

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21770073

研究課題名 (和文) ノンスパイク介在神経の示す生理学的・形態的変異のシナプス統合作用への機能解析

研究課題名 (英文) Analysis of the influence of physiological and morphological variability to the synaptic integration of a nonspiking interneuron

研究代表者

高嶋 聡 (TAKASHIMA AKIRA)

東京大学先端科学技術研究センター・特任研究員

研究者番号：00374190

研究成果の概要 (和文)：

本研究計画は神経生理学的手法と計算論的神経科学的手法を用いて無脊椎動物の同定ニューロンの電気生理学・形態学的ばらつき (変異) の細胞全体の振る舞い (特にシナプス出力) への影響を調査・解析することを目的とした。平成21年度は神経生理学・神経薬理学的手法をもちいて、LDS細胞樹状突起膜の電位依存性膜コンダクタンス、細胞の三次元的構造をそれぞれ異なる標本から記録し、そのばらつき (変異) がどの程度であるか定量化することを目指し、標本により膜電位依存性膜コンダクタンスに大きな違いがあることが明らかになった。しかしながら、ルシファイエローによる細胞染色と電気生理学的記録を同時に同じ細胞で行うことは困難であることも明らかになった。そこで22年度は、LDS細胞樹状突起膜の3種の各電位依存性膜コンダクタンスの標本ごとのばらつき評価した。

研究成果の概要 (英文)：

The present study aimed to investigate the influence of physiological morphological variability to the synaptic integration (synaptic output) of an identified nonspiking interneuron (LDS neuron) using neurophysiological and computational methods. In 2009, in order to quantify the variability of the membrane conductance of dendrite and three-dimensional structure of the LDS cells, their membrane conductances were investigated neurophysiologically and neuropharmacologically and their three-dimensional structures were measured using a laser scanning microscope. The result shows large variability of the membrane conductance across the cells. However, the morphology of the cell could not be obtained while the membrane conductance was recorded at the same time using cell filling fluorescent dye, Lucifer Yellow so that three dimensional structures of the cells could not be quantified from the cell recorded electrophysiologically. In 2010, three types of membrane conductances in the LDS cell was estimated quantitatively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：シナプス統合作用, ノンスパイク介在神経, 無脊椎動物, 電位依存性コンダクタンス, HH-モデル

1. 研究開始当初の背景

動物の脳・神経系における情報処理は神経細胞（ニューロン）間のコミュニケーションによって行われる。個々のニューロンは樹状突起と呼ばれる構造で他の多数のニューロンから神経伝達物質と呼ばれる化学物質による入力を受け、それらを電気信号に変換して活動電位を発生させ、また別のニューロンへと出力する。つまり個々のニューロンの樹状突起における入力・出力変換過程—シナプス統合作用—は脳・神経系における情報処理における最も基礎となる最重要過程である。近年、シナプス統合作用を理解するためには、神経薬理学、神経生理学および神経解剖学など手法による実験結果をもとにニューロンのモデルを作り計算機シミュレーションにより調査する、計算論的神経科学的手法の有効性が明らかとなってきた。しかしニューロンモデルの作成には特定の同定されたニューロンにおいての実験的知見の集積が不可欠である。

モデル作成が可能な同定ニューロンの一つにザリガニ腹部最終神経節に存在する LDS 細胞がある。この細胞はその形態や生理学的性質により同定可能な細胞であり、その樹状突起膜上の神経伝達物質受容体の性質、電位依存性膜コンダクタンス（微視的にいえば電位依存性イオンチャネル）の動態、樹状突起の三次元的構造などがよく調べられている。ところで、上記の研究を進めていく際に LDS 細胞は同定ニューロンといえども、その樹状突起膜における総膜電位依存性コンダクタンスの大きさには記録される固体ごとに大きな変異が見られることを発見した（未発表）。それでは一つの細胞のコンダクタンスの変異は個体としての感覚受容や行動発現に何らかの影響をもたらさしめないだろうか？それともこのような個々のニューロンにおける変異は固体全体としては補償され影響はほとんどないのであるだろうか？という疑問に行き着く。

2. 研究の目的

アメリカザリガニの腹部最終神経節に存在する LDS 細胞は同定ニューロンといえども、その樹状突起膜における総電位依存性コンダクタンスの大きさには記録される固体ごとに大きな変異が見られる。それでは一つの細胞のコンダクタンスの変異は個体としての感覚受容や行動発現に

