

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2007～2008

課題番号：19680021

研究課題名（和文） 活動電位の発生部位が聴覚情報処理に果たす役割の解明

研究課題名（英文） Roles of spike initiation site in auditory signal processing

研究代表者 久場 博司（KUBA HIROSHI）

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：10362469

研究成果の概要：

神経細胞はシナプス入力を活動電位に変換することにより、情報を符号化する。しかしながら、活動電位が神経細胞のどこで発生するのか、さらにその部位が神経細胞の情報処理にどのような意味をもつのかについては明らかでない。トリの大細胞核（NM）は音の時間情報処理に関わる。NMには周波数局在があり、聴覚情報は特徴周波数（CF）領域毎に処理される。さらに、NMではシナプス入力の数とサイズがCFに応じて異なり、低いCFの細胞ほど多数の小さな入力を受ける。従って本研究では、NMにおいて活動電位の発生部位をCF領域毎に調べ、その聴覚情報処理に果たす役割を検討した。

初年度には、電気生理学的手法と組織形態学的手法を用いて、NM細胞における活動電位の発生部位が細胞体近傍の軸索起始部であることを示し、さらにそこでのNaチャンネルの発現量が低いCF領域ほど高いことを明らかにした。次年度には、コンピューターシミュレーションにより、その機能的意義を検討した。その結果、低いCF領域の細胞においてNaチャンネルの発現量が高いことは、多数の小さな入力が増加する際に生じるNaチャンネルの不活性化の影響を減少させることにより正確な時間情報処理を行う上で重要な役割を果たすことを明らかにした。さらに以上の結果から、神経細胞では活動電位の発生部位とそこでのイオンチャンネル発現がシナプス入力に応じて細胞毎に精巧に調節されることにより、細胞機能が最適化されていることを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	15,600,000	4,680,000	20,280,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	17,000,000	5,100,000	22,100,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学，神経・筋肉生理学

キーワード：軸索

1. 研究開始当初の背景

神経細胞はシナプス入力を活動電位に変換することにより，情報を符号化する．従って，我々の複雑な脳機能が発現するしくみを理解する上では，神経細胞において活動電位が発生する過程を明らかにする必要がある．活動電位が軸索上のどこで発生するかについては，これまで脊髄前角細胞や大脳皮質錐体細胞，小脳プルキンエ細胞を中心に研究が進められてきたが，その正確な部位については未だ議論が分かれている．一方，他の神経細胞での活動電位の発生部位については殆ど調べられておらず，さらにその発生部位が神経細胞の情報処理や機能発現にどのように関わるのか？という問題については全く解明されていない．

以前申請者は，両耳に到達する音の時間差を検出することにより音源定位に関わる神経核（層状核）において，活動電位の振幅が特徴周波数（characteristic frequency, CF）領域毎に異なり，これが軸索におけるNaチャンネル分布の違いに起因することが報告した．このことから軸索における活動電位の発生部位は，細胞の機能や処理する情報に応じて異なる可能性が示唆される．つまり，活動電位の発生過程には従来考えられているよりもはるかに精巧なしくみが存在すると考えられる．

トリの蝸牛神経核（大細胞核，nucleus magnocellularis, NM）の神経細胞は入力に対して正確なタイミングで発火することにより音の時間情報を抽出する．また，NMには周波数局在があり，聴覚情報はCF毎の細

胞に処理される．近年，NM細胞はCF毎に機能分化し，活動電位の振幅にも違いがあることが報告されている．従って，NMでは活動電位の発生部位がCFに応じて異なり，その違いが各CF領域における聴覚情報処理に重要な役割を果たしている可能性が考えられる．従って，本研究ではこの仮説を検証した．

2. 研究の目的

脳幹の聴覚神経核（NM）において活動電位が軸索のどこで発生するのかをCF領域毎に明らかにする．さらに，活動電位の発生部位が神経活動に及ぼす効果を調べることにより，聴覚情報（時間，周波数）処理における活動電位発生部位の役割を明らかにする．得られた知見をもとに，活動電位の発生部位が神経細胞の情報処理に果たす役割についての基本的な概念を確立する．

