博士（理　学）　青　沼　仁　志

学位論文題名

Neuronal Mechanisms Underlying Synaptic Depression of Crayfish Neuro-Muscular System

（ザリガニ神経－筋系におけるシナプス抑圧の神経機構に関する研究）

学位論文内容の要旨

動物は周囲の状況に即した行動をとることで環境に適応している。外部環境からの様々な信号は刺激という形で伝えられ、動物は特定の感覚器でそれらを受容し、中枢での情報処理統合を経て、適切な行動パターンが形成される。この際、莫大な外部信号の中から必要な情報を選択的に抽出し、不要な信号を排除する様々な神経機構が存在している。馴化はこの不要な信号を排除する神経機構のひとつで、シナプス抑圧と連鎖して起こり、動物の応答性が刺激の繰り返しによって減少する現象である。更に馴化は記憶や学習の最も単純な形態と考えられており、シナプス抑圧の神経機構を明らかにすることは、馴化成立の際のシナプス伝達の可塑的な性質を解明すると共に、学習・記憶といったより高次脳機能の神経機構の理解につながる。

無脊椎動物、特に甲殻類や昆虫などの節足動物は個々の神経細胞が同定可能で行動制御機構を神経レベルで解析する上で適した実験材料である。更に、神経-筋標本は特定の神経細胞と筋細胞の活動を同時に観察でき、シナプス抑圧の神経機構を調べる上で非常に適した実験系である。

本研究は、アメリカザリガニ *Procambarus clarkii* (Girard)を実験材料に用い、腹部屈曲筋とそれを支配する運動神経間の神経筋接合部で起こるシナプス抑圧の神経機構を解析した。ザリガニは頭部または尾部への強い刺激に対し腹部を屈曲させ、すばやく刺激源から遠ざかる逃避行動(tail-flip)を示す。Tail-flip は、司令神経として知られる巨大介在神経(Lateral giant, Medial giant)の発火により、腹部各神経節に１対ずつ存在する巨大運動神経 motor giant (MoG)が発火して一群の腹部速屈曲筋が収縮することで起こる。屈曲筋は MoG の他に non-giant fast-flexor 運動神経(FFMN)と呼ばれる運動神経にも支配されているが、MoG は tail-flip のときだけ発火する特徴的な運動神経である。MoG を繰り返し電気刺激すると筋細胞はシナプス抑圧を示し、筋肉の応答は減少する。一方、同じ筋細胞を支配する FFMN を繰り返し刺激すると筋細胞はシナプス促通を示す。（１）MoG と FFMN の電気刺激に対して、同一筋細胞が全く異なるシナプス応答を示すこと、（２）これら運動神経は比較的大型で容易に同定でき、選択的に刺激でき、長時間に渡って安定した記録が可能である、（３）神経-筋標本は中枢に比べ、より薬理学的実験に適していることから、シナプス抑圧の神経機構を解明するのに最適の実験系と考え、電気生理学・神経薬理学・神経化学的手法を用いて解析した。

MoG の神経伝達物質はいまだ同定されておらず、FFMN と同じ伝達物質が用いられてい

るのであれば、何らかの神経修飾作用によってMoGとFFMNそれぞれに対する筋細胞の応答が逆転すると仮定した。そこで、MoG の神経伝達物質をまず同定し（第1,2章）、一酸化窒素(NO)が神経修飾物質としてシナプス抑圧に深く関与していることを明らかにした（第3，4章）。

第1章：MoGの細胞体だけが選択的に青紫光照射により黄緑色の自家蛍光を発することを明らかにし、電気生理学的実験もしくは細胞内染色なしで MoG を容易に同定することが可能となった。

第2章：MoG を選択的に電気刺激して発火させると、屈曲筋は興奮性接合部電位（EJP）で応答する。グルタミン酸を神経筋接合部に局所的微量投与すると、屈曲筋細胞は膜脱分極し、すぐに脱感作した。膜脱分極はコンダクタンスの増加を伴い、逆転電位は0 mV付近だった。MoG刺激に伴うEJP振幅は、グルタミン酸の灌流投与により可逆的に阻害された。グルタミン酸拮抗剤ジョロウグモ毒(JSTX)により MoG のシナプス伝達は阻害された。従って、MoGの伝達物質はグルタミン酸であることが判明した。FFMNの伝達物質もグルタミン酸であることが知られていることから、筋細胞が示すシナプス抑圧及び促通が、単純な伝達物質の違いなのではなく、運動神経側の伝達物質放出機構の違いによることが判明した。