何らかの影響をもたらさしめないだろうか？それともこのような個々のニューロンにおける変異は固体全体としては補償され影響はほとんどないのであるだろうか？この個々のニューロンの樹状突起膜レベルでの変異（差異？）が細胞全体の振舞いもしくは生物個体のレベルでの影響については、最近になって neuronal homeostasis (Schulz et al., 2006) という言葉で語られるようになりつつある。本研究は、今まで多数の標本から記録をとり平均を取ることで見過ごされてきたこの点について、神経生理学的手法、行動生理学的手法と計算論的神経科学的手法を用いて解明することを目的とする。

3. 研究の方法

LDS 細胞は薬理的性質、活性化/不活性化の電位依存性、カイネティクスのことなる 3 種類の電位依存性外向コンダクタンスを持つことが知られている（業績 3）。そしてこのコンダクタンスには標本ごとの変異（ばらつき）が見られること先行実験にてわかっている（未発表データ）。そこで、ザリガニ腹部最終神経節の単離標本からの電気生理学的計測、神経薬理学的実験、細胞内蛍光色素注入と共焦点レーザー顕微鏡を用いた形態記録を同一の標本で行い、それを複数の標本（6 から 12 個体を目安にする）から収集する。

3 種類の外向きコンダクタンスはそれぞれ電位依存性 K⁺チャネルの阻害剤である、TEA, 4-AP でブロックすることが可能である。また TEA でブロックされる外向きコンダクタンスはその活性化/不活性化の電位依存性、カイネティクスの違いから明瞭に 2 つに分離できる。ただし薬理学的問題として各種試薬の効果が正しくその試薬の効果であることを確認するために各試薬投与前、投与中、投与後 (wash) の電気生理学的記録をとる必要があるが、4-AP の効果は不可逆的であるため、実際の実験において同一の標本からこの 2 つの試薬の効果をはっきりと分離するためにははまず TEA を投与しその効果を確認した後に生理食塩水で wash し TEA の効果が回復した後、4-AP を投与し、4-AP 単独の効果を記録する必要がある。こうして各試薬で膜コンダクタンスをブロックした後、試薬投与前の記録からブロック中の記録をデジタルサブトラクションすることにより、各試薬でブロックされる膜コンダクタンス成

分を単離する。

取得した神経生理学的及び形態学的データを基にリアリスティックなマルチコンパートメントモデルを構築し（6から12個体分）、感覚神経束を刺激したとき見られる LDS 細胞の膜電位応答をコンピュータ上でシミュレーションする。この結果を平成21年度に実験的に取得した膜電位応答と比較することで、実験的に見られる電位応答のばらつきが膜コンダクタンスレベルおよび、細胞の微小形態レベルでのばらつきにより説明できるかを調査する。

電気生理学的計測及び神経薬理学的実験、で得られた各電位依存性膜コンダクタンスを Hodgkin-Huxley 型の数理モデル（HH モデル; Hodgkin and Huxley, 1952）で各標本ごとに記述する。また各電位依存性膜コンダクタンスの平均をとり、標準化された膜コンダクタンスモデルも作成する（標準化 HH モデル）。

形態計測の結果を基に、形態をデカルト座標系でプロットし、定量化したのち、樹状突起を長さや太さの異なる円柱（シリンダー）で近似し、マルチコンパートメントモデルを構築する。マルチコンパートメントモデルに関しても標準化したマルチコンパートメントモデルを作成する（標準化形態モデル）。（1）で記述した各膜コンダクタンスの Hodgkin-Huxley 型モデルを（2）で構築したマルチコンパートメントモデルに組み込み、リアリスティックな LDS 細胞モデルを各標本分を作成する。これらのモデルをニューロンモデルの汎用シミュレータである、GENESIS (Bower and Beemanr, 1997) を用いてコンピュータ上でシミュレーションする。各標本に基づいたモデルは実際の電気生理学的記録をうまく説明できるか？また標準化 HH モデルに対して、ばらつきのある各 LDS 細胞形態モデル組み合わせる。また標準化形態モデルに対して、各標本から取得した（平均化されていない）HH モデルを組み合わせる。さらに標準化 HH モデルと標準化形態モデルを組み合わせる。以上の3つの標準化モデルを用いて、多くの標本で見られるような典型的な膜電位応答を示すか？を検証していくことで、細胞の示す応答のばらつきや neuronal homeostasis の成立原因を説明する。

4. 研究成果

LDS 細胞はアメリカザリガニ腹部最終神経節に1対存在するノンスパイク型介在神経である。その形態は正中線をまたいで両側に樹状突起を伸ばしている。細胞体の同側の樹状突起は滑らかな表面をもち、細胞体の反対側の樹状突起にはバリコシティーが数多く存在する（図1）

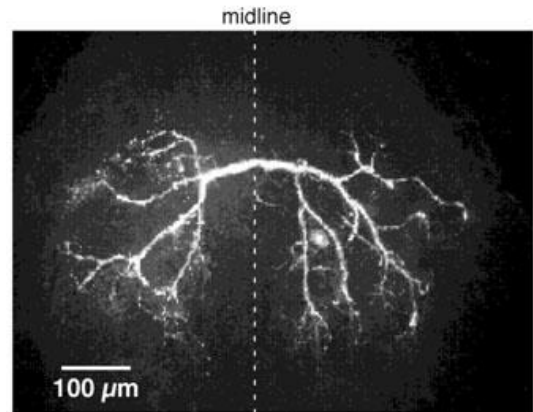


図1 LDS 細胞形態の共焦点顕微鏡画像

この LDS 細胞の正中線付近の比較的大い樹状突起にガラス管微小電極を刺入し、不連続膜電位固定法（ヴォルテージクランプ）をおこなうと、脱分極に対し、素早い活性化を示すも外向き電流と、比較的ゆっくりとした持続性の外向き電流が生じる（図2）。これらは神経薬理的に3種類、すなわちとても速い活性化（2 msec 以内）と不活性化を示すもの、比較的速く活性化（5 msec 以内）し、ゆっくりと不活性化するものと、いわゆる遅延整流型的外向き電流である。

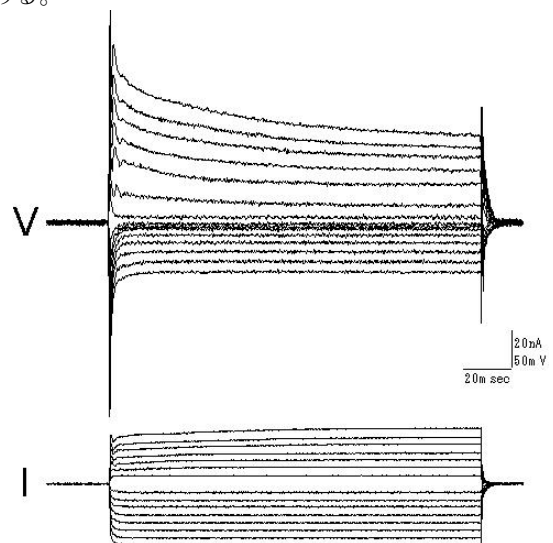


図2 LDS 細胞の示す電位依存性膜電流

この電位依存性外向き電流（および内向き電流）を合計 17 標本から計測した。そのうち 3 例を図 3 に示す。

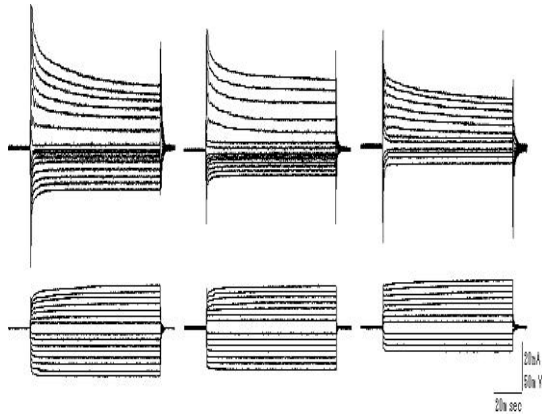


図 3 LDS 細胞の示す電位依存性外向き電流のばらつき（変異）

これら 9 例についてその最大電流値（静止電位から +70mV 脱分極時）のばらつきについて統計をとっている。さらに神経薬理実験を行い 3 種類の電位依存性外向き電流を単離し、そのばらつきを定量化しその最大値から最小値までを 5 段階程度にわけ、5×5×5 の組み合わせのコンダクタンスについて計算機シミュレーションを行っている。

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 2 件）

- ① 高嶋聰、加沢知毅、神崎亮平、昆虫の嗅覚系全脳シミュレーション、電気学会誌、査読有、129 巻 12 号、2009、808-811
- ② Shigehiro Namiki, S. Shuichi Haupt, Tomoki Kazawa, Akira Takashima, Hidetoshi Ikeno, Ryohei Kanzaki: “Reconstruction of virtual neural circuits in an insect brain”, *Frontiers in Neuroscience* 3(2):206-213 (2009)

〔学会発表〕（計 7 件）

- ① Akira Takashima, Shigehiro Namiki, Tomoki Kazawa, Stephan Shuichi Haupt, Ikuko Nishikawa, Hidetoshi Ikeno, Ryohei Kanzaki: “Simulation of a small neural network related to programmed behavior in pheromone orientation in male silkworms.”, *Frontier in Neuroinformatics. Conference Abstract: 2nd INCF Congress of*

Neuroinformatics. doi: 10.3389/conf.neuro.11.2009.08.064 (2009) Sep6-8, Pilsen.

- ② Ikuko Nishikawa, Akira Takashima, Shigehiro Namiki, Tomoki Kazawa, Stephan Shuichi Haupt, Hidetoshi Ikeno and Ryohei Kanzaki: “Estimation of the information pathway in the neural network in the premotor center of *Bombyx mori* to generate the flip-flop activity and its validation by the simulation.”, *Frontiers in Neuroinformatics Conference Abstract: 2nd INCF Congress of Neuroinformatics.* doi: 10.3389/conf.neuro.11.2009.08.113 (2009) Sep6-8, Pilsen.
- ③ Akira Takashima, Shigehiro Namiki, Tomoki Kazawa, Stephan Shuichi Haupt, Ikuko Nishikawa, Hidetoshi Ikeno, Ryohei Kanzaki: “Simulation of a small neural network involved in pheromone orientation male silkworms.”, *Asia Simulation Conference 2009/Japan Society for Simulation Technology, ID051 (2009) Oct9, Kusatsu.*
- ④ Ikuko Nishikawa, Yoshiki Igarashi, Akira Takashima, Shigehiro Namiki Tomoki Kazawa, Stephan Shuichi Haupt, Hidetoshi Ikeno, Ryohei Kanzaki: “A simulation of the dynamics of the premotor center in an insect brain to generate the programmed behavior for the pheromone orientation.” *Asia Simulation Conference 2009/Japan Society for Simulation Technology, ID084 (2009) Oct9, Kusatsu.*
- ⑤ Hidetoshi Ikeno, Tomoki Kazawa, Shigehiro Namiki, Stephan Shuichi Haupt, Akira Takashima, Ryota Fukushima, Ikuko Nishikawa, Ryohei Kanzaki: “Development of standard brain for silkworm moth, *Bombyx mori*, linked with a neuron database”, *CNS2009 (2009) July18-23, Berlin*
- ⑥ Yohei Sato, S Shuichi Haupt, Tomoki Kazawa, Shigehiro Namiki, Akira Takashima, Hidetoshi Ikeno, Ikuko Nishikawa and Ryohei Kanzaki “Large-scale realistic network simulation of pheromone-processing circuits in the silkworm brain” *Neuroinformatics 2010 3rd INCF Congress of Neuroinformatics Abstract: p87 (2010) Aug30-Sep1, Kobe.*
- ⑦ Tomoki Kazawa, Namiki Shigehiro, Akira Takashima, Stephan Shuichi Haupt, Sakiko

Siga, Hiroyuki Ai, Hitoshi Aonuma, Masakazu Takahata, Ryohei Kanzaki, Hidetoshi Ikeno and Shiro Usui "From Bombyx neuron database to Invertebrate brain platform - toward a virtual invertebrate neuroscience lab" Neuroinformatics 2010 3rd INCF Congress of Neuroinformatics Abstract: p147 (2010) Aug30-Sep1, Kobe.

[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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

高嶋 聡 (TAKASHIMA AKIRA)
東京大学先端科学技術研究センター・特任
研究員
研究者番号：00374190

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：