

学 位 論 文 題 名

Neurophysiological analysis of modulatory mechanism for habituation of LG-mediated escape behavior of the crayfish

(ザリガニ逃避行動馴化の修飾機構に関する神経生理学的解析)

学位論文内容の要旨

動物はある特定の刺激に対して定型的な行動を多く示すが、その応答は環境条件の変化、動物の内的状態、及び学習・経験等によって修飾され、より適応的に変化する。ザリガニをはじめとする節足動物は、脊椎動物に比べ比較的単純な神経系を持ち、定型的な行動をよく示す一方、状況に応じて十分に複雑・多様な行動バリエーションを示すため、行動の発現・修飾の神経機構を解明する上で理想的な実験動物である。本研究では、ザリガニが尾部への強い機械的刺激に対して示す逃避行動が繰り返し刺激によって起こらなくなる現象“馴化”について、それがどのような神経機構で起こり、修飾され、保持されるのか神経生理学的・薬理学的手法を用いて解析した。

尾部への強烈な刺激に対しザリガニは、腹部を素早く屈曲させ、刺激源から遠ざかる逃避行動を示す。この行動は腹部を縦走する一対の巨大神経 Lateral Giant (LG) によって制御されており、LG 逃避と呼ばれる。繰り返し刺激を与えると、LG は突然スパイク応答なくなり、逃避行動が起こらなくなる。これを逃避行動の馴化と呼び、一般に最も単純な学習の一例であると考えられている。尾部への刺激は機械感覚毛によって受容され、直接電気シナプスを介して LG へ (α 成分)、或いは化学シナプスを介して上行性介在神経へ興奮性のシナプス電位 (EPSP) として伝えられる。そして介在神経は電気シナプスを介して LG と接続しており、 β 成分と呼ぶ EPSP を生じさせることが知られている。馴化の成立機構については、1970 年代に提唱された「LG 応答の消失は機械感覚神経-介在神経間の化学シナプスの伝達効率が、繰り返し刺激によって減少し、介在神経が応答しなくなること」に起因する。」というモデルが、これまで盲目的に信じられてきた。

しかし、i) 当時は局所介在神経をはじめ、現在同定されている感覚性介在神経の殆どが知られておらず、また、ii) 繰り返し刺激に用いられた刺激強度も実際に LG がスパイク応答を示す強度よりもかなり弱かったため、実際に馴化が起こる際の介在神経の応答がどのように変化するのかは不明のままであった。そこで、LG が発火するのに十分な刺激強度で刺激を与え、馴化成立前後の感覚性介在神経の応答変化を解析したところ、LG のスパイクが消失し、馴化が成立しても、全ての感覚性介在神経において、大きな応答の減少は見られなく、従来のモデルでは馴化を説明できないことが明らかになった。LG 発火直前の刺激強度に対し、実際には LG が $\alpha \cdot \beta$ 成分の間に第三の EPSP 成分 (α' 成分) が新たに加わる、3 段階の応答変化を示すことを見出した。① この α' 成分がみられるようになって初めて LG がスパイク応答できること、② 繰り返し刺激に対し LG が馴化を示す時、この α' 成分の振幅が極端に減少していること、③ LG への過分極電流注入により α' 成分のシナプス電位の振幅だけが選択的に増大すること、④ 感覚神経の神経伝達物質であるアセチルコリンの拮抗薬灌流下では、 α' 成分のシナプス電位の振幅が可逆的に減少すること、⑤ 尾扇肢単一感覚毛刺激実験により、機械感覚神経の一部は LG にダイレクトな化学シナ

プスを形成していることを明らかにした。つまり、LG に対し直接化学シナプス介して接続する機械感覚神経が α' 成分を形成し、繰り返し刺激によってこのシナプスの伝達効率が低下することで馴化が起こるのである。

ザリガニは個体間の闘争により優位・劣位といった社会的地位を形成し、これによって闘争行動を始め様々な行動が修飾される。優位個体は劣位個体を常に追いかけて回し、劣位個体は優位個体が接近すると、すぐにその場から立ち去る。そこで、優劣といった社会的地位が馴化の成立過程に及ぼす影響を解析したところ、① 単独飼育個体に比べ、劣位個体では馴化成立までの過程が著しく遅れた、② 予想に反し、優位個体の馴化成立までの過程も単独飼育個体に比べ有意に遅くなっていることを明らかにした。

