

ノン・スパイキング・ニューロンの感覚情報処理機構

Sensory processing of nonspiking interneurons

代表研究者 北海道大学理学部動物学助手 長山俊樹
Assist. Prof., Zool. Inst., Fac. of Sci., Hokkaido Univ.
Toshiki NAGAYAMA

The aim of my research is to understand the functional role of local interneurons and their local circuitry relating to behavioral context. Mechanical stimulation of the tailfan in crayfish elicits a dart-like response. This response is mediated by nonspiking as well as spiking local interneurons.

Synaptic connection to and from nonspiking local interneurons in the avoidance reflex is investigated in detail with simultaneous intracellular recordings and stainings. Some nonspiking interneurons are found to receive excitatory sensory input from afferents by using single sensory hair stimulation. The connection is direct and chemically-mediated. A single nonspiking interneuron receives inputs from several afferents and a single afferent connects not only nonspiking but also spiking local and projecting interneurons. Neither direct connection between motor neurons and afferents nor direct inhibitory connection between interneurons and afferents are detected. Inhibitory input from afferents is transmitted into nonspiking interneurons via certain spiking local interneurons. Membrane potential change of nonspiking interneuron, in turn, is effective to change the membrane potential of postsynaptic uropod motor neurons by means of graded release of chemical transmitter.

研究目的

ヒトを含め動物の脳は、基本構成単位であるニューロン（神経細胞）が幾重にも集合した極めて複雑かつ精巧な階層システムといえる。そして特定のニューロンの間の幾重にも渡る選択的な接続、ニューラル・ネットワーク（神経回路網）を経て、優れた情報処理機能を果たす。しかし、高等脊椎動物の脳は余りにその数が多く（10～100億個）、その機能の全貌を解明することは不可能に近く、ニューラル・ネットワークの構造、情報処理機構の本質を理解するには、比較的少数のニューロンで構成される節足動物中枢神経系を研究対象とするケースが多い。

ニューロン間の情報伝達は全動物界を通じ普遍で、全か無的に生ずるスパイク（活動電位）を基本要素に行われると従来考えられてきたが、80年代に入りザリガニ・バッタといった節足動物でスパイクを全く発生せず、膜電位変化のみで機能

を営むノン・スパイキング・ニューロンの存在が明らかとなり、ニューラル・ネットワークの構成を考える際にアナログ的情報伝達という概念の導入の必要性が生じてきた。しかし、その発見が比較的新しいこと、極めて小さく記録が容易でないことから、これらノン・スパイキング・ニューロンの入・出力接続に関する詳細な解析はほとんどなく、実際のシナプス入・出力変換の具体的機構はよくわかっていないのが現状であった。

本研究は、アメリカザリガニ中枢内の同定ノン・スパイキング・ニューロンの接触感覚情報処理能に的を絞って、①最終付属肢である尾扇肢からの機械性感覚入力受容・統合、②ザリガニ行動への出力変換機構について、通常のスライディング・ニューロンとの比較と合わせ、生理・形態学的手法を用いて定性・定量的解析を行った。

研究経過

ノン・スパイキング・ニューロンの存在は、

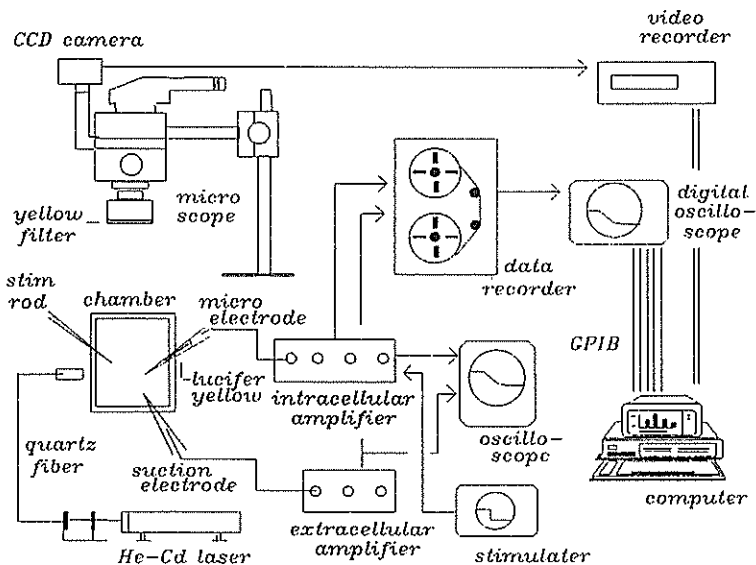


図1. 実験の概要. 詳細は本文を参照.