3. 研究の方法

A. 免疫組織学的解析

まず，Naチャンネルに対する抗体（pan Nav, Nav1.6）を用いた免疫染色により，ヒヨコのNM細胞におけるNaチャンネルの局在をCF領域毎に調べた．特に，細胞内局在を正確に評価するために，麻酔下のヒヨコにおいてNMの投射先の神経核（層状核）に蛍光トレーサー（Dextran Alexa）を脳定位的に注入することにより，逆行性にNM細胞を可視化した標本を用いて免疫染色を行った．注入部位の同定は，両耳への音提示下に電場電位を記録することにより行った．軸索においてNaチャンネルとKチャンネルは

軸索起始部で共存するのに対して, Ranvier 絞輪では共存しないことが知られている. 従って, 上記の手法と K チャネル (Kv1.1 と Kv1.2) の免疫染色を組み合わせることにより, 活動電位発生部位の構造的基盤を検討した.

B. 電気生理学的解析

ヒヨコの脳切片標本を作成し, 各 CF 領域の NM 細胞の細胞体からホールセル記録を行った. 電流固定下に基本的な膜特性を記録するとともに, 順行性の活動電位 (シナプス刺激, 細胞体通電による) および逆行性の活動電位 (軸索刺激による) を記録した. 特に, 逆行性の活動電位に対する細胞体の脱分極の効果から, 軸索における活動電位発生部位の細胞体からの距離を検討した. さらに, 細胞体からのホールセルおよびセルアタッチ下に Na 電流を記録することにより, Na チャネルの細胞内局在を電気生理学的に検討した. また, Na 電流の活性化と不活性化の電位依存性や時間経過を記録することにより, Na チャネルの種類を検討した.

C. 計算論的解析

組織形態学および電気生理学的実験により得られた知見をもとに, Web 上に公開されている計算ソフト NEURON で NM 細胞の理論モデルを構築し, 軸索での Na チャネル局在がそれぞれの細胞の情報処理に果たす役割について検討した. 具体的には, Na チャネル局在部位の長さ, 細胞体からの距離, さらにチャネル密度を変化させ, 活動電位の形状, 細胞の興奮性, 入出力特性に対する効果を調べた. モデルの妥当性は, *in vitro* で得られた細胞の活動電位や発火特性, また *in vivo* における入出力特性と比較することにより評価した.

4. 研究成果

A. 免疫組織学的解析

NM 細胞を逆行性に標識した標本において pan Nav 抗体を用いて免疫染色を行った結果, Na チャネルは全ての CF 領域で細胞体近傍の軸索上に存在したが, 低 CF 領域の細胞ほど軸索上の長い領域に高い密度で局在することを明らかにした. つまり, NM では低 CF 領域の細胞ほど活動電位の発生部位に Na チャネルを多く発現すると考えられた. 一方, Nav1.6 抗体を用いた免疫染色においても, pan Nav 抗体と同様に全ての CF 領域で信号が認められたことから, 発現する Na チャネルの種類には CF に応じた違いはないと考えられた. また, これらの Na チャネル局在は Kv1.1 と Kv1.2 チャネルと共存したことから, 軸索起始部に相当すると考えられた.

B. 電気生理学的解析

NM 細胞における順行性と逆行性の活動電位の振幅はともに低い CF 細胞で大きいことから, 低い CF 細胞ほど多くの Na チャネルを発現していると考えられた. 一方, 細胞体の脱分極は逆行性の活動電位の振幅を一樣に小さくしたことから, 活動電位の発生部位は CF によらず細胞体の近傍にあると考えられた. また, 細胞体から記録された Na 電流の電流密度は, セルアタッチ下ではホールセル下に比べてはるかに小さいことから, Na チャネルはその殆どが軸索に局在していると考えられた. さらに, Na 電流の活性化と不活性化の電位依存性と時間経過は CF によらず一定であったことから, 発現する Na チャネルの種類にも CF による違いはないと考えられた.

C. 計算論的解析

免疫組織学的解析と電気生理学的解析により, NM 細胞では細胞体近傍の軸索起始部で活動電位を発生し, かつ低い CF 領域の細胞ほどそこに多くの Na チャネルを発現してい

ることが分かったため、このことの機能的意義を検討した。NMではシナプス入力の数とサイズもCFに応じて異なり、低いCFの細胞ほど多数の小さな入力を受ける。そこで、コンピューターシミュレーションを行った結果、多数の小さな入力を受ける低いCF領域の細胞では、軸索起始部にたくさんNaチャンネルをもつことが正確なタイミングで発火を行う上で特に重要であることが分かった。これは入力が増加される場合にはEPSPの立ち上がりが遅くなりNaチャンネルの不活性化とKチャンネルの活性化を生じるが、Na電流量が大きいと活動電位発生の潜時が短くなり、この効果を減少させるためであった。一方、大きな入力を受ける高いCF細胞では少ないNaチャンネルでも正確なタイミングでの発火が可能であった。これらの結果から、神経細胞では活動電位の発生部位とそこでのイオンチャンネル発現がシナプス入力に応じて細胞毎に精巧に調節されることにより、細胞機能が最適化されていることを明らかにした。

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3件)

1) Kuba, H.

Cellular and molecular mechanisms of avian auditory coincidence detection.

Neurosci Res. 59, 370-376 (2007).

2) Nishino, E., Yamada, R., Kuba, H., Hioki, H., Furuta, T., Kaneko, T., Ohmori, H.

Sound-intensity-dependent compensation for the small interaural time difference cue for sound source localization.

J Neurosci. 28, 7153-7164 (2008).

3) Kuba, H., Ohmori, H.

Roles of axonal sodium channels in precise auditory time coding at nucleus magnocellularis of the chick.

J. Physiol. (Lond.) 587, 87-100 (2009).

[学会発表] (計9件)

1) 第54回中部日本生理学会, 第100回近畿生理学談話会 (三重)

2007年10月19日-20日開催

トリ大細胞核神経細胞におけるNaチャンネルの細胞内局在

久場 博司, 福井 巖, 大森 治紀
ポスター

2) 第54回中部日本生理学会, 第100回近畿生理学談話会 (三重)

2007年10月19日-20日開催

トリ層状核神経細胞における新たな抑制機構の解明

山田 玲, 奥田 裕子, 西野 恵里, 久場 博司, 石井 孝広, 大森 治紀
ポスター

3) 第54回中部日本生理学会, 第100回近畿生理学談話会 (三重)

2007年10月19日-20日開催

トリ層状核における両耳間時間差検出の抑制性入力による向上

西野 恵里, 山田 玲, 久場 博司, 大森 治紀
口演

4) 第85回日本生理学会大会 (東京)

2008年3月25日-27日開催

聴覚時間情報処理細胞における活動電位発生部位の解析

久場 博司, 福井 巖, 大森 治紀
ポスター

5)第 85 回日本生理学会大会 (東京)
2008 年 3 月 25 日-27 日開催
トリ層状核における両耳間時差検出の抑制
性調節機構
西野 恵里, 山田 玲, 久場 博司, 大森 治
紀
ポスター

6) 第 85 回日本生理学会大会 (東京)
2008 年 3 月 25 日-27 日開催
ニワトリ層状核神経細胞における聴覚同時
検出に対する時間情報を保持した抑制性入
力の働き
山田 玲, 奥田 裕子, 西野 恵里, 久場 博
司, 石井 孝広, 大森 治紀
ポスター

7)第 101 回近畿生理学談話会 (大阪)
2008 年 9 月 13 日開催
トリ層状核神経細胞にフィードフォーワー
ド抑制機構の働き
山田 玲, 奥田 裕子, 西野 恵里, 久場 博
司, 石井 孝広, 大森 治紀
口演

8) 第 101 回近畿生理学談話会 (大阪)
2008 年 9 月 13 日開催
トリ層状核の両耳間時間差検出における両
耳間音圧差の補正
西野 恵里, 山田 玲, 久場 博司, 大森 治
紀
口演

9) Neuroscience 2008 (Washington, DC)
2008. 11. 15-19
Distribution of axonal Na channels for
precise spike timing in an auditory relay
neuron
Kuba, H., Ohmori, H.
Poster

[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]
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者
久場 博司 (KUBA HIROSHI)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号: 1 0 3 6 2 4 6 9

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし