

学 位 論 文 題 名

Neurophysiological studies on the synaptic integration
in an identified nonspiking interneuron of crayfish

（ザリガニ同定ノンスパイキング介在神経における
シナプス統合作用に関する神経生理学的研究）

学位論文内容の要旨

昆虫やザリガニなど無脊椎動物の中樞神経系では、ノンスパイキング介在神経（NSI）が多数報告されており、情報処理において重要な働きをされると考えられている。これらの細胞では、活動電位（スパイク）を発生することなく、シナプス電位が樹状突起膜を拡散し、その膜電位変化により、神経伝達物質の放出量を直接的に調節して、シナプス後細胞の活動を制御する。したがって、NSIの働きを理解するためには、シナプス入力が出力に変換される過程、すなわちシナプス統合作用がまず解明されねばならない。一般に、神経細胞におけるシナプス入力の統合は、（１）樹状突起の三次元形態および突起膜の受動的電気性質とに基づく細胞の電気緊張的構造、（２）前シナプス細胞からの神経伝達物質を受け取る受容体の性質、および（３）電位依存型イオンチャンネルなど膜の能動的生理性質、の三つの要因によって規定される。

アメリカザリガニの腹部神経系で同定されるLDS細胞は、その生理学的性質や解剖学的・電気緊張的三次元形態がよく知られている大型の機械感覚性NSIである。腹部最終神経節に左右一対のみ存在し、神経節の左右両側に伸びた細く枝分かれした樹状突起は、正中線付近の1本の太い樹状突起（直径約20 μ m）で互いに結合する。LDS細胞はその細胞体と同側の樹状突起において、尾扇肢及び尾角体表の水流機械感覚毛から単シナプス入力を受ける。入力シナプスはアセチルコリン（ACh）駆動性で、受容体は脊椎動物のニコチン型ACh受容体様の性質を示す。このシナプス活動で生じる脱分極性シナプス電位は、細胞体と反対側の樹状突起に拡散して、上行性の介在神経の活動を抑制し、刺激方向の検出能力を高める働きをされると考えられている。

本研究では、LDS細胞の樹状突起によるシナプス統合過程を調査し、その機能的役割との関連を解明することを目的として、電位依存型イオンチャンネルなど膜の能動的な生理性質を、単一ガラス管微小電極による不連続電流・電位固定法および薬物環流実験により定量的解析を行った。さらに、得られた実験結果に基づいて、LDS細胞のマルチコンパートメントモデルを作成し、コンピュータシミュレーションにより、樹状突起でのシナプス電位の時間的・空間的分布を調査した。

その結果、電位固定法によりLDS細胞樹状突起の膜電位を静止電位（約-65mV）から約20mV脱分極させると、一過性の外向き電流とそれに続く持続性の外向き電流が生じた。この二相性の外向き電流はTEA、4-APなどのイオンチャンネル阻害剤に対する感受性、活性化/不活性化の電位依存性および時間経過の違いなどから、持続性のK⁺コンダクタンス（ g_s ）の他に、2種類の脱分極依存性一過型K⁺コンダクタンス（ g_{I1} , g_{I2} ）に区別されることが明らかになった。持続性の g_s は20mM TEAによって阻害され、ゆっくりした活性化を示した（半増時間 > 5 msec）。また電位依存性不活性化は示さなかった。 g_{I1} はやはり20mM TEAによって阻害されるが、非常に素早い活性化/不活性化を示した（半増時間 < 0.92 msec ピーク時 < 2.5 msec, 半減時間 < 1.2 msec）。 g_{I2} は、 g_{I1} よりは遅いが g_s よりは素早い活性化を示したが（半増時間 < 1.94 msec, ピーク時 < 10.0 msec）、不活性化は g_{I1} よりゆっくりしていた（半減時間 > 131.8 msec）。これら

の一過型 K^+ コンダクタンスは、いずれも静止電位では不活性化されておらず、活性化/不活性化の電位依存性、およびその時間経過が今まで報告されている通常の一過型外向き電流とは異なる性質を示した。またこれらの3種類の K^+ コンダクタンスの動特性はHodgkin-Huxley型モデルで記述することができた。この K^+ コンダクタンスモデルを用いて、LDS細胞を単一の等電位コンパートメントとして近似して作成したモデルを用いて、定電流注入時の電位応答およびシナプス電位応答をシミュレーションした結果、脱分極性電流注入時に見られる外向き整流作用を現実の細胞応答とよく一致して再現することができた。ただし、感覚神経束を電気刺激した時のシナプス応答を計算した結果、スパイク状の脱分極と比較的ゆっくりした減衰を伴う特徴的なシナプス電位波形は、部分的な一致にとどまった。この結果は、LDS細胞の樹状突起でのシナプス電位分布が、膜性質のみならず、その三次元構造にも大きく影響されることを示す。

