

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440183

研究課題名(和文) ナメクジ嗅覚中枢の振動ネットワークの再編成能力を用いて脳波の仕組みを解明する

研究課題名(英文) Reconstructed synchronous oscillatory network in olfactory center of the slug

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳のニューロンが同期活動する仕組みと意義を知りたい。ナメクジ嗅覚中枢のニューロンを一度バラバラにしても *in vitro* で(培養皿上で)再び同期的振動ネットワークが再形成されることをみつけたので、ネットワークが一から作られる様子を薬理的に調べた。グルタミン酸およびアセチルコリンが同期的振動の発生に必須なのに対し、ドーパミン、セロトニン、アドレナリン、ノルアドレナリン、オクトパミンなど多くの生体アミンたちは必須ではないことが分かった。これは *in vivo* (実際の脳内)で生体アミンたちが外因性の調節因子として重要な働をしていることと一致する。脳波の仕組みと役割を考える上での新しい基礎的知見を得た。

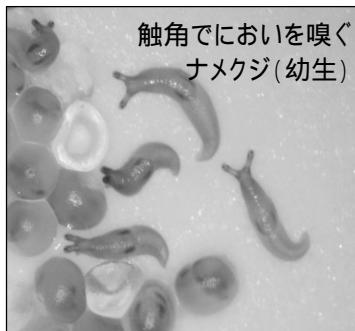
研究成果の概要(英文)：Synchronous oscillatory activity in a laminar structure is common in the central nervous system of both vertebrates and invertebrates. In the terrestrial slugs, periodic oscillation is recorded from the surface of the laminar structure of procerbrum (PC), olfactory center, and its frequency changes are suggested to encode the olfactory information and memory. We found that *in vitro* oscillatory neuronal network was formed from dispersed cell culture of PC neurons. Nicotine or acetylcholine esterase inhibitor induced synchronous oscillatory activity in the culture networks. Previous our studies show acetylcholine increased frequency of LFP oscillation in the PC may be via nicotinic ACh receptors. These results suggest cholinergic system can function as a major chemical transmitter in cultured PC neuron network. It may play an essential role, such as driving force for synchronous oscillation in the olfactory neuron network.

研究分野：神経生理学

キーワード：synchronous oscillation olfactory center slug cultured neuron

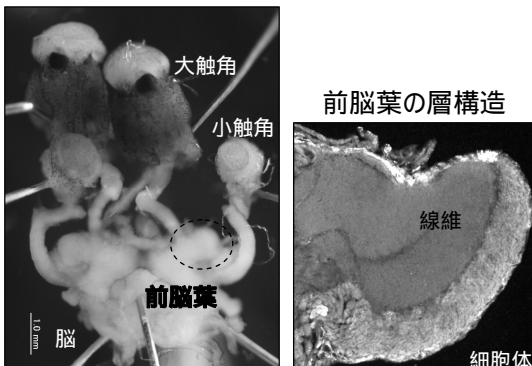
1. 研究開始当初の背景

陸棲の軟体動物であるチャコウラナメクジ (*Limax valentianus*) は、脳のニューロンネットワークが哺乳類と比べてシンプルな割には嗅覚条件づけが成立しやすく、記憶・学習の研究対象として永く用いられてきた。ナメクジの嗅覚中枢である「前脳葉 (Procerebrum, PC)」は、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) を発生して嗅覚情報処理を行っていると考えられている。研究代表者らによる最近の研究より、前脳葉ニューロンの分散培養下でも同期的振動ネットワークが再形成されることが発見された。



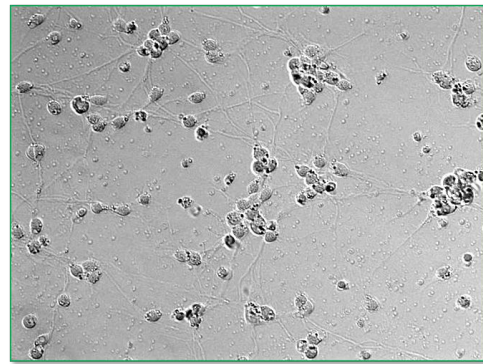
2. 研究の目的

嗅覚中枢である前脳葉は、自発的な同期的振動を発生し、におい刺激により振動数が変化すること、嗅覚の連合学習および記憶の保持に必要な脳部位であることが分かっている。しかし、その同期的振動ネットワーク内については、およそ 10 万個のニューロンが整列していること以外は未知な部分が多く、ブラックボックスとして残されたままであった。本研究課題では、分散培養によって一度バラバラになった前脳葉ニューロンが再び同期的振動ネットワークを形成する過程をボトムアップ的に調べることで、同期的振動活動を発生させるしくみを明らかにすることを試みた。そして脳波を発生させるようなニューロンネットワークの意義を解明することを目指した。



