

論 文 要 旨

A new role for photoresponsive neurons called simple

photoreceptors in the sea slug *Onchidium*:

Potentialiation of synaptic transmission and motor response

〔 軟体動物イソアワモチの単純光受容器細胞の新しい役割：
シナプス伝達と運動出力の増強作用 〕

下 津 京 子

【序 論】

最近、哺乳類網膜の神経節細胞の中に intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs) という光感受性の神経細胞が発見された。この細胞はよく知られている光受容器細胞、視細胞 (rod/cone) と異なり、夜と昼のようなゆっくりとした光の変化に応答する。一方、軟体動物イソアワモチの神経節にも ipRGCs によく似た光感受性の神経細胞、すなわち単純光受容器細胞の存在が古くから知られている。

現在、脊椎動物における ipRGCs の一次神経細胞としての機能はかなり解明されてきているが、二次神経細胞 (介在神経細胞) としての働きはほとんどわかっていない。そこで私は、ipRGCs の基本的かつ原始的なモデル系として、同じくゆっくりとした光反応を示すイソアワモチの単純光受容器細胞の二次神経細胞としての働きを明らかにしようと考えた。

【材料および方法】

- ①実験動物は桜島に生息する水陸両生の軟体動物イソアワモチを使った。
- ②単純光受容器細胞 Ip-1 そして Ip-2 の働きを調べるために、神経節を動物から単離した神経節標本と非単離の動物・神経節標本を作製した。
- ③これらの神経細胞の電氣的応答は従来の微小電極法そして行動生理学的手法を用いて記録した。
- ④神経細胞および呼吸器系の形態を、 Ni^{2+} -ルベアン酸による細胞内染色法などを用いて組織学的に調べた。

【結果】

- ①イソアワモチの光感受性の神経細胞は普通の眼の視細胞（光受容器細胞）に特徴的な繊毛とか微絨毛構造が欠けているために、単純光受容器細胞（Simple photoreceptors）と呼ばれた。
- ②イソアワモチは水陸両生のため、満潮時には呼吸口を閉じ、干潮時になると呼吸口を開け肺呼吸運動を行う。
- ③光感受性の神経細胞 Ip-1、Ip-2 は腹部神経節に存在し、いずれも 2 本の腹部神経に軸索を伸ばしており呼吸口付近で終わっていた。
- ④Ip-1、Ip-2 は多くの神経例えば腹部神経 1 や腹部神経 2 などを通して抑制性のシナプス入力（水圧および接触感覚）を受けていた。
- ⑤細胞内同時記録によって、Ip-1 と Ip-2 の間に電気シナプスの存在が発見された。
- ⑥過分極性の光応答を示す Ip-1、Ip-2 のシナプス抑制性の電位は光照射によって増強されることが示された。
- ⑦呼吸口は干潮に続き、動物の外套における水圧または接触刺激からの解放、すなわち抑制性のシナプス入力からの解除によって開くことが示された。
- ⑧従って、肺呼吸運動は Ip-1、Ip-2 が受ける光照射によって大きく変調（増強）することが予測された。

【考察】

イソアワモチの単純光受容器細胞の光応答は、非常にゆっくりとしていて、順応も遅いために、光応答が早く順応も早い視細胞（光受容器細胞）の形態的視覚の機能と異なり、新しい非形態的視覚機能に関係することが示唆された。

この実験によって、イソアワモチの単純光受容器細胞はシナプス伝達及びそれに続く運動出力を増強させる役割即ち非形態的視覚の役割を演じることが示唆された。既に脊椎動物の ipRGCs は非形態的視覚機能として体内時計や瞳孔反射に対する一次の感覚入力細胞として機能していることが報告されている。しかし相同のイソアワモチの単純光受容器細胞のように二次性の神経細胞、すなわち介在神経細胞としての非形態的視覚機能については何も知られていない。

論文審査の要旨

報告番号	総研第101号	学位申請者	下津 京子
審査委員	主査	亀山 正樹	学位
	副査	原田 秀逸	副査
	副査	田松 裕一	副査
			博士 (医学)
			坂本 泰二
			矢沢 和人