第3章：シナプス抑圧が神経伝達機構の修飾作用で起こると仮定すると、MoGに対し抑制性の修飾作用、FFMNに対し興奮性の修飾作用を持つ物質があれば、それがシナプス抑圧に関与している可能性が極めて高い。まず、高速液体クロマトグラフィー法(HPLC法)により MoG 細胞内含有アミノ酸を定性・定量的に解析した。神経修飾効果をもつことが知られている各種生体アミン・神経ペプチド及び、HPLC 法解析結果で得られたアミノ酸を灌流投与し、MoG 及び FFMN の神経伝達に対する修飾作用を解析した結果、アミノ酸の一つアルギニンだけが、MoGに対しては抑制性、non-giantに対しては興奮性の修飾作用をもつことが判明した。更に、アルギニンは筋細胞のグルタミン酸感受性を変ずに、運動神経のグルタミン酸放出量を変えることも突き止めた。

第4章：アルギニンはNO合成酵素の基質であり、合成されたNOは伝達物質の放出を修飾することでシナプスの可塑性に関与することが主に脊椎動物を使った実験から明らかになりつつある。そこで、シナプス抑圧の神経機構に NO が関与している可能性について検討した。MoGの発火に伴うEJPは、アルギニンを灌流投与すると可逆的に阻害され、NO発生剤 NOC7 を灌流投与することで同様に阻害された。一方、NO 除去剤 Carboxy-PTIO を灌流投与すると、EJPの振幅は可逆的に増大した。MoGを繰り返し刺激することで起こるシナプス抑圧は NOS 阻害剤 L-NAME 灌流投与により可逆的に阻害された。一方、non-giantを同様に刺激し、L-NAMEを灌流投与するとそのEJPの振幅は逆に減少し元の灌流液に戻すことで回復した。パーオキシナイトライト($ONOO^-$)合成剤 SIN-1 は NO と活性酸素 O_2^-を同時に合成し、NO と O_2^-が反応することで $ONOO^-$を合成する。SIN-1 を灌流投与するとEJP の振幅は可逆的に増大し、シナプス抑圧は阻害された。一方、SIN-1 とスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)を同時に灌流投与すると EJP 振幅は殆ど変化が無く、シナプス抑圧は阻害されなかった。

以上の結果から、（1）ザリガニ神経筋接合部におけるシナプス抑圧は、運動神経側の伝達物質放出機構が修飾され、放出量が減少するために起こること、（2）ザリガニ末梢神経系に NO 合成系が存在し、NO がシナプス抑圧に重要な働きをしていることを初めて明らかにした。MoGが発火すると、細胞内のNOSが活性化しアルギニンからNOを合成、NO 濃度の増加で、グルタミン酸の放出量が抑えられる。中枢で見られる馴化成立過程に

おいても本研究で明らかにしたシナプス抑圧の神経機構がその基盤となっていることが十分予想でき、本研究のさらなる展開によって記憶・学習といった高次脳機能の理解にひとつの作業仮説を提出できると考える。

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　鈴　木　教　世

副　査　助教授　長　山　俊　樹

学位論文題名

Neuronal Mechanisms Underlying Synaptic Depression of Crayfish Neuro-Muscular System

(ザリガニ神経－筋系におけるシナプス抑圧の神経機構に関する研究)

近年、ヒトなど高等脊椎動物を含む動物の脳機能における記憶・学習等の可塑性の研究が急速に伸展している。比較的少数の神経細胞（ニューロン）によって遂行される無脊椎動物の行動制御においても、中枢神経系機能の可塑性は、重要な働きを担っている。無脊椎動物の神経系は、個々の細胞を同定することが可能であるという長所をもち、細胞・回路網レベルで可塑性の生理機構を明らかにするための有力な実験系を提供する。

