

令和元年6月11日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08193

研究課題名(和文) マーモセット視覚中枢における、電気シナプスを介した化学シナプスの伝達効率の改善

研究課題名(英文) Electrical synapses between gap-junctionally connected visual cells increase neural spike generation to enhance glutaminergic excitatory synapses from the visual centers of the common marmoset.

研究代表者

日高 聡 (Hidaka, Soh)

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：00228735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：大脳皮質の並列神経回路網の構築と成熟過程で電気シナプスを介した化学シナプス伝達の効率化のメカニズムを解明するため、成体コモンマーモセットと生後すぐの幼弱ラットを用いて比較生理学的な実験解析を行い、大脳皮質視覚野の神経細胞間でギャップ結合を解明した。成長過程の錐体細胞群のカラム状配列と、細胞体間のギャップ結合を発見した。幼弱ラットの大脳皮質で、電気シナプス形成の錐体細胞ペアで発達生理学的な電気生理学実験での解析の結果、両細胞への閾値以下の入力によるスパイク発生と細胞ペアでの同期興奮を実証した。計算論的数理モデルでもこの特性を立証し、電気シナプスがあれば出力の化学シナプスで情報伝達の改善は起こる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果として、コモンマーモセットの大脳皮質視覚野の神経細胞間でギャップ結合を介した電気シナプスがあれば、電気シナプスを介したシナプス前Ca<sup>2+</sup>スパイクの増大によって、出力の化学シナプスで情報伝達の改善が起こるといふシナプス伝達効率化のメカニズムを解明できた。本研究の成果の学術的意義は、霊長類の脳成長・発達過程における“経験や環境に依存した脳の神経回路の機能的な成熟機構”の比較生理学的な解明に発展する所にある。また本研究の成果の社会的意義として、“ヒトの脳の機能の発達や成熟の発達生理学的な解明”の研究分野に波及し、本研究は発展して行くと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Electrical synapses through gap junctions occurred between excitatory neurons of cerebral cortex of developing animals. Electrical connections between these neurons are expected to control cells' excitation. In this study, we examined cells' excitation by electrical coupling between excitatory neurons. We found gap junctions involving connexin36 in the cerebral visual cortex of adult common marmoset, and between pyramidal cells in cerebral cortex of developing rats. Dual whole-cell patch clamp analysis of pairs of neighboring cells revealed the occurrence of prominent electrotonic transmission between pairs of cells with symmetrical gap junction conductance. Immature cortical pyramidal cells promote neural spiking by synchronous injection of subthreshold currents into pairs of electrically coupled cells. Electrical coupling via electrical synapses between gap-junctionally connected visual neurons appears to increase spike generation to enhance glutaminergic excitatory synaptic outputs.

研究分野：神経生理学

キーワード：電気シナプス ギャップ結合 閾値下電流 同期興奮 興奮性シナプス後電位 シナプス伝達の効率化  
大脳皮質視覚野 神経回路網の成熟

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本研究は 霊長類の大脳皮質視覚野の並列神経回路の形成・成熟過程で、マーモセット脳への視覚情報の入力による“活動依存的な機構”を介した化学シナプス伝達の効率化が誘導されるメカニズムを解明します。 [背景] 霊長類の脳では シナプス伝達の効率化の過程で、並列配列の興奮性ニューロン間の電気シナプスが重要な働きをしていると考えられます。シナプスの効率化における電気シナプスの役割はこれまで不明でした(Connors と Landisman, *Science.*, 2012)。我々の業績から、Ca<sup>2+</sup>スパイクはラットの視覚中枢系ニューロン間の電気シナプスを両方向に伝播します(日高等, *J. Neurosci.*, 2004)。 [特色] 本研究は霊長類マーモセットの視覚野でも発達生理学的に“活動依存的な化学シナプス伝達の効率化”が発生し、この改善は“シナプス前的な Ca<sup>2+</sup>スパイクが並列神経回路ニューロン間の電気シナプスを伝播し、シナプス前的な神経伝達物質の放出量の増加を経て、シナプス後ニューロンの興奮性シナプス後電流の増大”によって誘導されるという全く新しい着眼点で開始されます。