そこで次に、実験的に明らかになった樹状突起膜の能動的生理性質を、三次元形態計測に基づくLDS細胞のマルチコンパートメントモデルに組み込んで、シナプス活動および定電流注入に対する膜電位応答を計算した。その結果、感覚刺激によって誘起されるシナプス応答が、実際の細胞応答とよく一致して再現されるようになった。また、樹状突起末端に入力シナプスを想定し、シナプス電位の時空間的分布をシミュレーションした結果、3種類の K^+ コンダクタンスが活性化されない膜電位レベルで生じる過分極性のシナプス電位は、他の突起末端にまで伝播する過程で振幅が $9.6 \pm 0.61\%$ に減衰するとともに、ピークに達するまでの時間および半減時間がそれぞれ $474 \pm 5.5\%$ および $505 \pm 9.3\%$ に延長した。一方脱分極性のシナプス電位は、電位依存性 K^+ コンダクタンスの影響を受けて、振幅が $9.4 \pm 0.62\%$ に減衰したのに対し、ピークに達するまでの時間および半減時間の延長はそれぞれ $489 \pm 13.1\%$ 、 $452 \pm 12.5\%$ であった。脱分極、過分極性シナプスで見られたこれらの違いは半減時間のみ、統計的に有意であった($P < 0.05$; Student の両側 t 検定)。また連続的にシナプス入力が生じた場合、各シナプス電位は過分極性の場合、入力部位でははっきりと時間的に分離されたのこぎり歯状の波形であっても、樹状突起上を拡散する過程でシナプス電位の時間的加算が起り、持続的でなだらかな波形に変換された。一方、脱分極性の場合、電位依存性 K^+ コンダクタンスにより膜時定数が減少するため、のこぎり歯状の波形はその波形を維持して拡散することが示された。さらに、これらシナプス電位の時間的加算は、シナプス入力が生じる時の膜電位レベルにより異なることが示された。

LDS細胞は、静止電位レベルで脱分極性、過分極性いずれの入力をも受けることが知られている。本研究の結果から、LDS細胞の後シナプス細胞への抑制性出力は、背景入力として過分極性入力を受けることで修飾を受ける可能性が示唆された。今後は、ザリガニの行動状態によって、LDS細胞の持つ側抑制機能が変化する可能性が実験的に検討されなければならない。また、感覚神経に対するLDS細胞の特徴的なシナプス応答がシングルコンパートメントモデルとマルチコンパートメントモデルとでは大きく異なっていたという今回のシミュレーション結果は、NSIでのシナプス電位の時空間的加算が樹状突起膜の能動的な性質だけでなくその三次元構造によっても大きく影響を受けることを初めて理論的に証明したものである。本研究は、実際の実験結果に基づくモデルを用いたシミュレーションが、神経細胞の機能を調査する上で強力な方法となりうることを示している。

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

Neurophysiological studies on the synaptic integration in an identified nonspiking interneuron of crayfish

(ザリガニ同定ノンスパイキング介在神経における
シナプス統合作用に関する神経生理学的研究)

近年、昆虫やザリガニなど無脊椎動物の中樞神経系では、ノンスパイキング介在神経(NSI)が多数報告されており、情報処理において重要な働きをされていると考えられている。NSIは、活動電位(スパイク)を発生せず、樹状突起膜上を拡散するシナプス電位が、直接的に神経伝達物質の放出量を調節してシナプス後細胞の活動を制御する。従って、NSIの働きを理解するためには、シナプス入力がシナプス出力に変換される過程、すなわちシナプス統合作用がまず解明されねばならない。

本研究では、アメリカザリガニの腹部神経系で同定されるLDS細胞の樹状突起膜が有する電位依存型コンダクタンスを、単一ガラス管微小電極を用いた不連続電流・電位固定法および薬物環流実験により定量的解析を行い、その機能的役割との関連を調査した。さらに、得られた実験結果に基づいて、LDS細胞のマルチコンパートメントモデルを作成し、計算機シミュレーションにより、樹状突起でのシナプス電位の時間的・空間的分布を実験結果と比較して調査した。

