ザリガニ局所回路とその抑制経路

長 山 俊 樹*

ザリガニ腹部最終神経節は尾扇肢感覚情報処理・運動出力制御の中枢であり、上行性・局在性スパイク及びノンスパイク介在ニューロンからなる局所回路が形成されている。この回路の抑制経路を電気生理学的・薬理的・免疫組織化学的手法を用い明らかにした。前運動性要素のノンスパイク介在ニューロンにはPL, ALという2グループが存在し、PLニューロンの抑制性伝達物質はGABA, ALニューロンはグルタミン酸で、相反的な並列経路を形成、回避行動発現時の尾扇肢運動を制御している。また、尾扇肢への機械感覚刺激に対し多くの上行性介在ニューロンは側抑制を示し、素早く短いfast IPSP、もしくはゆっくりとした持続時間の長いslow IPSP応答が起こる。fast IPSPはグルタミン酸作動性の両側性スパイク局在ニューロン、一方、slow IPSPはGABA作動性の両側性ノンスパイクニューロンLDSによって引き起こされる。ClチャンネルブロッカーPTX存在下でfast IPSPは阻害されるが、slow IPSPは影響を受けず、またslow IPSPに比べfast IPSPの逆転電位が極めて浅いことから、グルタミン酸の抑制作用がCl⁻の流入、GABAがK⁺の流出を介していることが分かった。

1. はじめに

J-P. EvertによるNeuroethology An introduction to the neurophysiological fundamentals of behavior⁸⁾あるいはJ.M. Camhi著のNeuroethology Nerve cells and the natural behavior of animals⁶⁾が出版されてから30年あまり、神経行動学という研究分野もその黎明期を過ぎ、それなりに確立され、この夏第11回国際神経行動学会が27年振りに日本で開催される。この比較生理生化学会の会員においても、自らの研究のバックボーンとなっている者も多いはずである。さて、動物行動の基盤となる神経機構を解き明かそうという神経行動学の研究は節足動物を対象に、細胞内記録・染色法という技法の導入で、一気に展開した。これらの動物がステレオタイプな行動パターンをよく示すことで、行動の定量的解析が容易になり、神経系が単純で、ニューロン数が比較的少ない、つまり頑張れば相当数の神経要素を定性的に捉えられるという利点を持つ。個々のニューロンは比較的大型で、微小ガラス管電極を用いた細胞内記録法による解析が容易にでき、蛍光色素ルシファーイエローをその後電気泳動的に注入することで、簡単にそのニューロン像を捉えることができ、今では共焦点レーザー顕微鏡を用いることで、短時間でそのニューロンの三次元構造を明らかにできる。これら生理学的・形態学的データの蓄積

により、個々のニューロンはそれぞれユニークなニューロンとして同定することが可能となった¹⁰⁾。この同定ニューロンという概念の導入により、ある応答が生じる、あるいは、修飾・変化する際の個々のニューロンの役割やその神経接続を知ることが可能となり、この30余年の成果として、詳細な神経回路が明らかになった例がいくつも報告され、関連する出版物も数え切れない程増えている^{5, 7, 37, 38, 40)}。

2. ザリガニ尾扇肢運動制御の局所回路

アメリカザリガニ (*Procambarus clarkii* Girard, 以降単にザリガニと記す) は、尾部への機械的接触刺激に対し、その刺激の強さに応じ2つの行動が引き起こされる。強い刺激に対してザリガニは急速に腹部を屈曲させ、宙返りし、後方へ泳いで逃げるテイルフリップと呼ばれる逃避行動を示す^{17, 31)}。一方、弱い接触では回避行動が引き起こされ、その応答パターンは齢依存的、地位依存的に両側の尾扇肢を閉じながら前進歩行する逃避型のダート応答から防御型の鉄を持ち上げながら刺激源に振り返るターン応答に切り替わる^{9, 24)}。ダート応答では両側の尾扇肢が閉じる動きを示す(図1)のに対し、ターン応答では左右の尾扇肢は非対称的な開閉運動を示す。このダート応答発現時の尾扇肢運動を制御している腹部最終神経節内の局所神経回路を我々は詳しく調べてきた^{15, 18, 27)}。図2のように、尾扇肢上の機械感覚毛支配の感覚ニューロンは直接尾扇肢運動ニューロンにシナプス接続しているのではなく、脳に向け軸索を投射している上行性介在ニューロン(ascending interneurone)、この神経節内に全構造の納まるスパイク発射型のスパイク局在ニューロン(spiking local interneurone, spL)、及び、スパイクを全く発射せず漸次的な膜電位変化だけで機能するノンスパイク局在ニューロン(nonspiking interneurone)にダイレクトな興奮性化学シナプスを形成する^{13, 22)}。同時細胞内記録法は2つのニューロン間のシナプスの有無や方向・極性を知る上で、直接的な証拠を得ることのできる最も信頼できる生理学的手法であり、これと多重染色法を組み合わせることで、神経回路構築の強力なツールとなる。この3つの介在ニューロングループのうち、ノンスパイクニューロンは尾扇肢運動ニューロンへの出力を持ち、自らの膜脱分極に従ってアナログ的に伝達物質を放出し、漸次的かつ持続的に運動ニューロンの膜電位を変化させ、前シナプス要素として尾扇肢運動パターン形成を制御している^{23, 33)}。スパイク局在ニューロンは20個同定され²⁶⁾、ノンスパイクニューロンにダイレクトな抑制性シナプスを形成し、感覚入力の信号反転器の役割