1980年代に入り多くの節足・軟体・下等脊椎動物などで確認され、また通常のスパイクを発生するニューロンもその一部分でスパイクによらない情報伝達を行うという多くの報告もあり、アナログ的情報伝達という概念はニューラル・ネットワークを解析する上ですでに定着したと言える。さらに多くの研究者が、これらのニューロンが1個の神経単位として機能するのではなく、各部位で複数の独立した機能を果たし得ると言う機能仮説を提出、最近の脳・神経生理学の一傾向となっている。

数年来行ってきたザリガニ中枢内のノン・スパイキング・ニューロン研究を通じ、一早くニューラル・ネットワークがこれらのニューロンを主要要素とする並列した局所回路網の複合構成であり、情報処理・行動発現が複数の局所回路の並列的情報統合の相互作用によるという仮説を提起してきた。

研究成果

1. 背景

ザリガニは尾扇肢への接触感覚刺激に対し、両側の尾扇肢を閉じながら前進する刺激回避行動を取る。この時の尾扇肢の動きは腹部最終神経節内に局在する2タイプの片側性ノン・スパイキン

グ・ニューロンを主要要素とする介在ニューロン群の一連の並列的接続よりなるニューラル・ネットワークにより制御されており、ノン・スパイキング・ニューロンが受容する感覚入力シナプス電位という形のまま運動出力へと変換される。

2. 感覚入力受容機構及び応答特性

第1に検討すべきことは、ノン・スパイキング・ニューロンが感覚情報をどのように受け取るかという点である。従来の実験は感覚ニューロン束を電気刺激したり、尾扇肢全体に水流を与えるというかなり一律的・粗なもので入力受容の実際は判然としていなかった。そこで単一感覚毛を局所的、選択的に刺激し、それに対する応答を解析し、より正確かつ詳細な感覚受容機構を明らかにすることを目指した。

a) 実験の概略 実験はアメリカザリガニ (*Procambarus clarkii* Girard) の雌雄成体 (体長7~10 cm) の腹部単離標本を用い、腹部最終神経節とその第1~6根を腹側より露出し、生理食塩水に浸した (図1)。最終付属肢である尾扇肢外肢 (exopodite) は、その末端部を除き、腹側クチクラ及び結合組織を注意深く取り除き、感覚ニューロン束を露出、2箇所から感覚ニューロンの活動を細胞外誘導した。尾扇肢外肢末端上の感覚毛は、

その先端に微針を取り付けたロッドを油圧マニピュレータで垂直方向にわずかに駆動することで、限定的かつ選択的に刺激した。感覚毛の刺激部位及び細胞外電極の記録位置は、双眼実体顕微鏡に備え付けた CCD カメラよりビデオ撮影し、実験終了後、パーソナル・コンピュータ (NEC 9801VX) により画像処理し、細胞外電極の二点間の距離を測定、その距離と外部誘導スパイクの記録時間差から感覚ニューロンの伝導速度を算出した。

ノン・スパイクング・ニューロンならびに他の中枢ニューロンは蛍光色素ルシファー・イエローを充填した微小ガラス管電極を刺入し、その活動、ならびに感覚毛刺激に対する応答を細胞内記録した。単一感覚毛刺激に対する中枢ニューロンの応答は極めて微弱であり、各ニューロンの応答はまずデータレコーダ (NF RP882) に記録・保存し、実験終了後に再生、デジタルオシロスコープ (Tektronix 2440) にて A/D 変換、スパイク・トリガー：加算平均した後、パーソナルコンピュータ (HP VectraES/12) に転送して波形解析した。

