

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02541

研究課題名(和文) 中枢聴覚回路の周波数域依存的な機能分化機構の解明

研究課題名(英文) Tonotopic differentiations in central auditory circuit

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ニワトリの蝸牛神経核では、シナプスや神経細胞の特性が周波数域毎に機能分化することで正確な時間情報処理が可能となる。本研究では、この周波数域依存的な機能分化の詳細と形成機構を明らかにすることを目指した。まず、抑制性シナプス入力の特性について調べ、その数やサイズが周波数域毎に異なり、このことが幅広い周波数域と音圧域での情報処理の実現に重要なことを明らかにした。次に、NaチャンネルやKチャンネルの発達過程を調べ、神経活動依存的なチャンネル発現の制御機構の効率が、特に高音域で高いことを示した。すなわち、聴覚回路の機能分化には、神経細胞の遺伝的性質と聴覚経験の両者の連関が重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

音の時間情報を幅広い周波数域で正確に処理することは、聴覚の機能発現に不可欠である。本研究では、この幅広い周波数域での正確な聴覚情報処理の神経回路基盤を明らかにするとともに、その形成過程における細胞特性と聴覚入力の連関の重要性について示した。これらの知見は、中枢聴覚回路の機能最適化という観点から今後の難聴治療戦略に新たな可能性を提示するだけでなく、様々な感覚系でみられる活動依存的な回路成熟、さらには脳部位特異的な回路成熟の仕組みを理解する上でも重要な示唆を与えると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Avian nucleus magnocellularis is a homologue of mammalian anteroventral cochlear nucleus, and represents temporal information of sound with great precision. This precision is accomplished by tonotopic specializations in synaptic and postsynaptic properties. To achieve better understanding on these specializations, we first examined properties of inhibitory synapses, and found that they were differentiated in number and size along the tonotopic axis, ensuring precise and reliable signal processing across frequencies and intensities. We next examined expressions of Nav and Kv channels during development, and found that their expressions were strongly accelerated via auditory input specifically in neurons tuned to higher-frequency sound. This occurred because the activity-dependent mechanism was more efficient in the neurons, proposing a concept that both neuronal tonotopic identity and pattern of afferent input are critical for the tonotopic specializations.

研究分野：神経生理

キーワード：聴覚 神経回路 神経活動

## 1. 研究開始当初の背景

我々は音に含まれる時間、強さ、周波数などの情報を正確に聞き分けることで、周囲の状況を知ることや、会話や音楽を楽しむことができる。特に音の時間情報は、これら聴覚機能の発現に重要であり、脳ではマイクロ秒レベルの処理が行われる。音の時間情報は、脳の聴覚回路で神経活動のタイミングとして表される。これは聴神経が音の特定の位相に一致して活動電位を生じることによる。さらに、音の時間情報は周波数毎に異なる神経細胞で処理され、これは聴覚回路に周波数局在構造があり、個々の細胞が細胞固有の周波数(特徴周波数、CF)に応答するためである。音の周期は周波数によって異なり、低音ほど長い。このため、聴神経での時間情報の精度は低音ほど低い、すなわち神経活動の時間揺らぎは大きい。これに対して、脳では聴神経に比べて、周波数間での時間情報精度の違いは小さく、このことは、脳の聴覚回路に時間精度の違いを補正するしくみがあることを示している。鳥類の大細胞核(NM)は哺乳類の蝸牛神経核に相当する一次聴覚中枢であり、聴神経からの入力に正確に応答することで、音の時間情報伝達に関わる。NMでは興奮性シナプス投射の数やサイズと、イオンチャネルの発現量や細胞内局在がCF域毎に異なり、このことによりCF域間での時間精度の違いが補正され、幅広い周波数帯域での時間情報処理が可能になる。しかしながら、NMの各CF域の細胞がCF域に応じた機能特性を獲得する仕組みについては理解が進んでいなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、発達期のニワトリ NM を対象に、CF 域に応じた機能分化の詳細と形成過程を明らかにすることで、聴覚回路が正確な情報処理機能を獲得する原理を理解することを目指した。

