

学 位 論 文 題 名

Quantitative Analyses of Anatomical and Electrotonic Structures
of Local Spiking and Nonspiking Interneurons
by Three-Dimensional Morphometry in Crayfish

(ザリガニ局在性介在ニューロンの三次元形態計測による
解剖学的及び電気緊張的構造の定量的解析)

学位論文内容の要旨

無脊椎動物の中樞神経系では、ノンスパイク介在ニューロン(NSI)という神経細胞集団の存在が数多く確認されているが、中樞情報処理におけるその機能的意義については、不明の点がまだ多く残されている。NSIでの情報処理では、活動電位ではなく段階的なシナプス電位が用いられる。シナプス電位の細胞上での空間、時間的広がり、細胞の樹状突起の電気緊張的構造によって基本的に規定される。電気緊張的な特性は樹状突起膜の受動的性質と三次元的構造に依存する。しかし、特に後者については従来の光学顕微鏡による解析では十分な調査が困難であったため、樹状突起構造の三次元的な解析はNSIの機能を調べる上でまず取り組まれるべき重要な課題であった。

アメリカザリガニ *Procambarus clarkii* Girard の腹部最終神経節では、感覚情報処理系および運動制御系でNSIが働いている。感覚情報処理系で同定されるNSIであるLDS細胞は、神経節の両側に樹状突起を伸ばし、片側で尾扇体表の水流機械感覚毛から興奮性単シナプス入力を受け、反対側の上行性介在ニューロンを抑制することで、刺激方向の検出能力を高めると考えられている。一方、運動系でも多数のNSIが報告されているが、クラスターを形成するため個々の同定はされていない。これらの細胞の樹状突起は神経節の片側にとどまっている。主に下行性介在ニューロンから入力を受け取り、尾扇肢筋肉を神経支配する運動神経の活動を直接コントロールすることから前運動性のNSIと呼ばれている。加えて、腹部最終神経節では、感覚情報処理系において、活動電位を発生する局在性スパイク介在ニューロンが働いていることも確認されているが、感覚情報処理系においてスパイクを発生するものとししないものの両方が働いていることの機能的意義は未だ不明である。

本研究では、腹部最終神経節に存在するNSI及び局在性スパイク介在ニューロンの機能的意義を解明する事を目的として、これら介在ニューロンの解剖学的および電気緊張的構造を定量的に解析した。第1章においては、感覚性の同定NSIであるLDS細胞の三次元形態と受動的膜性質を定量的に調査するとともに、その個体間変異の調査を行った。三次元形態計測は、蛍光色素 Lucifer yellow を細胞内注入した細胞に共焦点レーザー顕微鏡を適用して得られた光学的連続切片を用い、個々の樹状突起の直径・長さ、神経節内での空間的位置を三次元的に計測した。樹状突起は、異なる直径と長さ、座標を持つ円筒の集合体とし

て近似し、細胞形態の三次元的な再構成を行った。また、樹状突起の長さ、直径、分岐のパターンを反映したデンドログラムを作成した。今回の調査では、LDS細胞は418～823個の円筒で表された。

13個のLDS細胞を元にした三次元形態の定量的な調査の結果、樹状突起の総膜面積、解剖学的長さの合計、神経節の中心線から末端に至るまでの平均の実長、総分岐数などにおいて、個体間変異が観察された。また、樹状突起の神経節内における空間的な分布を調べた結果、中心の太い突起とその両端から直接分岐する4本の主要な突起がほぼ同様の空間配置をとる一方、入出力シナプスが存在する末梢の突起になるほど、その分布はばらつくことが明らかになった。上述の個体間変異の他に、各個体に共通した性質も明らかになった。神経節中心線から見て細胞体が存在する側の樹状突起とその反対側の樹状突起の比較を行ったところ、細胞体側の突起は、長さ、分岐数、面積のいずれにおいても反対側のそれを有意に上回っているという点で各個体とも共通していた。さらに、電気生理学的手法によって明らかになった細胞の受動的膜性質と樹状突起の三次元構造に基づいて、樹状突起電気緊張的距離を表すデンドログラムも作成した。その結果、解剖学的構造における個体間変異は電気緊張的構造にも反映されている事が明らかになり、LDS細胞はその形態的な変異と関連して、シナプス統合作用における機能的な変異を持つ可能性が示された。

