

学位論文題名

Toward an understanding of free behavior:
neuronal basis for spontaneous initiation of walking in
crayfish, *Procambarus clarkii*

(自由行動の理解に向けて：ザリガニにおける自発性歩行開始の神経基盤)

学位論文内容の要旨

動物の行動は、外部感覚刺激によっても開始されるが、明確な感覚刺激が存在しない条件において、自発的にも開始される。自発性の行動は、一部の脊椎動物においては、随意行動と呼ばれ、その神経メカニズムに関する知見が蓄積している。一方、無脊椎動物においては、感覚刺激に対する応答としての行動のメカニズムに比べて、ほとんど情報が蓄積していない。しかしながら、随意行動とは区別されているが、概日リズムで知られる locomotor activity と呼ばれるものは、同じく自発性の行動を見ているのである。無脊椎動物であっても自発性行動それ自体は広く観察されている事実である。アメリカザリガニ *Procambarus clarkii* の locomotor activity においても恒暗条件下において周期が約 26.3 時間の自由継続リズムが観察されている。ただし、このときのリズムというのは、あくまである一定時間における自発性行動の発生頻度によるものであり、それぞれの自発性行動そのものがいかにして生じるのかというかたちで問われることは、ほぼ皆無である。また、随意行動にしてもそのメカニズムが問われるのは、オペラント条件づけのパラダイムのもとであり、多くの場合、報酬あるいは罰とオペラント行動の発生頻度の関係においてである。そもそもの自発性行動としてのオペラント行動がいかにして生じるのかという神経メカニズムに関する問いかけはほとんどなされていないのが現状である。

ザリガニでは、自発性のものではなく、感覚刺激に対する応答としての行動開始メカニズムとして、逃避行動開始のメカニズムは神経生理学的に詳細に調べられてきた。その潮流の中で、いわゆる歩行司令繊維というニューロン軸索が、囓食道縦連合、すなわち食道上神経節(脳)と結合している軸索の束の中に存在することが Bowerman と Larimer によって報告された。軸索の束をほぐし小束への電気刺激を行うという方法を用いることで、Bowerman と Larimer は、歩行司令繊維には前方歩行司令繊維と後方司令繊維があると報告している。しかしながら、この実験は脳を切り離した状態の個体を用いおり、自然状態の個体において、とくに、自発性の歩行開始時にこれらの司令繊維がどのように動員されるのかが不明である。そこで本研究では、単一ニューロンレベルから個体の行動レベルの解析を行うことが比較的容易なザリガニを用いて、自発性行動の実験的研究を、行動遂行中の無麻酔全体標本を用いて行い、自発性行動の開始の神経メカニズムを同定ニューロンレベルで明らかにすることを目的とした。新たに球形トレッドミルシステムを開発し、ザリガニの脳内局所性および下行性ニューロンの行動生理学的解析を行った。

第一章では、囓食道縦連合(脳)より下行するニューロンの軸索断端からガラス管吸引電極を用いてマルチユニットレコーディングを行い、もう一方の断端には刺激電極を用いて電気刺激し、下行性ニューロン

の機能的役割を検討した。その結果、自発的な歩行開始に数秒以上先行する、自発性の運動準備発射活動を示す下行性ユニットを、180 ユニット中、58 ユニット見出した。12 個体、82 個の下行性ユニットにおいて、自発性および刺激誘発性の歩行運動のいずれに動員されるのかを検討したところ、歩行開始前 1 秒間に自発性特異的に動員されるユニットを 10 個、刺激誘発性特異的に動員されるユニットが 33 個見出され、異なる経路によって歩行運動が開始されることが判明した。これは、自発性の行動開始特有のメカニズムが存在することを示唆している。さらに、自発性歩行開始時のスパイク活動と歩行の方向性との関係を検討した。その結果、運動準備発射の一部は、歩行の方向性に非特異的な信号であり、従来報告されていた、前方・後方歩行司令とは異なっていること、非特異的な信号が特異的な信号よりも約 2.5 秒先行して動員されることが判明した。これは、行動の開始が一般的な決定から特殊な決定、すなわち、「前後いずれにせよ歩く」という決定から「前後どちらかに歩く」という決定、という階層的な行動開始プロセスがあることを示唆している。運動準備発射ユニットを含む軸索小束に対する電気刺激実験で行動を誘引することができたため、この活動が機能的であることも分った。以前の報告で自発性と刺激誘発性では、歩行の開始時の筋活動の特徴が異なっていることが判明していたが、本研究での電気刺激実験においても、いずれにも対応する筋活動の特徴を示す歩行が開始された。これは、自発性と刺激誘発性のそれぞれの経路も機能的であることを示唆する。さらに歩行運動の維持や停止にかかわる下行性スパイク活動が見出された。これは、自発性の歩行開始、維持、停止経路が並列機能モジュール構成になっていることを示す。機能モジュールを構成することで、柔軟な歩行運動の制御を可能にしていると考えられる。

