

論文の内容の要旨

氏名：石田 康平

博士の専攻分野の名称：博士（理学）

論文題目：

チャコウラナメクジの嗅覚中枢神経系における神経活動と一酸化窒素の時空間動態

第1章 序論

本研究では、軟体動物に属するナメクジの嗅覚刺激に対する神経活動の変化に着目し実験を行った。軟体動物の中枢神経系（神経節）は哺乳動物のものと形状は異なっているが、神経細胞の基本構造や神経細胞間の情報伝達の方法は哺乳動物と同じである。さらに、神経細胞の数は哺乳動物に比べ非常に少なく、神経構造も単純である。また、神経節と感覚器を繋げたまま単離することができるため、神経系のモデル実験動物として利用されてきた。軟体動物の神経節の働きを明らかにすることは、哺乳動物における中枢神経系の働きを理解することにつながる。本研究で用いたチャコウラナメクジ (*Limax valentianus*) (以下、ナメクジと略す) は、嗅覚が優れており、また哺乳動物に見られる記憶や学習といった高次脳機能を有しているため、匂い嫌悪学習による行動の変化についての研究が行われてきた。しかし、匂い刺激や匂い嫌悪条件づけによる神経活動の時空間的な変化についてはあまり調べられていない。

本研究では、ナメクジの嗅覚中枢神経系である前脳葉 (図1) に着目し、神経生理学的手法を用いて匂い刺激や匂い嫌悪条件づけによる神経活動の時空間的な変化を調べた。さらに本研究では、生理機能や記憶や学習に関係する神経伝達物質である一酸化窒素 (nitric oxide: NO) に着目し、前脳葉における NO の振る舞いおよび匂い刺激によるその変化を調べた。本研究の結果から、ナメクジの嗅覚情報処理について新たな知見を得ることが期待される。

第2章 実験方法

本研究では、ナメクジの前脳葉における神経活動の時空間動態を測定するために、時間分解能が優れている細胞外電位記録法と空間分解能が優れている蛍光イメージング法を用いた。ガラス電極を用いた細胞外電位記録法により前脳葉における神経活動を測定し、蛍光イメージング法の1つである膜電位感受性色素 (Di-4-ANEPPS) を用いた膜電位イメージングも同時に行った (図2)。2つの測定手法を同時に行うことで、前脳葉における神経活動の時空間動態を詳細に捉えることができる。さらに、もう1つの蛍光イメージング法として NO 感受性色素 (DAR-4MAM) を用いた NO イメージングを行った。これらの実験手法を用いて、匂い刺激による前脳葉の神経活動の変化を測定した。匂い刺激は匂いを含んだ空気が触角のみに当たるように吹きかけた (図2)。