甲殻類において生体アミンの一種であるセロトニン・オクトパミンが優劣形成に深く関与していると考えられており、生体内へのセロトニン投与により優位個体様の、オクトパミン投与により劣位個体様の姿勢が生じる。そこで、セロトニン・オクトパミンが馴化成立過程にどのような修飾作用を及ぼすか調べたところ、① セロトニン・オクトパミン存在下では優劣個体同様に馴化が成立するまでにより多くの刺激の試行回数が必要であった。セロトニン・オクトパミンによるこの馴化の成立過程の遅れは感覚刺激に対する LG のシナプス応答の増強に起因していた。さらに、② 二次メッセンジャーである cAMP 存在下では馴化の成立過程は遅れたが、cGMP 存在下では影響が見られなかった、③ cAMP 産生酵素アデニル酸シクラーゼの阻害剤との同時投与により、セロトニンのシナプス増強効果は抑制されるが、オクトパミンの効果は影響を受けない、④ IP_3 ・ジアシルグリセロール産生酵素であるホスホリパーゼ C の阻害剤の直接投与により、オクトパミンのシナプス増強効果は抑制されるが、セロトニンの効果は影響を受けない、⑤ cAMP アナログ及び IP_3 の LG 内部への直接投与によって、セロトニン・オクトパミン同様 LG のシナプス応答が増強された。これらの結果から、セロトニン・オクトパミンが LG 内部にそれぞれ cAMP・ IP_3 という異なる二次メッセンジャー系を活性化させ、感覚入力に対する LG のシナプス応答を修飾していることを明らかにした。

馴化は行動レベルでは数日に渡って保持される一方、腹部単離標本を用いた実験では、馴化成立に伴う LG の感覚刺激に対する応答の低下は、ごく短い時間で回復することが知られており、上位中枢からの抑制性入力による LG の応答性制御が馴化の長期的保持の主要因であると考えられてきた。しかし、LG の応答性が馴化成立後どのように変化するのかを詳細に解析した研究はこれまでなかった。そこで、腹部単離標本を用い、様々な刺激間隔で馴化を成立させ、一定時間の休息後再び感覚刺激を与え、その時の LG の応答を経時的に解析したところ、① LG 応答は馴化成立後数分で回復するが、5-15 分の休息時間の後再び低下し、この応答性の減少は 1 時間以上に渡って保持されること、② 繰り返し刺激の間隔が短ければ短いほど馴化は早く成立するが、LG 再抑圧までの休息時間が長くなること、さらに、③ オクトパミンがこの再抑圧の過程を促進していることを明らかにした。これらの結果から、中枢からの抑制制御無しに長期間馴化を保持する機構が、逃避行動を司る腹部の神経系に備わっており、この機構にオクトパミンが関連している可能性があることを明らかにした。

本研究は従来の馴化成立機構の理解を塗り替える画期的な研究成果を含み、馴化という行動の可塑的変化がザリガニの社会的地位に伴うセロトニン・オクトパミンといった液性因子によってさらに修飾されること、その修飾作用が cAMP・ IP_3 という異なる二次メッセンジャー系が並列的に活性化されることに依っていることを示唆している。馴化の成立・保持といった学習成立の仕組みの理解をさらに進めていく上で、その神経生理学的基盤と行動学的意味の連関をより詳細に明らかにしていくことが重要であろう。

学位論文審査の要旨

主 査 助 教 授 長 山 俊 樹

副 査 教 授 浦 野 明 央

副 査 教 授 高 畑 雅 一

学 位 論 文 題 名

Neurophysiological analysis of modulatory mechanism for habituation of LG-mediated escape behavior of the crayfish

(ザリガニ逃避行動馴化の修飾機構に関する神経生理学的解析)

ある特定の刺激に対して動物は定型的な行動を多く示すが、その応答は環境条件の変化、動物の内的状態、及び学習・経験等によって修飾され、より適応的に変化する。ザリガニをはじめとする節足動物は、脊椎動物に比べ比較的単純な神経系を持ち、定型的な行動をよく示す一方、状況に応じて十分に複雑・多様な行動バリエーションを示すため、行動の発現・修飾の基盤となる神経機構を解明する上で理想的な実験動物である。