### 2. 研究の目的

脳の構成要素を対象とした分子細胞レベルで神経回路の機能を解明することは、ヒトの脳機能の発達の理解に必須です。神経回路は、個体発生の過程でゲノム遺伝子の設計に基づいてその基本構造が構成され、生後の成長・発達に伴い、動物の経験や環境に依存して機能的に成熟し、それぞれの脳の領域において特異的な機能を発現する。脳の神経回路の基本構造が構築される過程で、脳のそれぞれの領域では 興奮性ニューロンによる並列な神経回路が形成され、“整合した自発的な神経活動”が出現する時には、チャンネル蛋白・connexin36(Cx36)が構成するギャップ結合を介したニューロン間の機能的な連絡が構築される(日高等, *J. Neurosci.*, 2004; Kandler, *Nature Neurosci.*, 2010; Katz と Mooney, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2012)。

霊長類の大脳皮質視覚野の並列神経回路では、神経回路の形成はニューロンの“遺伝的なプログラム”だけではなく、末梢からの求心性入力の成熟化に先立ち、並列神経回路での自発的な神経活動に依存している(Shatz と Stryker, *Science*, 1988; Penn, Shatz 等, *Science*, 1998)。コモンマーモセットの脳の、生後の視覚系の成長・発達の過程では、視覚情報の求心性の入力によって引き出された“活動依存的な機構”によって化学シナプスの効率化が誘導されると考えられるが、霊長類での視覚系の成熟に必要な、シナプス伝達の効率化を誘導する、神経活動依存的な機構の分子細胞レベルでのメカニズムは分かっていない。本研究では、ラットの視覚中枢系ニューロン間の電気シナプスで機能構造の特性と比較することによって、マーモセットの脳皮質視覚野のニューロンでシナプス伝達の効率化の分子細胞レベルでのメカニズムを解明する。

コモンマーモセットの大脳皮質視覚野で 電気シナプスを介したシナプス前的な Ca<sup>2+</sup>スパイクの増大による、シナプス伝達効率化のメカニズムを解明できると考えられる。霊長類の脳の成長・発達過程における“経験や環境に依存した脳の神経回路の機能的な成熟機構”の比較生理学的な解明や、“ヒトの脳の機能の発達や成熟の発達生理学的な解明”の研究分野に波及し、本研究は 発展すると考えられる。

### 3. 研究の方法

霊長類の大脳皮質視覚野の並列な神経回路網の発達・成長過程で、電気シナプスを

介した化学シナプス伝達の効率化の生理機能メカニズムを解明するため、研究方法として、成体のコモンマーマセットと生後7日までの幼弱ラットを用いて、実験解析法の4本の技術シーズ(日高等, J. Neurosci., 2004): [シーズA] 電気生理学実験手法の dual whole-cell patch-clamp 法による、幼弱な動物の大脳皮質視覚野の錐体細胞ペアでの実験解析; [シーズB] コネキシン36 遺伝子組換え動物を用いた解析; [シーズC] 人工抗体法で作成されたチャンネル制御抗体を用いた解析; [シーズD] Carl Zeiss社のLSM710レーザー共焦点顕微鏡や、日立製作所HITACHI H-7650電子顕微鏡と生理学研究所のHITACHI H-1250超高压電子顕微鏡(加速電圧1,000kV)による、網膜と大脳皮質視覚野のニューロンの超微細形態の解析: を利用し、網膜と大脳皮質視覚野の神経回路網について発達生理学的に実験解析する。研究代表者が幼弱な動物の大脳皮質視覚野の神経回路網について、視覚野の錐体細胞ペアで電気生理学実験手法の dual whole-cell patch-clamp 法による実験解析を行う。得られた実験データを元に、研究分担者は計算論的数理モデルを構築して、細胞ペアでの神経パイプの発生について、電気シナプスの機能的な役割を解析し実証する。連携研究者との共同で、遺伝子組換え実験と人工抗体を作製して実験解析する。研究協力者と共に、網膜と大脳皮質視覚野の微細形態を解析し、また大脳皮質視覚野での、電気シナプスによるシナプス伝達効率化の高次機能を、比較生理学的にマーマセットの行動実験で解明する計画であった。

