

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22680032

研究課題名（和文）

聴覚ニューロンの軸索起始部での新規可塑性

研究課題名（英文）

Plasticity at the axon initial segment in auditory neurons

研究代表者

久場 博司 (Hiroshi Kuba)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10362469

研究成果の概要（和文）：

本研究では、哺乳類の蝸牛神経核に相当するトリの大細胞核を対象に聴覚入力が神経細胞の軸索起始部 (AIS) に及ぼす効果を検討した結果、この神経核では聴神経活動の消失に伴って AIS の長さが延長し、Na チャネルの発現が増加することにより、細胞の興奮性が増すことを明らかにした。すなわち、活動電位の発生部位である AIS が可塑的な性質をもち、神経活動の入力依存的な調節に関わっていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Axon initial segment (AIS) is the most critical site to determine the neural activity. In this project, I examined the properties of plasticity of AIS in avian brainstem auditory neurons and found that the deprivation of auditory inputs rearranges the AIS to increase its length, leading to augment the excitability of the neuron. This plasticity at the spike initiation site should be a most efficient mechanism to regulate the neural activity, and may play a critical role in the maintenance of auditory pathway after hearing loss.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	10,400,000	3,120,000	13,520,000
2011年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2012年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
総計	19,700,000	5,910,000	25,610,000

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

1. 研究開始当初の背景

音は蝸牛から聴神経を介して脳幹の蝸牛神経核へ伝えられ、ここでその基本的属性（時間，強さ）が抽出されることにより，上位の神経核での様々な聴覚情報処理が可能となる。トリでは大細胞核（nucleus

magnocellularis, NM）がこの役割を担う。NM 細胞が正確に時間情報を層状核（nucleus laminaris, NL）へ送ることにより音源定位が実現される。これまで我々は、ヒヨコの NM と NL において AIS での Na チャネル分布が音の周波数領域に応じて異なり，このことによ

り正確な聴覚情報処理が実現されることを示した。すなわち、AIS は高い周波数領域ほど NM では短く、NL では細胞体からより離れた位置に存在する。このことは AIS が処理する情報と細胞機能に応じて最適化されており、さらにシナプス入力に依存して変化する、つまり可塑的能力をもつ可能性を示唆している。特に、AIS は活動電位の発生部位であることから、AIS での可塑性は神経活動に最も強く影響し、その結果、神経回路の形成・維持に重要な役割を果たしていることが予想される。この考えに基づき、本研究では以下の仮説を考えた。すなわち、この AIS の可塑性は homeostatic plasticity として、内耳が障害された際に、NM 細胞活動を亢進し、聴神経活動の消失を代償することで、聴覚中枢神経回路の構造と機能の維持に関わる。また、この可塑性は内耳障害時以外にも、音環境が変化した際に NM 細胞の聴覚時間情報処理を最適化することに関わる。しかしながら、この AIS の可塑性が具体的に AIS の機能特性をどのように変化させ、このことが神経細胞と神経回路の構造と機能にどのように影響するのかが明らかでない。また、この可塑性の誘導条件や分子機構についても明らかでない。従って本研究では、これらの問題を明らかにすることにより上記仮説を検証した。

2. 研究の目的

聴覚入力を様々なレベルに変化させること（内耳除去、耳小骨障害、鼓膜障害、騒音環境飼育）により AIS の可塑性を誘導し、AIS の機能・構造特性の変化を明らかにするとともに、その NM 細胞の膜特性と神経活動に対する効果、さらにその NM と NL の神経回路構築に対する効果を明らかにする。これにより、AIS 可塑性の聴覚神経回路維持における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 手術

NM への神経活動入力レベルを変化させるために、孵化後 1 日のヒヨコを包水クロラール麻酔下に内耳の機械的除去、耳小骨障害、鼓膜傷害の手術を行った。下記 B と C の解析には主に手術後 7 日目の動物を用いた。

(2) 免疫組織学的解析

AIS には Na チャネル (Nav1.2, 1.6), K チャネル (Kv1.1, Kv1.2, Kv3.1, 7.2, 7.3) が存在する。従って、これらの発現量と分布の変化を免疫染色により評価した。軸索上での位置の同定は、スライス標本においてパッチ電極により蛍光色素 (Alexa594) を注入し、NM 細胞を可視化した標本を用いることで行った。また、AIS 構造との関係は、AIS の足場蛋白である ankyrinG の免疫染色により評価した。