## 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、各 CF 域における NM 細胞の機能特性を調べた。NM 細胞の機能特性は、パッチクランプ法を用いて、通電に対する活動電位応答、Na 電流や K 電流、及び抑制性シナプス電流を記録することにより評価した。Na チャネルと K チャネルの発現量と分布は、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注入、もしくは蛍光トレーサーを用いた逆行性標識により NM 細胞を可視化した標本を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 抑制性入力の機能分化

NM 細胞は、聴神経から興奮性投射と多シナプス性のフィードフォワード抑制性投射を受ける。興奮性入力には CF 域毎に異なる刺激強度依存性をもつことが知られている。しかしながら、抑制性入力の刺激強度依存性については明らかでなかった。従って、この興奮・抑制回路が保存された厚さ約 2mm の急性切片標本を開発し、ブラインド・パッチクランプ記録法を用いて、聴神経刺激に対する神経活動応答と興奮性と抑制性のシナプス電流の刺激強度依存性について解析を行った。高 CF 域では抑制性入力に比べて遥かに高い閾値をもち、刺激強度の増加に伴って活動応答が容易に飽和するため、応答域が狭くなる。こ

れに対して、低 CF 域では抑制性入力と興奮性入力の閾値が近く、両者が刺激強度に応じて段階的に変化することで活動応答の飽和を防いでおり、このことにより幅広い応答域が実現されている。すなわち、NM では、興奮性と抑制性のシナプス強度が周波数域毎に最適化されることで、様々な周波数と強さの音に対する情報処理が実現されていることを明らかにした。

### ( 2 ) 活動依存的な Na チャネルの発現制御

NMではAISにおけるNaチャネルの分布がCFに応じて異なり、高CF域の細胞ほど短い。従って、このCF域特異的なNaチャネル分布が形成過程を明らかにするために、各CF域でのNaチャネルの分布とNa電流、さらに活動電位の発達変化を解析した。蛍光色素によりNM細胞の軸索を可視化した標本を用いてpan Navの免疫染色により分布を調べた結果、Naチャネルの軸索分布はいずれの領域においても聴覚開始期以降である胚齢15日から孵化後3日にかけて短縮した。しかしながら、その程度は高CF域ほど大きく、このことにより周波数域による違いが生じた。このことと一致して、急性切片標本を用いて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CF域の細胞ほど小さく、胚齢21日以降にCF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CF域の細胞ほど高かった。また、本研究ではSTED顕微鏡によるAISの骨格構造の観察も行った結果、AIS骨格の周期構造は発達過程で変化しないことを見出した。このことから、Navチャネルの分布変化はAIS遠位端の構造再編によることを明らかにした。Naチャネルの分布変化には、聴覚入力に関与する可能性が考えられる。従って、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日でのNaチャネル分布を調べたところ、健常群と比べて僅かな延長は見られたものの、大きな違いはみられなかった。一方、孵化後に内耳除去を行うことで聴神経入力を遮断した場合には、Naチャネル分布は健常群と比べて大きく延長した。このことから、Naチャネルの分布変化の神経活動依存性は孵化後に生じる、すなわち時期特異的である可能性が示唆された。

NMを含む切片培養標本では高K液刺激(10.6 mM、3日間)を行うことにより、高CF域で観察されるNaチャネルの活動依存的な分布変化を再現することができる。これまでに、この過程には神経活動に伴う細胞内Ca濃度の上昇が関わることを明らかにした。従って、本研究ではこの切片培養標本を用いて、Ca下流の細胞内シグナル経路についても検討を行った。高K液刺激によるAIS短縮に対する種々の阻害剤の効果を検討したところ、アデニル酸シクラーゼ(DDA, SQ22536)、PKA(KT5720)、MEK(U0126, PD98059, AZD6422)、cdk5(Roscovitine)の阻害剤により短縮が阻害された。これに対して、アデニル酸シクラーゼの活性化剤(FSK)や膜透過型cAMP誘導體(8-br-cAMP)は、高K液刺激と同様のAIS短縮を生じた。これらの結果から、活動依存的なAISの短縮にはcAMPを起点としたシグナル経路が関与することを明らかにした。

### ( 3 ) 活動依存的なKチャネルの発現制御

NMではKチャネル(Kv1.1)の発現量もCFに応じて異なり、高CF域の細胞ほど高い。このCF域に応じたKv1.1発現量の違いは、孵化前後におけるKv1.1の発現増加が高CF域で顕著なことによる。さらに、上述の切片培養標本では高K液刺激(10.6 mM、3日間)を行うことにより、この高CF域でのKv1.1の発現増加が再現される。興味深いことに、高K液刺激によりNM細胞の細胞内Ca濃度はCF域によらず同様に上昇する。これらの知見は、Kv1.1発現の細胞内Ca濃度

依存性が細胞毎に異なり、このことがCF域に応じた聴覚入力依存的なKv1.1発現の違いに関わる可能性を示唆する。従って、この高CF域の細胞でのKv1.1の発現増加に対する種々の阻害薬の効果を検討した結果、アデニル酸シクラーゼの阻害剤 (DDA、SQ22536) で阻害されることを見出した。さらに、このKv1.1の発現増加はアデニル酸シクラーゼの活性化剤 (FSK)、膜透過型cAMP誘導体 (8-br-cAMP、DB-cAMP) 及びホスホジエステラーゼの阻害剤 (IBMX) により再現された。すなわち、この発現増加には細胞内cAMPの上昇が関わることを示唆された。一方、FSK、8-br-cAMP、IBMXのいずれも低CF域の細胞でのKv1.1発現に影響しなかったことから、CF域に応じた細胞内Ca濃度依存性の違いはcAMPよりも下流のシグナル経路の違いによると考えられた。

#### (4) 発達期の遺伝子発現解析

上述のように NM におけるチャネル分布制御の活動依存性には CF 域特異性がある。従って、この活動依存性を決定づける分子の特定、さらにその分子機構を明らかにするために、各 CF 域の NM 組織から mRNA を抽出し、その発現プロファイルを RNA-seq により比較解析することを行った。その結果、CF 域間で異なる分子として、E15 では 245 個、E21 では 284 個、P3 では 321 個を抽出することができた。今後は、ノックアウト・スクリーニングによる分子のさらなる絞り込みを行う予定であり、そのために in-ovo 電気穿孔法と CRISPR Cas9 を組み合わせたノックアウトの実験系を構築した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Adachi Ryota, Yamada Rei, Kuba Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Tonotopic Differentiation of Coupling between Ca2+ and Kv1.1 Expression in Brainstem Auditory Circuit	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 199 ~ 213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.02.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 久場博司	4. 巻 90
2. 論文標題 軸索起始部の構造と機能による神経興奮性の制御	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 69 ~ 74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 久場 博司	4. 巻 70
2. 論文標題 軸索コンパートメントの構造可塑性と聴覚チューニング	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 19 ~ 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.2425200940	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nargis Akter, Ryota Fukaya, Ryota Adachi, Hiroshi Kawabe, Hiroshi Kuba	4. 巻 40
2. 論文標題 Structural and functional refinement of the axon initial segment in avian cochlear nucleus during development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 6709-6721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.3068-19.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Al-Yaari Mohammed, Yamada Rei, Kuba Hiroshi	4. 巻 40
2. 論文標題 Excitatory-Inhibitory Synaptic Coupling in Avian Nucleus Magnocellularis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 619 ~ 631
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.1124-19.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kuba H
2. 発表標題 Tuning of excitable axonal domains in central auditory neurons
3. 学会等名 Axon in the hills (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kuba H
2. 発表標題 Activity-dependent tuning of Kv1.1 expression in brainstem auditory circuit
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会 (神戸) (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kuba H
2. 発表標題 Activity-dependent regulation of ion channel expression in developing auditory circuits
3. 学会等名 ENP days (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久場博司
2. 発表標題 脳幹聴覚神経回路におけるイオンチャネルの発現制御機構
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久場博司
2. 発表標題 音源定位回路における樹状突起とシナプス分布の機能連関
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関