

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 30 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23570099

研究課題名(和文) ナメクジ嗅覚中枢におけるGABAニューロンの振動活動調節・回路再編成機構

研究課題名(英文) GABAergic modulation on the oscillatory activity and network reconstruction in the slug olfactory center

研究代表者

小林 卓 (Kobayashi, Suguru)

徳島文理大学・薬学部・助教

研究者番号：50325867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ナメクジの脳には、においの嗅ぎ分けや記憶に必要な「前脳葉」という部位がある。前脳葉では、ヒトの脳と同じようにニューロンが規則正しく並び層構造を成し、同期的な振動活動(脳波)を発生することでにおいの情報処理や記憶を可能にしている。研究代表者らは、ヒトの神経振動ネットワークにおいて一般的には「抑制性」として重要なGABAニューロンが前脳葉の振動ネットワークでは「興奮性」に働いていることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Synchronous oscillatory activity is common in the olfactory behavior of both vertebrates and invertebrates. In the terrestrial slugs, periodic oscillation is recorded from the surface of the laminar structure of olfactory center, proocerebrum (PC) and its frequency changes are suggested to encode the olfactory information and memory. Gamma-aminobutyric acid (GABA) neurons are known to inhibitory neurons as a kernel of rhythm generation in oscillatory networks of vertebrate. In the present study, we found that GABAergic neuron has a role to play as an excitatory modulator in the PC oscillatory network of the slugs. This observation and the conclusion have been supported by the pharmacological study in reconstructed oscillatory networks of cultured PC neurons.

研究分野：神経生理学

キーワード：GABA oscillatory network laminar structure olfactory center slug cultured neuron

1. 研究開始当初の背景

陸棲の軟体動物であるチャコウラナメクジ (*Limax valentianus*) は、脳の神経ネットワークが哺乳類と比べてシンプルな割には嗅覚学習が成立し易く、記憶・学習の研究に良く用いられてきた。特に、ナメクジの嗅覚と記憶をつかさどる脳部位である「前脳葉 (Proocerebrum, PC)」では、ニューロンが規則正しく並び層構造を成し、ニューロン同士の同期的な振動活動、いわゆる脳波が記録できる。この前脳葉の脳波はにおい情報や記憶をコードするとされている。哺乳類の嗅球、海馬といった脳層構造で発生する脳波が様々な認知機能に深く関係すること、そしてこれらの同期的振動活動の発生と周波数調節に抑制性の GABA ニューロンが重要な働きをすることは既知である。これまでの知見からナメクジの脳にも GABA ニューロンが存在することが示唆されてきたが、その役割については注目されて来なかった。研究代表者による最近の研究により、(1) 前脳葉の神経突起層へ入力する GABAergic な線維があること、(2) 前脳葉の細胞体層に少数 GABA ニューロンが存在すること、(3) GABA が前脳葉の局所場電位振動の周波数を変化させることを示唆する結果が得られた。

2. 研究の目的

以上のことから、哺乳類と同様に、ナメクジの脳層構造の振動性ネットワークの中にも GABA ニューロンが存在し、しかし全く異なる機構・役割をもつことが予想される。本研究課題では、ナメクジ前脳葉の GABA ニューロンに注目しその神経機構と役割を解明する。これまでブラックボックスであった前脳葉内のネットワークを明らかにすることで、脳層構造の振動性ネットワークにおける種に共通のメカニズムの一端を解明することをめざす。

前脳葉内の GABA ニューロンの分布と投射様式: Gelperin らが GABA ニューロンの免疫組織学的解析結果についてすでに報告しており前脳葉以外の細胞体の位置を示している (Cooke et al. 1985)。研究代表者は、凍結切片標本に免疫染色を行うことで新たに前脳葉内にも GABA 陽性反応があることを見つけている。前脳葉において、Gelperin らよりも詳細な線維投射および細胞体の分布を示すために、(1) cerebral ganglion (脳神経節) から前脳葉の 2 つの神経突起層 (入力層と出力層) へ投射する GABA ニューロン線維と、(2) 前脳葉の細胞体層にある少数の GABA ニューロンの分布について調べた。