(3) 電気生理学的解析

スライス標本を用いたパッチクランプ法により AIS の機能特性、すなわち、AIS における Na 電流と K 電流の特性、分布、および密度の変化を解析した。NM 細胞は樹状突起をもたない。従って、AIS における電流は細胞体からのホールセル記録とセルアタッチ記録の差分をとることで評価した。Na チャネルの増加は膜興奮性を増加すると予想される。従って、基本的な膜特性、順行性と逆行性の活動電位を解析するとともに、自発活動の有無を調べることにより、AIS 可塑性の膜興奮性と神経活動に対する効果を明らかにすることも行った。スライス標本では蝸牛神経節細胞の影響を受けることなく、NM 細胞自体の活動性を評価することができる。

4. 研究成果

初年次

ヒヨコの内耳を機械的に取り除くことで聴覚入力の変断を行い、このことでの NM における AIS の Na チャネル分布に及ぼす効果を検討した。まず、聴覚遮断を行った動物を用いて免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡により解析を行った。その結果、NM における AIS の Na チャネル分布は、聴覚遮断により 3-7 日の時間経過で約 1.5 倍に延長することを明らかにした。この Na チャネル分布は膜の足場蛋白質である ankyrinG の分布と一致することから、聴覚遮断は AIS の構造自体を変化させると考えられた。次に、聴覚遮断に伴う AIS の機能変化を、脳幹の急性切片標本を用いてパッチクランプ法により調べた。まず、電圧固定下に NM 細胞から Na 電流を記録したところ、軸索の Na 電流は聴覚遮断により約 1.5 倍に増加するのに対して、細胞体の Na 電流には変化を認めなかった。さらに、電流固定下に活動電位を記録したところ、聴覚遮断により活動電位の閾値は低下し、振幅は増加した。以上のことから、NM 細胞では聴神経活動の消失に伴って、AIS の長さが延長し、Na 電流が増加することにより、細胞の興奮性が増すことを明らかにした。

二年次

内耳除去による聴覚遮断では AIS の変化が聴神経活動の変化でなく、内耳障害自体で生じた可能性も否定できない。従って、さらに内耳が無傷な状態で入力を変化させ、このことが NM 細胞の AIS 分布に及ぼす効果を検証した。まず、鼓膜を破ることや、耳小骨を固定または除去することにより様々な伝音性難聴の動物を作製した。これらは、それぞれ 20dB と 50dB の聴力低下を生じることが知られている。鼓膜を破った場合、NM 細胞の AIS には僅かな延長がみられるのみであった。一方、耳小骨を固定または除去した場合には著明な延長が認められた。このことから、AIS

の変化には大きな聴覚入力の変化が必要だと考えられる。次に、動物を騒音環境 (70-90 dB) に 1 週間暴露したところ、AIS には軽度の短縮傾向が認められた。以上、内耳が無傷な状態でも NM 細胞の AIS の分布には変化が生じ、かつその程度は聴覚入力と関連することを明らかにした。これらの結果から、AIS の可塑性は内耳傷害でなく聴覚入力自体の変化によって生じる、すなわち、AIS の変化には聴神経からのシナプス入力の変化が重要であることを明らかにした。

三年次

この AIS の可塑性における K チャネルの変化について検討した。まず、様々な K チャネルに対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、内耳除去により NM 細胞の AIS では、Kv1 の発現が減少し、Kv3 と Kv7 の発現が増加することを観察した。Kv1 は活性化が速く、閾値も低いため、Kv3 と Kv7 に比べて膜興奮に対する抑制効果が強い。従って、これらの K チャネルの相補的な発現変化は、細胞が静止膜電位を保ちつつ、膜興奮性を増加させるしくみとして働いている可能性が考えられる。実際、脳スライス標本を用いたパッチクランプ記録により、内耳除去後の NM 細胞では静止膜電位に大きな変化がなく、一方、活動電位の閾値は低下していることが確認された。そこでさらに、これらの K チャネルに対する選択的阻害剤 (DTX, Kv1 ; TEA, Kv3 ; XE991, Kv7) を用いて、各 K チャネル成分の活動電位の閾値に対する関与を検討したところ、Kv3 と Kv7 阻害の効果は内耳除去側で大きいものに対して、Kv1 阻害の効果は健常側で大きかった。以上、聴覚入力変化に伴う NM 細胞の AIS 可塑性では、AIS の空間分布と Na チャネルの発現量だけでなく、K チャネルの発現量もサブタイプ特異的に変化し、