*Toshiki NAGAYAMA, 山形大学理学部生物学科(〒990-8560 山形県山形市小白川町1-4-12)

Received 28 November 2013, Accepted 6 February 2014

を果たす¹³⁾。30個の同定上行性介在ニューロン²⁵⁾の多くは、逆にノンスパイクニューロンにダイレクトな興奮性出力を持ち、信号増幅器となっている、と同時に前方の腹部・歩脚運動系の活動性を協調的に制御する^{2, 13)}。感覚ニューロンは腹部最終神経節腹部側に終末し、運動ニューロンの樹状突起は背側側に枝を伸ばしており、感覚ニューロンから受け取ったノンスパイクニューロンの興奮性シナプス後電位 (EPSP) は減衰しながら出力シナプスへ伝わっていく。上行性介在ニューロンは背側部でノンスパイクニューロンに出力することで、感覚信号の減衰分を担保している。

前運動性ノンスパイクニューロンは片側性で、細胞体と同側の片半球にのみ広範囲に細い枝を分枝し、その細胞体の位置及びその基本構造の違いから大きく posterolateral (PL) ニューロン (図3A), anterolateral (AL) ニューロン (図3B) という2グループに分類でき

図1 ザリガニ回避行動ダート応答 小型ザリガニは尾部への弱い接触刺激に対し、両側の尾扇肢を閉じながら前進歩行し、刺激源から遠ざかる。

図2 ダート応答発現時の尾扇肢制御の局所神経回路 単一感覚毛支配の感覚ニューロンの細胞外スパイクをプレトリガーに3グループの介在ニューロンの応答を重ね書きすると、それぞれがダイレクトなEPSP応答を示す。また、上行性介在ニューロンあるいはスパイク局在ニューロンのスパイクをプレトリガーにノンスパイクニューロンの応答を重ね書きすると、それぞれダイレクトなEPSPあるいはIPSP応答を示す。ノンスパイクニューロンへの脱分極性電流注入によって、尾扇肢運動ニューロンは持続的な膜脱分極あるいは過分極を示す。

る²⁰⁾。PLニューロンは神経節の後側方に細胞体を持ち、細胞体から神経節前方に向かって主要突起を伸ばす。ALグループは弓矢様の構造を示し、細かい突起を中央部に向け広げている。細胞体は主に神経節の側方部、中央部あるいは前側方部に位置し、その違いからAL-I~IIIという3つのサブグループに分けられる。PLニューロンは尾扇肢を閉じる方向の、一方ALニューロンは尾扇肢を開く方向の運動パターンを作り出し (図3C), 相反的並列回路を形成している^{20, 34, 35)}。ノンスパイクニューロンの抑制性出力は化学シナプスを介しているのに対し、興奮性出力は電気シナプスを介している³³⁾。脊椎動物においてもノンスパイクニューロンのようなアナログ的制御は網膜や嗅球で見出されており、また、スパイク局在ニューロンとノンスパイクニューロンの階層的接続はバッタの後胸神経節でも詳しく解析されている⁵⁾。このザリガニ局所回路の神経接続、ノンスパイクニューロンの機能的生理に関しては、別の場所で詳しく解説しているので¹⁸⁾、そちらのほうを参照願いたい。

図3 2グループのノンスパイクニューロンが形成する相反的並列経路 (A) PLニューロンの形態 (左がPL-3, 右がPL-1ニューロン)。(B) ALニューロンの形態 (左がAL-III, 右がAL-IIニューロン)。(C) closer運動ニューロン(上), opener運動ニューロン(下)に対し、興奮性(興奮性入力を受け、興奮性出力を持つ)、抑制性(興奮性入力を受け、抑制性出力を持つ)、脱促進性(抑制性入力を受け、興奮性出力を持つ)、脱抑制性(抑制性入力を受け、抑制性出力を持つ)神経経路を形成するAL, PLニューロンのサンプル数。主にPLニューロンが尾扇肢を閉じる方向の、一方ALニューロンは開く方向の運動パターンを形成する。

3. 抑制性伝達物質の同定

ある行動発現に關与するニューロン群のシナプス接続が分かったとしても、それで神経回路の全てが構築されたことにはならない。1つの伝達物質でも興奮性、抑制性両方の作用を持つものが知られているし、また同じ興奮性伝達物質でも、受け手の受容体の性質によっても、その回路の挙動は変わってくる。従って、興奮性・抑制性出力がどのような伝達物質を介しているのか、そして、どのようなタイプの受容体が關与しているのか明らかにすることこそ、神経回路の機能を知る上で重要であり、次の展開すべきステップでもある。その為には、電気生理学的手法に加え、薬理的・免疫組織化学的手法を用いた解析を進めていく必要がある。

ザリガニ局所回路の場合、感覚ニューロンからの興奮性伝達物質はアセチルコリンであり³⁹⁾、運動ニューロンの興奮性伝達物質はグルタミン酸である³⁾。 γ -アミノ酪酸(GABA)は脊椎・無脊椎動物両方において代表的な抑制性伝達物質であり、実際に腹部最終神経節ニューロパイル内への圧力注入による微量投与によって尾扇肢を開く機能を持つ opener 運動ニューロンに持続的な膜過分極を引き起

