

学 位 論 文 題 名

Physiological Roles of Neural Oscillatory Activity  
in Olfactory Processing  
in the Terrestrial Slug *Limax marginatus*

（チャコウラナメクジの嗅覚情報処理における  
神経電位振動の生理学的役割）

学位論文内容の要旨

動物が外界の情報を認識し価値判断を下すプロセスには、まず外界の情報が脳内で表現され、さらに高次な処理を行う脳部位において抽出・計算されることが必要である。例えば、脊椎動物の嗅覚系においては、嗅球がにおい情報を表現し、さらに嗅皮質がその情報を計算する。におい情報の価値判断の計算原理を神経回路レベルから理解するためには、神経回路の組織学的同定と生理学的解析が不可欠である。しかし、嗅皮質についてはその構造の複雑さからそれらの知見が限られている。そのため嗅覚神経系に種を越えて共通な計算原理を、より神経系が単純な動物をモデルとして明らかにすることが求められており、それによって得られた結果は、より複雑な神経系での実験デザインにも大いに役立つであろう。軟体動物腹足類であるチャコウラナメクジ *Limax marginatus* は、外界認識を嗅覚に依存するため、におい認識能力が発達している。一方、嗅覚中枢である前脳葉は、他の脳領域と明確な解剖学的区別があり、その神経回路も比較的規則的で一様であると考えられており、上記のモデル動物として最適である。この前脳葉については、これまで国内外のグループによって多くの解析がすでに行われているため、主に本研究では、におい受容器官に存在する末梢の嗅覚神経組織である触角神経節について、生理学的・組織学的研究を行い、両者の関係を理解することを目指した。

第1章では、嗅覚末梢神経系と嗅覚中枢との関係を生理学的に解析した。嗅覚中枢である前脳葉には、神経細胞集団の自発的な電位振動が存在し、その周波数はおよそ0.7 Hzで一定である。この周波数はナメクジが好きなにおいを与えると増加し、嫌いなにおいでは減少するというように、においの好き嫌いとの相関が示されている。そこで、この周波数変化を起こす神経細胞を推定するために、触角神経節のさまざまな部位に対して局所的電気刺激を行った。触角神経節は触角先端の内部に存在し、触角先端にあるにおいを受容する嗅上皮とは触角神経節から指状に分岐しながら伸びる触角神経束（digits）によって接続されている。このdigitsの表面は神経細胞が覆い、嗅細胞や嗅覚介在神経細胞が含まれると予想される。このdigitsへの電気刺激は、前脳葉の電位振動の周波数を変化させた。また、周波数変化は刺激部位により異なった。ナメクジはそれぞれ一対の大触角・小触角があるが、大触角ではdigitsのすべての刺激部位において周波数を有意に増加させた。小触角では、一番分岐が進んだ先端部では周波数を有意に増加させたが、触角神経節側に近づいた中間部・基部では周波数を有意に減少させた。これらの結果は、周波数変化に関与する出力神経細胞がdigitsに存在していること、また小触角が嫌いなにおいの認識により深く関与する可能性を示唆している。

第2章では、第1章で推定された前脳葉へにおい情報を送る出力細胞についてその種類、形態、分布を組織学的に解析した。触角神経節と前脳葉は触角神経束によって接続されている。この触角神経束の断端から蛍光色素Lucifer yellowを取り込ませることにより、神経細胞の逆行性染色を行った。その結果、触角神経節およびdigitsに2種類の介在神経細胞（それぞれサブタイプが2つ）、2種類の感覚神経細胞およびその他2種類の神経細胞が発見された。これらサブタイプを含めた計8種類の神経細胞の分布、大きさ、形態には、大触角と小触角との間で違いがなかった。計8種の内4種類は、近縁種において相当する細胞が報告されておらず、本研究により新規に同定された。

