

モノアラガイ中枢神経系の巨大ニューロンの振動活動
 Oscillatory activity of cerebral giant cells in the pond snail *Lymnaea stagnalis*

○加藤功弥¹, 細井誠², 仲田正吾², 斎藤稔², 小松崎良将³

*Kouya Kato¹, Makoto Hosoi², Shougo Nakata², Minoru Saito², Yoshimasa Komatsuzaki³

Abstract: Rhythmic patterns of electrical activity are a ubiquitous feature of central nervous system (CNS). Cerebral giant cells (CGCs) in the pond snail *Lymnaea stagnalis* exhibit oscillations as rhythmical pattern of action potentials, and play key roles in the feeding system of the CNS. In this work, we performed electrophysiological and optical recordings of CGCs to investigate the effect of membrane depolarization evoked by current injection.

1. はじめに

学習・記憶に代表されるような中枢神経系の機能における研究は、様々な動物種で進められてきた。この神経機能の解明には、脳の階層性が重要である^[1]。すなわち、「個体レベルの行動変化」⇔「神経回路レベルの可塑的現象」⇔「ニューロン（神経細胞）間及びニューロン内での情報伝達系の変化」⇔「遺伝子発現（分子レベル）」の一連の機構を理解しなければならない。哺乳動物の脳は、細胞数が非常に多く（例えば、ヒトの場合数百億以上）、その一個一個が数千個以上の細胞と神経結合している非常に複雑な構造を持つので、その脳を理解するのは容易ではない。一方、軟体動物（カタツムリ、ナメクジ、アメフラシ等）の脳（神経節）は、神経細胞の数が少なく（1つの神経節でニューロンが数百-数千個程度）、神経回路が比較的単純であるので、その理解が比較的容易である。また、ニューロンが比較的大きいので、微小ガラス電極を用いた電気生理測定による個々の細胞の活動を調べたり、組織学的研究による神経回路の同定が行われてきた。加えて、生体から取り出した神経節標本を生理食塩水でシャーレ上にて長時間生かしておくことも可能である。

これらの点に加えて、軟体動物はある特定の学習行

動に伴って生じる、単一のニューロンレベルやシナプスレベルでの電氣的活動の変化を捉えることができるという利点もある。

本研究で用いた軟体動物は淡水性カタツムリの一種のヨーロッパモノアラガイ (*Lymnaea Stagnalis*) である (Fig. 1)。神経節の1つである cerebral ganglion には食餌行動における咀嚼リズムに関与する巨大神経細胞 (cerebral giant cell; CGC, Fig.2) が存在し、food-reward 条件付け後に CGC が持続的に脱分極することが知られている^[2]。この CGC の膜電位変化が、結果として咀嚼行動を引き起こす運動ニューロンの活動を変調させることで、条件付け後の咀嚼行動の変化を引き起こすと考えられている。本研究ではこのように学習行動に深く関与する CGC に脱分極刺激を与えた時に生じる活動パターンを解析した。

2. 実験方法

本研究では、味覚嫌悪学習 (conditioned taste-aversion conditioning, CTA) を行った。学習方法は以下の通りである。モノアラガイの嗜好性反応であるスクロース (シヨ糖) 溶液と忌避性反応の塩化カリウム (KCl) 溶液の組み合わせ提示を数回繰り返した。条件付け後にスク

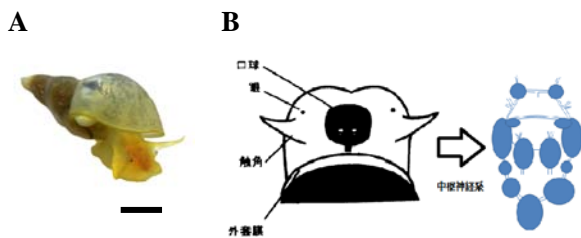


Figure 1. (A) *Lymnaea stagnalis* and (B) the central nervous system. (A) Scale bar: 1cm.

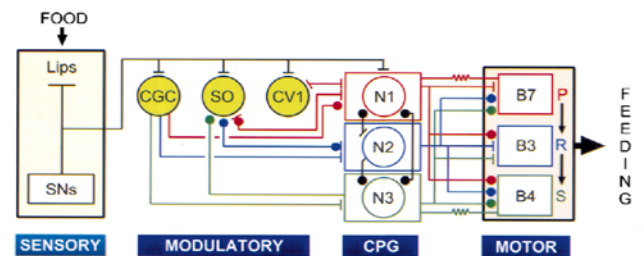


Figure 2. The feeding network of *Lymnaea*. CPG:central pattern generator.