A new role for photoresponsive neurons called simple photoreceptors in the sea slug *Onchidium*: Potentiation of synaptic transmission and motor response

(軟体動物イソアワモチの単純光受容器細胞の新しい役割: シナプス伝達と運動出力の増強作用)

最近、哺乳類網膜における神経節細胞のなかに intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs) と呼ばれる光感受性の神経細胞が発見された。一方、軟体動物のイソアワモチの神経節にも ipRGCs と類似した光感受性の神経細胞 (単純光受容器細胞と呼ぶ) の存在が古くから知られている。そこで、学位申請者は、イソアワモチの単純光受容器細胞を ipRGCs の基本的かつ原始的なモデル系として考え、この細胞の働きの解明に取り組んだ。学位申請者は、イソアワモチの神経節を取り出し単離した神経節標本および非単離の動物・神経節標本を作製し、これらを用いて、単純光受容器細胞である Ip-1、Ip-2 および呼吸器系の形態を組織学的に調べるとともに、Ip-1 および Ip-2 の電氣的応答を記録して電気生理学的に解析した。

その結果、本研究では、以下の知見が明らかにされた。

- ①光感受性の神経細胞 Ip-1、Ip-2 は、腹部神経節に存在し、いずれも 2 本の腹部神経に軸索を伸ばしており呼吸口付近に終わっていた。
- ②細胞内同時記録によって、神経細胞 Ip-1 と Ip-2 の間に電気シナプスの存在が観察された。
- ③神経細胞 Ip-1、Ip-2 は、腹部神経 1 や腹部神経 2 など多くの神経を通して抑制性のシナプス入力 (水圧および接触感覚) を受けていた。
- ④過分極性の光応答を示す神経細胞 Ip-1、Ip-2 の末梢神経刺激による抑制性シナプス後電位は光照射によって増強されることが示された。
- ⑤呼吸口は、動物の外套における水圧または接触刺激からの解放、すなわち抑制性のシナプス入力からの解除によって開くことが観察された。
- ⑥肺呼吸運動は神経細胞 Ip-1、Ip-2 が受ける光照射によって大きく変調 (増強) されることが推測された。

以上のごとく、本研究では、イソアワモチにおける単純光受容器細胞が呼吸口の開閉を調節する機能を有し、光によるシナプス修飾作用を持つことを明らかにするとともに、それが呼吸口への運動出力を増強させる役割すなわち非形態的視覚の役割を演じることも示唆した。

本研究は、神経回路の光照射による調節に関する新たな知見を提供するもので学術的価値が高く、学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第101号		学位申請者	下津 京子
審査委員	主査	亀山 正樹	学位	博士 (医学)
	副査	原田 秀逸	副査	坂本 泰二
	副査	田松 裕一	副査	矢沢 和人

主査および副査の5名は、平成22年3月5日、学位申請者 下津 京子 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) ヒトにおける ipRGCs の働きはどのように推測されるか。

(回答) ヒトに関する情報はまだありませんが、日内変動や瞳孔反射に関与すると推測している。

質問2) イソアワモチなどの軟体動物よりも高等な動物に関して単純光受容器細胞の研究がなされているか。

(回答) マウスでは単純光受容器細胞の研究が行われており、日内変動や瞳孔反射に関与する働きがあるが、現時点では他の動物に関する研究は行われていない。

質問3) イソアワモチの末梢神経は左右対称に存在しているが、Ip-1/Ip-2 と 2 本の腹部神経は両側性に存在しているのか。

(回答) 左右対称ではなく、中枢神経節のやや左寄りに存在している。

質問4) Ip-1/Ip-2 は非常にゆっくりとした光応答を示しているが、何らかの液性調節を行っている可能性はないか。

(回答) イソアワモチに関しては未だ発見されていないが、軟体動物のアメフラシでは光受容器細胞からホルモンの分泌が確認されている。

質問5) Ip-1/Ip-2 が電気シナプスでつながっているということだが、形態学的にはどのようにつながっているのか。

(回答) おそらく、すでに哺乳類の神経細胞において知られているように、gap-junction のような結合様式をとっていると推測されるが、今後形態学的に研究する予定である。

