

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19500272

研究課題名（和文） 皮質内微小神経回路網の発達に伴うシナプス結合の精緻化

研究課題名（英文） Development of microcircuits in neocortex

研究代表者

吉村 由美子 (YOSHIMURA YUMIKO)

名古屋大学・環境医学研究所・准教授

研究者番号：10291907

研究成果の概要：

ラットより作成した大脳皮質視覚野スライス標本を用いて、錐体細胞間抑制性伝達の特性と経験依存的発達を電気生理学的手法により検討した。錐体細胞間抑制性結合は、興奮性結合に比べて高い頻度で観察された。両結合は、発達初期の視覚野では発達後期に比べて低頻度でしか観察されなかった。しかし、興奮性結合の形成は生後直後からの発達後期までの暗室飼育により抑えられたが、抑制性結合は、暗室飼育の方が高頻度で観察された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：視覚野、暗室飼育、局所回路、経験依存的発達、ラット

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質の情報処理メカニズムを理解するためには、その基盤となる神経回路特性を知ることが重要である。これまでに我々は、マウス大脳皮質視覚野スライス標本を用いた実験で、興奮性錐体細胞の活動によって、近傍の別の錐体細胞に、興奮性ではなく抑制性の反応が生じる、全く新しい抑制性神経伝達機構

が大脳皮質に存在することを報告した。この錐体細胞間抑制性シナプス後電流 (IPSC) は、GABA_A 受容体遮断薬および non-NMDA 受容体遮断薬投与により消失したことから、2シナプス性の反応と考えられるが、その潜時は短く、個々のシナプス結合における潜時の変動係数は錐体細胞間にみられる単シナプス性興奮性シナプス後電流 (EPSC) の値と有意

な差はなかった。そのメカニズムを解析した結果、錐体細胞の軸索が抑制性細胞の樹状突起・細胞体を介さずに、直接抑制性細胞の軸索終末を活性化し、伝達物質を放出させるという全く新しいタイプの神経回路による抑制反応であることが判明した。しかしながら、この錐体細胞間抑制性伝達の詳細な特性や形成機構については全く明らかではない。

2. 研究の目的

本計画では、錐体細胞間抑制性結合の特性を、スライス標本を用いた研究によりさらに明らかにする。マウスに比べて視覚生理実験が容易なラットにおいても、マウスと同様な錐体細胞間抑制が存在するかを検討する。また、一次視覚野の視覚反応選択性は生後の視覚体験に強く依存して発達するので、錐体細胞間抑制性結合が、視覚反応と同様に視覚体験に依存して成熟するかを調べることで、この抑制が視覚反応選択性形成に関与するかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 正常視覚環境下で飼育した生後 2 1 - 2 6 日齢のラットより一次視覚野スライス標本を作成し、電気生理学的実験を行う。近赤外線微分干渉装置を備えた顕微鏡下で切片上にあるニューロンを観察し、複数の 2/3 層錐体細胞からホールセルパッチクランプ法により同時記録する。一部の実験では、抑制性ニューロンと錐体細胞から同時記録を行う。
- (2) 記録している錐体細胞間に抑制性シナプス後電流 (IPSC) が発生するかを調べる。シナプス後細胞の膜電位を興奮性シナプス後電流 (EPSC) の反転電位に固定し、シナプス前細胞の発火に伴い、シナプス後細胞に IPSC が発生するかを観察する。記録している錐体細胞ペアに興奮性シナプスがあるかについては、IPSC の反転電位に膜電位を固定して、EPSC を観察する。
- (3) 抑制性結合している錐体細胞と興奮性結合している錐体細胞の分布と比較し、錐体細胞間に形成される抑制性結合と興奮性結合がどのような相互関係にあるかを明

らかにする。

- (4) 錐体細胞間 IPSC を仲介する抑制性軸索終末に存在するグルタミン酸受容体のサブタイプを薬理学的手法により同定する。AMPA 受容体遮断薬またはカイニン酸受容体遮断薬を灌流液より投与し、IPSC の変化を観察する。
- (5) 記録電極内液にバイオサイチンを入れておく。電気生理学的実験終了後、スライス標本をパラフォルムアルデヒドにより固定し、細胞内染色法により記録細胞の形態的同定を行う。
- (6) 正常視覚環境下で飼育した生後 1 4 - 1 6 日齢の発達前期群、2 1 - 2 6 日齢の発達後期群、生後直後からの暗室飼育により視覚体験を経っていない暗室飼育群 (生後 2 1 - 2 6 日齢) の 3 群のラットを使用する。上記の 2、3 の実験をこの 3 群で行い、結果を比較し、錐体細胞間の興奮性および抑制性結合の発達過程と、その成熟が視覚体験に依存するかどうかについて検討する。