本論文の第2章においては、前運動性NSIの解剖学的及び電気緊張的構造を、第1章と同じ手法によって解析した。前運動性NSIの樹状突起は細胞体の位置などによってAL細胞とPL細胞の2つに大きく分類されているが、これまで両者の樹状突起の形態的・電気緊張的な構造の差異は定量的に明らかにされてはいなかった。定量的な解析の結果、AL細胞とPL細胞は非常に類似した樹状突起の分布および解剖学的構造を持つことが明らかになった。また、三次元形態計測値および受動的膜性質に基づき、定常状態における樹状突起上での電位減衰率を計算した結果、樹状突起の肥部分から末端方向及びその逆方向での電位減衰率において両者に統計的な違いは見られず、電気緊張的構造においても両者の細胞は非常に類似していることが示された。次に感覚性NSIであるLDS細胞と前運動性NSIとの間で、樹状突起の解剖学的・電気緊張的構造の比較を行った。その結果、解剖学的構造においてLDS細胞は前運動性NSIと比較して比較的単純で大きな解剖学的構造を持つ事が明らかになった。樹状突起の肥厚部位から末端方向および逆方向での電位減衰率は、LDS細胞が前運動性NSIより大きな値を示し、電気緊張的にも大きな構造を持っていることが明らかになった。一方、樹状突起の膜時定数は、前運動性NSIがLDS細胞を有意に上回っていた。この結果は、断続的なシナプス入力を持続的な膜電位変化に変換する樹状突起のシナプス平滑化作用が、前運動性NSIにおいてより強いことを示しており、前運動性NSIが運動ニューロンの全般的な背景興奮性を調節していると言う仮説を支持している。

本論文第3章では、局在性スパイク介在ニューロンの解剖学的・電気緊張的構造を定量的に明らかにし、NSIとの間での比較を行った。局在性スパイク介在ニューロンは、一見したところ、NSIと同様の解剖学的構造を示す。樹状突起が神経節両側に広がるタイプと片側に留まるタイプが存在し、両タイプとも、NSIと同様に明確な軸索構造を持たない。三次元形態計測による定量的解析の結果、局在性スパイク介在ニューロンは、樹状突起肥厚部分から樹状突起末端までの平均の距離において、感覚性・前運動性のNSIのいずれよりも有意に大きいことが明らかになった。すなわち、NSIと較べて細い突起がよく発達していることを示す。また、膜の受動的性質において、局在性スパイク介在ニュー

ロンはNSIと比較して有意に小さい膜時定数を持つことも分かった。定常状態解析の結果、局在性スパイクンク介在ニューロンの樹状突起上での電位減衰率は、NSIと較べると有意に大きいことが判明した。局在性スパイクンク介在ニューロンのこの巨大な電気緊張的構造は、活動電位すなわち樹状突起膜の興奮性によって補償されていると考えられる。ただし、活動電位は信号の伝播のためではなく、情報処理様式の一つとして機能すると考えられる。

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 伊 藤 悦 朗

学 位 論 文 題 名

Quantitative Analyses of Anatomical and Electrotonic Structures of Local Spiking and Nonspiking Interneurons by Three-Dimensional Morphometry in Crayfish

(ザリガニ局在性介在ニューロンの三次元形態計測による
解剖学的及び電気緊張的構造の定量的解析)

近年、無脊椎動物の中樞神経系では、ノンスパイキング介在ニューロン (NSI) と呼ばれる活動電位 (スパイク) を発生しない神経細胞集団が数多く確認されているが、中枢情報処理におけるその機能的意義については、不明の点がまだ多く残されている。NSIでの情報処理では、活動電位ではなく段階的なシナプス電位が用いられる。従ってNSIの働きを理解するためには、細胞上でのシナプス電位の空間・時間的分布を規定する樹状突起の電気緊張的構造がまず解明されなければならない。

本研究では、アメリカザリガニ腹部最終神経節に存在するNSIの機能的意義の解明を目的として、その解剖学および電気緊張的構造を、三次元形態計測と神経生理学実験により、定量的に解析した。さらに、同神経節内で、NSIと同様の局在性形態を示すスパイクンク介在ニューロンについてもその解剖学および電気緊張的解析を行い、局在性細胞における活動電位の機能的意義を調査した。

その結果、まず、感覚性の同定NSIであるLDS細胞が、樹状突起の解剖学的構造において一定の個体間変異を示すことが判明した。特に、神経節中心腺付近の太いセグメントとその両端から直接分岐する4本の主要な突起がほぼ同様の空間配置をとる一方、入出力シナプスが存在する末梢の突起になるほど、その分布はばらつくことが明らかになった。また、上述の個体間変異の他に、各個体に共通した性質も明らかになった。細胞体が存在する側の樹状突起とその反対側の樹状突起の比較を行ったところ、細胞体側

の突起は、長さ、分岐数、面積のいずれにおいても反対側のそれを有意に上回っているという点で各個体とも共通していた。さらに、電気生理学的手法によって明らかになった細胞の受動的膜性質と樹状突起の三次元構造に基づいて、樹状突起電気緊張的距離を表すデンドログラムも作成した。その結果、解剖学的構造における個体間変異は電気緊張的構造にも反映されている事が明らかになり、LDS細胞はその形態的な変異と関連して、シナプス統合作用における機能的な変異を持つ可能性が示された。

また、前運動性のNSIは、細胞体の位置などによってAL細胞とPL細胞に大別されるが、定量的解析の結果、両細胞は非常に類似した樹状突起の分布および解剖学的構造を持つことが明らかになった。三次元形態計測値及び受動的膜性質に基づき、定常状態における樹状突起上での電位減衰率を計算した結果、樹状突起の肥厚部分から末端方向及びその逆方向での電位減衰率において両者に統計的な違いは見られず、電気緊張的構造においても両者の細胞は非常に類似していることが示された。感覚性のLDS細胞と前運動性NSIとの間で、樹状突起の解剖学的・電気緊張的構造の比較を行った結果、解剖学的構造においてLDS細胞は前運動性NSIと比較して比較的単純で大きな解剖学的構造を持つ事が明らかになった。樹状突起の肥厚部位から末端方向および逆方向での電位減衰率は、LDS細胞が前運動性NSIより大きな値を示し、電気緊張的にも大きな構造を持っていることが明らかになった。一方、樹状突起の膜時定数は、前運動性NSIがLDS細胞を有意に上回っていた。この結果は、断続的なシナプス入力を持続的な膜電位変化に変換する樹状突起のシナプス平滑化作用が、前運動性NSIにおいてより強いことを示しており、前運動性NSIが運動ニューロンの全般的な背景興奮性を調節していると言う仮説を支持している。

局在性スパイクンク介在ニューロンは、一見、NSIと同様の解剖学的構造を示す。三次元形態計測による定量的解析の結果、局在性スパイクンク介在ニューロンは、樹状突起肥厚部分から樹状突起末端までの平均の解剖学的距離において、感覚性・前運動性のNSIのいずれよりも有意に大きいことが明らかになった。また、膜の受動的性質において、局在性スパイクンク介在ニューロンはNSIと比較して有意に小さい膜時定数を持つことも分かった。定常状態解析の結果、局在性スパイクンク介在ニューロンの樹状突起上での電位減衰率は、NSIと較べると有意に大きいことが判明した。局在性スパイクンク介在ニューロンのこの巨大な電気緊張的構造は、活動電位すなわち樹状突起膜の興奮性によって補償されていると考えられる。ただし、活動電位は信号の伝播のためではなく、情報処理様式の一つとして機能すると考えられる。

これを要するに、著者は、NSI樹状突起のシナプス統合作用の基盤となる電気緊張的構造を確立するとともに、局在性ニューロンでの樹状突起形態と活動電位発生機能との関連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。