生理実験中、色素を電気泳動的に神経細胞内に注入し、He-Cd レーザーの青紫光の落射照射により発光させ、*in situ* の状態で、染色したニュー

ロンの形態及び電極の刺入部位を双眼実体顕微鏡下で観察・確認した。実験終了後、最終神経節を摘出、固定、脱水、透徹し、透過型蛍光顕微鏡でその微細形態を連続写真撮影することでさらに詳しく再構成した。

b) ノン・スパイクング・ニューロンへのダイレクトな興奮性入力 図 2 は、以上の実験概略のもと、その結果の一例を示したものであるが、細胞体が神経節の前側方部にある AL タイプのノン・スパイクング・ニューロンからの記録である。電極刺入部位は矢印で示したように、腹側の比較的太い枝であった。記録は 120 回の応答を加算平均したものであるが、脱分極性の膜電位変化、興奮性シナプス後電位 (EPSP) が、感覚ニューロンのスパイクに引き続き 9.74 ミリ秒の遅れで観察される。細胞外電極の二点間の距離は 3.7 ミリで、記録されたスパイクの時間差は 4.76 ミリ秒、したがって、この感覚ニューロンの伝導速度は 0.78 メートル/秒となる。末梢部の細胞外電極から神経節までの距離は 6.6 ミリあり、感覚ニューロンのスパイクが神経節に到達してから、ノン・スパイクング・ニューロンの EPSP 立ち上がりまでに 1.26 ミリ秒の遅れがあることになる。神経節内での伝達物質放出までの時間を考慮

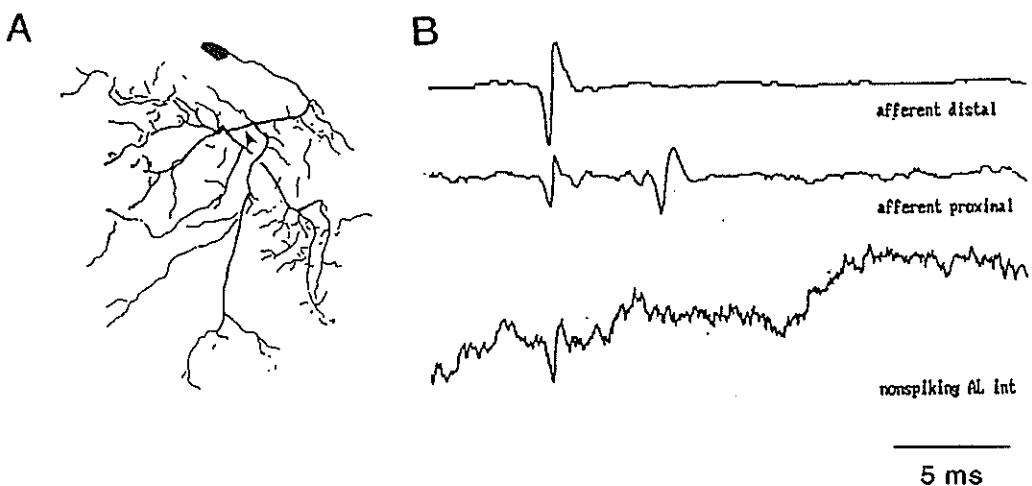


図 2. ノン・スパイクング・ニューロンへの興奮性感覚入力。A) 記録ニューロンの形態。矢印は電極刺入部位を表わす。B) 単一感覚毛刺激に対するノン・スパイクング・ニューロンの応答。末梢部の感覚ニューロンのスパイクをプレ・トリガーに 120 回の応答を加算平均したもの。

に入れば、シナプス遅延は約 1.0 ミリ秒と計算でき、ダイレクトなコネクションと結論できる。20 個のノン・スパイキング・ニューロンに関し、同様の方法で解析した結果、15 個でそのシナプス遅延時間は 1.3 から 0.8 ミリ秒と算出され、多くのノン・スパイキング・ニューロンが直接感覚ニューロンから興奮性入力を受け取っていることが判明した。

多くのノン・スパイキング・ニューロンは近隣の複数の感覚毛から同時に興奮性入力を直接受け取っていた。つまり、入力の収斂 (convergence of inputs) が起こっていた。しかし、ある 1 本の感覚毛刺激に対し、形態が非常に類似した 2 個の PL タイプのノン・スパイキング・ニューロンから順次応答を記録したところ、ダイレクトな接続が認められたのは一つのニューロンだけで、もう一方のノン・スパイキング・ニューロンには顕著な膜電位変化は観察されなかった。つまり、ノン・スパイキング・ニューロンは、その感覚毛群を支配する全ての感覚ニューロンと接続を持つわけではなく、特定の感覚ニューロンとのみ選択的にシナプスを形成していることも明らかとなった。

c) スパイキング介在ニューロンへの興奮性入力との比較 軸索を前方の神経節へ伸ばす上行性のスパイク発生型の介在ニューロンも尾扇肢感覚毛から興奮性入力をダイレクトに受け取ってい

た。ノン・スパイキング・ニューロンの EPSP と比較し、その立ち上がりまでの早さ、EPSP の持続時間は極めて短く、分枝の長さ、直径の太さ、枝分かれの頻度などによるケーブル特性の違いのためと思われる。

1 本の感覚毛から複数の上行性介在ニューロンへ同時にダイレクトな接続があることも判明した。つまり、情報の発散 (divergence of inputs) も起こっていた。しかし、上行性のニューロンに対し、シナプスを形成している感覚ニューロンとノン・スパイキング・ニューロン間に直接の接続はなく、上行性ニューロンの興奮性応答から約 2~3 ミリ秒遅れてノン・スパイキング・ニューロンに膜電位脱分極が起こった。このことから、特定の感覚毛からの情報は直接ではなく、上行性介在ニューロンを介してノン・スパイキング・ニューロンに伝達されていると推定された。

d) ノン・スパイキング・ニューロンへの抑制性入力 興奮性入力ばかりではなく、あるタイプのノン・スパイキング・ニューロンは接触感覚情報として抑制性入力を受け取っている。しかし、感覚毛刺激から IPSP が起こるまでの潜時は極めて長く、ダイレクトな接続とは考えられない。同じく最終神経節内にその全構造が納まるスパイク発射型の局在性介在ニューロンが、ノン・スパイキング・ニューロンへの抑制性入力源であ

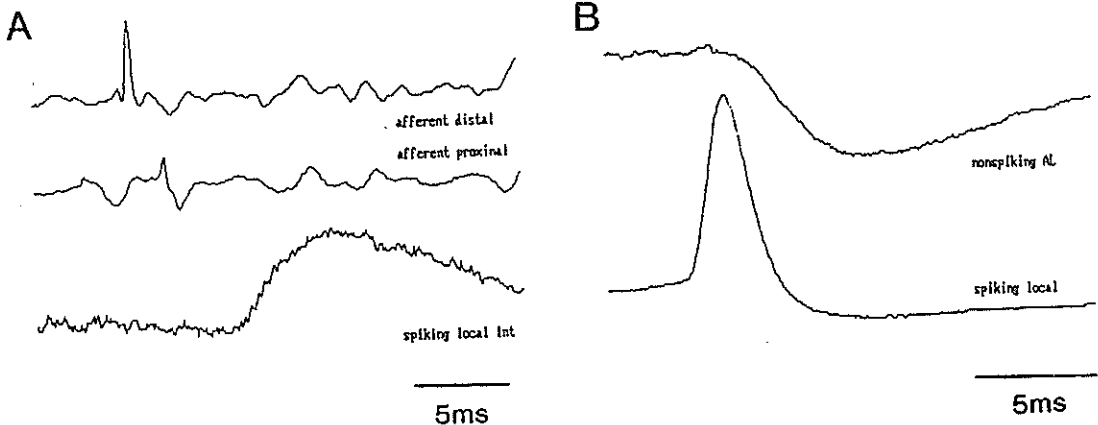


図 3. スパイキング局在ニューロンの入・出力接続。A) 単一感覚毛刺激に対するスパイキング局在ニューロンの応答。応答は 256 回の加算平均。B) スパイキング局在ニューロンのスパイクをトリガー源にノン・スパイキング・ニューロンの応答を 256 回加算平均したもの。