こすことができる(図4 A)。このGABAによる過分極の振幅は運動ニューロンへの脱分極性電流注入によって大きくなり、過分極性電流注入によって徐々に小さくなり、やがて逆転する(図4 B)。ノンスパイクニューロンへの脱分極性電流注入によっても opener 運動ニューロンにスムーズな膜過分極を引き起こすことができるが、その際の振幅も運動ニューロンへの過分極性電流注入によって同様に小さくなり、3 nA 過分極性電流で GABA 投与時のように逆転する(図4 C)。従って GABA がノンスパイクニューロンの抑制性伝達物質だと容易に想像でき¹⁶⁾、実際にノンスパイクニューロンが GABA を持っていることを示せば良い。そこで、細胞内染色法により蛍光色素ルシファーイエローをノンスパイクニューロンに注入し、その後、その腹部神経節を取り出し、抗 GABA 抗体を用いた免疫組織化学染色(ルシファーとは違う励起波長の Cy-3 で可視化)を行い、二重ラベル解析した^{1, 14, 28, 30)}。図5 A はその一例で、染色した PL ニューロンの全体像を左に、ルシファーイエローでラベルされたこのニューロンの細胞体の拡大図を中央に、同一焦点面の Cy-3 でラベルされた GABA 陽性反応を示した細胞体像を右に示してある。矢じりで示された細胞体がこの PL ニューロンの細胞体で、

図4 ニューロパイル内へのピコポンプを用いた圧力注入による GABA 微量投与 (A) 1 mM GABA 圧力注入により、opener 運動ニューロンは膜過分極性応答を示す。(B) 運動ニューロンへの電流注入による膜過分極性応答の変化。3 nA 過分極性電流注入によって膜過分極は逆転する。(C) ノンスパイクニューロンから opener 運動ニューロンへの抑制性出力。ノンスパイクニューロンへの 1 nA 脱分極性電流注入により、opener 運動ニューロンは膜過分極を示し、運動ニューロンへの 3 nA 過分極性電流注入によって逆転する。

図5 PL ノンスパイクニューロンの細胞内染色と抗 GABA 抗体免疫組織化学染色の二重ラベル解析 (A) ルシファーイエローによる PL ニューロン細胞内染色の全体像が左、中央は細胞体に焦点を合わせた拡大像。抗 GABA 抗体を用い免疫組織化学染色を施し Cy-3 で可視化した同一焦点像が右。矢じりで示されているように、この PL ニューロンの細胞体は GABA 陽性反応を示す。(B) PL ニューロンは PL-1 から PL-3 の 3 つのサブセットに同定でき、その細胞体はすべて GABA 陽性反応を示すクラスター内に見出せる。

Cy-3でラベルされており、このことからこのPLニューロンがGABA作動性であることがわかる。また、このPLニューロンの周りに、GABA陽性反応を示す細胞体のクラスターが観察できる。これらの細胞体の直径はすべて25 μm 以下と小さく、二重ラベル解析の結果、このクラスターは7~12個の細胞体からなり、そのすべてがPLニューロンの細胞体であることがわかった(図5 B)。主要突起の数及びその分枝パターンから3つのサブセット、PL-1, PL-2, PL-3に分類することが可能で、PLニューロンはサブセットとしてなら同定可能であることが分かった³⁰⁾。

ALニューロンの細胞体群はPLニューロンの細胞体群ほど密には集合しておらず、異なる3つの部位に分散して存在しており、細胞体が側方部に位置するAL-I、中央部に位置するAL-II(図3 B右)はPLニューロン同様、GABA陽性反応を示す³⁰⁾。しかし、主要ALニューロンである(=細胞内染色で引っかかってくる確率が一番高い)細胞体が神経節の前側方部に位置するAL-IIIニューロンの細胞体は図6 AのようにGABA陽性反応を示さなかった。また、同定スパイキング局在ニューロン spL-ant1の細胞体もGABA陽性反応を示さなかった(図6 B)。spL-ant1のスパイクをプレトリガーにノンスパイキングニューロンの応答を加算平均すると、1ミリ秒以下の潜時で抑制性シナプス後電位(IPSP)が引き起こされ、その振幅は脱分極性・過分極性電流注入によって変化し(図6 C)、spL-ant1はノンスパイキングニューロンに化学シナプスを介したダイレ

クトな抑制性シナプスを形成している。つまりGABA以外の抑制性伝達物質が、これらGABA陽性反応を示さなかった介在ニューロンで用いられていることになる。

図7 Aのように尾扇肢速閉筋 adductor 筋にグルタミン酸を圧力注入により微量投与すると、excitatory junctional potential (EJP) が記録される。ルシファーイエローによる細胞内染色と抗グルタミン酸抗体を用いた免疫組織化学染色の二重ラベル解析により³²⁾、adductor 運動ニューロンの細胞体はグルタミン酸陽性反応を示す(図7 B)。しかし、腹部最終神経節ニューロパイル内にグルタミン酸を微量投与すると、ノンスパイキングニューロンに持続的な過分極が引き起こされ、closer 運動ニューロンの自発性スパイク活動も抑制される(図7 C)。つまり、グルタミン酸は中枢内では抑制性伝達物質として機能することがわかった。そこで、抗グルタミン酸抗体を用い、ノンスパイキングニューロン、スパイキング局在ニューロンを二重ラベル解析した。GABA作動性であるPLニューロン(図5)は、抗グルタミン酸抗体に対して陽性反応を示さなかった(図8 A)のに対し、GABAでラベルされなかったAL-IIIニューロン及びスパイキング局在ニューロン spL-ant1の細胞体は、図8 B, Cのように抗グルタミン酸抗体に対し、陽性反応を示した^{1, 30, 32)}。つまり、尾扇肢運動制御の局所回路においてGABA、グルタミン酸という2種類の抑制性伝達物質がニューロンのタイプによって使い分けられているのである。当然送り手の伝達物質が違えば、受け手のレセプ