その結果、電位固定法によりLDS細胞樹状突起の膜電位を静止電位(約-65mV)から約20mV脱分極させると、一過性の外向き電流とそれに続く持続性の外向き電流が生じた。この二相性の外向き電流はTEA、4-APなどのイオンチャネル阻害剤に対する感受性、活性化/不活性化の電位依存性および時間経過の違いなどから、持続型の K^+ コンダクタンスの他に、2種類の脱分極依存性一過型 K^+ コンダクタンスに区別されることが明らかになった。持続型の K^+ コンダクタンスはTEAによって阻害され、ゆっくりした活性化を示した。また電位依存性不活性化は示さなかった。一方の一過型 K^+ コンダクタンスはやはりTEAによって阻害されるが、非常に素早い活性化/不活性化を示した。他方の一過型 K^+ コンダクタンスは、もう一方よりは活性化、不活性化ともにゆっくりした時間経過を示した。これらの一過型 K^+ コンダクタンスは、いずれも静止電位では不活性化されておらず、活性化/不活性化の電位依存性、

およびその時間経過が今まで報告されている通常の一過型外向き電流とは異なる性質を示した。またこれらの3種類の K^+ コンダクタンスの動特性はHodgkin-Huxley型モデルで記述することができた。この K^+ コンダクタンスモデルを用いて、LDS細胞を単一の等電位コンパートメントとして近似して作成したモデルを用いて、定電流注入時の電位応答およびシナプス電位応答を計算した結果、脱分極性電流注入時に見られる外向き整流作用を現実の細胞応答とよく一致して再現することができた。ただし、感覚神経束を電気刺激した時のシナプス応答を計算した結果、スパイク状の脱分極と比較的ゆっくりした減衰を伴う特徴的なシナプス電位波形は、部分的な一致にとどまった。この結果は、LDS細胞の樹状突起でのシナプス電位分布が、膜性質のみならず、その三次元構造にも大きく影響されることを示す。

そこで次に、実験的に明らかになった樹状突起膜の能動的生理性質を、三次元形態計測に基づくLDS細胞のマルチコンパートメントモデルに組み込んで、シナプス活動および定電流注入に対する膜電位応答を計算した。その結果、感覚刺激によって誘起されるシナプス応答が、実際の細胞応答とよく一致して再現されるようになった。また、樹状突起末端に入力シナプスを想定し、シナプス電位の時空間的分布をシミュレーションした結果、3種類の K^+ コンダクタンスが活性化されない膜電位レベルで生じる過分極性のシナプス電位は、他の突起末端にまで伝播する過程で振幅が大きく減衰するとともに、ピークに達するまでの時間および半減時間が延長した。一方脱分極性のシナプス電位は、電位依存性 K^+ コンダクタンスの影響を受けて、振幅が同様に減衰したのに対し、ピークに達するまでの時間および半減時間には過分極性ほどの延長は見られなかった。脱・過分極性シナプス活動間のこれらの違いは、統計的に有意であった。また連続的シナプス入力が生じた場合、各シナプス電位は過分極性の場合、入力部位でははっきりと時間的に分離されたのこぎり歯状の波形であっても、樹状突起上を拡散する過程でシナプス電位の時間的加算が起これ、持続的でなだらかな波形に変換された。一方、脱分極性の場合、電位依存性 K^+ コンダクタンスにより膜時定数が減少するため、のこぎり歯状の波形はその波形を維持して拡散した。さらに、これらシナプス電位の時間的加算は、シナプス入力時の膜電位レベルにより異なることが示された。

LDS細胞は、静止電位レベルで脱分極性、過分極性いずれのの入力をも受けることが知られている。本研究の結果から、LDS細胞の後シナプス細胞への抑制性出力は、バックグランド入力として過分極性入力を受けことで修飾を受ける可能性が示唆された。今後は、ザリガニの行動状態によって、LDS細胞の持つ側抑制機能が変化する可能性が実験的に検討されなければならない。また、感覚神経に対するLDS細胞の特徴的なシナプス応答がシングルコンパートメントモデルとマルチコンパートメントモデルとでは大きく異なっていたという今回のシミュレーション結果は、NSIでのシナプス電位の時空間的加算が樹状突起膜の能動的な性質だけでなくその三次元構造によっても大きく影響を受けることを初めて理論的に証明したものである。本研究は、実際の実験結果に基づくモデルを用いたシミュレーションが、神経細胞の機能を調査する上で強力な方法となりうることを示している。

これを要するに、著者はNSIの樹状突起におけるシナプス統合作用に関して、実験的新知を得るとともに、計算機シミュレーションによってその機能的意義を明らかにしたものであり、行動制御におけるNSIの働きに関する神経生理学的理解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。