

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500358

研究課題名 (和文) レーザー光刺激法を利用したヒゲ入力遮断後のシナプス結合種特異的可塑性の解析

研究課題名 (英文) Analysis of synaptic connection specific plasticity following whisker deprivation using laser photostimulation.

研究代表者

木村 文隆 (Kimura Fumitaka)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00202044

研究成果の概要 (和文)：

マウスの体性感覚野、バレル皮質において、視床から4層への投射は、興奮性細胞よりも抑制性細胞へのほうが潜時が約0.7 ms短いことを明らかにした。これにより、4層、2/3層細胞に非常に早い抑制がおり、4層→2/3層順の発火順序ができる。これが、臨界期開始と同期していることから可塑性発現を制御していると考えられる。また、この潜時差は、視床細胞線維の太さの差に由来していると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：

In the somatosensory barrel cortex of mice, we found that thalamic latency to GABAergic neurons are shorter than that to excitatory neurons in layer 4, by about 0.8 ms. This latency difference enables very fast inhibition in L4 and L2/3 neurons, which plays a critical role in generation of spike sequences of "L4 followed by L2/3" in response to whisker stimulation. We also found that such latency difference was created after P12-14, simultaneously with the initiation of critical period. We indicated that such latency difference was resulted from differed thickness of axons projecting those target neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経筋肉生理学

キーワード：ニューロン、シナプス、神経回路、可塑性、学習、記憶、大脳皮質、体性感覚野

## 1. 研究開始当初の背景

ほ乳類の感覚皮質には、発達の一時期に入力依存性にシナプスの伝達効率を変えること

のできる臨界期が存在し、遺伝的な枠組みの中で形成された神経回路は、臨界期中の神経活動に従ってさらに精緻に仕上げられていくことが知られている。この様な可塑性発現

のメカニズムは、学習や記憶の素過程と多くを共有していると考えられており、その解明は社会的にも大きな期待が寄せられているが、未だに多くの点が不明である。齧歯類の体性感覚野、バレル皮質は頬髭を受容野としているが、一部の頬髭の除去を行うと除去ヒゲを支配していた皮質領域は周辺の残存ヒゲによって支配されるようになる可塑性を示す。また、このような可塑性は生後12-14日以降に発現し、この発現には皮質4層-2/3層間のシナプスが重要な役割を果たすことが知られている。さらに、このシナプスの可塑性は、可塑性の大きさと方向がシナプス前細胞と後細胞の発火のタイミングに依存する、スパイクタイミング依存性可塑性 (STDP) を示すことも知られている。一方、私は、バレル皮質4層から複数細胞を同時に細胞内記録をする実験を行っていたが、視床刺激による潜時が興奮性細胞よりも抑制性細胞の方がわずかに短いという現象が非常に安定して観察されることに気がついていた。

## 2. 研究の目的

本実験では、細胞種 (興奮性、抑制性) による視床潜時の差を定量的に精査し、これが可塑性発現と何らかの関わりがあるのかを検討することを目的としている。そのために以下の点に注目して調べる。

### (1) 潜時差の定量的検討

(2) 同一バレル内からさらに多くの細胞からの同時記録によっても同じ現象が確認出来るのか?

(3) 生後発達のどの時期に潜時差が生まれるのか?

### (4) 潜時差を生み出すメカニズムは何か?

(5) 潜時差と4層、2/3層細胞の発火順序形成に何らかの関係があるか?

## 3. 研究の方法

(1) マウスの体性感覚野、バレル皮質から視床と皮質が繊維連絡を保った視床-皮質切片標本作製する。視床に刺激電極を静置し、4層のGABA細胞と興奮性細胞からパッチ電極を用いて膜電位を同時記録する。GABA細胞の同定のために、GAD67-GFP mouseを用いる。視床刺激による潜時を両細胞で比較する。

