1PA117

蛍光色素FM1-43と高速共焦点レーザ顕微鏡による線虫神経回路の可視化

○岡浩太郎, 深田達, 清水亮作, *小川宏人, 生塩研一, **守田智, 長名優子, 川村清 (慶大・理工, *埼玉医大・生物, **静岡大・工)

[背景] 線虫 (*C. elegans*) の逃避行動に関わる神経回路研究は、レーザビームによる特定神経細胞の破壊と、それに伴う行動変化の観察により従来行われてきた。また神経細胞間の接続は電子顕微鏡の切片像を再構成することにより、シナプスレベルで知られている。われわれはこれらの神経接続をデータベース化し、計算機内に再構成した神経回路についてランダムウォーク法を利用して神経回路の機能について調べてきた。しかし計算機シミュレーション結果を補うような神経回路動態を実験的に調べる手法の開発が望まれる。そこでシナプス部位で活動度依存的に細胞内に取り込まれることが知られている蛍光色素FM1-43を利用して、生きたまま神経回路を可視化することを試みたので報告する。

[方法] 大腸菌プレート上で飼育した線虫 (野生株) を FM1-43 (100 μ M) 含んだ溶液中に3分間浸し、頭部または尾部を白金線により3〜4回刺激して、逃避行動を行わせた。その後 FM1-43 溶液を洗浄し、高速共焦点レーザ顕微鏡 (Noran Oz with Intervision) で観察した。[結果] 咽頭部、陰門、および尾部に明るい蛍光染色が観察された。咽頭部と陰門の明るい染色像は腹腔内への色素侵入によるものと思われるが、それ以外にも細胞体またはシナプス終末と思われる構造が観察できた。また腹部に沿って頭部から尾部に向かう長い神経線維の存在も確認できた。この染色方法は、神経細胞を生きたまま可視化できるという利点があり、共焦点レーザ顕微鏡観察下で行動と神経活動に依存したイメージを同時に取得可能である。これらの実験結果をコンピュータシミュレーションによる神経回路解析の結果と比較して報告する。

K.Oka, M.Fukada, R.Shimizu, H.Ogawa, K.Oshio, S.Morita, Y.Osana, K.Kawamura : Activity-dependent staining of neural circuits for avoidance reflex in *C. elegans*

1PA119

コオロギ giant interneuron における一過性Ca上昇と逆行性活動電位・シナプス入力との同時性

○小川宏人, *馬場欣哉, **岡浩太郎 (埼玉医大・生物, *北大・電子研・神経情報, **慶大・理工・システムデザイン工学)

[背景] コオロギの最終腹部神経節内には、尾葉 (cercus) への風刺激に応答し、逃避行動を引き起こす8対の giant interneuron (GI) が存在する。我々はこれまでに、尾葉への風刺激による電気的興奮に伴って、GIの樹状突起部でCa濃度が上昇することを報告した。さらにこのGI内Ca上昇は活動電位を必須としながらも、ほぼ同じ活動電位バーストを引き起こす2方向からの風刺激に対し、その応答性が異なった。これはGI樹状突起内を逆伝搬する活動電位によるCa上昇がシナプス入力により修飾されるか、もしくはGI内における活動電位発生部位・伝搬様式自身がシナプス入力によって変化する可能性を示唆している。そこで今回、逆行性活動電位とシナプス入力を様々なタイミングで与えたときの樹状突起内のCa動態を比較し、cercus-to-giant synapse におけるシナプス前後の興奮性の時間的一致がGI内Ca濃度変化にどのように影響するかを明らかにした。

[方法] フタホシコオロギ (*Gryllus bimaculatus*) の最終腹部神経節を尾葉および尾葉神経束とともに摘出した。GI樹状突起部に Calcium Green 1 を充填したガラス微小電極を刺入し、電気泳動的に色素注入した。細胞内電位変化をガラス微小電極から誘導すると同時に、細胞内Ca濃度変化をICCDカメラで計測した。

[結果と考察] GIにおいて、単発の活動電位で誘導される一過性Ca上昇が観察された。左右の尾葉神経束へのシナプス刺激で誘導される一過性Ca上昇を比較したところ、その振幅は細胞体と同側の神経束のみを刺激した場合よりも両側神経束を同時に刺激した場合の方が小さかった。またGI軸索への逆行性刺激とシナプス刺激を組み合わせたところ、逆行性活動電位は、樹状突起部にシナプス刺激と同程度の一過性Ca上昇を引き起こすが、シナプス刺激と同期させた場合の方がその振幅は小さくなった。以上の結果から、活動電位依存性一過性Ca上昇はシナプス入力によって修飾されると考えられる。

H. Ogawa, Y. Baba, K. Oka: Coincidence between post-synaptic action potential and pre-synaptic input modulates the Ca transient in cricket giant interneuron.