ロースを提示して、咀嚼回数を測定することで条件付けによる記憶保持テストを行った。

また電気生理実験では、単一神経細胞の複雑な活動パターンを観測した。単離した神経節の CGC に微小ガラス電極を刺し細胞内電位を測定した。細胞内電位はアンプで増幅され、1kHz の Sampling rate でコンピュータに取り込まれた。

さらに膜電位イメージングでは、膜電位感受性色素として Di-4-ANEPPS を用いた。膜電位変化によって構造が変化することで細胞膜内において存在する深度が変化し、素早く蛍光強度が変化する。光源には中心波長 530nm の LED を用い、CCD カメラによって波長の 705nm の蛍光を測定した。

3. 結果

モノアラガイは、味覚嫌悪学習後にはショ糖溶液に対する咀嚼反応を有意に低下させた。しかし、ショ糖溶液と KCl 溶液の提示順序を反転させるバックワードコントロールでは、咀嚼反応は低下しなかった (Fig. 3)。

次に、電気生理測定によって CGC の膜電位を観察した。CGC にビート発火状態から規則的なバースト発火状態への遷移が見られた。脱分極電流の増加に伴って、発火率の増加から 2 周期発火状態、3 周期発火状態への遷移が観察された (Fig. 4)。

4. まとめ

細胞内電位測定によりモノアラガイの巨大ニューロン (CGC) の活動を測定したところ、脱分極刺激によって複雑な活動パターンが見られた。膜電位イメージング測定系で CGC の活動パターンを Di-4-ANEPPS の蛍光強度変化として捉えることができた (Fig. 5)。

謝辞 本研究の一部は日本大学学術研究助成金 (総合研究「総 11-002」) の援助を受けて行われた。

5. 参考文献

- [1] 伊藤 悦朗:「脳の階層性を重視したモノアラガイの学習・記憶機構」,日本水産学会誌 Vol.68, No.6, pp911-912, (2002).
- [2] Paul R. Benjamin, Kevin Staras *et al.*: “A Systems Approach to the Cellular Analysis of Associative Learning in the Pond Snail *Lymnaea*”, LEARNING & MEMORY, Vol.7, pp124-131, (2000).
- [3] 鈴木 範男:「身近な動物を使った実験」, 三共出版, Vol.2, pp.21-39, (2009).

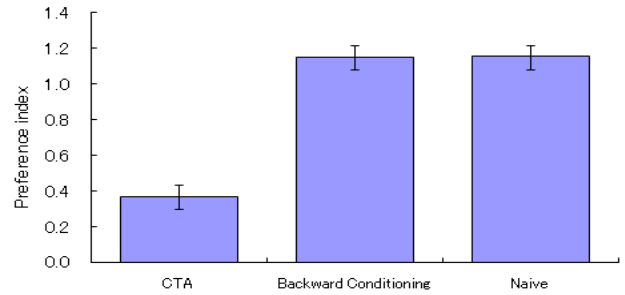


Figure 3. Influence of taste aversion conditioning.

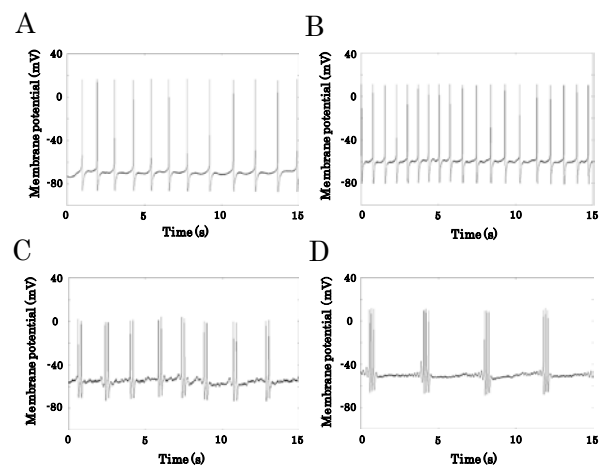


Figure 4. Change of firing patterns of CGC evoked by current injection. (A) 0 pA, (B) 90 pA, (C) 146 pA, (D) 219 pA

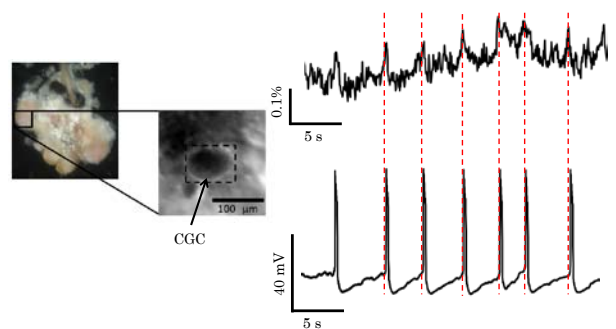


Figure 5. Optically recorded electrical activity of CGC.