第3章では、この触角神経節から前脳葉への出力について、触角神経束断端から細胞外記録を行い、におい刺激応答の解析を行った。触角神経束からも、前脳葉と同様に、におい刺激のない状態でも自発的な電位振動が記録された。周波数解析によると、0.6-6 Hzの周波数帯に最もパワーがあった。嗅上皮へのにおい刺激（エタノール）は、この0.6-6 Hzの振幅を有意に減少させた。一般に神経細胞の同期振動に関わっている $\gamma$ -アミノ酪酸（GABA）の関与をアンタゴニストであるbicucullineやpicrotoxinを用い解析した。その結果、アンタゴニストは電位振動の振幅を減少し、におい応答も阻害した。以上の結果より、触角神経節にはにおい情報処理に関与するGABA作動性の振動性回路の存在が明らかになった。

第4章では、第3章での解析をさらに進め、GABAの他に軟体動物腹足類において抑制性の伝達物質として知られるグルタミン酸（Glu）、アセチルコリン（ACh）についても同様の解析を行った。AChに関しては、昆虫の研究から嗅細胞の興奮性伝達物質の可能性もある。その結果、GluのアンタゴニストであるPVP-25によっても自発的電位振動の振幅の減少と、におい応答の阻害が起こった。AChのアゴニストであるツボクラリンは、自発的な電位振動の振幅をわずかに有意に減少し、におい応答もばらつきが大きくなり有意な振幅減少がなくなった。これらの結果は、におい応答に関わっている神経回路へのGluとAChの関与を示している。

また、digits、触角神経節、触角神経束から同時記録を行い解析した。周波数解析により、15 Hz以下の周波数に3つの部位に共通にパワーが存在した。この比較的低い周波数帯は前脳葉にも共通であり、チャコウラナメクジの嗅覚神経系全体に重要であることが分かった。次に、触角神経束での自発的電位振動の源を調べるため、digitsを触角神経節から切断した。その結果、触角神経束の電位振動は非常に弱くなったが、切断されたdigitsは電位振動を続けていた。従って、digitsが触角神経束の電位振動を駆動していることが示唆された。

さらに、digitsと触角神経束から同時記録を行い、GABA、GluおよびAChについてのアゴニストおよびアンタゴニストの灌流投与（4分）を行い電位振動への影響を調べた。その結果、触角神経束では0.6-6 Hzの振幅が、bicucullineを除きすべてのアゴニストとアンタゴニストで減少した。ただしbicucullineもさらに長く与えると減少に転じた。しかし、digitsではGABAとツボクラリン以外の薬はこの周波数を上昇させる傾向にあった。触角神経束の0.6-6 Hzの減少には、digitsでの0.6-6 Hzの減少、あるいはdigitsの0.6-6 Hzおよび6-30 Hzの上昇が伴った。このことは2通りの減少の機構が存在することを示唆している。また触角神経束に変化はdigitsでの変化を伴い、digitsが振動の源であることがここでも支持された。以上の結果は、digitsでの振動変化に起因する触角神経束での振動変化が、前脳葉への活動電位発生に対して影響を与える可能性があることを示している。

以上の研究結果は、軟体動物のみならず、ほ乳類を含め多くの脳領域で観察はされているもののその生理学的機能が全く不明である低い周波数成分の機能的役割について大きな示唆を与えるものである。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浦 野 明 央

副 査 教 授 小 池 達 郎

副 査 教 授 高 畑 雅 一

副 査 助 教 授 伊 藤 悦 朗

## 学 位 論 文 題 名

### Physiological Roles of Neural Oscillatory Activity in Olfactory Processing in the Terrestrial Slug *Limax marginatus*

(チャコウラナメクジの嗅覚情報処理における  
神経電位振動の生理学的役割)

