

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04257

研究課題名(和文) 軸索起始部の形成原理と分子基盤の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of axon initial segment maturation

研究代表者

久場 博司 (Kuba, Hiroshi)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10362469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞の軸索起始部(AIS)は活動電位の発生部位であり、神経活動決定の要である。本研究では、AISが細胞毎に異なる分布を示すトリ脳幹の大細胞核において、AISの形成過程を調べることで、AIS分布の決定原理を明らかにすることを目指した。まず、発達期のNM細胞のAISを経時的に観察したところ、細胞間でのAIS分布の違いは聴覚開始後に顕著になることが分かった。一方、聴覚入力完全に欠如した培養標本ではAIS分布の違いはみられなかった。すなわち、AISの分布決定には神経活動が重要なことを明らかにした。また、神経活動依存的なAIS分布の変化には、Kチャネルの種類と量の変化を伴うことも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The axon initial segment (AIS) is a highly excitable axonal domain near the soma and involved in initiation of action potentials in neurons. In the aim of elucidating mechanisms underlying determination of AIS distribution, we examined development of AIS in avian nucleus magnocellularis (NM), which is known to show differentiation of AIS distribution along the tonotopic axis. What we found was that the differentiation of AIS started after hearing onset and completed after hatch in vivo, while the differentiation was abolished in organotypic culture, where afferent input was totally absent during development, suggesting the importance of neuronal activity in defining the distribution of AIS. We also found that the activity-dependent changes of AIS distribution accompanied rearrangement of potassium channel expression at the AIS.

研究分野：神経科学

キーワード：軸索 活動電位 ナトリウムチャネル カリウムチャネル

## 1. 研究開始当初の背景

我々の脳機能は、神経細胞が多様なシナプス入力を適切に活動電位へと変換することにより実現される。この変換は細胞体と軸索の間にある軸索起始部 (axon initial segment, AIS) と呼ばれる部位で行われ、これは AIS に Na チャネルが高密度で集積することによる。近年、AIS の分布と機能は従来考えられてきたよりもはるかに多様であり、このことが個々の神経回路の機能発現に重要なことが分かってきた。さらに、AIS の異常は様々な精神神経疾患を引き起こす。このように、AIS は神経活動決定の要であり、脳の機能や疾患に深く関わっていることから、AIS の分布・機能に関する研究は急速に進んでいる。特に、AIS の形成過程は主に初代培養の錐体細胞で調べられ、Na チャネルとの結合蛋白である ankyrinG の関与、さらにその発現を制御する分子が報告されている。しかしながら、AIS を制御するしくみ、特にその分布と機能の決定原理についてはまだ良く分かっていない。一方、AIS の分布は聴覚入力に応じて可塑的に変化することが近年明らかとなり、AIS の分布・機能の決定過程には神経活動が関わる可能性が示唆されている。

## 2. 研究の目的

以上の状況を踏まえて、本研究では、AIS の分布が神経核内の領域毎に異なることで知られるトリ脳幹の一次聴覚神経核である大細胞核 (nucleus magnocellularis, NM) を対象に、AIS の形成過程と活動依存的な再編過程を調べることにより、AIS 分布・機能の決定原理を明らかにすることを旨とした。

## 3. 研究の方法

発達期のニワトリ (胚齢 12 日から孵化後 3 日齢) より作成した急性切片標本、もしくは

切片培養標本 (胚齢 10 日に作成) を用いて、NM における AIS の発達変化を調べた。

AIS に発現する Na チャネル (Nav1.2, 1.6) と K チャネル (Kv1.1, Kv3.1, 7.2) の発現量と分布は、免疫染色により評価した。軸索上での位置の同定には、電気穿孔法による蛍光色素 (Alexa488 hydrazide) 注入、もしくは蛍光トレーサー (Dextran Tetramethylrhodamine) による逆行性標識によって NM 細胞を可視化した標本を用いた。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。

AIS の機能は、急性切片標本、もしくは切片培養標本においてパッチクランプ法により、通電に対する活動電位応答、Na 電流や K 電流を記録することで評価した。チャネルの種類と同定には薬理学的手法も用いた。

