

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月16日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07345

研究課題名(和文)軸索起始部の可塑性における分子機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of the axon initial segment plasticity using organotypic slice culture

研究代表者

安達 良太 (ADACHI, Ryota)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：00436057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ニワトリの蝸牛神経核である大細胞核は受け取る音の周波数によって細胞毎に異なる性質を持つ。高周波数域の細胞におけるK⁺電流の増大が一つの例だが、切片培養にすることでその特徴が消失した。神経を脱分極させると生体内と同様K⁺電流が増大した。これは細胞内Ca²⁺濃度の上昇によって起こるが、細胞種間で濃度差は見られなかった。またこの応答にアデニル酸シクラーゼが関与することがわかり、細胞種でもともと発現する分子の種類や量などが異なっており、神経活動が引き金となって細胞の機能分化を引き起こす可能性があることを突き止めた。

この実験系を用いて脱分極、活動電位の頻度上昇が軸索起始部を短くすることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経回路は脳を正しく機能させる為に形成、維持される。発達過程においては脳の各領域においてそれぞれの特性を持った回路が形成され、その後は外部からの刺激に応じて可塑的な変化を起こして機能的な回路を維持してゆく。これまでは神経特異的な性質の獲得には、入力が大部分を占めていると考えられてきた。しかしながら本研究は、入力も引き金として重要ではあるが、神経細胞自体の性質が異なっており、その運命に従って分化することを示した。各神経回路が特性を獲得する機構を理解することは脳機能の正しい理解に繋がると考える。

研究成果の概要(英文)：Tonotopic differentiations of ion channels ensure sound processing across frequencies. In organotypic culture of chicken cochlear nucleus, Kv1.1 was down-regulated and not differentiated tonotopically. Chronic depolarization increased Kv1.1 expression in the cells at higher-frequency regions, which restored the differentiation. The depolarization increased Kv1.1 via activation of calcium channels, whereas basal Ca²⁺ level elevated similarly irrespective of tonotopic regions. Thus, the efficiency of Ca²⁺-dependent Kv1.1 expression would be fine-tuned in a tonotopic-region-specific manner, emphasizing the importance of neuronal tonotopic identity as well as pattern of afferent input in the tonotopic differentiation of the channel in the auditory circuit.

研究分野：神経科学

キーワード：蝸牛神経核 脳幹切片培養 電位依存性K⁺チャネル 周波数局在性 軸索起始部

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 軸索起始部の構造と機能

軸索起始部は神経細胞の細胞体に近い軸索上に存在する構造である。電位依存性の Na⁺チャンネルや K⁺チャンネルが足場タンパク質であるアンキリン G や PSD95 によって集合し、それらのタンパク質の局在によって軸索起始部が定義される(引用文献)。これらのチャンネルが高密度に存在するが故に軸索起始部は活動電位発生の場としての役割を持つ。軸索起始部はてんかんや脳卒中のモデル動物、持続的な脱分極条件下での培養神経細胞等において長さや軸索上での位置が変化することが報告されている。また、軸索起始部は可塑的能力を持ち、その分布が活動依存的に変化することもわかってきている。従って前述の疾患に軸索起始部の可塑性が関与する可能性が考えられる。しかしながら軸索起始部の可塑性に関しては、関連する分子や動きの仕組み等詳しいことはほとんどわかっていない。

(2) トリ蝸牛神経核神経細胞における軸索起始部

ニワトリの蝸牛神経核である大細胞核(NM)は脳幹にあり、聴神経入力の情報時間を正確に上位に伝える役割を持つ。NMは神経核内の領域によって内耳から入力する音の周波数が異なる周波数局在性を示す。これによって細胞の興奮性や軸索起始部の長さが異なり、発達期において音入力の開始(hearing onset, 12日胚)以降軸索起始部は徐々に短くなり、孵化後3日頃には高周波数域(HCF)で10 μm、低周波数域(LCF)で20 μm程度になる(引用文献)。一方で内耳除去により音入力がなくなると軸索起始部が長くなることも示されている(引用文献)。このNM内の領域に応じて切片を作製し培養することでNM神経回路を保ったまま均一な長さの軸索起始部を持つ細胞集団を得、それを用いて軸索起始部の可塑性の仕組みを解明することを試みた。

2. 研究の目的

(1) 脳幹切片培養におけるNM神経細胞の特性

軸索起始部の可塑性機構を調べるにあたり、薬理的な操作の比較的簡単な切片培養を用いることにした。切片培養は分散培養と異なり、神経回路を含め髄鞘を形成するグリア細胞など周囲の環境がある程度維持されていることも研究を遂行する上で利点と考えた。まずは培養下でのNM神経細胞の性質を周波数特性に応じて解明することを目的とした。

(2) 周波数特性を形成する機構の解明

音入力のない切片培養を用いることで、周波数領域に応じた細胞特性の違いに対する発達期の音入力の影響を明らかにすることも目的とした。

(3) 軸索起始部の可塑性機構の解明

軸索起始部の可塑性とそれに関連すると思われる分子はいくつか報告があった。しかしながらその多くは分散培養系を用いた結果であり、細胞によって軸索起始部の動きが異なる場合があったため、まずは何が可塑性を引き起こすのかを明らかにすることを目的とした。その上で軸索起始部の可塑性に関わる分子の同定を試みた。

3. 研究の方法

(1) 脳幹切片培養におけるNM神経細胞の特性

ニワトリ10日胚から作製した脳幹切片を孵化後3日に相当する14日目まで培養した。脳幹NMの高周波数域、低周波数域から作製した切片の細胞から静的、動的な膜の特性を調べるためにパッチクランプ法によって膜電位や活動電位を記録した。また、聴覚神経などの高頻度で正確な発火を要する神経に多く見られるK⁺電流に着目し、記録を行った。

(2) 周波数特性を形成する機構の解明

音入力のない切片培養をKCl処理することで持続的な脱分極刺激を与え、擬似的に入力を再現する様な状況にした。この時の電気生理学的な記録を行った。また、Ca²⁺イメージング法により脱分極時の細胞内Ca²⁺濃度も調べた。

(3) 軸索起始部の可塑性機構の解明

培養切片をDNQXによりシナプス伝達を、TTXにより活動電位をそれぞれ阻害すると軸索起始部が長くなる結果を得ていた。*in vivo*においても内耳除去によって軸索起始部が長くなることから、神経活動が可塑性に関連することが考えられた。そこで細胞外K⁺に着目し、これを変化させることで活動頻度を上昇させることができるか、またそれによって軸索起始部の長さが変わるかどうかを調べた。

4. 研究成果

(1) 脳幹切片培養におけるNM神経細胞の特性

HCFとLCFそれぞれの領域から作製した切片培養のNM神経細胞はどちらも培養初期には突起を多く持っていたが、培養14日目には *in vivo* で見られる様な球状で樹状突起の少ない形態へと分化した。膜特性を見てみると、閾値における活動電位の数や入力電流に対する外向き整流性の応答などNM神経細胞の性質を保持していたが、脳幹急性切片に比べると静止膜電位が脱分極し入力抵抗が高くなっていた

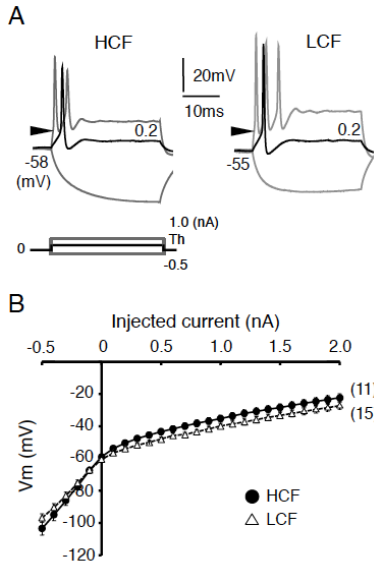


図1 切片培養における大細胞核神経細胞の膜特性

(図1) これらの結果は切片培養ではK⁺電流が少ないことを示唆していたが、興味深いことに周波数域に関わらずどちらの細胞も似た性質を示した。そこで電位固定法によりK⁺電流を記録した(図2A)。活性化曲線をボルツマンの式に当てはめることで、低電位で活性化されるチャンネル(Kv1, 図2B オレンジ)と高電位で活性化されるチャンネル(Kv3, 図2B 緑)由来の電流から構成されることがわかった。Kv1は静止膜電位の維持に関わる電位依存性K⁺(Kv)チャンネルだが、図1で示した結果から予想した通り、約0.5 nAと非常に少ないことがわかった(図2B, C)。K⁺電流においても周波数域に関わらず似た値を示しており、切片培養ではNMの周波数特性が消失している、あるいはほとんどないことがわかった。

