

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06788

研究課題名(和文)ランビエ絞輪に局在するグルタミン酸受容体による活動電位伝播制御

研究課題名(英文) Action potential regulation at the node of Ranvier and perineuronal nets' regulation of GABAergic transmission in the deep cerebellar nuclei

研究代表者

廣野 守俊 (Hirono, Moritoshi)

同志社大学・研究開発推進機構・准教授

研究者番号：30318836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳神経活動では活動電位が忠実性を保ちながら伝播する必要がある。パラノードに発現するBKチャネルはこの忠実性に寄与し、T型Ca²⁺チャネルを介して流入するCa²⁺によって活性化されることが示唆された。高頻度発火する小脳プルキンエ細胞の出力先である小脳核ニューロンはペリニューロナルネット(PNN)を形成する。このPNNを除去するとGABA放出が促進し、瞬目反射条件付け遅延課題の学習効率が高くなることが分かった。成熟に伴って構築される小脳核ニューロンのPNNは、プルキンエ細胞からのGABA放出を低下させ、新たな小脳運動学習を制限し、既に獲得されている記憶の維持に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Regulation of axonal action potentials (APs) by K⁺ channels is important in the CNS. Application of BK channel blockers and T-type Ca²⁺ channel blockers to axons of cerebellar Purkinje cells (PCs) increased the failure rate of antidromic APs, suggesting that paranodal BK channels support high-fidelity firing at the node of Ranvier. Perineuronal nets (PNNs) are the extracellular matrix of neurons and are found around large neurons in the deep cerebellar nuclei (DCN). Enzymatic PNN depletion of DCN neurons reduced the paired-pulse ratio of inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) and increased the miniature IPSC frequency without changing the amplitude, suggesting that PNN depletion enhances GABA release from presynaptic terminals. Mice having received the enzyme in the interpositus nuclei exhibited a higher conditioned response rate in delay eyeblink conditioning than control mice, suggesting that PNNs suppress GABAergic transmission and impede motor learning in the adult cerebellum.

研究分野：神経薬理

キーワード：活動電位 ネット パラノード BKチャネル プルキンエ細胞 小脳核 細胞外マトリックス ペリニューロナルネット 瞬目反射条件づけ

1. 研究開始当初の背景

有髄神経の軸索はその大部分がミエリン鞘で絶縁されており、活動電位はミエリン鞘が途切れたランビエ絞輪を跳び跳びに伝播する跳躍伝導という現象によって高速に神経終末へ伝わる。したがってランビエ絞輪の正常な形成と生理機能は我々の脳神経活動において不可欠である。脱髄性疾患の多発性硬化症のニューロンでは活動電位の伝播が忠実性を失ってしまう。また運動協調にかかわる小脳プルキンエ細胞(PC)は高頻度(～100 Hz)で同期発火して小脳核(DCN)ニューロンの発火パターンを制御するが、脱髄が生じると小脳性運動失調が生じる。

(1)ランビエ絞輪には種々のチャンネルが局在し、我々はPCの有髄軸索のランビエ絞輪近傍(パラノード)にCa²⁺依存性カリウムチャンネル(BKチャンネル)が発現し、このチャンネルが高頻度発火の活動電位伝播に寄与することを明らかにした。パラノードにおけるBKチャンネルの活性化にはランビエ絞輪付近のCa²⁺濃度上昇が必要であるが、その供給源は不明である。

(2)ランビエ絞輪のチャンネルの局在には細胞外マトリックスが関与し、PCの標的ニューロンはペリニューロナルネット(PNN)とよばれる細胞外マトリックスを成熟に伴って形成することが知られている。PNNは臨界期の形成や記憶の長期的な維持にかかわることが知られている。またPNNは統合失調症の脳では低形成であり脳梗塞や脊髄損傷からの回復過程ではその成分が阻害作用を示すため、精神神経疾患にかかわる重要な構造物と考えられている。しかしPNNがPC-DCNニューロン間のGABAシナプス伝達を如何に修飾して小脳運動学習を制御するかは分かっていない。

2. 研究の目的

(1)PCのランビエ絞輪付近のCa²⁺濃度上昇の供給源を明らかにする。特にその付近に発現すると推測される電位依存性Ca²⁺チャンネル(VDCC)やグルタミン酸受容体を同定し、その膜タンパク質の活性化が活動電位伝播の忠実性を如何に制御するのかを明らかにする。

(2)DCNニューロンに形成されるPNNがPC-DCNニューロン間のGABAシナプス伝達をどのように修飾して小脳運動学習を如何に制御するか明らかにする。

3. 研究の方法

(1)3～4週齢のマウスから急性の小脳切片を作製し、PCからホールセル電流固定法により逆行性活動電位を記録し、VDCCやグルタミン酸受容体の種々の阻害薬、アンタゴニスト、アゴニストをランビエ絞輪へ局所投与する。逆行性活動電位

の波形変化や高頻度発火伝播への作用を検証し、ランビエ絞輪あるいはその周囲で働く膜タンパク質を同定する。さらに軸索パッチ法を適用してより生理的な順行性活動電位や登上線維刺激により生じる複雑スパイクを遠位の軸索より記録する。ランビエ絞輪の膜タンパク質の活性化・不活性化がこれらのスパイクを如何に制御するのかを解明する。

(2)3～4週齢のマウスから急性の小脳切片を作製し、PNNの分解酵素であるコンドロイチナーゼABC(ChABC)で3時間以上処理して、PNN除去した脳切片とコントロール脳切片においてGABAシナプス伝達を比較する。DCNニューロンにホールセル電位固定法を適用し、PCの軸索が含まれる白質を電気刺激して誘発性抑制性シナプス後電流(IPSC)を記録する。また微小IPSCを記録してその振幅や頻度を比較する。次にDCNニューロンへの感覚入力は苔状線維が仲介し、苔状線維DCNニューロン間のシナプス伝達の長期増強が小脳運動学習の基礎メカニズムの一つと示唆され、このシナプス可塑性の形成にはDCNニューロンの過分極後に発火するrebound firingが必要であると考えられている。そこでDCNニューロンのrebound firingをPCの軸索刺激によって惹起し、その発火頻度を比較する。さらに小脳中位核にChABCを注入してPNNを除去したマウスに遅延課題の瞬目反射条件づけを行い、生食を注入したコントロールマウスに対して学習曲線を比較する。ここではマウスの瞬きを高速カメラで撮影する瞬目反射条件づけ装置を構築して条件づけを行う。

4. 研究成果

(1)軸索起始部ではT型Ca²⁺チャンネルの活性化が活動電位の発生を制御することが知られている。したがってパラノードにおいてもT型を含むVDCCの活性化がかかわる可能性が示唆されている。そこでPCから逆行性活動電位を記録しながら、阻害剤であるニッケルを局所投与すると高頻度刺激下での活動電位の欠失頻度(failure rate)が上昇した。さらにニッケル以外の阻害剤ML218を局所投与したところ、failure rateが上昇した。ゆえにT型Ca²⁺チャンネルの寄与が確定した。したがってT型のVDCCを介して流入したCa²⁺によってBKチャンネルは活性化されることが明らかとなった。より生理的な活動電位を測定するため順行性活動電位をPCの軸索から軸索パッチにより記録することを試みた。しかし、PCの細胞体にホールセルパッチして蛍光色素を注入して軸索の長さを観察することは実験効率が悪く、安定した軸索パッチの成功率向上は困難であった。

ランビエ絞輪付近のCa²⁺濃度上昇にはグルタミン酸受容体の関与が挙げられる。何故なら、海馬CA3錐体細胞の無髄軸索においてAMPA型受容体活性化が活動電位の波形を調

整することが報告されているからである。そこでPCから逆行性活動電位を記録しながらランビエ絞輪付近のAMPA型受容体の関与を調べようとした。しかしこの実験系では既にAMPA型受容体の阻害剤が処理されているため、AMPA型受容体の逆行性活動電位への寄与を明らかにすることは不可能であった。NMDA受容体についても同様な問題が生じた。したがってPCの軸索から軸索パッチを行い、順行性活動電位を安定して記録することが求められる。また1型の代謝調節型グルタミン酸受容体(mGluR1)の寄与も考慮されるため、このアゴニストやアンタゴニストを使用した実験を継続している。我々はPC軸索のランビエ絞輪にNMDA受容体が局在する証拠を既に得ている。また小脳プルキンエ細胞の軸索や坐骨神経のランビエ絞輪にはIP₃受容体が発現することから、mGluRが活動電位の跳躍伝導にかかわることが推測されることから、この可能性を明らかにすることが求められる。