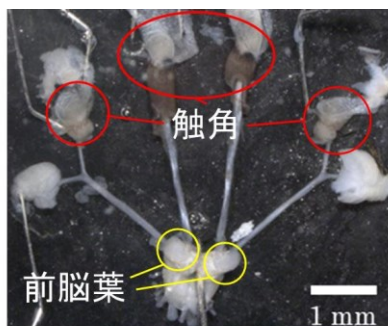


図1 単離脳（神経節-触角）標本

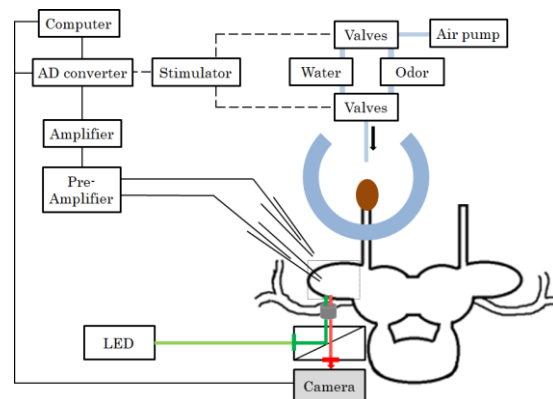


図2 実験系の模式図

第3章 単離脳標本系における神経活動の時空間動態の測定

本章では、単離脳標本系における匂い刺激による神経活動の変化について、細胞外電位記録と膜電位イメージングを用いて神経活動の時空間動態を調べた。その結果、局所場電位 (local field potential: LFP) には約 1 Hz の振動が見られた (図 3A)。また、前脳葉の先端部から基部に向かって神経活動が伝搬している様子を捉えることができた (図 3B)。そして、忌避性の匂い刺激 (0.1%ヘキサノールと玉ねぎ) によって LFP 振動の周波数の増加が見られ、神経活動の伝搬速度が増加することを明らかにした (図 4)。一方、誘引性の匂い刺激 (ニンジンとキュウリ) ではそのような神経活動の変化は見られなかった (図 4)。さらに、ニンジンの匂い刺激直後に味覚受容器の神経線維に対して電気刺激を与え、単離脳標本系で匂い嫌悪条件づけを行った。味覚受容器の神経線維に対する電気刺激は行動実験における匂い嫌悪条件づけの苦味刺激に相当する。単離脳標本系を用いることにより、同一個体で条件づけ前後の神経活動の変化を調べることが可能にした。条件づけ後、再び誘引性の匂い刺激 (ニンジンとキュウリ) を与えた。その結果、ニンジンに対してのみ LFP 振動の周波数と神経活動の伝搬速度が増加した (図 4)。以上のことから、LFP 振動の周波数と神経活動の伝搬速度の増加は、忌避性の匂い刺激と条件づけされた匂い刺激によって生じており、忌避行動に関係していることが示唆された。

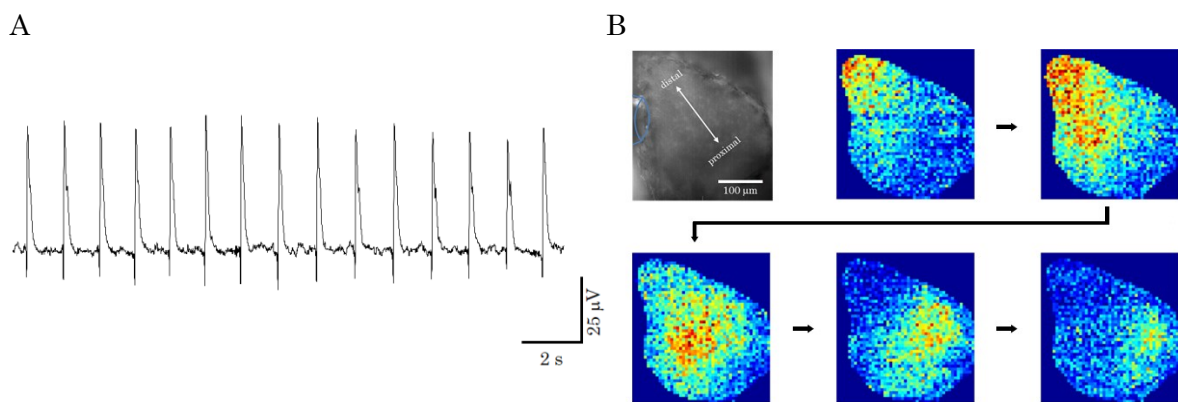


図 3 単離脳標本系で測定した神経活動

(A) 細胞外電位記録法によって得た LFP 振動、(B) 膜電位イメージングで捉えた神経活動の伝搬の様子。(B) の左上の図は蛍光画像。擬似カラー画像においては、蛍光強度変化のピークを赤色で示している。それぞれの擬似カラー画像の時間間隔は 0.1 秒である。

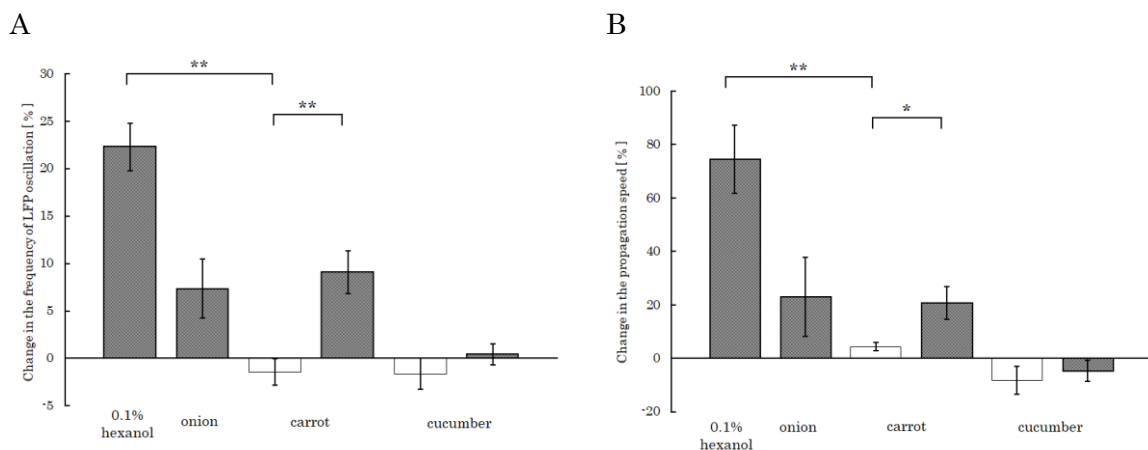


図 4 各匂い刺激による前脳葉の神経活動の変化

(A) LFP 振動の周波数の変化率、(B) 神経活動の伝搬速度の変化率。匂い嫌悪条件づけ前を白、匂い嫌悪条件づけ後をグレーで示す。** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$

第4章 匂い刺激による前脳葉の神経活動の変化に対するNOの関与

第3章では、忌避性の匂い刺激によってLFP振動の周波数が増加し、また前脳葉における神経活動は伝搬しており、その伝搬速度が増加することを明らかにした。本章では、そのような神経活動の変化に対するNOの関与について調べた。その結果、忌避性の匂い刺激(0.1%ヘキサノール)によるLFP振動の周波数と神経活動の伝搬速度増加は、NO合成酵素阻害剤(L-NAME)を用いてNO合成を阻害することで見られなくなった(図5)。このことから、忌避性の匂い刺激によって生じる神経活動の変化にNOが関係していることが明らかになり、ナメクジにおける匂い識別にNOが関係していることが示唆された。NO合成をさらに高濃度のL-NAMEで完全に阻害するとLFP振動が消失することが知られていることから、LFP振動の発生から匂い刺激によるLFP振動の周波数の増加、神経活動の伝搬速度の増加に至るまでNOが関係していると示唆された。

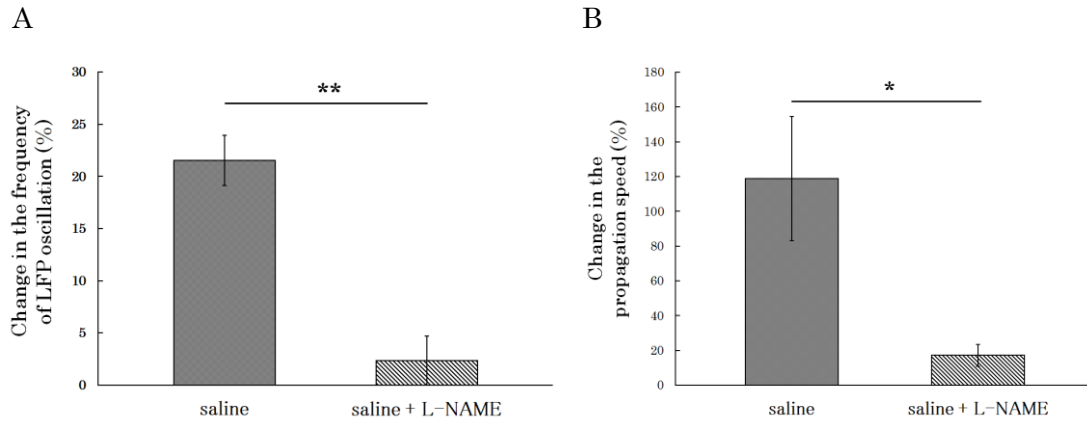


図5 忌避性の匂い刺激による前脳葉の神経活動の変化とL-NAMEの影響
(A) LFP振動の周波数の変化率、(B) 神経活動の伝搬速度の変化率。** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$

第5章 NO感受性色素を用いたNOイメージングの実験系の確立とNOの時空間動態の測定

第4章では、忌避性の匂い刺激によって前脳葉に生じるLFP振動の周波数と神経活動の伝搬速度の増加にNOが関係していることを明らかにした。しかしながら、その際のNOの時空間動態については明らかになっていない。そこで本章では、NOイメージングを用いて前脳葉におけるNOの時空間動態について調べた。用いたNO感受性色素(DAR-4MAM)はNOと不可逆的に反応する。匂い刺激がなくても蛍光強度は一定の割合で増大していたことから、前脳葉においてNOが一定の速度で合成されていることが分かった。蛍光強度の時間変化の傾きを求めることで、前脳葉におけるNOの合成速度の変化を評価することができる。その結果、忌避性の匂い刺激(0.1%ヘキサノール)によって蛍光強度変化の傾きが増加した(図6A)。L-NAMEを用いてNO合成を阻害して忌避性の匂い刺激をした場合には傾きは増加しなかった(図6A)。このことから、忌避性の匂い刺激によってNOの合成速度が増加するということが明らかになった。また、前脳葉を構成する3層の中でもIM層と言われる部位においてNO合成酵素が最も多く存在すると示唆されている。そこで、IM層とその他の層(TM層とCM層)で忌避性の匂い刺激による蛍光強度変化の傾きの最大変化率を比較した。その結果、最大変化率はIM層の方が他の層よりも大きく、またIM層ではL-NAMEによって傾きの最大変化率が顕著に減少した(図6B)。

以上のことから、忌避性の匂い刺激によって前脳葉におけるNOの合成速度が増加し、特にIM層において顕著であることを明らかにした。

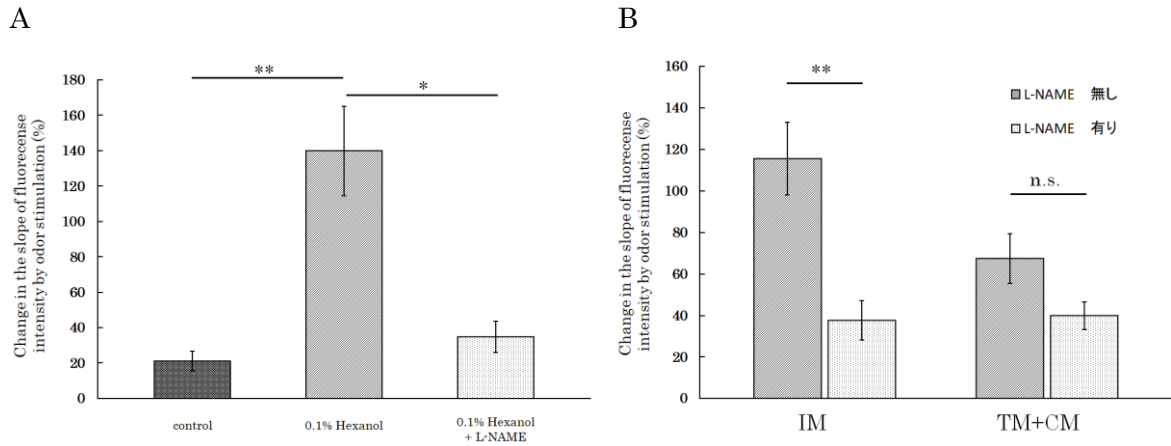


図6 忌避性の匂い刺激による前脳葉における蛍光強度変化の傾きの変化と L-NAME の影響
 (A) 前脳葉全体における蛍光強度変化の傾きの最大変化率、(B) 前脳葉の各層における蛍光強度変化の傾きの最大変化率。 ** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$

第6章 総括

第3章では、ナメクジの単離脳標本系における神経活動の時空間動態の測定および匂い刺激によるその変化について述べた。細胞外電位記録により前脳葉では LFP に約 1 Hz の振動が生じており、膜電位イメージングにより前脳葉の先端部から基部に向かって神経活動が伝搬している様子を捉えることができた。そして、忌避性の匂い刺激によって LFP 振動の周波数と神経活動の伝搬速度は増加した。一方で、誘引性の匂い刺激を行った場合にはそのような神経活動の変化は見られなかった。匂い嫌悪条件づけを行った匂い刺激に対しては忌避性の匂い刺激と同様な神経活動の変化が見られた。以上のことから、前脳葉における LFP 振動の周波数と神経活動の伝搬速度の増加は、忌避行動に関係しているということが示唆された。第4章では、忌避性の匂い刺激による前脳葉における神経活動の変化に対する NO の関与を調べた結果について述べた。忌避性の匂い刺激による LFP 振動の周波数と神経活動の伝搬速度の増加は、NO 合成を阻害することで見られなくなった。このことから、そのような忌避性の匂い刺激によって生じる前脳葉の神経活動の変化には NO が関与していることを明らかにし、ナメクジにおける匂い識別に NO が関係していることが示唆された。第5章では、NO 感受性色素を用いた NO イメージング実験系を確立し、その実験系を用いて NO の時空間動態を測定した結果について述べた。忌避性の匂い刺激によって NO の合成速度が増加し、それは前脳葉を構成する3層の中で IM 層で顕著に見られるということを示唆した。

本研究の結果から、忌避性の匂い刺激によって前脳葉における LFP 振動の周波数と神経活動の伝搬速度が増加することが明らかになり、それは前脳葉、特に IM 層における NO の合成速度の増加によって引き起こされる現象であることが示唆された。また、このような一連の神経活動の変化がナメクジの忌避行動と関係していることが示唆された。