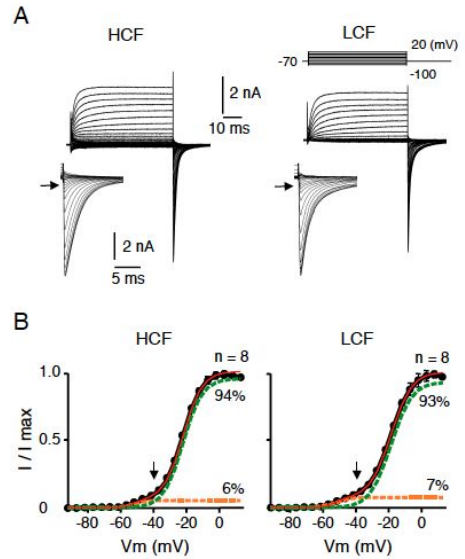


図2 切片培養における大細胞核神経細胞のK⁺電流

(2) 周波数特性を形成する機構の解明

切片培養ではNMへの聴覚入力存在しない。神経の活動を上昇させるためにK⁺濃度を上げた培地(1.5倍濃度、7.95 mM)中で培養し、膜特性とK⁺電流を記録した。その結果、HCFの細胞においてのみ活動電位の閾値の上昇、静止膜電位の過分極、そして入力抵抗の劇的な減少が見られた(図3)。K⁺電流についてもKv1由来の電流がHCFでは約5倍、LCFでは約2倍に増加していた(図4)。これらの結果は切片培養のNMにおいて周波数特性が回復したことを示している。Kv1に対する抗体を用いて免疫染色をすると、高K⁺濃度で培養したHCFの細胞においてのみ細胞膜に強い蛍光が観察された。これらの結果から刺激によってHCFでは細胞膜上で機能するKv1が増加し、電流が増大したものと考えられる。このKv1電流は培地中