本論文は、ザリガニが尾部への強い機械的刺激に対して示す逃避行動が刺激が繰り返されることによって起こらなくなる現象、“馴化”について、それがどのように起こり、修飾され、保持されるのかを明らかにすることを目的として、神経生理学的・薬理学的手法を用いてその神経的基盤を詳細に解析した。

ザリガニは刺激に対し、腹部を素早く屈曲させ、その場から遠ざかる逃避行動を示す。この行動は腹部を縦走する一対の巨大神経 Lateral Giant (LG) によって制御されていて、LG 逃避と呼ばれる。繰り返し刺激を与えると、LG は突然スパイク応答なくなり、逃避行動が起こらなくなる。これを逃避行動の馴化と呼び、一般に最も単純な学習の一例であると考えられている。接触情報は、感覚神経より電気シナプスを介し LG へ (α EPSP)、或いは化学シナプスを介し上行性介在神経へ伝えられる。上行性介在神経は電気シナプスを介し LG と接続し、 β EPSP を生じさせる。馴化は 1970 年代に提唱された感覚神経 - 上行性介在神経間シナプス伝達効率低下によるという仮説が妥当と従来信じられてきたが、その実験の刺激強度は閾値下であった。そこで LG が発火する十分な刺激強度で再実験を行ったところ、馴化が成立しても、感覚性介在神経に顕著な応答の低下は見られないことがわかった。そこで第一章では馴化が起こる際の神経機構を解析した。その結果、LG 発火直前に LG の

$\alpha \cdot \beta$ EPSP の間に第三の EPSP (α' 成分) が新たに加わることを見出した。①この α' 成分が現れて初めて LG がスパイク応答すること、②LG 馴化の際、 α' 成分の振幅が極端に減少すること、③LG への過分極通電により α' EPSP が選択的に増大すること、④クラーレ存在下で α' EPSP が可逆的に減少すること、⑤そして一部の感覚神経と LG とのダイレクトな化学シナプスにより α' EPSP が形成され、繰り返し刺激によってそのシナプス伝達効率が低下して馴化が起こることを解明した。

ザリガニは個体間闘争により優位・劣位といった社会的地位を形成し、闘争行動を始めとした様々な行動が修飾される。第二章で優劣地位が馴化の成立過程に及ぼす影響を解析した結果、単独飼育個体に比べ、優位・劣位個体とも馴化成立までの過程が著しく遅れることを明らかにした。甲殻類においては生体アミンのセロトニン・オクトパミンが優劣形成に深く関与している。そこで、第三章において、セロトニン・オクトパミンが馴化成立過程にどのような修飾作用を及ぼすか調べた結果、①優劣個体同様、セロトニン・オクトパミン存在下では馴化成立過程が遅れ、それが LG の感覚応答の増強に起因していること、②二次メッセンジャーである cAMP 存在下でも馴化の成立過程は遅れ、cAMP 産生酵素アデニル酸シクラーゼ阻害剤存在下ではセロトニンのシナプス増強効果のみが抑制されること、③IP₃・ジアシルグリセロール産生酵素であるホスホリパーゼ C 阻害剤存在下では逆にオクトパミンのシナプス増強効果のみが抑制されること、④cAMP アナログ及び IP₃ の LG 内部への直接投与によっても、セロトニン・オクトパミン同様 LG のシナプス応答を増強することを明らかにした。これらの結果から、セロトニン・オクトパミンが LG 内部にそれぞれ cAMP・IP₃ という異なる二次メッセンジャー系を活性化させ、感覚入力に対する LG のシナプス応答を修飾していることを解明した。

LG の応答性が馴化成立後どのように変化するか詳細に解析した研究はこれまでなく、第四章で、様々な刺激間隔で馴化を成立させ、一定時間の休息後再び感覚刺激を再び与え、その時の LG の応答を経時的に解析した。その結果、①LG 応答は馴化成立後数分で回復するが、5-15 分の休息時間の後再低下し、その応答性の減少は 1 時間以上保持されること、②刺激間隔が短ければ短いほど馴化は早く成立するが、LG 再抑圧までの休息時間が長くなること、③オクトパミンがこの再抑圧の過程を促進していることを明らかにした。

これを要するに、著者は馴化の成立・修飾・保持機構について従来の理解を塗り替える新知見を得たものであり、行動の可塑的变化に対してその基盤となる神経機構の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)の学位を授与させる資格あるものと認める。