また、いろいろな生後齢のマウスで同様の実

験を行い、潜時差が生まれる日齢を探索する。

(2) 視床に加えて、白質に刺激電極をおき、2点刺激を行い、潜時差が生まれるメカニズムを探る。

(3) 潜時差が生まれるメカニズムを探る目的で、ミエリン破壊、刺激閾値差の比較等を行う。

(4) 4層、2/3層細胞の同時記録により、視床刺激によるEPSPの発火順序、およびGABA抑制との関連を検討する。

## 4. 研究成果

(1) GABA細胞と興奮性細胞とを同時記録することにより、視床刺激による潜時差は平均して0.7 msあることがわかった (図1)。

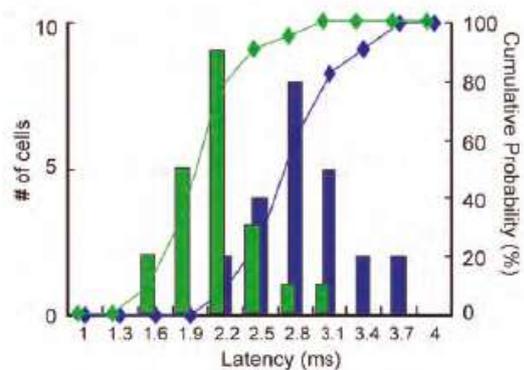
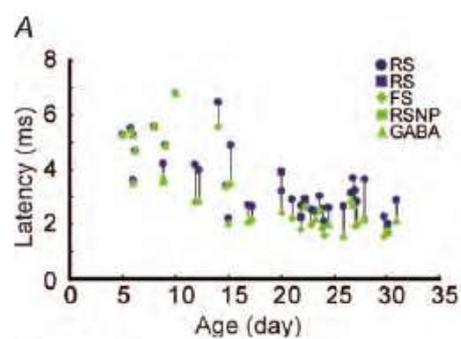


図1 視床潜時の比較 緑は抑制性、青は興奮性細胞

(2) 同一バレル内より最大7個の細胞から同時記録することにより、抑制性細胞の短潜時性はバレル内での場所の差によるのではないことがわかった。

(3) 次に、生後齢と潜時差の関係を調べると、生後12-14日以降に潜時差が生まれ、以後ずっと維持されていることがわかった



(図2)

図2 潜時差の生後発達 緑:抑制性、青:興奮性細胞 生後12日以降に潜時差が見

られる。

(4) 視床、白質の2点刺激より、潜時差は伝導速度の差によることが明らかになった。また、ミエリンを破壊しても潜時差が残ることから伝導速度の差はミエリンの程度の差ではないことが明らかとなった。これは、ミエリン化が進んでいない、生後12-14日に既に潜時差ができることと一致する。伝導速度を生み出すメカニズムとして、軸索の太さの差が考えられるが、興奮閾値の差を検討した結果、興奮性細胞と抑制性細胞へシナプスする視床細胞には閾値の差が見られ、抑制性細胞へシナプスする視床細胞の軸索は閾値が低く、太いことが推察された(図3)。

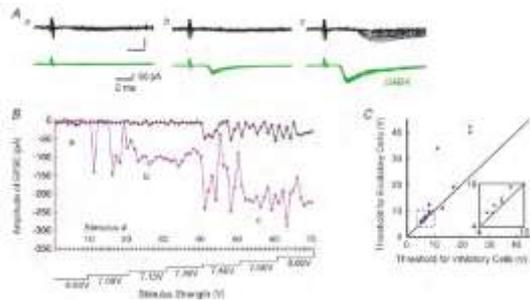


図3 刺激強度を徐々に上げて閾値を探ると抑制性細胞(緑)の方が興奮性細胞(黒)よりも低閾値であることがわかる。

(5) この様な潜時差ができることによって、4層、2/3層細胞間に非常に早い抑制をかけることができ、4層→2/3層順の発火順序を形成するのに役立っている可能性が考えられる。これと矛盾しない例を2例挙げる。

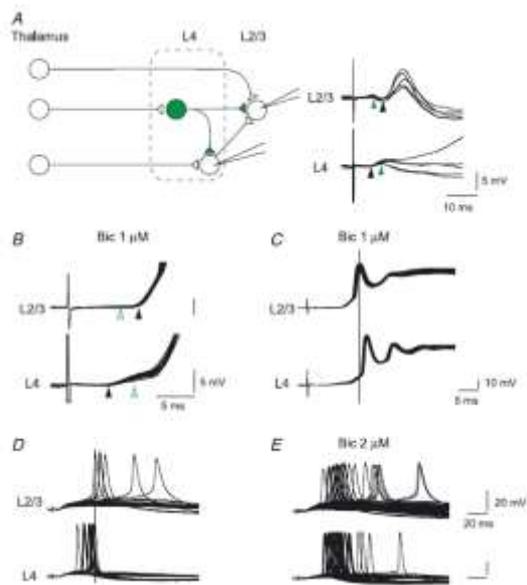


図4 説明は本文参照

図4のA-Cでは、disynaptic IPSP, disynaptic EPSP等の潜時が、これまでの議論と翼一致しているが、GABAの拮抗薬を投与するとIPSPの消失に加えて、4層と2/3層細胞との発火順序が逆転しているのがわかる。また同様に、D,Eの例ではGABA拮抗薬により、4層では遅れた発火が、さらに2/3層では先行する発火が出現し、結果的に発火順序が破綻していることがわかる。

以上の結果は、生後12-14日以降、視床皮質投射はGABA細胞をわずかに早く興奮させることにより4層→2/3層の発火順序形成に貢献していることを示す。4層、2/3層間シナプスは4層→2/3層順の発火で結合が強化され、逆順発火で結合が弱化する、スパイクタイミング依存性可塑性(STDP)を示すことが知られている。従って、生後14日以降に4層→2/3層順の発火順序が成立することはヒゲ刺激によりこのシナプスが強化されること、またヒゲ除去により発火順序が逆転しこのシナプスが弱化されることを意味し、可塑性発現と密接に関わっている。では、発火順序の形成されない12日以前ではスパイクタイミング依存性可塑性のルールはどうなっているのだろうか?この点を次に検討した。その結果、生後13日以前では、全く異なるルールのSTDPがあることを見出した。ではこのルールの下ではヒゲ除去による受容野可塑性は発現するかどうか、は非常に興味ぶかい。そこで、現在、ヒゲ除去を行い可塑性発現の有無を探索中である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Akaneya, Y., Souya, K., Kitamura, A., Kimura, F., Washburn, C., Zhou, R., Ninan, I., Tsumoto, T., and Ziff, E. (2010) Ephrin-A5 and EphA5 Interaction Induces Synaptogenesis during Early Hippocampal Development. *PLoS One* 5 (8): e12486 (査読有)
- ② Kimura, F., Itami, C., Ikezoe, K., Tamura, H., Fujita, I., Yanagawa, Y., Obata, K. and Ohshima, M. (2010) Fast activation of feedforward

inhibitory neurons from thalamic input and its relevance to the regulation of spike sequences in the barrel cortex. *Journal of Physiology* 588:2769-2787 (査読有)

- ③ Kimura, F. and Itami, C. (2009) Myelination and Isochronicity in neural networks. *Frontiers in Neuroanatomy* 2009;3:12. Epub 2009 Jul 6. (査読有)

[学会発表] (計 1 1 件)

- ① Itami, C. and Kimura, F. Developmental switch in the spike timing-dependent plasticity underlying the initiation of map plasticity. 41st Annual Meeting for the Society for Neuroscience Washington D.C, USA, 2011.11.13
- ② 木村文隆、伊丹千晶 発達期バレル皮質 2/3 層錐体細胞への 2 つの異なるスパイクタイミング依存性可塑性の集束 第 3 4 回日本神経科学大会 2011.9.15 横浜
- ③ Kimura, F. and Itami, C. Developmental switch in the spike timing dependent plasticity at layer 4 to layer 2/3 synapses in coincidence with the initiation of critical period in the mouse barrel cortex 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Firenze, Italy, 2011.7.18
- ④ Itami, C. and Kimura, F. Characterization of bilateral spike timing dependent plasticity specifically appeared during the 2nd postnatal

week at L4-L2/3 synapses in the mouse barrel cortex 40th Annual Meeting for the Society for Neuroscience San Diego, USA, 2010.11.14

- ⑤ 木村文隆、伊丹千晶 バレル皮質 4 層 - 2 / 3 層のスパイクタイミング依存性可塑性と発達に伴う変化 第 3 3 回日本神経科学大会 2010.9.3 神戸
- ⑥ 木村文隆、伊丹千晶 4 - 2 / 3 層間シナプスのフィードフォワード抑制による発火タイミング制御の発達とそれに伴う STDP の変化 第 8 7 回生理学会大会シンポジウム (脳のリズムとシナプス可塑性 2010.5.21 盛岡
- ⑦ F. Kimura, M. Ohshima, C. Itami, Y. Yanagawa Activation of a2A adrenoceptors suppresses excitatory synaptic transmission to layer 4 cells both from thalamic and intracortical sources in the mouse barrel cortex through presynaptic mechanism. 39th Annual Meeting for the Society for Neuroscience 2009.10.19 Chicago, USA.
- ⑧ C. Itami, S-I. Watanabe, F. Kimura Developmental switch in the spike timing-dependent plasticity between L4-L2/3 synapse in parallel with feedforward inhibition in mouse barrel cortex 39th Annual Meeting for the Society for Neuroscience 2009.10.18 Chicago, USA.
- ⑨ 木村文隆、伊丹千晶 フィードフォワード

ード抑制による発火タイミング制御の発達とそれに伴う可塑性の変化 第32回日本神経科学大会 2009.9.18 名古屋国際会議場

⑩ 大島稔、伊丹千晶、小幡邦彦、柳川右千夫、木村文隆 バレル皮質4層細胞への興奮性伝達に対する  $\alpha 2 A$  ノルアドレナリン受容体によるシナプス前性抑制 第32回日本神経科学大会 2009.9.17 名古屋国際会議場

⑪ 池添貢司、田村弘、木村文隆、藤田一郎 ラット感覚野ニューロン群におけるノイズ相関の生後発達 第31回日本神経科学学会大会 2008.7.10 東京

[その他]  
ホームページ等

[http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molneu/member\\_kf.html](http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molneu/member_kf.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木村 文隆 (Kimura Fumitaka)  
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：00202044