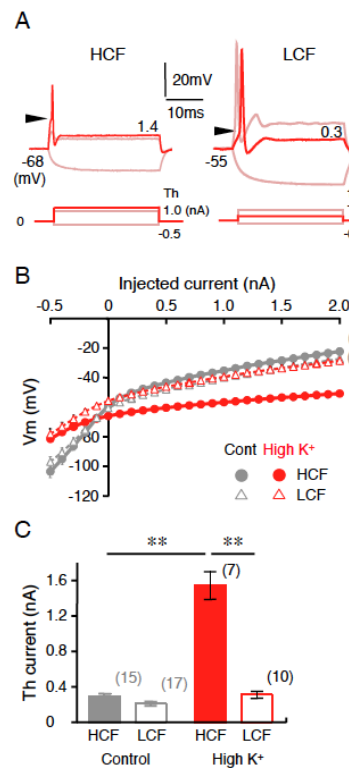


図3 高K⁺濃度培養時の大細胞核神経細胞の膜特性

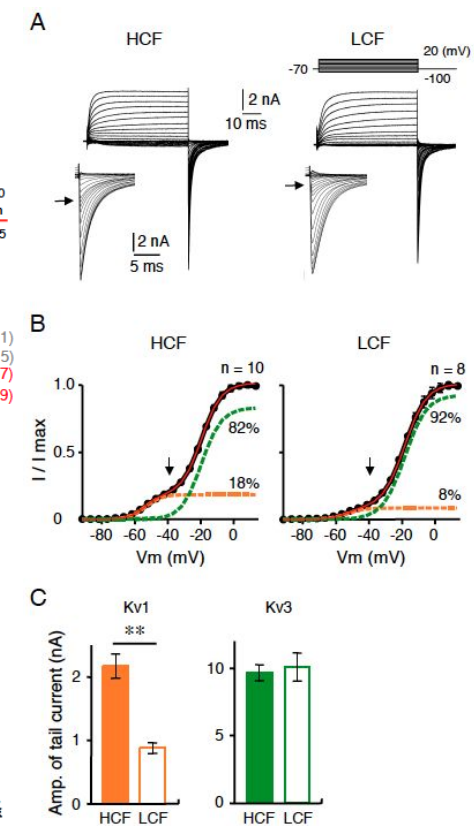


図4 高K⁺濃度培養時の大細胞核神経細胞のK⁺電流

の K^+ 濃度依存的に増加した。HCF では 2K (2 倍濃度、10.3 mM) でほぼ平衡状態に達した (3.9 nA) が、LCF では 3K (3 倍濃度、15.9 mM) にしてようやく元の 2 倍程度 (0.8 nA) にまで増えた (図 5)。またこのときの静止膜電位を測定すると、それぞれの K^+ 濃度で HCF、LCF 双方の細胞は同程度の膜電位を示し、通常の K^+ 濃度 (5.3 mM) では約 -55 mV、1.5K では -52~-47 mV、2K では -45~-43 mV、3K では -39~-37 mV であった。この結果は HCF だけでなく LCF の細胞も高 K^+ 濃度刺激により Kv1 電流を増加させる能力を持っているものの、HCF の細胞でその効果が大きいことを示している。細胞の脱分極は電位依存性の Ca^{2+} チャンネルを介した Ca^{2+} の細胞内への流入を引き起こすと予想される。実際、脱分極に応じた NM 細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が

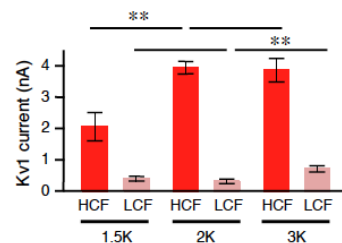


図 5 周波数域による Kv1 電流の K^+ 濃度依存性の違い

HCF、LCF の細胞ともに同程度観察された (図 6A, B)。この時の細胞内 Ca^{2+} 濃度を計測すると、3K 刺激時の脱分極レベルでも通常時と比べて 50 nM 程しか上昇せず、ニフェジピンによって上昇が阻害されたことから、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介して Ca^{2+} が流入するが、その変化は極小さいものであると考えられる (図 6C)。DNQX によりシナプス伝達を、TTX により活動電位の発生を、それぞれ阻害した場合でも高 K^+ 濃度刺激により Kv1 電流が増加することから、活動電位に誘導される一過性の多量の Ca^{2+} よりも閾値以下の脱分極による少量の Ca^{2+} が必要十分であることを示唆している。これらの結果は高 K^+ 濃度刺激による脱分極と細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇までは NM 神経細胞に共通して起こる現象だが、それ以降の Kv1 の機能発現までの情報伝達経路が細胞によって異なることを意味している。つまり、もともと細胞の性質は周波数域によって異なっており、音入力引き金となって各細胞を機能分化させ周波数特性を形成するプログラムが走るようになるのではないかと考えられる。