図6 (A) AL-III ノンスパイキングニューロンの細胞内染色と抗GABA抗体免疫組織化学染色の二重ラベル解析。全体像が左、細胞内染色した細胞体像が右上、抗GABA抗体を用い免疫組織化学染色を施しCy-3で可視化した同一焦点像が右下。このニューロンの細胞体はGABA陽性反応を示さない。(B) 同定スパイキング局在ニューロン spL-ant1の細胞内染色と抗GABA抗体免疫組織化学染色の二重ラベル解析。spL-ant1の全体像が上、細胞内染色した細胞体像が左下、抗GABA抗体を用い免疫組織化学染色を施しCy-3で可視化した同一焦点像が右下。spL-ant1の細胞体はGABA陽性反応を示さない。メルクマールとなる細胞体を(*)で示している。(C) spL-ant1からノンスパイキングニューロンへのダイレクトな抑制性接続。spL-ant1のスパイクをプレトリガーにノンスパイキングニューロンの応答を64回加算平均している。ノンスパイキングニューロンへの電流注入によりIPSPの振幅は増減する。

図7 (A, B) 興奮性伝達物質としてのグルタミン酸。(A) 神経-筋接合部への0.1 mM グルタミン酸微量投与。速閉筋 adductor 筋は興奮性応答を示す。(B) adductor 運動ニューロンの細胞内染色と抗グルタミン酸抗体免疫組織化学染色の二重ラベル解析。左が全体像, 右上が抗グルタミン酸抗体を用い免疫組織化学染色を施し Cy-3 で可視化した像, 右下が同一焦点面の adductor 運動ニューロン細胞体像を重ね合わせた像。矢じりで示されているように adductor 運動ニューロンの細胞体はグルタミン酸陽性反応を示す。(C) 抑制性伝達物質としてのグルタミン酸。ニューロパイル内へ1 mM グルタミン酸を微量投与すると, ノンスパイクニューロンは膜過分極を示し, closer 運動ニューロンのスパイク発射も抑制される。

ター等も違い, そこに何らかの機能差が生じてくるはずである。この GABA とグルタミン酸を介した抑制経路の機能差は, 次に述べるように, 尾扇肢への機械感覚入力を脳へ運ぶ際に生じる上行性介在ニューロンの側抑制 (transverse lateral inhibition) のメカニズムを知ることによって明らかになった。上行性介在ニューロンは局在性ニューロンに比べ大型で, 容易に, しかも長時間に渡って安定した記録が可能で, 灌流実験のような薬理的アプローチに適している。

4. 2つの経路を介した側抑制とその機能差

30個の同定上行性介在ニューロン²⁵⁾の多くは細胞体と反対側のニューロパイル内に樹状突起を広げ, 軸索を脳へ向

図8 細胞内染色と抗グルタミン酸抗体免疫組織化学染色の二重ラベル解析 (A) PL-1 ニューロンの細胞体はグルタミン酸陽性反応を示さない。左が全体像, 中が抗グルタミン酸抗体を用い免疫組織化学染色を施し Cy-3 で可視化した像, 右が同一焦点面の PL-1 ニューロンの細胞体を重ね合わせた像。メルクマールとなる細胞体をアスタリスクで示している。(B) AL-III ニューロン。左が全体像, 中央が AL-III ニューロンの細胞体像, 右が抗グルタミン酸抗体を用い免疫組織化学染色を施し Cy-3 で可視化した同一焦点像。矢じりで示したように, この AL-III ニューロンの細胞体はグルタミン酸陽性反応を示す。(C) スパイク局在ニューロン spL-ant1。左が全体像, 中央が抗グルタミン酸抗体を用い免疫組織化学染色を施し Cy-3 で可視化した像, 右が同一焦点面の spL-ant1 の細胞体を重ね合わせた像。spL-ant1 の細胞体はグルタミン酸陽性反応を示す。メルクマールとなる細胞体をアスタリスクで, spL-ant1 のループ状の特徴的分枝を矢印で示している。

け投射している (図9 A)。それらの上行性介在ニューロンは細胞体と反対側の尾扇肢, つまり軸索が位置する側と同側の接触機械感覚情報並びに弦音器官からの自己受容情報を感じニューロンからダイレクトに受け取り^{4, 13, 29, 36)}, 一方, 反対側, つまり細胞体が位置する側の尾扇肢からは抑制性の感覚情報を受け取り, この側抑制を通じて刺激の方向性がより明確になるよう工夫されている^{12, 26)}。細胞体が位置する側, すなわち反対側の感覚ニューロン束を電気刺激すると, 1 個 1 個短い IPSP からなる持続時間の短い過分極性応答を示す variably effective interneurone (VE) -1 のような上行性介在ニューロン (図9 B) と, 図9 C のような極めてゆっくりとした時間経過を示す持続時間の長い過分極性応答を示す coactivating interneurone (CA) -1 や

reciprocally opening interneurone (RO) -1, RO-2といった上行性介在ニューロンに二分できる¹²⁾。感覚ニューロンの中枢内投射は神経節の片半分で終末し正中線を越え反対側には到達していないので²²⁾、左右両半球に枝を広げている両側性介在ニューロンがこの側抑制を引き起こしているはずである。その候補となるのが、同定ノンスパイキング

図9 上行性介在ニューロンの側抑制 (A) 同定ニューロン RC-3は細胞体と反対側の片半球にのみ樹状突起を広げる。(B, C) 細胞体が位置する側の感覚ニューロン束への繰り返し電気刺激(矢印の間20 Hz)に対する2タイプの抑制性応答。(B) 同定ニューロン VE-1が示す短い持続時間の膜過分極応答。(C) 同定ニューロン CA-1が示すゆっくりとした長い膜過分極応答。

図10 2タイプの両側性局在ニューロン (A) ノンスパイキングニューロン LDS。その染色像 (A-1)。細胞体側の感覚ニューロンからのダイレクトな興奮性入力 (A-2)。上行性介在ニューロン RC-7への抑制性出力 (A-3)。(B) 両側性スパイキング局在ニューロン spL-med グループ。spL-med1の染色像 (B-1)。細胞体側の感覚刺激に対する spL-med1のスパイク応答 (B-2)。spL-med5のスパイクをプレトリガーに上行性介在ニューロン (非染色) の IPSP 応答を32回加算平均したもの (B-3)。

ニューロンの local directionally selective interneurone (LDS) と、スパイキング局在ニューロンのうちの spL-med グループである^{19, 21, 26)}。LDSは両側の広範な枝が太い transverse processで連結されたノンスパイキングニューロンで¹¹⁾、細胞体が位置する側の枝はスムーズで、反対側の枝には多くの瘤状構造が観察され、それぞれ入力・出力部となっている (図10 A -1)。入力部では感覚ニューロンからダイレクトな興奮性入力を受け (図10 A -2)、反対側に樹状突起を広げる上行性介在ニューロンに抑制性出力を持つ (図10 A -2)。spL-med グループは med1から med6までの6個が同定されており^{19, 26)}、すべて両側性のニューロンである (図10 B -1)。やはり、細胞体が位置する側の感覚ニューロンから興奮性入力を受け (図10 B -2)、細胞体と反対側側で上行性介在ニューロンにダイレクトな抑制性シナプスを形成している (図10 B -3)。二重ラベル解析により、LDSは GABA 作動性 (図11 A)、spL-med グループはグルタミン作動性ニューロン (図11 B) であることがわかって^{1, 28, 32)}。また腹部最終神経節ニューロバイル内に GABA を微量投与した際、上行性介在ニューロンには長時間に渡る膜過分極が引き起こされ (図11 C)、グルタミン酸圧力注入によって引き起こされる膜過分極は比較的短い持続時間で元の状態に戻る (図11 D)。

図11 (A) GABA 作動性 LDS。細胞内染色と抗 GABA 抗体免疫組織化学染色の二重ラベル解析。左が全体像、中央が LDS の細胞体像、右が抗 GABA 抗体を用い免疫組織化学染色を施し Cy-3 で可視化した同一焦点像。矢印で示されているように LDS の細胞体は GABA 陽性反応を示す。(B) グルタミン酸作動性 spL-med5。細胞内染色と抗グルタミン酸抗体免疫組織化学染色の二重ラベル解析。左が全体像、中央が spL-med5 の細胞体像、右が抗グルタミン酸抗体を用い免疫組織化学染色を施し Cy-3 で可視化した同一焦点像。矢印で示されているように spL-med5 の細胞体はグルタミン酸陽性反応を示す。(C, D) GABA (C) とグルタミン酸 (D) 微量投与による上行性介在ニューロンの抑制性応答。

実際に単発感覚刺激によって引き起こされる上行性介在ニューロンの抑制性応答には、VE-1が示す立ち下がり及早く持続時間の短いIPSP (図12A-1) とCA-1に代表される立ち下がりが遅く、持続時間の長いIPSP (図12B-1) に区別でき、VE-1のIPSP 振幅は Cl^- チャンネルブロッカーのピクロトキシン (PTX) 灌流下で可逆的に小さくなる (図12A-2) のに対し、CA-1のIPSP 振幅はPTX 存在下でもほとんど変化しない (図12B-2)。両者のIPSP 立下りから振幅ピークに達するまでの時間をヒストグラムにとり比較すると、PTX 非感受性IPSPの方が遅くなっている (図12C)。LDSはその膜脱分極により、漸次的に上行性介在ニューロンに持続的な抑制性応答を引き起こせるのに対し、spL-med グループによる抑制性出力はそのスパイク列に規定され、くしの歯状の短い応答となり (図9BとC)、VE-1の短い抑制性応答がspL-med グループを介して引き起こされ、一方、CA-1のゆっくりとした抑制性応答がLDSを介していることを裏づけている。またGABA 微量投与 (GABAはLDSの伝達物質) の方がグルタミン酸微量投与 (spL-med グループの伝達物質) に比べ、長時間の膜過分極を引き起こせ、PTXの阻害効果が後者では見られない。これらのことから、LDSがslow IPSP, spL-med グループがfast IPSPを形成していることが示唆される。

図12 単発感覚刺激に対する上行性介在ニューロンのfast IPSPとslow IPSP 応答 (A) 上行性介在ニューロン VE-1は単発感覚刺激 (矢印) に対し、持続時間の短いIPSPが引き起こされ (A-1)、その振幅は Cl^- チャンネルブロッカーのピクロトキシン (PTX) 灌流によって可逆的に小さくなる (A-2)。(B) 上行性介在ニューロンCA-1は単発感覚刺激に対し、持続時間の長いIPSP 応答を示し (B-1)、その振幅はPTX 灌流によってもほとんど変化しない (B-2)。(C) PTX 感受性応答と非感受性応答を示すIPSPのピークに達するまでの時間のヒストグラム。

