胞 (CGC) と、唾液分泌に関与する運動神経細胞 (B1 cell) との間のシナプス伝達における cAMP の効果について調べた。その結果、CGC への cAMP 注入後 3 時間で、B1 cell における EPSP の振幅が有意に増大することを見出した。さらに cAMP の効果は PKA の阻害剤である Rp-cAMPS によって抑制されるだけでなく、EPSP は cAMP の注入前の振幅以下に抑えられることも発見した。また cAMP が注入された CGC において、スパイク幅や入力抵抗などの電気的特性には変化がないこと、さらには EPSP の振幅増強はタンパク質合成を必要としないということもわかった。そして cAMP によって増強された EPSP が、CGC の神経伝達物質の競合的拮抗剤によって濃度依存的に抑制されたことから、EPSP の振幅増強は CGC からの神経伝達物質の放出量の増加によることが強く示唆された。以上の結果から、シナプス前細胞である CGC における PKA 活性が、神経伝達物質の放出量を調節し、シナプス増強を直接的に引き起こすことが明らかになった。

これを要するに、著者は、軟体動物腹足類の咀嚼神経経路において、その末梢での化学受容経路を明らかにし、中枢でのシナプス増強機構について新知見を得たものであり、これらの結果は、脳の高次機能に関与する神経伝達経路におけるシナプス可塑性、ならびにそれを素過程とする学習記憶機構全体の解明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。