## 4. 研究成果

生体における AIS 形成過程の解析

NM では、AIS の長さが細胞の応答する音の周波数に応じて異なり、高音領域の細胞ほど短い。従って、この周波数領域特異的な AIS 分布が形成される過程を明らかにするために、発達期の NM において AIS の形態と機能の経時的な解析を行った。まず、蛍光色素により NM 細胞を可視化した標本を用いて Na チャネルの免疫染色により AIS 分布を調べた結果、周波数領域による AIS 分布の違いは、聴覚開始後の胚齢 15 日以降に出現し、孵化後にかけて顕著になることが分かった。実際、急性脳切片標本を用いて NM 細胞の Na 電流を記録したところ、発達に伴う Na 電流の増加は高音領域の細胞ほど小さく、胚齢 21 日以降に周波数領域間での有為な差がみられた。さらに、通電に対する活動電位応答においても、胚齢 21 日以降では活動電位の閾値の違いがみられ、高音領域の細胞ほど高かった。これ

らの結果から, NM における周波数領域に応じた AIS 分布の決定過程には聴覚入力に関わる可能性が示唆された。

続いて, 胚齢 2 日に聴覚原基を除去することで聴神経入力を遮断し, 胚齢 21 日の時点での AIS 分布を調べたところ, 健常群との間に大きな違いはみられなかった。一方, 孵化後に内耳除去による聴覚入力遮断を行った場合には, AIS の分布変化は減弱する。このことは, AIS の分布変化の神経活動依存性が孵化後に生じる, すなわち時期特異的である可能性を示唆する。しかしながら, 聴覚原基を除去した動物では対側の NM 細胞や周囲の神経細胞から興奮性シナプス投射が形成されるため, 神経活動が保たれている可能性も考えられる。そこで, さらに発達期の NM 細胞へ K チャネル (Kir2.1) を強制発現させることで, NM 細胞の静止膜電位を過分極させ, 神経活動を抑制することを試みた。具体的には, Kir2.1 を synapsin プロモーター下に発現するプラスミドを胚齢 2 日の動物の神経管へガラス電極により注入し, *in ovo* 電気穿孔法による遺伝子導入を行った。その結果, 高音領域の NM 細胞への Kir2.1 遺伝子の発現を確認することはできたものの, 胚齢 21 日の時点での AIS 分布に変化はみられなかった。今後, パッチクランプ法による Kir2.1 発現時の膜電位の計測, より発現効率が高い CMV プロモーターや Tet-Off 制御下で Kir2.1 を発現するコンストラクトの効果検証を含めて, 検討を続けていく予定である。

#### 培養標本における AIS 形成過程の解析

AIS の分布変化の分子機構を効率的に解析するために, 培養実験系の確立を目指した。特に AIS は細胞接着因子を介して周囲の細胞外基質と結合しているため, 細胞外環境が比較的保たれている切片培養標本を作成した。

様々な培養条件を検討した結果, NM 細胞の生存率と AIS の形成率が非常に高い標本を得ることができた。この切片培養標本の NM 細胞では, 発火や膜電流の特性は生体内でみられるものと同様であり, さらに約 20Hz の自発神経活動がみられた。この神経活動はグルタミン酸受容体の阻害剤である DNQX で阻害されることから, 興奮性のシナプス入力により生じていると考えられた。興味深いことに, 自発神経活動と AIS 分布に周波数領域による違いはみられなかった。このことは, AIS 分布の決定には, 神経活動が重要であることを示している。そこで, さらにこの自発神経活動を減弱もしくは増強することの効果について検討した。その結果, 高音領域の細胞では, Na チャネル阻害剤 (TTX) やグルタミン酸受容体阻害剤 (DNQX) により神経活動を抑制することで, AIS の分布が延長した。このことは, AIS の分布変化が NM 細胞での脱分極 (シナプス電位, 活動電位) の消失により生じる可能性を示している。一方, 高濃度 K イオン溶液により神経活動を軽度増加させた場合には, AIS の分布に変化はみられなかった。しかしながら, K チャネル阻害剤 (4AP, Dendrotoxin) により K 電流を阻害した場合には, AIS の短縮が認められた。このことから, K チャネルは神経活動依存的な発現変化を示すことで, 神経活動変化の効果を軽減させている可能性が示唆された。

#### K チャネルの活動依存的な発現変化の解析

上記結果を踏まえて, AIS における K チャネルの神経活動依存的な発現変化について, さらに電位固定法による解析を行った。まず, NM 細胞の AIS では入力遮断に伴って Kv1 が減少し, Kv7 は増加することを免疫染色により明らかにした。次に, 各 K チャネル成分の電流をパッチクランプ法により記録し, 入力遮

断が Kv1 を介した電流成分を減少させるのに対して, Kv7 を介した電流成分は増加させることを明らかにした. さらに, 入力遮断の膜興奮性に対する効果について調べ, 以下のことを明らかにした. (1) 入力遮断後の NM 細胞では活動電位の閾値が低下し, 膜興奮性が増加する. (2) 入力遮断後の NM 細胞でみられる自発神経活動の頻度は, Kv7 を活性化させると減少し, Kv7 を阻害すると増大する. (3) 二光子レーザー顕微鏡観察下に AIS への薬剤の局所投与を行なうと, Kv7 の阻害剤は入力遮断後の細胞でのみ活動電位の閾値を低下させるのに対して, Kv1 の阻害剤は入力遮断前の細胞でのみ閾値を低下させる. Kv1 は活性化の閾値が低く, 速度も速いため, Kv7 に比べて活動電位の発生を抑える効果が強い. つまり, これらの結果は, 入力遮断時に NM 細胞が AIS での K チャネルを Kv1 から Kv7 に変化させることで膜興奮性を高めていることを示している. さらに, コンピューターモデルによる解析を行った結果, これら K チャネルの相補的な発現変化は, AIS の静止膜電位を維持しつつ, AIS の延長と協調することで効果的に興奮性を高めるしくみとして働くことを明らかにした.

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Fukaya R, Yamada R, [Kuba H](#)  
Tonotopic Variation of the T-Type Ca<sup>2+</sup> Current in Avian Auditory Coincidence Detector Neurons.  
J. Neurosci. 38:335-346 (2018). (査読有り)
2. Akter N, Adachi R, Kato A, Fukaya R, [Kuba H](#)  
Auditory input shapes tonotopic differentiation of Kv1.1 expression in

avian cochlear nucleus during late development.

J. Neurosci. 38:2967-2980 (2018). (査読有り)

3. Susuki K, [Kuba H](#)  
Activity-dependent regulation of excitable axonal domains.  
J. Physiol. Sci. 66, 99-104 (2016). (査読有り)

4. Yamada R, [Kuba H](#)  
Structural and Functional Plasticity at the Axon Initial Segment.  
Front. Cell Neurosci. 10:250 (2016). (査読有り)

5. [Kuba H](#), Yamada R, Ishiguro G, Adachi R  
Redistribution of Kv1 and Kv7 enhances neuronal excitability during structural axon initial segment plasticity.  
Nat. Commun. 6:8815 (2015). (査読有り)

6. Adachi R, Yamada R, [Kuba H](#)  
Plasticity of the axonal trigger zone.  
Neuroscientist 21, 255-265 (2015). (査読有り)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. [Kuba H](#)  
Roles of auditory input in tonotopic differentiation of Kv1.1 expression in avian nucleus magnocellularis  
ARO 2018 MidWinter Meeting (San Diego)  
2018 年 2 月 12 日

2. [久場博司](#)  
音源定位の神経回路機構

第 95 回に本生理学会大会（高松）

2018 年 3 月 30 日

3. Kuba H

Tonotopic differentiation of dendritic computation in sound localization circuit  
The 48th NIPS International Symposium (Okazaki)

2017 年 11 月 2 日

4. 久場博司

中枢聴覚神経回路の恒常性維持機構

第 93 回日本生理学会大会（札幌）

2016 年 3 月 24 日

5. 久場博司

中枢聴覚神経細胞における興奮性軸索ドメインの最適化機構

第 38 回日本神経科学大会（横浜）

2016 年 7 月 21 日

6. 久場博司

軸索起始部における K チャネル発現の恒常的制御

第 38 回日本神経科学大会（神戸）

2015 年 7 月 28 日

7. Kuba H

Switching of Kv channels enhances neuronal excitability during structural plasticity at the axon initial segment

Central Axon Workshop 2015 (Bersheva)

2015 年 11 月 2 日

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

なし

取得状況（計 0 件）

なし

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/1710/1712/saibouseirigaku\\_bunshidoutaigaku.html](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・医学系研究科・教授

研究者番号：10362469

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