質問6) Ip-1 と Ip-2 は常に併記されているが、何か主従関係、相補関係などが存在するのか。その違いは何か。

(回答) Ip-1 の方が自発放電がやや多く、Ip-2 とは 0.05~0.1 の割合で電気シナプスにより結合している。役割としての違いはないと考えている。

質問7) Ip-1/Ip-2 は、全個体において2つしか存在しないのか。

(回答) 3つ以上ある個体は経験したことがないが、おそらく2つしか存在しないと考えている。

質問8) Ip-1/Ip-2 が過分極を、哺乳類の ipRGCs が脱分極をするメカニズムは分かっているのか。

(回答) Ip-1/Ip-2 については解明されつつあり、cGMP 作動性 K⁺チャンネルが開くためであると考えられているが、哺乳類の ipRGCs についてはまだわかっていないのが現状である。

質問 9) Ip-1/Ip-2 の細胞内染色において Ni²⁺-ルベアン酸を用いているが、細胞の中の何と結合しているのか。

(回答) 鍍銀法と同じく、Ni²⁺-ルベアン酸は細胞内骨格のタンパク質に結合するため、神経細胞体と軸索が染色される。

質問 10) イソアワモチは、給餌なしで 1~2 ヶ月生存できるという記述があるが、給餌しない目的は何か。

(回答) イソアワモチは、捕獲後 1~2 ヶ月は摂食行動を起こさない。また、摂食による実験結果への影響をなくすために絶食の条件下で実験を行った。さらに長期間にわたって飼育する場合には、適切な給餌を行っている。

質問 11) 実験方法について、麻酔薬の量が多いようだが何か理由があるのか。

(回答) 血管内投与ではなく腹腔内投与であり、動物を鎮静させるために必要な液量を注射した。

質問 12) 麻酔薬としてマグネシウムを用いているが、マグネシウムはどのように麻酔作用を発揮するのか。

(回答) マグネシウムが、カルシウムと拮抗的に働いて Ca チャンネルをブロックしていると考えている。

質問 13) 呼吸口の組織図において、ガス交換をどこでどのように行っているのか。血液のようなものが存在するのか。

(回答) 肺胞様の構造物の周辺に血管様の構造物があるため、おそらくそこでガス交換を行っていると考えている。

質問 14) Ip-1/Ip-2 が光照射を受けると K⁺チャンネルが開いて過分極をすることだが、それまでの細胞内機構はどうなっているのか。

(回答) ロドプシン様の視物質によって G タンパク質と共役したグアニル酸シクラーゼが活性化し、cGMP が生成されるために cGMP 作動性 K⁺チャンネルが開く。

質問 15) イソアワモチの Ip-1/Ip-2、哺乳類の ipRGCs における視物質はロドプシンなのか。

(回答) 現段階では、Ip-1/Ip-2 について視物質の同定はまだ行われておらず、「ロドプシン様」という表現にとどめている。哺乳類の ipRGCs における視物質はメラノプシンであることが明らかにされている。

質問 16) 呼吸口の開閉について、Ip-1/Ip-2 が興奮すると開くということだが、実際に Ip-1/Ip-2 が呼吸口の筋組織まで軸索を伸ばしているのか。

(回答) 形態的には呼吸口まで軸索を追うことができなかつたため、直接支配しているかどうかは不明であるが、呼吸口周辺には神経細胞も散見されたため、Ip-1/Ip-2 がそれらの神経細胞にシナプス結合している可能性がある。

質問 17) Ip-1/Ip-2 の活動が光照射のもとで末梢神経刺激を受けると大きく抑制されるが、これは post-synaptic な反応なのか。

(回答) その様に考える。シナプス後電位が光照射によって増強されると考えている。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。