第二章では、まず、脳内のニューロパイルと呼ばれる神経突起によって構成された部位をまず鍍銀染色法で明らかにした。つぎに、第一章での下行性ニューロンが並列階層的に構成されていることを受けて、下行性ニューロンおよび局所性ニューロンを介して、自発性歩行の開始プロセスがどの領域で処理されているのかを明らかにすることを目的とした。第一章と同様に球形トレッドミルシステムを用いてザリガニの歩行をモニターし、ガラス管微小電極による細胞内記録および染色法を用いて、下行性および局所性ニューロンの樹状突起投射部位を精査した。得られたニューロンは、行動の開始に対して、先行したシナプス活動の変化を示すものを先行型、随伴するものを随伴型、遅れて変化するものを遅延型と分類した。その結果、127 個のニューロンからの記録に成功し、そのうち 34 個の下行性ニューロン、15 個の局所性ニューロンおよび 3 個の上行性ニューロンを含む 52 個のニューロンの形態が明らかとなった。下行性ニューロンにおいては、先行型は中心体をはじめとする前大脳に投射する傾向が見られ、局所性ニューロンにおいては、先行、随伴、遅延型のいずれにおいても、前大脳、中大脳、後大脳に広く投射する傾向があった。さらに、電流注入実験を行ったが、直接的な行動出力の効果を持つものは見出されなかった。これは、単一のニューロンだけで行動開始が引き起こされるのではなく、複数のニューロンの活動によって行動が開始されるということを示唆している。さらに断続的な定電流注入実験により、膜コンダクタンス変化を調べることで、単一ニューロンにおいても、自発性および反射性の異なるシナプス入力部位を持ちうることを示唆された。

以上の結果を総合して、次のことを本研究で明らかにした。まず局所性ニューロンにおいて広範な、予測性の運動および感覚情報処理が行われる。つぎに歩行開始の準備・実行については、下行性ニューロンが前大脳でのシナプス活動に基づいて発生するスパイク活動によって胸部神経節に信号が送られるが、このとき一般から特殊を表現するような並列階層的行動準備プロセスを経て、自発性の歩行が開始されるということである。

学位論文審査の要旨

主査	教授	高畑雅一
副査	教授	松島俊也
副査	教授	水波誠
副査	准教授	和多和宏
副査	准教授	小川宏人
副査	准教授	北田一博

学位論文題名

Toward an understanding of free behavior: neuronal basis for spontaneous initiation of walking in crayfish, *Procambarus clarkii*

(自由行動の理解に向けて：ザリガニにおける自発性歩行開始の神経基盤)

近年、動物行動の神経機構に関する研究が盛んに行なわれているが、従来の研究は、主として＜感覚刺激に対する反応としての行動＞という思考的枠組みの中で行なわれて来た。しかし、動物の行動は、外部感覚刺激によって開始されるのみならず、明確な感覚刺激が存在しない条件においては、自発的にも開始される。自発的な行動は、一部の脊椎動物においては、随意行動と呼ばれ、その神経メカニズムに関する知見が蓄積している。一方、無脊椎動物においては、感覚刺激に対する応答としての行動のメカニズムに比べて、ほとんど情報が蓄積しておらず、その解明が待たれている状況にある。