#### 4. 研究成果

本研究では、哺乳類の大脳皮質視覚中枢の並列神経回路の形成と成熟過程で、目の網膜の神経細胞から伝達経路を経て脳への視覚情報の入力による“活動依存的なメカニズム”を介した化学シナプスの伝達の効率化が誘導されるメカニズムを解明することが目的である。伝達の効率化では、並列配列の細胞間の電気シナプスが重要な働きをしていると考えている。我々のこれまでの研究から電気シナプスの働きを発見した。本研究では「伝達の改善」は電気シナプスが働き、出力の細胞でシナプスが増強して誘導されるという新しい着眼点で開始された。

哺乳類の大脳皮質の視覚野の並列神経回路網の構築とその成熟過程で、電気シナプスを介した化学シナプス伝達の効率化のメカニズムを解明するため、比較生理学的な実験解析を行った。コモンマーマセットの神経組織の実験は、生理学研究所・生体システム研究部門・南部研究室で行った。

成体のコモンマーマセットと生後7日までの幼弱ラットを用いて、網膜と大脳皮質視覚野の神経回路網について、Carl Zeiss社のLSM710レーザー共焦点顕微鏡、日立製作所HITACHI H-7650電子顕微鏡と生理学研究所のHITACHI H-1250超高压電子顕微鏡(加速電圧1,000kV)によって視覚系構造の微細形態を解析した。その結果、網膜神経節細胞間と、大脳皮質視覚野の神経細胞間とで、ギャップ結合を同定し、その微細構造を解明した。電気生理学実験の後で、蛍光色素を細胞内注入して解析した結果、成長過程の幼弱ラットの大脳皮質の錐体細胞群は、特徴的に視覚野ではカラム状に配列していることが分かり、またギャップ結合は樹状突起同士の間他に、細胞体同士の間にも存在することを見つけた。成体のコモンマーマセットの大脳皮質視覚野では、細胞種は未だに不明であるが、ギャップ結合が細胞体同士の間にも存在することが明らかになった。

視覚機能の達成における電気シナプスの機能的役割を遺伝子発現のレベルで明らかにするために、連携研究者との共同で、電気シナプス・ギャップ結合蛋白・コネキシンに関する遺伝子組み換え動物を用いた実験解析を行ったが、良い成果は得られなかった。

生後4日から生後7日までの幼弱ラットの大脳皮質で近傍にある錐体細胞ペアで、電気生理学実験手法の dual whole-cell patch-clamp 法を実施して解析した。電気シナプスを形成しているそれぞれの神経細胞へのシナプス入力電流が増大し、活動電位の閾値以下の電流がそれぞれの神経細胞に入力した場合には容易に神経スパイクが発生できることを明らかにし、錐体細胞ペアで同期興奮を測定した。研究分担者は本電気生理学実験のデータを元に、計算論的数理モデルを構築して解析した。その結果、大脳皮質の神経細胞間に電気シナプスが存在する場合には、細胞間の結合抵抗が小さい時(電気的カップリングが強い時)、片方の神経細胞だけに活動電位の閾値以下の電流を入力しても神経スパイクが発生できないが、一方、両方の細胞に同時に閾値以下の電流を入力すると(または閾値以下の電流が同期して入力すると)容易に神経スパイクが発生できることを実証し、さらに強い電気的カップリングは神経細胞間で同期興奮を引き起こしていることが明らかになった。この実験結果から、細胞間に電気シナプスがあれば、出力の化学シナプス伝達の効率化即ち情報伝達の改善が起ると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

日高, 海野. Conflicting effects by antibodies against connexin36 during the action of intracellular cyclic-AMP. *J. Integr. Neurosci.* 15(4), 571-591, 2016.

日高, 海野. Physiological roles of electrical synapses between neuronal cells in the retina. *Frontiers in Cellular Neurosci.* 投稿中.

日高, 海野. Two parallel mechanisms promoting mammalian retinal ganglion cell excitation. *Journal of Neuroscience* 投稿中.