においの情報はまず末梢嗅覚神経系に表現され、さらに嗅覚中枢により価値判断などの高度な情報処理が行われる。この計算原理を神経回路レベルで理解するためには、神経回路の組織学的同定と生理学的解析が不可欠である。しかし、ほ乳類の嗅皮質についてはその構造の複雑さから知見が限られてため、嗅覚神経系に種を越えて共通な計算原理を、神経系がより単純な動物をモデルとして明らかにすることが求められる。軟体動物腹足類であるチャコウラナメクジ *Limax marginatus* は、におい認識能力が発達しており、その嗅覚中枢である前脳葉は、その神経回路が規則的で一様なため、上記のモデル動物として最適である。前脳葉は、これまで多くの解析がされているため、本研究ではにおい受容器官に存在する触角神経節について生理学的・組織学的研究を行い、両者の関係を理解することを目指した。

第1章では、嗅覚末梢神経系と嗅覚中枢との関係について生理学的に解析した。前脳葉には、神経細胞集団の自発的電位振動が存在し、その周波数は約0.7 Hzで一定である。この周波数はにおい刺激で変化する。そこでこの周波数変化を起こす神経細胞を、触角神経節のさまざまな部位に局所的な電気刺激を行い推定した。その結果、周波数変化に関与する出力神経細胞が嗅上皮と触角神経節を接続する触角指状神経束 (digits) 上に存在することが明らかになった。

第2章では、第1章で推定された前脳葉へにおい情報を送る出力細胞について組織学的解析を行った。触角神経節と前脳葉を接続する触角神経束の断端から蛍光色素Lucifer yellowを取り込ませ、神経細胞を逆行性染色した。その結果、触角神経節およびdigitsに2種類の介在神経細

胞（サブタイプが2つずつ），2種類の感覚神経細胞およびその他2種類の神経細胞が染色された．大触角と小触角との間で染色された神経細胞の分布，大きさ，形態に違いはなかった．サブタイプ含め計8種類の内4種類が本研究により新規に同定された．

第3章では，この触角神経節から前脳葉への出力について，触角神経束断端から細胞外記録を行い，におい刺激応答の解析を行った．周波数解析によると0.6-6 Hzの周波数帯に最もパワーがあり，におい刺激（エタノール）は，この周波数帯の振幅を有意に減少させた．一般に神経細胞の同期振動に関わっている $\gamma$ -アミノ酪酸（GABA）の関与をアンタゴニストであるbicucullineやpicrotoxinを用いて解析した．その結果，アンタゴニストは電位振動の振幅を減少し，におい応答も阻害した．以上の結果は，におい情報処理に関与するGABA作動性の振動回路が触角神経節に存在することを示している．

第4章では，第3章での解析をさらに進め，GABAの他に軟体動物腹足類において抑制性の伝達物質であるグルタミン酸（Glu），アセチルコリン（ACh）についても同様の解析を行った．その結果，Glu，AChも正常なにおい応答に必要なことが分かった．

またdigits，触角神経節，触角神経束，前脳葉の電位振動について周波数解析を行った．その結果，15 Hz以下の周波数帯には共通にパワーがあり，嗅覚神経系全体に重要な周波数帯であることが分かった．次に，触角神経束で記録される電位振動の源を調べるため，digitsを触角神経節から切断した．その結果，触角神経束の電位振動は非常に弱くなったが，切断されたdigitsは電位振動を続けていた．従って，digitsが触角神経束の電位振動を駆動することが示唆された．

さらに，digitsと触角神経束から同時記録を行い，GABA，GluおよびAChについてのアゴニストとアンタゴニストの灌流投与（4分）を行い電位振動への影響を調べた．その結果，アゴニストおよびアンタゴニストによって触角神経束での0.6-6 Hzの減少が起き，それにはdigitsでの0.6-6 Hzの減少，あるいは0.6-6 Hzと6-30 Hzの上昇が伴っていた．このことは，触角神経束の0.6-6 Hzの減少機構には2通りあることを示唆している．以上の結果は，digitsでの振動変化に起因する触角神経束での振動変化が，前脳葉への活動電位発生に対して影響を与える可能性があることを示している．

これを要するに，著者は，軟体動物腹足類において嗅覚情報処理機構についての新知見を得たものであり，これらの結果は，軟体動物腹足類のみならず多くの動物における感覚情報処理機構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．