IPSP 発生のイオン機構としては、 Cl^- イオンの流入と K^+ イオンの流出の2つが挙げられる。そこで、GABA、グルタミン酸投与時の膜過分極が逆転するのに必要な過分極性電流量を、ノンスパイクニューロンを例に比較した。グルタミン酸によって引き起こされる膜過分極はノンスパイクニューロンへの1 nA 過分極性電流注入によってすぐに逆転し脱分極性電位変化に切り替わり、その後は注入電流量増加に伴ってその振幅も増大した (図13A)。一方、GABA 投与に伴うノンスパイクニューロンの膜過分極はノンスパイクニューロンへの3 nA 過分極性電流注入によっても逆転しなかった (図13B)。すべての実験結果をまとめてヒストグラムにしてみると、グルタミン酸による膜過分極は2 nA 以下の過分極性電流注入ですべて逆転したのに対し、GABAでは半数以上の個体で逆転には3~6 nA の電流量が必要だった (図13C)。正確に逆転電位を測定するには単電極膜電位固定法を用いた計測が必須ではあるが、 K^+ イオンに比べ Cl^- イオンの平衡電位はより浅い電位にあることを考えれば、GABAによるIPSPには K^+ イオン、グルタミン酸によるIPSPには Cl^- イオンが関与していると考えて妥当だろう。実際に Cl^- チャンネルブロッカーPTXはfast IPSPには影響を持つが、slow IPSPには効果がない (図12)。

図13 グルタミン酸及びGABAによるノンスパイクニューロン膜過分極の逆転電位 (A) グルタミン酸微量投与によって生じるノンスパイクニューロンの膜過分極はノンスパイクニューロンへの1 nA 過分極性電流注入によって逆転する。(B) GABA 微量投与によって生じるノンスパイクニューロンの膜過分極はノンスパイクニューロンへ3 nA 過分極性電流を注入しても逆転しない。(C) グルタミン酸及びGABAによる膜過分極が逆転するのに必要なノンスパイクニューロンへの過分極性電流注入量をプロットしたヒストグラム。

そこで、最後にGABA 及びグルタミン酸による尾扇肢運動ニューロンへの抑制効果に対するPTX 灌流実験を行った。GABA、グルタミン酸のニューロパイル内への微量圧力注入により opener 運動ニューロンのスパイク発射はほぼ完全に抑制される (図14A上とB上)。PTX 存在下においてもGABAによる抑制効果には何ら変化が見られない (図14A中) のに対し、グルタミン酸投与による運動ニュー

図14 グルタミン酸及びGABAによる opener 運動ニューロスパイク抑制に対するPTXの効果 (A) GABA 圧力注入によって生じた運動ニューロンのスパイク抑制はPTX 存在下でも影響を受けない。(B) グルタミン酸圧力注入によって生じた運動ニューロンのスパイク抑制はPTX 存在下では逆に興奮性応答を引き起こす。(C) 感覚刺激(矢印)に対する opener 運動ニューロンの抑制性応答はPTX 存在下で影響を受けない。

ロンのスパイク発射抑制は消え、逆にそのスパイク発射頻度がグルタミン酸投与によって高まった(図14B中)。このようにPTX 存在下で、グルタミン酸投与で運動ニューロンの活動性が逆に昂進したことから、グルタミン酸は中枢内で興奮性伝達物質としての機能も持ち、それが抑制性作用によってマスクされている可能性も考えられる。運動ニューロンに対するグルタミン酸の抑制効果は、その後ノーマルリンガー液に再置換することで回復した(図14B下)。また、感覚刺激に対する opener 運動ニューロンの抑制性応答はPTX 存在下でも阻害されず(図14C)、GABA 作動性のPL ニューロンがこの opener 運動ニューロンの抑制経路となっているという我々の結果(図3C)と一致している。

5. まとめ

以上、ザリガニ尾扇枝の感覚情報処理・運動制御の場である腹部最終神経節の局所回路には、GABA 及びグルタミン酸を伝達物質とする介在ニューロンの抑制性経路が並列的に組み込まれている。

図2のように感覚入力受容側の腹部最終神経節内では、感覚ニューロンは上行性介在ニューロン、スパイク局在ニューロン、ノンスパイク局在ニューロンにダイレクトな興奮性シナプスを形成、スパイク局在ニューロンは信号反転器としてノンスパイク局在ニューロンに抑制性出力を持ち、その際グルタミン酸が放出される。ノンスパイク局在ニューロンはその細胞体の位置及び大まかな形態からPL, ALの2グループに分類でき、PL ニューロンは尾扇枝を閉じる方向の、一方、AL ニューロンは尾扇枝を開く方向の神経経路として組み込まれ(図3)、この相反的並列回路を通じ、文脈・年齢・社会地位依存的な尾扇枝運動の修飾が起こる^{9, 24, 34)}。ノンスパイク局在ニューロンは運動ニューロンへ出力を持つと共に、ノンスパイク局在ニューロン同士でシナプス接続を形成し、興奮性出力は電気シナ