〔学会発表〕(計 10 件)

日高, と海野. Functional differentiation of gap-junctionally connected retinal amacrine cells and modulation of channel opening of their electrical synapses. 第38回日本神経科学大会、神戸国際会議場・神戸国際展示場、神戸市・兵庫、2015年7月28日(火)-31日(金)

日高, と海野. ギャップ結合形成した網膜アマクリン細胞間の電気シナプスと、アマクリン細胞から神経節細胞への抑制性シナプスの働き. 第93回日本生理学会大会、札幌市コンベンションセンター、札幌市・北海道・2016年3月22日(火)~24日(木).

日高, と海野. Inhibitory synapses onto retinal ganglion cells in accordance with electrical synapses between gap-junctionally connected retinal amacrine cells. 第39回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、横浜市・神奈川、2016年7月20日(水)-22日(金).

日高, と海野. ギャップ結合で連結した興奮性視覚系中枢ニューロン間の電気シナプスの機能的意義. 第 94 回日本生理学会大会、浜松アクトシティコンgresセンター、浜松市・静岡、2017 年 3 月 28 日(火) ~ 30 日(木).

日高, と海野. Electrical synapses of visual cortex neurons and retinal ganglion cells can enhance chemical output excitatory synapses from these neurons. 第 40 回日本神経科学学会、幕張メッセ、千葉市・千葉、2017 年 7 月 20 日(木) - 23 日(日).

日高, と海野. 網膜神経節細胞間と大脳皮質錐体細胞間のギャップ結合・電気シナプスの働き. 第 21 回視覚科学フォーラム・豊橋技術科学大学 エレクトロニクス先端融合研究所、豊橋市・愛知、2017 年 9 月 28 日(木) - 29 日(金).

日高, と海野. 視覚系ニューロン間のギャップ結合・電気シナプスの機能的意義. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会・ConBio2017(第 40 回日本分子生物学会年会), 招待講演, 神戸国際会議場・展示場・神戸ポートピアホテル、神戸市・兵庫、2017 年 12 月 6 日(水) ~ 9 日(土).

日高, と海野. Electrical synapses of visual cortex neurons and retinal ganglion cells can enhance excitatory synaptic outputs from these neurons. 第 95 回日本生理学会大会, サポートホール高松・高松シンボルタワー、高松市・香川・2017 年 3 月 28 日(水) ~ 30 日(金).

日高, と海野. Electrical synapses of retinal ganglion cells and visual cortex neurons can enhance excitatory synapses through synchronous excitation between cells. 第 41 回日本神経科学学会, 神戸国際会議場・展示場、神戸市・兵庫、2018 年 7 月 26 日(木) - 29 日(日).

日高, 金子, と海野. 視覚系ニューロン間のギャップ結合・電気シナプスのチャネル開口率の解析. 第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 招待講演, 朱鷺コンベンションセンター、新潟市・新潟, 2019 年 3 月 27 日(水) ~ 29 日(金).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

Journal of Integrative Neuroscience, Editorial board

<https://jin.impress.org/EN/column/column137.shtml>

Journal of Neuroscience, research articles

<http://www.jneurosci.org/content/24/46/10553.long>

Pflügers Archiv, research articles

<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs004240050664>

Journal of Integrative Neuroscience, research articles

<https://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S021963521650031X>

Brain Research, research articles

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899312001576?via%3Dihub>

The Journal of Comparative Neurology, research articles

<https://doi.org/10.1002/cne.902470205>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名： 海野 修

ローマ字氏名： Osamu Umino

所属研究機関名： 東邦大学

部局名： 理学部 情報科学学科

職名： 教授

研究者番号（8桁）： 70119907

### (2)研究協力者

研究協力者氏名： 赤堀 泰

ローマ字氏名： Yasushi Akahori

研究協力者氏名： 金子 千之

ローマ字氏名： Chiyuki Kaneko

研究協力者氏名： 藤田 公和

ローマ字氏名： Kimikazu Fujita

研究協力者氏名： 南部 篤

ローマ字氏名： Atsushi Nanbu

研究協力者氏名： 畑中 伸彦

ローマ字氏名： Nobuhiko Hatanaka

研究協力者氏名： Ricard Roman Poznanski

ローマ字氏名： Ricard Roman Poznanski

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。