本論文は、神経系機能の可塑性について、アメリカザリガニ*Procambarus clarkii* Girardの神経—筋接合部を実験系として用いて生理学的、解剖学的にそのシナプス抑圧の機序を解明することを目的として行われた一連の研究結果をまとめたものである。ザリガニの腹部速屈筋は、巨大運動神経（MoG）および速屈筋運動神経（FF）により支配される。運動神経の活動電位に対して、屈筋細胞は脱分極性の接合部電位を発生する。しかし、MoGの連続活動に対しては接合部電位が振幅の減少（シナプス抑圧）を示すのに対し、FFの連続活動に対しては増加（シナプス促通）を示す。本論文は、MoGの用いる伝達物質が、FFと同じくグルタミン酸であると同定した上で、MoGから屈筋細胞への信号伝達におけるシナプス抑圧に、一酸化窒素（NO）が神経修飾物質として密接に関与することを明らかにした。

実験には主に腹部単離標本を用い、吸引電極を用いてMoGを選択的に刺激した。屈筋細胞の接合部電位は、ガラス管微小電極による細胞内記録法により記録解析した。屈筋細胞の接合部電位は、グルタミン酸の局所投与によっても引き起こすことができ、また、MoGの活動に伴う接合部電位は、グルタミン酸の持続投与による脱感作で減少し、さらに、グルタミン酸の拮抗薬（JTX）による阻害を受けることなどから、MoGの伝達物質がグルタミン酸であることが実験的に証明された。

次に、運動神経から速屈筋細胞へのシナプス伝達の修飾物質を探索した結果、各種アミノ酸、生体アミン、神経ペプチドの中で、アルギニンのみがMoGから速屈筋細胞への伝達を抑制し、FFからの伝達を増強することが判明した。また、アルギニン灌流時のグルタミン酸局所投与実験から、アルギニンは屈筋細胞のグルタミン酸応答性を変化させるのではなく、MoGからの伝達物質放出機構に働くことが判明した。アルギニンは、NO合成酵素の基質であり、合成されたNOがシナプス可塑性に関与することが脊椎動物で報告されている。本研究では、NOが、MoGから屈筋細胞への伝達におけるシナプス抑圧に及ぼす影響を調査した。その結果、MoGの単一活動にともなうシナプス伝達は、アルギニンのほか、NOの発生剤（NOC7）の灌流投与によっても阻害されることが判明した。ま

た、NOの除去剤であるCarboxy-PTIOを灌流投与すると、シナプス伝達は可逆的に増強された。さらにNO合成酵素の阻害剤であるL-NAMEを灌流投与すると、MoGの繰り返し活動にともなうシナプス抑圧は可逆的に阻害された。一方、SIN-1は、NOと活性酸素O_2^-を同時に合成することが知られている。NOとO_2^-は速やかに反応して、パーオキシナイトライト（$ONOO^-$）が合成される。SIN-1の灌流投与により、シナプス抑圧が阻害されることが確認された。しかしSIN-1を活性酸素の除去剤であるSODと同時に投与すると、正常のシナプス抑圧が観察された。なお、FFの連続活動にともなう屈筋細胞の接合部電位の増強は、L-NAMEの灌流投与により消失し、逆に減少が観察された。

以上の結果は、MoGから屈筋細胞への伝達におけるシナプス抑圧に、NOが密接に関与することを示している。ザリガニ腹部神経系で同定されるMoGと速屈筋細胞との神経—筋接合部でのシナプス抑圧は、MoGの繰り返し活動にともなって活性化されるNO合成系で作られるNOによって、MoG軸索末端からのグルタミン酸放出量が減少することによって起こると結論される。

これを要するに、著者は、シナプス伝達において、前シナプス細胞の繰り返し活動に伴うその抑圧が、前シナプス細胞の軸索末端に作用するNOを介したメカニズムに基づくという新知見を得た。NOの生理機能を、はじめて同定細胞レベルで具体的な行動制御に直接関連づけて明らかにした本研究は、動物行動の神経機構の解明を目指す神経行動学研究の発展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。