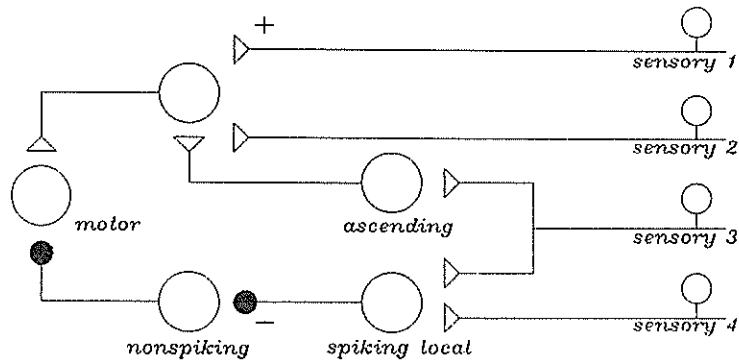


図4. ノン・スパイキング・ニューロンへの感覚入力伝達経路。詳細は本文を参照。

ることが、同時細胞内記録法によって明らかとなった。

細胞体の位置、その基本的構造の違いから十数個のスパイキング局在ニューロンが同定できたが、これらは尾扇肢感覚毛からやはり興奮性入力をダイレクトに受け取っており(図3A)、これらのニューロンのスパイクは1対1対応でノン・スパイキング・ニューロンに抑制性のシナプス後電位(IPSP)を引き起こすことができ、その潜伏は1ミリ秒以下であった(図3B)。

3. 出力変換機構

感覚入力受容によるノン・スパイキング・ニューロンの膜電位変化であるシナプス後電位は、指数関数的に減衰しながら電気緊張的に出力シナプ部位へ伝達され、興奮性、抑制性の化学伝達物質を放出し、前運動性効果を生み出す。ノン・スパイキング・ニューロンの出力変換特性を検討するため、微小ガラス管電極をそれぞれノン・スパイキング・ニューロン、運動ニューロンに刺入し、同時に細胞内記録を取りその相関を解析した。

ノン・スパイキング・ニューロンへの人為的な脱分極性電流注入により、後シナプ側である尾扇肢運動ニューロンは、その膜電位が脱分極、あるいは過分極した。その膜電位変化は、非常にゆっくりとしたもので、通電の間中持続し、1 nA以下という極めて微小な強度の通電でも、多くのノン・スパイキング・ニューロンは運動ニューロンに対し、その効果を発揮した。運動ニューロン

の膜電位変化の大きさは、ある程度までノン・スパイキング・ニューロンへの注入電流の強さに比例し、増加、あるいは減少し、漸時的な効果であることも確認された。また、あるタイプのノン・スパイキング・ニューロンでは過分極性の電流注入によっても運動ニューロンの膜電位を今度は逆方向に変化させることができ、両方向性の効果を示した。したがって、スパイク列というデジタル的信号で符号化された感覚情報は、一度ノン・スパイキング・ニューロンというインターフェイスの仲介によるアナログ的情報処理の過程を経て、よりスムーズな運動出力へと変換される。ノン・スパイキング・ニューロンは一種の整流作用を持つロー・パス・フィルターとして機能する。

今後の課題と発展

以上、多くのノン・スパイキング・ニューロンは尾扇肢からの機械的接触情報を感覚入力として受け、膜電位変化という情報変換の過程を経て、漸次的に運動ニューロンの活動性を調節し、回避行動発現を引き起こす主要神経要素であることがより明確となった。ある感覚毛からの興奮性入力は直接その感覚毛を支配する感覚ニューロンからダイレクトに、別の感覚毛からの情報は上行性介在ニューロンを經由し、間接的に伝えられ、抑制性の感覚情報はスパイク発生型の局在性介在ニューロンを介して伝達されていることが、本研究により初めて具体的に明らかとなり(図4)、今後の更なる回避行動発現時の局所神経回路網解析にとって、非常に有用な知見を得られた。

今回の解析結果により、多くの重要な疑問点が新たに生じたと共に、技術的困難性から解明できなかった問題点も二、三残った。例えば、感覚ニューロンとのシナプス形成時の高度な選択性は発生段階のどのような過程を経て獲得されているのか、単一感覚ニューロンのスパイクで生じたノン・スパイク・ニューロンの膜電位変化は、行動という出力を形成する際、どこまで有効であるのか？ 今後、解析をさらに継続し、これらの疑問点を順次解き明かしていくことで、感覚受容から運動形成にいたる情報の流れを個々の同定

ニューロン間のシナプス接続という、より具体的な神経回路図で検証し、脳の高次機能解明の基礎的理解の一翼を担いたい。

発表論文

The organization of receptive fields of an antero-medial group of spiking local interneurons in the locust with exteroceptive inputs from the legs. *J. Comp. Physiol.*, **166**: 471~476 (1990).

Input and output connections of an antero-medial group of spiking local interneurons in the metathoracic ganglion of the locust. *J. Neurosci.*, **10**: 785~794 (1990).