前脳葉ニューロンに対する GABA の作用: 研究代表者により、前脳葉表面から記録した

局所場電位 (local field potential, LFP) の周波数が GABA 投与により変化することが示唆されており、単一ニューロンレベルでも何らかの変化が起こっていると考えられる。最初に、前脳葉ニューロンの分散培養を行い、一度に多数の前脳葉ニューロンの薬理学的特性を網羅的に調べた。すなわち Ca²⁺イメージング法を用いて前脳葉ニューロンの自発的活動を測定し、GABA の薬理学的解析を行った。次に、摘出脳における前脳葉の単一ニューロンからのパッチクランプ記録により詳細な薬理学的解析を行った。以上の電気生理学的解析により、GABA 応答性の前脳葉ニューロンの割合や主要な GABA 受容体および細胞内カスケードについて調べた。

3. 研究の方法

前脳葉内の GABA ニューロンの分布と投射様式: Gelperin らが主に脳全載標本での GABA 免疫組織学的解析を行っていたのに対して研究代表者らは凍結切片標本を用いて前脳葉内の GABA 陽性反応を詳しく調べた。具体的には、固定した摘出脳から凍結切片 (厚さ 14~20 μm) を作製し、GABA 抗体および蛍光二次抗体で標識した標本について、(1) cerebral ganglion (脳神経節) から前脳葉の 2 つの神経突起層 (入力層と出力層) へ投射する GABA 陽性線維の詳細な分布、(2) 前脳葉の細胞体層にある少数の GABA 陽性細胞体の分布 (特に先端部 - 基部方向の分布の領域差) について調べた。

前脳葉ニューロンに対する GABA の作用: 最初に、前脳葉ニューロンの分散培養と Ca²⁺イメージング法を組み合わせることにより、一度に多数の前脳葉ニューロンの薬理学的特性を網羅的に調べた。摘出した前脳葉をデイスパーゼ処理し、生理食塩水中で 1~3 週間培養したのちに、Ca²⁺インジケータ (Oregon green 488 BAPTA-1, AM) をロードして細胞内 Ca²⁺濃度変化を測定した。そして自発的に発生する一過性の Ca²⁺上昇の頻度に対する GABA 受容体アゴニスト、アンタゴニストの効果を調べた。おおよその薬理学的特性が分かったのち、次に、単一ニューロンでの電気生理学的解析により詳細な GABA の調節作用について調べた。これまでの前脳葉ニューロンの記録にはナスタチンを用いた穿孔パッチ法のみが有効であり (Kobayashi et al. 2010)、膜電位固定時のスペースクランプの問題があった。研究代表者は、前脳葉ニューロンの細胞内 Ca²⁺濃度をコントロールすることによりホールセルパッチ法による膜電流記録を成功させ、膜電位をコントロールしながらより詳しく GABA の作用を調べた。そして GABA によって興奮・抑制される前脳葉ニューロンの割合と主要な GABA 受容体および細胞内カスケードについて調べた。

4. 研究成果

前脳葉内の GABA ニューロンの分布と投射様式：Gelperin らが GABA ニューロンの免疫組織学的結果についてすでに報告しているとおり、前脳葉以外の脳部位にある GABA 陽性ニューロンの細胞体の位置はほぼ一致した結果となった。研究代表者は、前脳葉に注目して調べることにより、新たに前脳葉内にも GABA 陽性反応があることを見つけた。すなわち、(1) 前脳葉基部の神経突起層へ GABA 陽性線維の細い束があり、層構造に沿ってサークル状の投射をすること、(2) その候補として前脳葉近傍のクラスタニューロン、そして触角からのごく少数の求心性線維があること、そして(3) 前脳葉の細胞体層に少数の GABA ニューロンがあることが示唆された。特に前脳葉ニューロンの細胞体での陽性反応については分散培養系でも確認されている。前脳葉内部の GABA ニューロンと外部の GABA ニューロンからの入力線維とは異なった役割を持つ可能性があり興味深い。

