

## 学位論文題名

## Neurophysiological analyses of the cellular mechanisms underlying central compensation following unilateral statolith removal in crayfish

(ザリガニ片側平衡石除去にともなう中枢性補償機構の神経生理学的解析)

## 学位論文内容の要旨

ザリガニなどの一部の甲殻類は、平衡胞と呼ばれる発達した重力感覚器を持っている。平衡胞は感覚毛とそれに接した平衡石から構成されていて、体が傾いた際に平衡石が感覚毛を刺激する。ザリガニはその感覚情報を手がかりに姿勢制御を行っている。しかし平衡胞は脱皮ごとに新しく作りかえられ、平衡石も新しいものに置き換えられる。新しい平衡石の重さは脱皮前と異なっているので、このとき感覚入力の左右不均衡が生じるが、脳内でそれがどのように補償されるかについては、全く調査が行われていない。また、片側の平衡石を実験的に除去すると、眼柄を含む付属肢が左右非対称の姿勢をとるようになるが、その個体を数週間飼育し続けると、眼柄姿勢が左右対称に回復する個体が現れてくる。この回復は中枢性補償として、古くから知られた現象ではあるが、その神経機構は全くわかっていないが、行動学的な研究から回復には、飼育期間中の歩脚からの入力が必要であることがわかっている。

第一章において、この中枢性補償の神経機構を明らかにするために、アメリカザリガニを実験動物として用い、平衡石の片側除去に伴って、巨大ノンスパイキング介在ニューロン(NGI)の樹状突起膜性質、シナプス活動がどのように変化するかを定量的に調べた。前大脳に左右五対存在するNGIは眼柄運動ニューロンに出力する前運動性ニューロンであり、平衡覚、視覚、歩脚自己受容覚の入力が収斂する。調査は正常個体、片側平衡石除去後1時間の個体、除去後14日後の正常姿勢回復個体および未回復個体で行った。NGIの活動は、無麻酔全体標本にガラス管微小電極を適用し、不連続電流固定実験により細胞内的に解析した。

正常個体で、NGIは $53.7 \pm 1.1$  mVの静止電位、 $6.0 \pm 0.4$  M $\Omega$ の入力抵抗、 $16.2 \pm 1.1$  msecの時定数を示し、左右間の統計的差異は見られず( $P > 0.05$ ; 両側 t-検定)、脱分極および過分極性の個別的シナプス活動が、刺激がない状態でも頻繁に見られた(EPSP;  $24.7 \pm 1.5$  回/秒、IPSP;  $22.3 \pm 1.3$  回/秒)。片側平衡石を除去すると、同側および反対側のNGIで、数mV程度の膜電位変化が観察されたが、平衡石除去1時間後の測定値では、静止電位の有意な違いは見られなかった。しかしシナプス活動では、除去反対側のNGIで大きな変化が見られ、脱分極性のシナプス活動頻度が $37.5 \pm 3.1$  回/秒と有意に増加し、過分極性のシナプス活動頻度が $8.0 \pm 1.7$  回/秒と有意に減少した( $P < 0.01$ )。除去同側ではこれと反対の傾向が見られたが、その違いは有意ではなかった。入力抵抗・膜時定数は両側で除去後に有意差を示さなかった。片側平衡石除去後1時間の段階では、すべての個体で眼柄の左右非対称が観察されたが、この違いはノンスパイキング介在ニューロンであるNGIの静止電位には反映されず、そのシナプス活動における差異として現れることが判明した。

除去後14日目の段階で、正常な眼柄姿勢を回復している個体と回復していない個体とに分けて調査した。回復個体では、除去同側のNGIで入力抵抗と膜時定数が除去1時間後の個体と比べ有意に増加していた( $P < 0.05$ )。回復個体の除去反対側のNGIでは、入力抵抗・

膜時定数ともに正常値から有意な変化が見られなかった。未回復個体では、除去同側の膜時定数が、除去1時間後の個体の値から有意に増加していたが( $P < 0.05$ )、除去同側の入力抵抗、除去反対側の入力抵抗・膜時定数は正常個体・除去1時間後の個体から得られた値から有意な変化が見られなかった。除去反対側の脱分極性のシナプス活動は、回復個体で  $18.0 \pm 1.4$  回/秒、未回復個体で  $21.6 \pm 2.1$  回/秒と、除去1時間後の値から有意に減少していた( $P < 0.01$ )。対して、過分極性シナプス電位頻度は未回復個体で  $11.3 \pm 1.3$  回/秒と、除去1時間後の個体の値とくらべて有意な変化は見られなかったが、回復個体で  $17.4 \pm 2.1$  回/秒と除去1時間後・未回復の値から有意に増加していた( $P < 0.01$ )。一方、除去同側では、脱分極性シナプス電位頻度は回復個体・未回復個体ともに除去1時間後の値から有意な変化が見られなかった。それに対して、除去同側の過分極性のシナプス活動は、回復個体で  $16.7 \pm 1.7$  回/秒、未回復個体で  $17.0 \pm 2.3$  回/秒と有意に減少していた( $P < 0.01$ )。回復個体の除去同側で、脱分極性、過分極性のシナプス活動がともに正常値から有意に減少していたが( $P < 0.05$ )、除去同側、反対側の間で有意差は見られなかった。それに対して、除去1時間後の個体と未回復個体では、左右のシナプス活動が不均衡になっていた。以上のように、眼柄姿勢の回復に、NGIの膜性質の変化に加え、NGIへのシナプス入力の変化がともなうことから、回復にはNGIのみならず、その前シナプス経路における活動変化が関与していると考えられる。

中大脳に投射する平衡胞感覚ニューロンと前大脳の背側前縁部に存在するNGIの間に存在する神経経路はこれまでに調べられていない。第二章において、二本のガラス管微小電極を用いた同時細胞内記録法により、前シナプスニューロンと推定されるニューロンに通電し、そのときのNGIの応答を調べることで前シナプスニューロンの同定を試みた。形態は蛍光色素であるルシファーイエローとテキサスレッドをイオン泳動により注入し、2つの介在ニューロンを別々に染色した。その結果、9つの下行性介在ニューロン、1つの上下行性介在ニューロンと11の局所性介在ニューロンを同定した。下行性、上行性の介在ニューロンとNGIの接続は非常に弱く、大きな通電( $+10\text{nA}$ )を与えても、NGIにはわずかな電位の上昇が見られるだけだった。それに対して、局所性介在ニューロンでは比較的大きな応答を見せる7つの介在ニューロンを同定した。2つの局所性介在ニューロンPLSIとUGLI-1はそれぞれ、同側と反対側のNGIに興奮的または抑制的に単シナプス的に接続していて、NGIのシナプス電位活動に直接的な影響を持つと考えられる。PLSIは前大脳に局在しているが、UGLI-1は、平衡胞感覚ニューロンが投射する外側小触角ニューロパイルと前大脳のNGIの投射部位に樹状突起を伸ばしていた。UGLI-1と形態学的に区別できないUGLI-2は、反体側NGIに多シナプス接続していて、NGIに緩電位とそれに重なる個別的なEPSPを引き起こした。UGLIは、これまでに平衡胞感覚ニューロンと歩脚からの入力を受けていることが知られている。それゆえNGIのシナプス電位活動を直接制御し、かつ歩脚からの入力を受けるUGLI-1は片側平衡石除去後の眼柄姿勢回復において重要な役割を果たす可能性が高い。

本研究の結果から、甲殻類の中枢性補償は、回復過程のNGIの膜性質が変化及び、UGLI-1のスパイク活動の変化に基づく結論される。これらの変化のメカニズムの解明にはさらなる神経生理学的研究が必要である。

# 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 松 島 俊 也  
副 査 助 教 授 長 山 俊 樹

## 学位論文題名

### Neurophysiological analyses of the cellular mechanisms underlying central compensation following unilateral statolith removal in crayfish

(ザリガニ片側平衡石除去にともなう中枢性補償機構の神経生理学的解析)

ザリガニの重力感覚器である平衡胞は感覚毛とそれに接した平衡石から構成されていて、体が傾いた際に平衡石が感覚毛を刺激する。ザリガニはその感覚情報を手がかりに姿勢制御を行っている。平衡胞は脱皮ごとに新しく作りかえられ、平衡石も新しいものに置き換えられる。新しい平衡石の重さは脱皮前と異なっているので、このとき感覚入力の左右不均衡が生じるが、脳内でそれがどのように補償されるかについては全く調査が行われていない。また、片側の平衡石を実験的に除去すると、眼柄を含む付属肢が左右非対称の姿勢をとるが、その個体を数週間飼育し続けると、眼柄姿勢が左右対称に回復する個体が現れてくる。この回復は中枢性補償として、古くから知られた現象ではあるが、その神経機構は全くわかっていない。行動学的な研究から回復には、飼育期間中の歩脚からの入力が必要であることがわかっている。

1) 中枢性補償の神経機構を明らかにするために、アメリカザリガニを実験動物として用い、平衡石の片側除去に伴い、眼柄運動ニューロンに出力し、平衡覚、視覚、歩脚自己受容覚の入力が収斂する巨大ノンスパイキング介在ニューロン(NGI)の樹状突起膜性質、シナプス活動がどのように変化するかを調べた。回復の過程で静止電位の変化は見られなかったが、膜の受動的性質である入力抵抗と膜時定数は回復にともなって除去同側でのみ増加した。NGIの自発的なシナプス電位活動は、除去1時間後の反対側NGIで興奮性のシナプス活動が増加し、抑制性のシナプス活動が減少していた。このことにより、左右のNGIのシナプス活動が不均衡となり、左右非対称な眼柄姿勢が生じたものと考えられる。除去後14日目の段階での未回復個体では、抑制性のシナプス活動が減少したままで、部分的な回復がみられたが、左右のNGIのシナプス活動は依然不均衡なままだった。そ

れに対して、回復個体では、全体的なシナプス活動は減少していたが、左右均衡なNGIのシナプス活動は回復していた。以上のことから、眼柄姿勢の回復に、NGIの膜性質の変化に加え、NGIへのシナプス入力の変化がともなうことから、回復にはNGIのみならず、その前シナプス経路における活動変化が関与していると考えられる。

2) 中大脳に投射する平衡胞感覚ニューロンと前大脳の背側前縁部に存在する NGI の間に存在する神経経路を特定するため、二本のガラス管微小電極を用いた同時細胞内記録法により、NGI の前シナプスニューロンの同定を試みた。その結果、9つ の下行性介在ニューロン、1 つの上下行性介在ニューロンと11の局所性介在ニューロンを同定した。下行性、上行性の介在ニューロンと NGI の接続は非常に弱く、大きな通電を与えても、NGI にはわずかな電位の上昇が見られるだけだった。それに対して、局所性介在ニューロンでは比較的大きな応答を見せる7つの介在ニューロンを同定した。2つの局所性介在ニューロン PLSI と UGLI-1 はそれぞれ、同側と反対側の NGI に興奮的または抑制的に単シナプス的に接続していて、NGI のシナプス電位活動に直接的な影響を持つと考えられる。このうち UGLI-1 は、平衡胞感覚ニューロンが投射する外側小触角ニューロパイルに投射していた。UGLI-1 と形態学的に区別できない UGLI-2 は、反体側 NGI に多シナプス接続していて、NGI に緩電位とそれに重なる個別的な EPSP を引き起こした。UGLI は、これまでに平衡胞感覚ニューロンと歩脚からの入力を受けていることが知られている。それゆえ NGI のシナプス電位活動を直接制御し、かつ歩脚からの入力を受ける UGLI-1 は片側平衡石除去後の眼柄姿勢回復において重要な役割を果たす可能性が高い。

これら一連の解析結果を要するに、筆者は、甲殻類の中枢性補償が、その回復過程の NGI の膜性質における変化のみならずその前シナプス経路のスパイク活動の変化に基づくこと、またそのシナプス経路で中枢性補償に関わると推定される局所性介在ニューロンの形態学および生理学的性質を実験的に明らかにしたものであり、動物の中枢神経系の可塑性に関する行動生理学的理解の拡張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。