本論文は、無脊椎動物における自発的な行動開始の脳機構を明らかにする目的で、アメリカザリガニ *Procambarus clarkii* を用いて、その歩行運動開始にかかわる腹髄下行性活動を神経生理学的に解析したものである。Bowerman と Larimer (1974) は、囓食道縦連合から軸索を単離して電気刺激を行うという方法で、前方あるいは後方への歩行運動を惹起する司令繊維を報告した。しかしながら、この実験は脳を切り離した状態の個体を用いており、自然状態の個体での自発性歩行開始時にこれら司令繊維がどのように動員されるのかは不明であった。本研究は、無麻酔全体標本を用いて、その自発的な行動開始の神経メカニズムを、脳内の同定ニューロンレベルで明らかにしたものである。

第一章では、脳から下行するニューロンの軸索断端からガラス管吸引電極を用いてマルチユニット記録を行い、もう一方の断端には刺激電極を用いて電気刺激し、下行性ニューロンの機能的役割を検討した。新たに球形トレッドミルシステムを開発し、動物行動を定量化すると同時に、ザリガニの脳内局所性および下行性ニューロンの行動生理学的解析を行った。

その結果、自発的な歩行開始に数秒以上先行する、自発性の運動準備発射活動を示す下行性ユニットを、26 個体で 180 ユニット中、58 ユニット見出した。自発性および刺激誘発性の歩行に選択的に動員されるユニットの存在が明らかとなり、2 種類の歩行が異なる経路によって開始されることが判明した。さらに、自発性歩行開始時のスパイク活動と歩行の方向性との関係を検討した結果、運動準備発射の一部は、歩行の方向性に非特異的な信号であり、従来報告されていた、前方・後方歩行司令とは異なっていること、非特異的な信号が特異的な信号よりも約 2.5 秒先行して動員されることが判明した。これは、歩行行動の開始に関して、一般的な決定から特殊・詳細な決定へ、という階層的なプロセスの存在を示唆している。自発性歩行ないし刺激誘発性の歩行の開始に先行するユニットを含む軸索小束に対する電気刺激実験では、それぞれに対応する筋活動の特徴を示す歩行が開始された。この結果は、自発性と刺激誘発性のいずれの経路も、それぞれの歩行開始に直接的にかかわる可能性を示唆する。また、これらユニット以外にも、歩行運動の維持や停止にかかわる下行性スパイク活動が見出された。これらの結果から、自発性の歩行開始、維持、停止経路が並列機能モジュールを構成することで、柔軟な歩行運動の制御を可能にしていると考えられる。

第二章では、自発性歩行の開始プロセスが脳内のどの領域で処理されているのかを明らかにすることを目的とした。そのため、脳内のニューロパイルと呼ばれる神経突起によって構成された部位をまず鍍銀染色法で明らかにした上で、歩行開始にかかわる下行性および局所性ニューロンの樹状突起投射部位を、ガラス管微小電極による細胞内記録・染色法によって、脳内ニューロン 127 個について調査した。得られたニューロンは、行動の開始に対して先行したシナプス活動変化を示すものを先行型、随伴するものを随伴型、遅れて変化するものを遅延型と分類した。その結果、下行性ニューロン（34 個）においては、先行型は中心体をはじめとする前大脳に投射する傾向が見られ、局所性ニューロン（15 個）においては、いずれのタイプも、脳内全域に広く投射する傾向があった。電流注入実験では直接的な行動出力の効果を持つものは見出されなかった。これは、行動開始が単一のニューロンだけでなく、複数のニューロン活動によってトリガーされる可能性を示唆する。膜コンダクタンス変化の解析により、単一ニューロンにおいて自発性および反射性の異なるシナプス入力部位を持ちうることを示唆された。

以上を要するに、著者はザリガニの脳内において、その自発的な行動開始に先行する明確な運動準備発射活動の存在をはじめて報告するとともにその機能的意義および脳内部位対応を明らかにしたもので、動物行動の生理学理解に対して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。