前脳葉ニューロンに対する GABA の作用：最初に、分散培養下の前脳葉ニューロンの薬理学的特性を網羅的に調べるために Ca^{2+} イメージングを行った。前脳葉ニューロン一個一個で自発的に発生する一過性の Ca^{2+} 上昇を記録し、その頻度に対する GABA 受容体の薬理学的解析を行った。Gelperin らは、前脳葉培養ニューロンが自発的な活動電位を発生していること、活動電位が一過性の Ca^{2+} 上昇と一致することを loose-patch whole-cell 法と Ca^{2+} イメージング法を組み合わせると同時に記録することにより確認している (Rhines et al. 1993)。研究代表者は、一部の前脳葉培養ニューロンにおいて(1) GABA 投与による自発的な Ca^{2+} 上昇の増大または振動活動がみられること、(2) GABA 受容体アンタゴニスト存在下ではアゴニストに対する阻害作用がみられることを示した。GABA_B 受容体を介する阻害が比較的顕著であった。さらに、ナメクジの GABA_A 受容体のサブユニットおよび GABA_B 受容体のタイプ 1 サブユニットをクローニングし、定量的な RT-PCR および Real-Time PCR 法により前脳葉には GABA_B 受容体が比較的多いことを示した。同じ軟体動物のウミウシ (*Hermisenda crassicornis*) の脳でも GABA_B 受容体および細胞内 Ca^{2+} カスケードが K^{+} チャネルを介してニューロンの興奮性を増大させるという報告 (Sakakibara et al. 2006) があることから、特に GABA_B 受容体に注目してさらに薬理的解析を行った。研究代表者は、細胞内 Ca^{2+} 濃度をコントロールすることにより単一の前脳葉ニューロンからのホールセルパッチ記録を成功させ、そして前脳葉ニューロンの膜電位をコントロールした状態で GABA の作用を調べた。その結果、(1) GABA が前脳葉ニューロンの自発的

な抑制性シナプス電流を減ずること、(2) GABA が GABA_B 受容体および K^{+} チャネルを介して脱分極性外向き電流を抑制すること、(3) これらのことが最終的に膜の興奮性を高めることが示唆された。これらの結果は先述のウミウシにおける GABA_B 受容体と K^{+} チャネルのストーリーと似ており興味深い。また、前脳葉表面から記録される局所場電位振動 (いわゆる脳波) の振動数が GABA 受容体アゴニストおよびアンタゴニストによって影響を受けること、特にアゴニストによる振動数上昇がみられることから、GABA による興奮性作用の存在が示唆される。

本研究課題により、嗅覚中枢における GABA の新規の神経機構が示唆された。また、前脳葉ニューロンの分散培養系での解析を行なう中で、振動ネットワークが自発的に再形成される様子が見つかった。このような振動ネットワークが一からつくられる過程を調べることで新たな研究課題が生まれる可能性があると考ええる。以上の結果が、脳層構造で発生する振動活動、すなわち脳波の仕組みと役割を考える上での新しい基礎的知見となれば幸いである。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計10件)

1. Matsuo R, Fukata R, Kumagai M, Kobayashi A, Kobayashi S, Matsuo Y. (2015) Histaminergic modulation of the oscillatory activity in the olfactory center of the terrestrial slug *Limax*. *J Comp Neurol*, in press. (査読あり)
2. Matsuo R, Kobayashi S, Wakiya K, Yamagishi M, Fukuoka M, Ito E. (2014) The cholinergic system in the olfactory center of the terrestrial slug *Limax*. *J Comp Neurol* 522:2951–2966. (査読有り) (DOI: 10.1002/cne.23559)
3. Murakami J, Okada R, Sadamoto H, Kobayashi S, Mita K, Sakamoto Y, Yamagishi M, Hatakeyama D, Otsuka E, Okuta A, Sunada H, Takigami S, Sakakibara M, Fujito Y, Awaji M, Moriyama S, Lukowiak K, Ito E. (2013) Involvement of insulin-like peptide in long-term synaptic plasticity and long-term memory of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *J Neurosci* 33(1):371-383. (査読有り) (DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0679-12.2013)
4. Ito E, Otsuka E, Hama N, Aonuma H, Okada R, Hatakeyama D, Fujito Y, Kobayashi S. (2012) Memory trace in feeding neural circuitry underlying conditioned taste aversion in *Lymnaea*. *PLoS One* 7(8):e43151. (査読有り) (DOI: 10.1371/journal.pone.0043151)

5. Kobayashi S, Ito E. (2012) GABAergic effects on the slow oscillatory neural activities in the procerebrum of *Limax valentianus*. *Acta Biologica Hungarica* 63 (Suppl. 2), pp. 217-221. (査読有り)

(DOI: 10.1556/ABiol.63.2012.Suppl.2.12)

6. Elekes K, Battonyai I, Kobayashi S, Ito E. (2012) Organization of the procerebrum in terrestrial pulmonates (*Helix*, *Limax*) reconsidered: cell mass layer synaptology and its serotonergic input system. *Brain Structure and Function* 218:477-490. (査読有り)

(DOI: 10.1007/s00429-012-0409-2.)

7. Kobayashi S, Matsuo R, Sadamoto H, Watanabe S, Ito E. (2012) Excitatory effects of GABA on procerebrum neurons in a slug. *J Neurophysiol* 108:989-998. (査読有り)

(DOI: 10.1152/jn.01137.2010)

8. Matsuo R, Kobayashi S, Morishita F, Ito, E. (2011) Expression of Asn-d-Trp-Phe-NH₂ in the brain of the terrestrial slug *Limax valentianus*. *Comp Biochem Physiol B* 160:89-93. (査読有り)

(DOI: 10.1016/j.cbpb.2011.06.007)

9. Matsuo R, Kobayashi S, Yamagishi M, Ito E. (2011) Two pairs of tentacles and a pair of procerebra: optimized functions and redundant structures in the sensory and central organs involved in olfactory learning of terrestrial pulmonates. *J Exp Biol* 214:879-886(査読有り)

(DOI: 10.1242/jeb.024562)

10. Kawai R, Kobayashi S, Fujito Y, Ito E. (2011) Multiple subtypes of serotonin receptors in the feeding circuit of a pond snail. *Zool Sci* 28:517-525. (査読有り)

(DOI: <http://dx.doi.org/10.2108/zsj.28.517>)

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 小林卓, Oscillatory network formation and cholinergic/histaminergic activity in the cultured olfactory neurons in the slug. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第 92 回日本生理学会大会合同大会(2015 年 3 月 21 日 ~ 23 日, 神戸国際会議場, 神戸市)

2. 小林卓, チャコウラナメクジ神経振動ニューロンにおけるネットワーク形成とコリナージック調節. 日本動物学会第 85 回仙台大会(2014 年 9 月 11 日 ~ 13 日, 東北大学, 仙台市)

3. Kobayashi S, Cholinergic regulation and in vitro reconstitution of synchronized oscillatory

networks in the olfactory center of the slug, *Limax valentianus*. 2014 ICN / JSCPB(国際神経行動学会 2014 年 7 月 28 日 ~ 8 月 1 日, 札幌コンベンションセンター, 札幌市)

4. Kobayashi S, Cholinergic system regulates oscillatory activity of the olfactory center in the slug. 9th FENS Forum of Neuroscience (欧州神経科学学会, 2014 年 7 月 5 日 ~ 7 月 9 日, ミラノ, イタリア)

5. 小林卓, アセチルコリンは嗅覚中枢の同期的振動活動を調節する. 第 91 回日本生理学会大会(2014 年 3 月 16 日 ~ 18 日, 鹿児島大学, 鹿児島市)

6. 小林卓, チャコウラナメクジ嗅覚中枢における神経振動ネットワーク調節機構. 日本動物学会第 84 回岡山大会(2013 年 9 月 26 日 ~ 28 日, 岡山大学)

7. 小林卓, ナメクジ嗅覚中枢の同期振動ニューロンにおける GABA の興奮性作用. 第 90 回日本生理学会大会(2013 年 3 月 27 日 ~ 29 日, タワーホール船堀, 東京都江戸川区)

8. 小林卓, ナメクジ嗅覚中枢の神経振動ネットワークにおける GABA の興奮性作用. 日本動物学会第 83 回大阪大会(2012 年 9 月 13 日 ~ 15 日, 大阪大学, 大阪市)

9. Kobayashi S, GABAergic modulation on the slow oscillatory neural networks in the procerebrum of *Limax valentianus*. 8th FENS Forum of Neuroscience (欧州神経科学学会, 2012 年 7 月 14 日 ~ 18 日, バルセロナ, スペイン)

10. Kobayashi S, Excitatory effects of GABA on synchronous oscillatory network in the olfactory center of a terrestrial slug. 第 89 回日本生理学会大会(2012 年 3 月 29 日, 信州大学, 松本市)

11. 小林卓, チャコウラナメクジ前脳葉の神経振動ネットワークにおける GABA の興奮性作用. 日本動物学会第 82 回旭川大会(2011 年 9 月 21 日, 大雪アリーナ, 旭川市)

12. Kobayashi S, GABAergic effects on the slow oscillatory neural activities in the procerebrum of *Limax valentianus*. 12th Symposium on Invertebrate Neurobiology (無脊椎動物神経生物学シンポジウム, 2011 年 8 月 31 日 ~ 9 月 4 日, ティハニー, ハンガリー)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 卓 (KOBAYASHI, Suguru)
徳島文理大学・香川薬学部・助教

研究者番号：50325867

(2) 研究分担者
なし