(2) ChABC 処理した小脳切片では、DCN ニューロンの誘発性 IPSC の振幅は増大し、2 発刺激による電流振幅の paired pulse ratio が小さくなった。さらに 100 Hz の頻回刺激を与えると IPSC の振幅の抑圧が大きくなった。また微小 IPSC の頻度が振幅の変化無く上昇したことから、PNN 除去はプレシナプスからの GABA 放出を促進することが分かった。PC の軸索刺激によって惹起される IPSP の過分極で誘導される rebound firing の発火頻度を測定したところ、ChABC 処理した DCN ニューロンでは rebound firing の頻度上昇が有意に増大した。したがって成体の小脳は PNN 除去によって神経可塑性が生じやすくなり、幼若期のような柔軟性を回復することが示唆された。

次に小脳中位核に ChABC を注入して PNN を除去したマウスに対して遅延課題の瞬目反射条件づけを行った。小脳中位核から PNN を除去したマウスはコントロールマウスに比べて高い学習効率を示すことが分かった。以上の結果から、成熟に伴って DCN ニューロンに構築される PNN は、PC からの GABA 放出を低下させ、新たな小脳運動学習を制限し、既に獲得されている記憶の維持に貢献するものと考えられる。

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 4 件)

- 1) Hirono M, Watanabe S, Karube F, Fujiyama F, Kawahara S, Nagao S, Yanagawa Y, Misonou H (2018) Perineuronal nets in the deep cerebellar nuclei regulate GABAergic transmission and delay eyeblink

conditioning. J Neurosci, 印刷中。(査読有)
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3238-17.2018.

- 2) Hirono M, Nagao S, Yanagawa Y, Konishi S (2017) Monoaminergic modulation of GABAergic transmission onto cerebellar globular cells. Neuropharmacology 11, 79-89. (査読有)
DOI: 10.1016/j.neuropharm.2017.03.011.
- 3) Watanabe S, Hirono M (2016) Phase-dependent modulation of oscillatory phase and synchrony by long-lasting depolarizing inputs in central neurons. eNeuro 3(5), 1-15. (査読有)
DOI:10.1523/ENEURO.0066-16.2016
- 4) Hirono M, Ogawa Y, Misono K, Zollinger DR, Trimmer JS, Rasband MN, Misonou H (2015) BK channels localize to the paranodal junction and regulate action potentials in myelinated axons of cerebellar Purkinje cells. J Neurosci 35, 7082-7094. (査読有)
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3778-14.2015.

〔学会発表〕(計 5 件)

- 1) 廣野守俊、渡辺恵、川原茂敬、永雄総一、柳川右千夫、御園生裕明、小脳核ニューロンのペリニューロナルネットによる GABA シナプス伝達修飾と瞬目反射条件づけ制御、第 40 回日本神経科学大会、2017.7.22、幕張メッセ(千葉県)
- 2) 廣野守俊、渡辺恵、川原茂敬、永雄総一、柳川右千夫、御園生裕明、小脳核神経細胞周囲網による GABA シナプス伝達修飾と運動学習制御、2017.3.30、第 94 回日本生理学会大会、アクトシティ浜松(静岡県)
- 3) 廣野守俊、渡辺恵、川原茂敬、永雄総一、柳川右千夫、御園生裕明、神経細胞周囲網による小脳核抑制性 GABA シナプス伝達の制御、第 93 回日本生理学会大会、2016.3.23、札幌コンベンションセンター(北海道)
- 4) 廣野守俊、御園生裕明、ランビエ絞輪近傍の BK チャネルは軸索の高頻度発火を制御する、第 53 回日本生物物理学会年会、2015.9.15、金沢大学角間キャンパス(石川県)
- 5) 廣野守俊、小川泰弘、御園生香、Zollinger R Daniel, Trimmer S James, Rasband N Matthew, 御園生裕明、パラノードの BK チャネルによる活動電位伝播の制御、第 38 回日本神経科学大会、2015.7.28、神戸国際会議場・神戸国際展示場(兵庫県)

〔図書〕(計 1件)

- 1) Hirono M, Springer, Essentials of cerebellum and cerebellar disorders. A primer for graduate students, Chapter 25 “Lugaro Cells”, 2016, 656 (207-211)
DOI: 10.1007/978-3-319-24551-5

〔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

https://researchmap.jp/m_hirono/

6. 研究組織

(1)研究代表者

廣野 守俊 (HIRONO, Moritoshi)
同志社大学・研究開発推進機構・准教授
研究者番号：30318836

(3)連携研究者

御園生 裕明 (MISONOU, Hiroaki)
同志社大学・脳科学研究科・教授
研究者番号：40609509

渡辺 祥司 (WATANABE, Shoji)
同志社大学・研究開発推進機構・助教
研究者番号：80462745

柳川 右千夫 (YANAGAWA, Yuchio)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90202366

平井 宏和 (HIRAI, Hirokazu)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70291086