プス、抑制性出力は化学シナプスを介している³³⁾。PL ニューロンではGABA, AL ニューロンのうち主要なAL-III グループはグルタミン酸を抑制性伝達物質として用い(図4~8)、PL ニューロンによって形成される closer 運動ニューロンへの脱抑制経路と opener 運動ニューロンへの抑制経路が主に回避行動ターゲット応答発現の際の尾扇枝を閉じる運動パターン(図1)を生みだしている。上行性介在ニューロンの場合、ノンスパイク局在ニューロンに対しては興奮性シナプスを形成し、信号増幅器の役割を果たしているが、抑制性の上行性介在ニューロンも存在し、感覚情報処理のような違う役割を担っていると考えられる。30個の同定上行性ニューロンのうち、CI-2, RC-5, RO-6, VE-1, NE-2, NE-4はGABA 作動性で³⁰⁾、RC-4, RC-8, NE-1, NE-4はグルタミン酸作動性である³²⁾。この抑制性上行性介在ニューロンのターゲットは他の上行性ニューロンで、グルタミン酸作動性のVE-1はGABA 作動性RC-5にIPSPを引き起こすことができる²²⁾。しかし、上行性介在ニューロンがノンスパイク局在ニューロンにダイレクトな抑制性接続を持つことはなく、ノンスパイク局在ニューロンにダイレクトなEPSPを引き起こすRC-3, CA-1のような上行性介在ニューロンはGABA, グルタミン酸どちらの抗体に対しても陰性であった^{30, 32)}。

多くの上行性介在ニューロンは、樹状突起が分枝している側と反対側の感覚信号に対し抑制性応答を示す(図9)。この側抑制によって刺激の方向性がより明確になる。この反対側からの感覚情報は2タイプの両側性の局在性介在ニューロン経路で伝達される(図15)。spL-med グループの両側性スパイク局在ニューロンはグルタミン作動性で、上行性介在ニューロンに持続時間の短いfast IPSPを引き起こす。一方、両側性ノンスパイク局在ニューロンLDSはGABA 作動性で、上行性介在ニューロンに持続時間の長いslow IPSPを引き起こす(図10, 11)。slow IPSPは長時間に渡り、応答性の低下を引き起こすことができ、神経節全体の興奮性調節に機能し、discreteなfast IPSPは逆に刺

図15 上行性介在ニューロン側抑制の神経経路の模式図 白三角は興奮性シナプス、黒丸は抑制性シナプスを示す。

激の方向性を的確に伝達できるであろう。fast IPSPは Cl^- チャンネルブロッカーのピクロトキシン存在下で阻害されるが、slow IPSPは阻害されない(図12)、それぞれの伝達物質を圧力注入で微量投与した際の抑制性応答はグルタミン酸投与のみPTX存在下で阻害され(図14)、逆転電位も浅かった(図13)。つまり、グルタミン酸によるfast IPSPは Cl^- イオンの流入で、GABAによるslow IPSPは K^+ イオンの流出で引き起こされ、その目的に応じ使い分けられている。ピクロトキシンは脊椎動物においてGABA受容体のブロッカーとして、 Cl^- イオンの細胞内への流入を阻害することが良く知られており、その機能的違いも今後の興味深い課題となろう。

6. 最後に

細胞内記録染色法に代表される局所回路の解析は今の若い研究者にとってはオールドファッションな古臭い研究手法と映るかもしれない。が、結局のところ、神経行動学研究は同定ニューロンの言葉でどれだけ明確に神経回路を語れるかであり、どんな研究手法を用いたとしても、最後はここに回帰するものと信じている。

謝 辞

この文章を書き終えて、まずは声をかけて頂いた関係者の皆様に感謝します。どんな内容でも構わないというK氏のお言葉に甘え、10年以上昔のデータでお話をさせて頂いた。そのほとんどは私が以前いた北大での仕事であり、青沼氏や難波氏をはじめとする多くの院生(その当時はだが...)や同僚らの協力で得られたデータである。ここに謝辞を述べたい。

文 献

- 1) Aonuma, H. & Nagayama, T.: J. Comp. Neurol., 410, 677-688 (1999)
- 2) Aonuma, H., Nagayama, T. & Hisada, M.: Zool. Sci., 11, 191-202 (1994)
- 3) Aonuma, H., Nagayama, T. & Takahata, M.: J. Crust. Biol., 18, 243-252 (1998)
- 4) Aonuma, H., Newland, P. L. & Nagayama, T.: J. Exp. Biol., 202, 2975-2984 (1999)