1PA118

線虫のタッチ反応に関与する神経細胞間の興奮性および抑制性結合

○岩崎唯史¹, 五味壮平², 長名優子³, 生塩研一³, 守田智⁴, 岡浩太郎³ (¹茨大・工, ²岩大・人文社会科学, ³慶大・理工, ⁴静大・工)

線虫 (*C. elegans*) は 302 個の神経細胞をもち、全神経細胞間の結合様式 (ギャップ結合, シナプス結合) が分かっている。しかし、それらの結合が興奮性であるか抑制性であるかの同定は充分には行われていない。そこで本研究では、まずタッチ反応に関与する神経細胞間の結合を対象に、コンピュータ・シミュレーションにより細胞間の結合の符号 (興奮性結合, 抑制性結合) について統計的解析を行った。

シミュレーションに際して、各神経細胞の発火のダイナミクスは次式で与えられるとした。

$$x_i(n+1) = \theta(\sum_j w_{ij} x_j(n) - c_i).$$

ここで、 $x_i(n)$ は n ステップにおける神経細胞 i の発火状態、 c_i は神経細胞 i の膜電位の閾値、 $\theta(x)$ は階段関数である。 w_{ij} は神経細胞 j から神経細胞 i への結合の荷重であり、興奮性であれば $w_{ij} > 0$, 抑制性であれば $w_{ij} < 0$ とした。各 w_{ij} の値はタッチ反応、および神経細胞の破壊実験の結果を満たすように決めた。本研究で着目すべきはこのようにして決めた w_{ij} の値、特にその符号である。

タッチ反応および神経細胞の破壊実験のデータだけでは各細胞間の結合荷重を一意に決めることはできなかったが、実験結果を再現する結合荷重の組 $\{w_{ij}\}$ には次のような共通の特徴があることが分かった。(1) 感覚ニューロンと介在ニューロン間、および介在ニューロンと運動ニューロン間の結合の符号はほぼ同定でき、そのような結合性をもつ神経回路網はタッチ反応を効率よく実現する。(2) 介在ニューロン間には興奮性結合と抑制性結合が混在するが、どちらであるかを同定することは難しい。講演時には、結合性に関する上記以外の特徴についても報告する。

本研究は、日本学術振興会未来開拓学術研究推進事業 (JSPS-RFTF 96T00102) からの援助を受けている。

Y. Iwasaki, S. Gomi, Y. Osana, K. Oshio, S. Morita, K. Oka: Excitatory and inhibitory pathways in neural network of *C. elegans* for touch-induced movement

1PA120

ミミズ腹髄神経節中での一酸化窒素合成酵素の局在性

○北村美一郎¹, 堀田悠人¹, 小川宏人², 岡浩太郎¹, 谷下一夫¹ (¹慶大・理工・システムデザイン工学, ²埼玉医大・生物)

<緒言>一酸化窒素 (NO) は、神経細胞活動時、特にシナプス間でのシグナル伝達において、逆行性の伝達物質として働くことが知られている。また、NO は不活性状態である神経細胞を興奮させる可能性も示唆されている。近年、神経ネットワーク中での NO の作用を調べるため、多くの NO 測定が試みられているが、個体での生理的な条件下、すなわち組織・行動レベルでの神経活動時の NO 作用を調べた例は極めて少ない。我々は、無脊椎動物であるアカミミズ (*Eisenia foetida*) に着目した。ミミズの様々な行動時に体軸方向に情報伝達を行う巨大軸索は、ミミズ腹側にある腹髄神経節中に存在する。このため、ミミズ神経細胞ネットワークの情報処理における NO 作用を考えるためには、腹髄神経節中での NO 発生を調べることに有効である。本研究では、ミミズ腹髄神経節中での NO 合成酵素 (NOS) を蛍光抗体法により染色し、NOS の存在およびその局在場所を調べることを目的とする。

<方法>麻醉を施したミミズを切開し、腹髄神経節を露出させた。バラホルムアルデヒドで固定後、3〜5 体節分の腹髄神経節を切り出した。これを NOS 抗体 (Rabbit Anti NO-synthase, Euro-Diagnostica) で染色し、共焦点レーザ顕微鏡 (Oz with Intervision, NORAN Instruments) で観察した。これにより NOS の存在および局在性を確かめた。

<結果・検討>腹髄神経節中で、NOS の存在を確認した。NOS は、特に腹側の細胞体で多く見られた。一般に、ミミズの神経細胞は、腹側に多く存在することが知られている。これらの神経細胞は、体壁中の感覚器や筋細胞に線維結合している。以上を考慮すると、ミミズ腹髄神経節中の神経細胞は、外部からの刺激に応じて NO を産生し、この NO を用いた何らかのフィードバック機構を形成していることが予想される。

本研究の一部は、日本学術振興会未来開拓学術研究推進事業及び文部省学術フロンティア推進事業より援助頂いた。

Y. Kitamura, H. Horita, H. Ogawa, K. Oka and K. Tanishita
Nitric oxide synthase localized in ventral nerve cord of earthworm