

学 位 論 文 題 名

Transmission mechanism of visual information
in the optic tectum of rainbow trout

(ニジマス視蓋における視覚情報伝達機構)

学位論文内容の要旨

視覚は動物が外界からの情報を得るための最も重要な感覚である。視覚情報に基づいた行動を制御する脳領域としては「視蓋」が知られており、視蓋は網膜からの視神経線維の投射領域である。この構造は全ての脊椎動物において保存されているが、魚類においてよく発達しており、視蓋の機能を研究するためには魚類が材料として適している。しかし、これまでの魚類視蓋の研究は細胞レベルでの解析を欠いており、網膜からの投射線維の入力を受け取る神経細胞さえも確定されていなかった。

そこで本研究では、魚類の中でも代表的な脳構造をもつニジマスを用いて、網膜からの入力を受ける神経細胞を同定し、この細胞を中心とした魚類の視覚情報処理機構を細胞レベルで解析することを目的とした。

第1章では、視神経線維からの入力に対する視蓋の応答を2次元観察し、網膜からの入力を受ける神経細胞を推定するため、視蓋スライスに対する膜電位の光学的測定を行った。その結果、視神経線維への電気刺激によって視蓋に脱分極が生じ、この脱分極は、まず視蓋の層構造に平行な方向に伝播した後、垂直な方向に伝播することを見出した。垂直方向の伝播はシナプス後細胞の応答と判断された。したがって、樹状突起を層構造に垂直に伸ばしている視蓋脳室周囲層ニューロンがシナプス後細胞であると考えられた。また、アンタゴニストを用いた薬理学実験から、視神経線維から放出される神経伝達物質はグルタミン酸であることも確かめられた。

第2章では、この視蓋脳室周囲層ニューロンが持つグルタミン酸受容体のタイプを調べるため、視蓋スライスに対するカルシウムイメージング法を用いた薬理学実験を行った。その結果、グルタミン酸ならびにイオンチャネル型グルタミン酸受容体のアゴニストの投与によって、脳室周囲層ニューロンの細胞体でカルシウム濃度上昇が観察された。このことから、視蓋脳室周囲層ニューロンがイオンチャネル型グルタミン酸受容体を介して、グルタミン酸作動性の伝達を受けることが示された。また、視蓋脳室周囲層ニューロンがイオンチャネル型グルタミン酸受容体をもつことを組織学的に示すための実験も行った。まず、NMDA受容体およびAMPA受容体サブユニット遺伝子の部分配列をクローニングし、それをもとに*in situ*ハイブリダイゼーションを行ったところ、視蓋脳室周囲層ニューロンの細胞体にはこれらの受容体サブユニットのmRNAが局在することが示された。さらに、免疫組織化学染色法により、NMDA受容体およびAMPA受容体サブユニットタンパク質分子が、視蓋脳室周囲層ニューロンの樹状突起の分布する領域に局在していることがわかった。これらの結果から、視蓋脳室周囲層ニューロンは機能的なNMDA受容体およびAMPA受容体を持っていることが示された。

哺乳類の海馬などでは、NMDA受容体およびAMPA受容体を介したグルタミン酸作動性シナプス伝達において、活動依存性に伝達効率の長期増強が認められる。したがってニジマス視蓋の視神経線維と視蓋脳室周囲層ニューロンとのシナプスにおいても上記のような可塑性が観察される可能性がある。それを確かめるために、第3章では視神経線維の電気刺激によって生じる集合興奮性シナプス後電位の経時変化を、細胞外記録法で記録した。その結果、1.0 Hz 20回の視神経線維への連続電気刺激によって、集合興奮性シナプス後電位は増強され少なくとも2時間持続した。さらに、NMDA受容体のアンタゴニスト (APV) を投与するとこの長期増強は完全に抑制された。これらの結果から、視神経線維と視蓋脳室周囲層ニューロンとのシナプスでは、視神経線維の活動に依存して伝達効率の長期増強が起こり、それにはNMDA受容体の活性化が必要であることが明らかになった。

視蓋にはゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) 産生ニューロンの投射が存在し、近年、ニジマス視蓋脳室周囲層ニューロンの細胞体にGnRH受容体のmRNAが局在することも示されている。GnRHは性成熟や性行動と関係の深いペプチドホルモンであるが、脳内において、グルタミン酸などの神経伝達活動への影響などはまったくわかっていない。そこで第4章では、GnRHによる視神経線維と視蓋脳室周囲層ニューロンとの情報伝達における神経修飾機構について解析を行った。まず、視神経線維を電気刺激した際に生じるシナプス後電流をパッチクランプ法により視蓋スライス上の脳室周囲層ニューロンから記録した。グルタミン酸受容体アンタゴニストにより抑制されるこの電流の振幅は、GnRHを投与すると増大し、GnRH受容体のアンタゴニストの共投与によって抑制されることがわかった。すなわち、GnRHが脳内の神経情報伝達に対して修飾的に関与することが始めて示された。また、パッチ電極にトレーサーを入れることで、電流の記録と同時に形態の解析も行った。その結果、脳室周囲層ニューロンはその形態から少なくとも2種類に分類された。そのうちの1種類は視蓋内に終末する軸索を持っていた。このことは脳室周囲層ニューロンが同じ種類のニューロンも含めて近隣のニューロンの樹状突起にシナプス接続している可能性を示している。ちなみに、もう1種類は軸索の追跡はできなかったが、視蓋の外へ投射している可能性が考えられた。

最後に視覚情報入力を受ける視蓋脳室周囲層ニューロンのうち、視蓋の外へ情報伝達するニューロンを同定し、その伝達先を調べるために、第5章では視蓋からの投射を受ける脳部位を同定して逆行性トレーサーを注入して、そこに投射している脳室周囲層ニューロンを染色した。その結果、視蓋脳室周囲層ニューロンの中には視蓋前域、浅視蓋前域核大細胞部、半円堤、峽核の少なくとも4部位に投射するニューロンが含まれることがわかった。他科の魚類ではこれらの部位に側線感覚や視覚の入力があることが知られており、特に峽核は逃避行動にも関わると考えられているため、視蓋脳室周囲層ニューロンへ伝達された視覚情報は最終的に他の脳領域へ伝達され、行動に影響することが考えられる。また、浅視蓋前域核大細胞部からは内側縦束核にある前運動ニューロンへの投射が認められたことから、脳室周囲層ニューロンで処理された情報が、浅視蓋前域核大細胞部を介して行動に影響することが示唆された。

以上の研究結果は、視蓋の脳室周囲層ニューロンが視神経線維からの入力を直接受け取るだけでなく、視覚情報処理の中心的な役割をになっており、このニューロンにおいて情報の重み付けや複数の情報の統合が行われ、統合された情報はさらに行動の制御領域へと伝達されることを示している。本研究で明らかになった脳室周囲層ニューロンを中心とした視蓋の情報処理機構は、視覚情報から行動を生み出すシステムの新しいモデルとして、脊椎動物におけるそのメカニズムの解明に大きな貢献を果たすものである。

学位論文審査の要旨

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

学 位 論 文 題 名

Transmission mechanism of visual information in the optic tectum of rainbow trout

(ニジマス視蓋における視覚情報伝達機構)

視覚は動物が外界からの情報を得るための最も重要な感覚である。視覚情報に基づいた行動を制御する脳領域に「視蓋」があり、視蓋は網膜から視神経線維の投射を受ける。この構造は全ての脊椎動物において保存されているが、魚類においてよく発達しており、視蓋の機能を研究するためには魚類が材料として適している。しかし、これまでの魚類視蓋の研究は細胞レベルでの解析を欠いており、網膜からの投射線維の入力を受け取る神経細胞さえも確定されていなかった。

そこで本研究では、魚類の中でも代表的な脳構造をもつニジマスを用いて、網膜からの入力を受ける神経細胞を同定し、この細胞を中心とした魚類の視覚情報処理機構を細胞レベルで解析することを目的とした。

第1章では視神経線維からの入力に対する視蓋の応答を2次元観察し、網膜からの入力を受ける神経細胞を推定するため、視蓋スライスに対する膜電位の光学的測定を行った。その結果、視神経線維への電気刺激によって視蓋に脱分極が生じ、この脱分極は、まず視蓋の層構造に平行な方向に伝播した後、垂直な方向に伝播することを見出した。この垂直方向の伝播は層構造に垂直に伸びている視蓋脳室周囲層ニューロンの樹状突起上を伝わったと考えられた。また、アンタゴニストを用いた実験から、視神経線維から放出される神経伝達物質はグルタミン酸であることも確かめられた。

第2章ではこの視蓋脳室周囲層ニューロンが持つグルタミン酸受容体のタイプを調べるため、視蓋スライスに対するカルシウムイメージング法を用いた薬理学実験を行った。その結果、グルタミン酸ならびにイオンチャネル型グルタミン酸受容体のアゴニストの投与によって、脳室周囲層ニューロンの細胞体でカルシウム濃度上昇が観察された。また、視蓋脳室周囲層ニューロンがイオンチャネル型グルタミン酸受容体をもつことを組織学的に示す実験も行った。NMDA 受容体および AMPA 受容体サブユニットについて *in situ* ハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学染色を行ったところ、視蓋脳

室周囲層ニューロンの細胞体にこれら受容体サブユニットの mRNA の局在が認められ、視蓋脳室周囲層ニューロンの樹状突起が分布する領域へのタンパク質分子の局在が示された。

NMDA 受容体および AMPA 受容体は哺乳類の海馬などでの可塑性に必要な分子であるため、視神経線維と視蓋脳室周囲層ニューロンとのシナプスにおいても同様の可塑性が観察される可能性があった。それを確かめるために、第 3 章では視神経線維の電気刺激によって生じる集合興奮性シナプス後電位の経時変化を細胞外記録法で記録したところ、視神経線維への連続電気刺激により集合興奮性シナプス後電位は増強されることがわかった。さらに、NMDA 受容体のアンタゴニストを投与すると、この長期増強は完全に抑制され、この長期増強に NMDA 受容体の活性化が必要であることが明らかになった。

視蓋にはゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) 産生ニューロンの投射が存在し、近年、ニジマス視蓋脳室周囲層ニューロンの細胞体に GnRH 受容体の mRNA が局在することも示されている。そこで第 4 章では、GnRH による視神経線維と視蓋脳室周囲層ニューロンの情報伝達における神経修飾機構について解析を行った。まず、視神経線維を電気刺激した際に生じるシナプス後電流をパッチクランプ法により視蓋脳室周囲層ニューロンから記録した。グルタミン酸受容体アンタゴニストにより抑制されるこの電流の振幅は GnRH を投与すると増大し、GnRH 受容体のアンタゴニストの共投与によって抑制されることがわかった。すなわち、GnRH が脳内の神経情報伝達に対して修飾的に関与することが始めて示された。また、パッチ電極にトレーサーを入れ、電流の記録と同時に形態の解析も行った。その結果、脳室周囲層ニューロンには視蓋内に終末する軸索を持つタイプと、視蓋内に終末が認められないタイプの 2 種類が存在することがわかった。

最後に、視覚情報入力を受ける視蓋脳室周囲層ニューロンのうち視蓋の外へ情報伝達するニューロンを同定し、その伝達先を調べるために、第 5 章では視蓋からの投射領域にトレーサーを注入して、そこに投射する脳室周囲層ニューロンを染色した。その結果、視蓋前域、浅視蓋前域核大細胞部、半円堤、峽核の少なくとも 4 部位に投射する視蓋脳室周囲層ニューロンが存在することがわかった。また、浅視蓋前域核大細胞部からは内側縦束核にある前運動ニューロンへの投射が認められたことから、脳室周囲層ニューロンで処理された情報が、浅視蓋前域核大細胞部を介して行動に影響することが示唆された。

これを要するに、以上の一連の結果は、視蓋脳室周囲層ニューロンが視覚情報処理の中心的な役割をになうことを示している。本研究で明らかになった脳室周囲層ニューロンを中心とした視蓋の情報処理機構は、視覚情報から行動を生み出すシステムの新しいモデルとして、脊椎動物におけるそのメカニズムの解明に大きな貢献を果たすものである。

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。