- 5) Burrows, M.: The neurobiology of an insect brain, Oxford University Press (1996)
- 6) Camhi, J. M.: Neuroethology, Sinauer (1984)
- 7) Carew, T. J.: Behavioral neurobiology, Sinauer (2000)
- 8) Evert J. -P.: Neuroethology, Springer (1980)
- 9) Fujimoto, S., Hirata, B. & Nagayama, T.: J. Exp. Biol., 214, 2718-2723 (2011)
- 10) Hoyle, G. & Wiersma, C. A. G.: Identified neurons and behaviour of arthropoda, Plenum Press (1977)
- 11) Kondoh, Y. & Hisada, M.: J. Comp. Neurol., 251, 334-348 (1986)
- 12) Miyata, H., Nagayama, T. & Takahata, M.: J. Neurophysiol., 77, 1213-1223 (1997)
- 13) Nagayama, T.: J. Exp. Zool., 279, 29-42 (1997)
- 14) Nagayama, T.: J. Exp. Zool., 283, 541-547 (1999)
- 15) Nagayama, T.: in The crustacean nervous system (Wiese, K. ed.), pp. 591-600, Springer (2001)
- 16) Nagayama, T.: J. Exp. Zool., 303A, 66-75 (2005)
- 17) 長山俊樹: 甲殻類の逃避行動, 昆虫ミメティックスー昆虫の設計に学ぶ(下澤楯夫, 針山孝彦監修), pp. 533-541, エヌ・ティー・エス (2008)
- 18) 長山俊樹: 神経機構, ザリガニの生物学(川井唯史, 高畑雅一編著), pp. 193-259, 北海道大学出版会 (2010)
- 19) Nagayama, T. & Hisada, M.: Zool. Sci., 2, 641-651 (1985)
- 20) Nagayama, T. & Hisada, M.: J. Comp. Neurol., 257, 347-358 (1987)
- 21) Nagayama, T. & Hisada, M.: J. Comp. Physiol. A, 163, 601-607 (1988)
- 22) Nagayama, T. & Sato, M.: J. Comp. Physiol. A, 172, 281-294 (1993)
- 23) Nagayama, T., Takahata, M. & Hisada, M.: J. Comp. Physiol. A, 154, 499-510 (1984)
- 24) Nagayama, T., Takahata, M. & Hisada, M.: Exp. Biol., 46, 75-82 (1986)
- 25) Nagayama, T., Isogai, Y., Sato, M. & Hisada, M.: J. Comp. Neurol., 332, 155-174 (1993)
- 26) Nagayama, T., Isogai, Y. & Namba, H.: J. Comp. Neurol., 337, 584-599 (1993)
- 27) Nagayama, T., Namba, H. & Aonuma, H.: Histol. Histopath., 9, 791-805 (1994)
- 28) Nagayama, T., Aonuma, H. & Miyata, H.: J. Exp. Biol., 199, 2447-2450 (1996)

- 29) Nagayama, T., Aonuma, H. & Newland, P. L.: J. Neurophysiol., 77, 2826-2830 (1997)
- 30) Nagayama, T., Namba, H. & Aonuma, H.: J. Comp. Neurol., 389, 139-148 (1997)
- 31) Nagayama, T., Araki, M. & Newland, P. L.: J. Comp. Physiol. A, 188, 621-630 (2002)
- 32) Nagayama, T., Kimura, K., Araki, M., Aonuma, H. & Newland, P. L.: J. Comp. Neurol., 474, 123-135 (2004)
- 33) Namba, H. & Nagayama, T.: J. Comp. Physiol. A, 190, 615-622 (2004)
- 34) Namba, H., Nagayama, T. & Hisada, M.: J. Neurophysiol., 72, 235-247 (1994)
- 35) Namba, H., Nagayama, T. & Takahata, M.: J. Comp. Physiol. A, 180, 463-472 (1997)
- 36) Newland, P. L. & Nagayama, T.: J. Comp. Physiol. A, 172, 389-400 (1993)
- 37) North, G. & Greenspan, R. J.: Invertebrate neurobiology, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2007)
- 38) Simmons, P. & Young, D.: Nerve cells and animal behaviour, 3rd ed., Cambridge University Press (2010)
- 39) Ushizawa, T., Nagayama, T. & Takahata, M.: J. Comp. Physiol. A, 179, 1-13 (1996)
- 40) Zupanc, G. K. H.: Behavioral neurobiology, Springer (2004)

Abstract

Crayfish local circuits and their inhibitory pathways

Toshiki NAGAYAMA

Department of Biology, Faculty of Science, Yamagata University, 1-4-12 Kojirakawamachi, Yamagata 990-8560, Japan

The aim of neuroethological approach is to explain animal behaviour in terms of underlying neural circuitry. Arthropod animals are suitable for this field of study, since they have a relatively simple nervous system and a smaller number of central neurones, that are frequently identifiable, than vertebrates. Small crayfish show an avoidance dart behaviour in response to gentle touching of the tailfan. The movement of the uropods in this response is controlled by local circuits within the terminal abdominal ganglion. Three distinct groups of interneurones, intersegmental ascending, spiking local and nonspiking local interneurones, receive cholinergic excitatory inputs directly from sensory afferents. The ascending interneurones make direct excitatory connections with nonspiking interneurones. By contrast, spiking local interneurones make direct inhibitory connections with nonspiking interneurones. A small amount of depolarizing current injected into nonspiking interneurones causes a sustained and smooth membrane hyperpolarization of the motor neurones. Using electrophysiological, pharmacological and immunocytochemical approaches, GABAergic and glutamatergic inhibitory pathways are revealed to be involved in this circuit. Premotor nonspiking interneurones are divided into two groups, PL and AL interneurones. PL interneurones

form neural pathways that close the uropod while AL interneurones form neural pathways that open it. Inhibitory outputs from PL interneurones are mediated by GABA while those of AL interneurones are mediated by glutamate. Thus, PL and AL interneurones form parallel and opposing pathways with different inhibitory transmitters. Functional differences between these two inhibitory pathways are revealed by the analysis of transverse lateral inhibition of ascending interneurones. Many ascending interneurones extend dendrites only within the hemiganglion contralateral to their somata. They receive transverse inhibitory inputs via two distinct bilateral local interneurones. Nonspiking interneurone, LDS is GABAergic and mediates slow IPSPs in the ascending interneurones, while spiking local interneurones of a medial group are glutamatergic and elicit fast IPSPs in different ascending interneurones. Bath application of picrotoxin blocks fast IPSPs but has no effect on slow IPSPs. The reversal potential of the glutamate-mediated hyperpolarization of interneurones is much lower than that of the GABA-mediated one. Slow inhibitory effects of GABA are mediated by a potassium current, while fast inhibition of glutamate is mediated by a chloride current.

Keywords: behaviour, identified neurone, synaptic interaction, transmitter, receptor