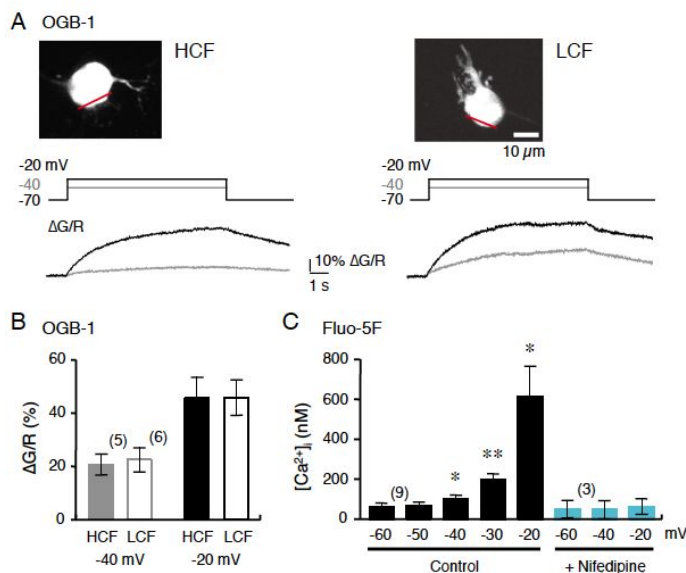


図 6 大細胞核神経細胞の脱分極レベルに応じた細胞内 Ca^{2+} イメージング

Ca²⁺ の下流の情報伝達経路で HCF の細胞における Kv1 電流の増加に関連する分子の探索を、薬理学的手法により行った。その結果、フォルスコリンによって Kv1 電流が増加した。高 K^+ 濃度刺激と同時にアデニル酸シクラーゼの阻害剤である 2',5'-Dideoxyadenosine を加えると Kv1 電流の増大が抑制されたことから、周波数特性の形成にアデニル酸シクラーゼが関与することが示唆された。フォルスコリンで活性化されるアデニル酸シクラーゼはニワトリでは 8 つのサブタイプが存在し、そのうち Ca^{2+} により活性化されるものは 3 つ、AC1、3、8 である。これらの遺伝子の発現パターンや発現量が周波数域によって異なることで Kv1 電流を介した周波数特性を形成する可能性が考えられる。

(3) 軸索起始部の可塑性機構の解明
前述の実験により切片培養の NM 神経細胞の性質がかなり明らかになった。また *in vivo* において内耳除去により軸索起始部が長くなることから神経活動の影響が示唆されていた。そこで神経の発火頻度と軸索起始部の長さの関連を調べた。NM 神経細胞は *in vivo* では 100~500 Hz の発火頻度を示すが、切片培養では約 20 Hz であった。ただしこれはパッチクランプ時に使用する人工脳脊髄液 (ACSF) 中での値であり、培地中で記録すると 1 Hz 以下であった (図 7A)。この違いは溶液の K^+ 濃度に起因するのではないかと考え (ACSF は 2.5 mM、培地は 5.3 mM) 高カリウム血症治療に用いられるポリスチレンスルホン

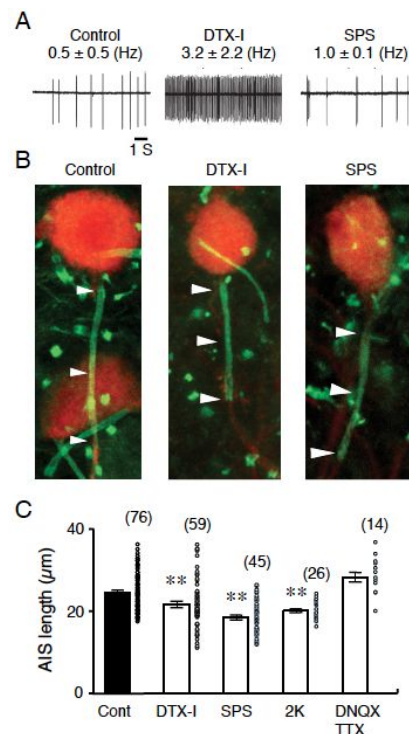


図 7 大細胞核神経細胞の発火頻度と軸索起始部の長さ

酸ナトリウム (SPS) で培地中の K^+ をキレートすることで ACSF の K^+ 濃度に近づけた。これによって発火頻度が上昇し、軸索起始部の長さも変化するのではないかと予想した。結果は約 1 Hz とそれほど増えてはいなかったが軸索起始部はコントロールに比べ 25% 短くなっていた (図 7, SPS)。Kv1 チャンネルの阻害剤である DTX-1 は発火頻度を 6 倍程度に上昇させ、軸索起始部も短くなったが 12% 程度であった (図 7, DTX-1)。以上の結果から神経の発火頻度と軸索起始部の長さに関連があることがわかった。また、高 K^+ 濃度処理でも軸索起始部は短くなったので、前述の Kv1 電流と同様に脱分極でも軸索起始部は長さを変える可能性がある (図 7C, 2K)。これらの結果は細胞内 Ca^{2+} が可塑性にも関わる可能性を示している。細胞体以外にも軸索起始部には小胞体様構造があり、 Ca^{2+} のストアに関わっている可能性がある。活動電位で可塑性が起こるのであれば軸索起始部局所での Ca^{2+} 動態が影響すると考えられる。今後、より発火頻度を上昇させる、あるいは発火パターンを変化させる目的で、チャンネルロドプシンを NM 細胞で発現させることを考えている。そのための発現ベクターを作製し、エレクトロポレーション法により目的の NM 細胞にチャンネルロドプシンが発現することを確認した。 Ca^{2+} の関与と活動電位の操作は今後の課題である。

切片培養の NM 神経細胞は前述のように音入力がないとはいえ、ある程度の頻度の自発発火を示す。DNQX や TTX で発火を抑えると軸索起始部は約 30 μm に伸び、発火を促すと 20 μm 弱にまで短くなる。この長さの差を利用して、軸索起始部の可塑性に関連する分子のスクリーニングをできないかと考えている。

以上の研究によりニワトリ聴覚神経細胞の神経回路が保存された切片培養系をモデルとして、神経細胞が活動のみならず細胞自身の性質により機能分化する運命が決定づけられることを示した。各神経回路が特性を獲得する機構を理解することは脳機能の正しい理解に繋がると考える。

< 引用文献 >

Rasband M. The axon initial segment and the maintenance of neuronal polarity. *Nat Rev Neurosci*:11, 2010, 552-562.

Kuba H & Ohmori H. Roles of axonal sodium channels in precise auditory time coding at nucleus magnocellularis of the chick. *J Physiol*:587, 2009, 87-100.

Kuba H, Oichi Y & Ohmori H. Presynaptic activity regulates Na^+ channel distribution at the axon initial segment. *Nature*:465, 2010, 1075-1078.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Ryota Adachi, Rei Yamada, Hiroshi Kuba. Tonotopic differentiation of coupling between Ca^{2+} and Kv1.1 expression in brainstem auditory circuit. *iScience* 13: 199-213, 2019, DOI: 10.1016/j.isci.2019.02.022, 査読有り

Nargis Akter, Ryota Adachi, Akitoshi Kato, Ryota Fukaya, Hiroshi Kuba. Auditory input shapes tonotopic differentiation of Kv1.1 expression in avian cochlear nucleus during late development. *Journal of Neuroscience* 38: 2967-2980, 2018, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2472-17.2018, 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

Nargis Akter, Ryota Adachi, Ryota Fukaya, Hiroshi Kuba. Development of tonotopic differentiation of axon initial segment in avian nucleus magnocellularis. 第 9 回アジア・オセアニア生理学連合大会 & 第 96 回日本生理学会合同大会 (FAOPS), 2019 年 3 月 28-31 日

Ryota Adachi, Rei Yamada, Hiroshi Kuba. Differentiation of intracellular Ca^{2+} sensitivity underlies tonotopic-region-specific Kv1.1 expression in avian cochlear nucleus. Latest advances in development & function of neuronal circuit, CSH Asia, 2018 年 9 月 25-28 日

Nargis Akter, Ryota Adachi, Akitoshi Kato, Ryota Fukaya, Hiroshi Kuba. Auditory input shapes tonotopic differentiation of Kv1.1 expression in avian cochlear nucleus during late development. Latest advances in development & function of neuronal circuit, CSH Asia, 2018 年 9 月 25-28 日

安達良太, 藤井諭, Israt Jahan, 久場博司. トリ蝸牛神経核培養細胞における軸索起始部の可塑性機構. 新学術研究領域「スクラップ&ビルドによる脳機能の動的制御」第 2 回領域会議, 2017 年 8 月 25-27 日

安達良太, 久場博司. トリ聴覚神経核の活動依存的な機能分化. 第 63 回中部日本生理学会, 2016 年 11 月 4-5 日

安達良太, 久場博司. 大細胞核の活動依存的な機能分化. 第 39 回日本神経科学大会, 2016 年 7 月 20-22 日

〔図書〕(計0件)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/laboratory/basic-med/cell-science/physiol1/

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。