3. 研究の方法

前脳葉の同期的振動ネットワークの性質を詳細に調べるために、前脳葉ニューロンの分散培養法に Ca^{2+} イメージング法を適用し、経日変化するニューロン同士の接続様式を薬理的に網羅的に調べた。そして、分散培養下の *in vitro* ニューロンネットワークと、*in vivo* の前脳葉ニューロンネットワークの薬理学的特性についての比較を行った。前脳葉ニューロンの興奮性の変化、興奮したニューロンの数、同期的振動活動の有無に着目して経日変化および薬理的な変化を調べることにし、「同期現象」に重要な要因を探すことにした。以上の生理学的実験により、これまでブラックボックスであった前脳葉の同期的振動ネットワークの仕組みを明らかにすることを試みた。



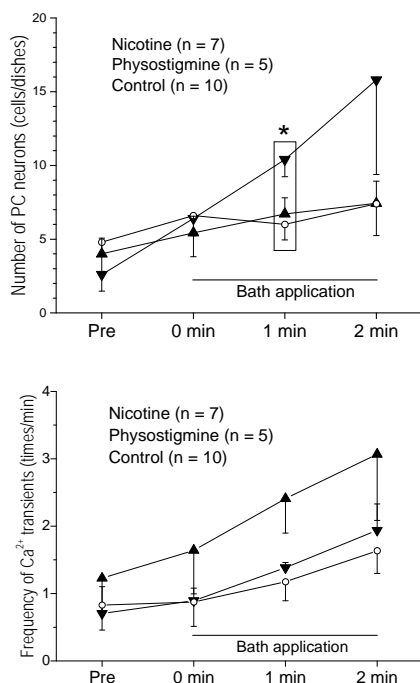
分散培養下での前脳葉ニューロン。培養1週間目以降は神経突起を伸ばしてお互いに接続している様子が観察される。

4. 研究成果

分散培養から数日間は、ほとんどの前脳葉ニューロンが神経突起を伸ばし始めるが、お互いに接続を持たないことが光学顕微鏡下にて観察された。およそ1週間後からお互いに接続していることが観察されたので、薬理的解析は培養7日目以降から行った。培養14日目、21日目にかけて、さらにネットワークが複雑になって行く様子が観察された。

分散培養下で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薬理的解析を行った。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、前脳葉培養ニューロンにおいて発生す

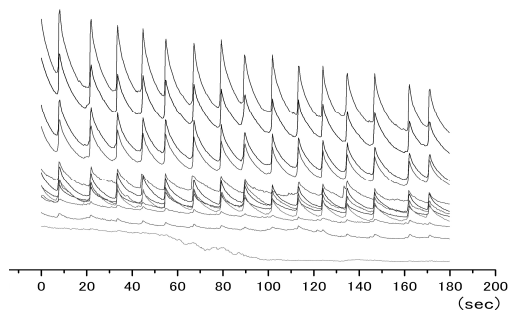
る Ca^{2+} 上昇の頻度と興奮した前脳葉ニューロンの数に注目し、薬物投与前後の変化を調べた。



興奮した前脳葉ニューロン数(上)と自発的な Ca^{2+} 上昇数(回/分)(下)の経時変化。フィズスチグミンにより、より多くのニューロンが動員されることが分かった。

結果として、グルタミン酸およびアセチルコリンだけが前脳葉ニューロンの興奮性に対して薬理学的作用をみせた。すなわち、グルタミン酸作動性ニューロンおよびアセチルコリン作動性ニューロンが *in vitro* ネットワークにおける前脳葉ニューロンの自発的活動を調節し得ることが示された (Matsuo et al. 2014)。一方で、ドーパミン、セロトニン、アドレナリン、ノルアドレナリン、オクトパミンなど多くの生体アミンは *in vitro* ネットワークにおける前脳葉ニューロンの自発的活動に影響を及ぼさなかった (Matsuo et al. 2016a,b)。このことから、*in vivo* の前脳葉ネットワーク内に存在する(内在性の)グルタミン酸とアセチルコリンが同期的振動活動の発生に直接寄与することが示唆された。そして、*in vivo* の脳内において、前脳葉ネットワークの外に存在するであろう生体アミンたちは同期的振動活動の発生自体には必須ではないこと、外からの調節因子として重要な働きをもつことが示唆された。実際、セロトニン作動性ニューロンが前脳葉外に存在し、嗅覚連合学習に重要な働きをすること (Inoue et al. 2002) とも一致する結果であった。

以上の結果の中でも、特にコリナージックシステムは同期的振動活動の発生に重要であることが分かってきた。培養 14 日目以降の十分に成熟した *in vitro* 培養ニューロンネットワークでは、コリンエステラーゼの抑制薬であるフィズスチグミンまたは受容体の存在が確認されているニコチンが、同期的振動活動を強制的に発生させることが分かった (Kobayashi 2017)。これまでの研究から、*in vivo* の前脳葉では、ニコチン性アセチルコリン受容体を介した振動調節機構が示唆されている (Matsuo et al. 2014)。前脳葉内にコリナージックニューロンおよびニコチン性受容体が見つかっていることと、*in vitro* の結果より、振動の変調だけでなく、同期的振動の駆動に関わっていることが強く示唆される。



前脳葉ニューロンの自発的な Ca^{2+} 振動と同期。コリナージックシナプスを賦活した際にしばしば観察される。

本研究課題により、嗅覚中枢における新規の神経機構が示唆された。すなわち、前脳葉ニューロンの分散培養系での解析を行なう中で、同期的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さらに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られる。以上の結果が、脳層構造で発生する同期的振動活動、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6件)

1. Ishiguro M, Kobayashi S, Matsuyama K, Nagamine T. (2018) Effects of propofol on IPSCs in CA1 and dentate gyrus cells of rat hippocampus: Propofol effects on hippocampal cells' IPSCs. *Neurosci Res*, *in press*.
2. Kobayashi S. (2017) Synchronous oscillatory network and cholinergic system in the slug olfactory center. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 46, S202-S202
3. Matsuo R, Tanaka M, Fukata R, Kobayashi S, Aonuma H, Matsuo Y. (2016a) Octopaminergic system in the central nervous system of the terrestrial slug *Limax*. *J Comp Neurol* 524, 3849-3864. (doi: 10.1002/cne.24039).
4. Matsuo R, Fukata R, Kumagai M, Kobayashi A, Kobayashi S, Matsuo Y. (2016b) Distribution of histaminergic neurons and their modulatory effects on oscillatory activity in the olfactory center of the terrestrial slug *Limax*. *J Comp Neurol* 524(1):119-35. (doi: 10.1002/cne.23829).
5. Watanabe S, Takanashi F, Ishida K, Kobayashi S, Kitamura Y, Hamasaki Y, Saito M. (2015) Nitric Oxide-Mediated Modulation of Central Network Dynamics during Olfactory Perception. *PLoS One* 10(9):e0136846. (doi: 10.1371/journal.pone.0136846).
6. 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. (doi: 10.1002/cne.23559)

〔学会発表〕(計16件)

<2017年度>

1. 第95回日本生理学会大会(高松)
2. 第88回日本動物学会(富山)
3. 19th International Union of Pure and Applied Biophysics (IUPA4B) congress (国際生物物理学会、エジンバラ、英国)

<2016年度>

4. 第94回日本生理学会大会(浜松)
5. Joint Events of 22nd ICZ & 87th ZSJ (国際動物学会、沖縄)
6. 10th FENS Forum of Neuroscience (欧州神経科学学会、コペンハーゲン、デンマーク)
7. 第8回日本生物物理学会・中四国支部大会

(高松)

<2015年度>

8. 第93回日本生理学会大会(札幌)
9. 8th FAOS (アジア・オセアニア生理学会、バンコク、タイ)
10. 第86回日本動物学会(新潟)
11. 第53回生物物理学会(金沢)
12. 13th Symposium on Invertebrate Neurobiology (国際無脊椎動物神経研究会、ティハニー、ハンガリー)

<2014年度>

13. 第92回日本生理学会大会(神戸国際会議場)
14. 9th FENS Forum of Neuroscience (欧州神経科学学会、ミラノ、イタリア)
15. 2014 ICN / JSCP (国際比較生理生化学会、札幌)
16. 第85回日本動物学会(東北大学、仙台)

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