4. 研究成果

ラットの一次視覚野においても、マウスと同様に、興奮性錐体細胞の単発発火により、近傍にある別の錐体細胞に短潜時の IPSC が観察された。この錐体細胞間抑制性結合は興奮性結合と比較して、やや高い頻度で観察された (図 1 参照)。単一の錐体細胞ペアにおいて、興奮性と抑制性の両方の結合が観察されることは極めて稀であった。これまでの実験で、錐体細胞間 IPSC を仲介する抑制性細胞の軸索終末にグルタミン酸受容体が存在し、その活性化によって GABA が放出されることを見出しているため、抑制性終末に存在するグルタミン酸受容体サブタイプを薬理学的手法を用いて検討した。その結果、記録した錐体細胞間 IPSC のうち、潜時が 3 ミリ秒以下の短潜時 IPSC はカイニン酸型受容体遮断により強く抑制されたが、AMPA 型受容体遮断薬の影響は受けなかった。一方、5 ミリ秒程度の比較的長い潜時を示す IPSC はカイニン酸型受容体を遮断すると著しく阻害されたが、AMPA 型受容体を遮断しても、抑制された。また、コントロール実験として、抑制性ニューロンと錐体細胞からの同時ホ

ールセル記録を行い、抑制性ニューロンの発火に伴い錐体細胞から観察される、通常の抑制性伝達がカイニン酸型受容体および AMPA 型受容体遮断の影響を受けるかを検討した。複数のサブタイプの抑制性ニューロンと錐体細胞のペアで検討した結果、そのサブタイプ由来の IPSC においても、カイニン酸型受容体および AMPA 型受容体遮断の影響は全く観察されなかった。したがって、錐体細胞間抑制は、一部は AMPA 受容体の関与があるものが、主としてカイニン酸受容体により仲介されていることが強く示唆された。

次に、2/3 層錐体細胞間にみられる IPSC と EPSC の発達と視覚体験依存性について調べた(図 1 参照)。EPSC および IPSC は、発達初期(生後 14-17 日齢)の視覚野では発達後期(生後 21-26 日齢)に比べて低頻度でしか観察されなかった。興奮性結合と抑制性結合の発達は共に視覚体験に依存したが、その影響の方向は逆であった。興奮性結合の形成は生後直後からの発達後期までの暗室飼育により抑制され、結合がみられたペアでも EPSC の振幅は正常視覚環境飼育に比べて小さかった。一方、錐体細胞間 IPSC は、正常視覚環境飼育より、暗室飼育の方が高頻度で観察され、その平均振幅も大きかった。以上の結果は、視覚入力がない場合には 2/3 層において、錐体細胞間の興奮性結合の発達は抑えられ、錐体細胞間の抑制性結合の発達は促進されることを示唆している。言い換えると、視覚入力を受けると発達と共に興奮性結合が抑制性結合に比べて優位になり、視覚体験により視覚野細胞の視覚反応が強化されると考えられる。

Detection probability for EPSCs and/or IPSCs in layer 2/3 pyramidal cell pairs

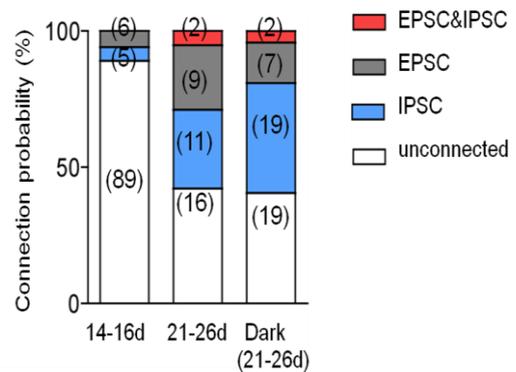


図 1. 発達初期、発達後期および暗室飼育した大脳皮質視覚野の 2/3 層錐体細胞間における EPSC と IPSC の検出確率。括弧内の数字は記録したペアの数を示す。14-16d は生後 14-16 日齢、21-26d は生後 21-26 日齢、Dark は暗室飼育群を示す。

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 Kurotani T, Yamada K, Yoshimura Y, Crair M, Komatsu Y, State-dependent bidirectional modification of somatic inhibition in neocortical pyramidal cells. *Neuron* 57: 905-916 (2008) 査読有
- ② Yoshimura Y, Inaba M, Yamada K, Kurotani T, Begum T, Reza F, Maruyama T, Komatsu Y Involvement of T-type Ca^{2+} channels in the potentiation of synaptic and visual responses during the critical period in rat visual cortex. *Eur J Neurosci* 28(4): 730-74 (2008) 査読有
- ③ Ren M, Yoshimura Y, Takada N, Horibe S, Komatsu Y, Specialized inhibitory synaptic actions between nearby neocortical pyramidal neurons. *Science* 316 (758): 758-761 (2007) 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 吉村由美子, 任 鳴, 堀部尚子, 小松由紀

夫, 大脳皮質視覚野における抑制性神経回路の発達, Development of pyramidal cell inhibition in visual cortex. 第30回日本神経科学大会, 2007. 9. 10 (横浜市)

- ② 吉村由美子, 大脳皮質における錐体細胞間の新規な抑制性シナプス作用. 第113回日本解剖学会総会・全国学術集会 2008. 3. 27-29 (大分県由布市)

- ③ Yoshimura Y, Characterization of excitatory and inhibitory connections

between nearby layer 2/3 pyramidal cells using dual whole-cell recording from visual cortex. 7th OIB Symposium “Frontiers of Biological Imaging -Synergy of the Advanced Techniques” 2008. 11. 10-13 Okazaki

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 由美子 (YOSHIMURA YUMIKO)
名古屋大学・環境医学研究所・准教授
研究者番号: 10291907