このことにより細胞の興奮性と恒常性が精巧に調節されていることを明らかにした。

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7件)

1. Yamada R, Okuda H, Kuba H, Nishino E, Ishii TM, Ohmori H The cooperation of sustained and phasic inhibitions increases the contrast of ITD-tuning in low-frequency neurons of the chick nucleus laminaris.

J. Neurosci. 33, 3927-3938 (2013).

(査読有り)

2. Okuda H, Yamada R, Kuba H, Ohmori H Metabotropic glutamate receptors improves the accuracy of coincidence detection by presynaptic mechanisms in the nucleus lamirnaris of the chick.

J. Physiol. (Lond.) 591:365-378 (2013).

(査読有り)

3. Kuba H Structural tuning and plasticity of axon initial segment in auditory neurons.

J. Physiol. (Lond.) 590:5571-5579 (2012).

(査読有り)

4. Taruno A, Ohmori H, Kuba H Inhibition of presynaptic Na(+)/K(+)-ATPase reduces readily releasable pool size at the avian end-bulb synapse.

Neurosci. Res. 72, 117-128 (2012).

(査読有り)

5. Grubb MS, Shu Y, Kuba H, Rasband MN, Wimmer VC, Bender KJ

Short- and long-term plasticity at the axon initial segment

J. Neurosci. 31, 16045-16055 (2011).

(査読有り)

6. Kuba H

Plasticity at the axon initial segment.

Commun. Integr. Biol. 3, 597-598 (2010).

(査読有り)

7. Kuba H, Oichi Y, Ohmori H

Presynaptic activity regulates Na⁺ channel distribution at the axon initial segment.

Nature 465, 1075-1078 (2010).

(査読有り)

[学会発表] (計8件)

1. Kuba H

Activity-dependent regulation of ion channel distribution in an auditory neuron.

64th Annual Meeting of the Korean Physiological Society (Pusan)

2012年10月26日(招待講演)

2. 久場博司

発達期における軸索起始部の空間分布制御

第36回日本神経科学大会(名古屋)

2012年9月18日(招待講演)

3. 久場博司

軸索起始部発達過程における神経活動の効果

第89回日本生理学会大会(松本)

2012年3月29日(ポスター)

4. 久場博司

軸索起始部の神経活動依存的制御
第 117 回日本解剖学会総会 (甲府)
2012 年 3 月 28 日 (招待講演)

5. Kuba H

Homeostatic regulation of axon initial
segment in an avian auditory neuron.
Neuroscience meeting 2011 (Washington DC)
2011 年 11 月 15 日 (招待講演)

6. Kuba H

Effective coupling between synaptic
inputs and axonal Na⁺ channels in auditory
neurons.
3rd European Synapse Meeting (Hungary)
2011 年 10 月 15 日 (招待講演)

7. 久場博司

軸索起始部における Na チャネル分布の活動
依存的制御
第 33 回日本神経科学大会 (神戸)
2010 年 9 月 2 日 (招待講演)

8. 久場博司, 尾市雄輝, 大森治紀
軸索起始部における新規神経可塑性
第 87 回日本生理学会大会 (盛岡)
2010 年 5 月 20 日 (ポスター)

[図書] (計 1 件)

ギャノン生理学 24 版
監訳 岡田奉伸、訳者 久場博司 他
丸善出版 (in press, 2013)

[その他]

ホームページ等

http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/1710/1712/saibouseirigaku_bunshidoutaigaku.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久場 博司 (KUBA HIROSHI)
名古屋大学・医学研究科・教授
研究者番号: 10362469

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし