

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20300109

研究課題名(和文)

視覚野における錐体細胞間抑制の特性と機能の解析

研究課題名(英文)

Analysis of the properties and functions of inter-pyramidal inhibition in visual cortex

研究代表者：

小松 由紀夫 (KOMATSU YUKIO)

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号：90135343

研究成果の概要(和文)：我々が最近視覚野で見出した近傍の錐体細胞間で生じる抑制の伝達機構を解析した。微小抑制性シナプス後電流の解析により、抑制性終末には non-NMDA 受容体だけでなく NMDA 受容体も存在することを見出した。錐体細胞からの同時ホール・セル記録により、軸索終末に存在する NMDA 受容体は non-NMDA 受容体と協同的に作用し、錐体細胞軸索終末から抑制性細胞軸索終末への興奮性伝達とそれに伴う抑制性終末から錐体細胞への GABA 放出に寄与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Neurons integrate synaptic inputs arriving on their soma and dendrites and generate action potentials at a frequency depending on the level of depolarization resulting from that integration at the initial segment of their axon. The action potentials are conducted along their axons to their terminals and transfer signals to other neurons at synaptic junctions. This is the basic method of signal transmission between neurons. We recently found that, in visual cortex, action potentials generated in a single layer 2/3 pyramidal (excitatory) neuron can reliably evoke large inhibitory postsynaptic currents in other nearby pyramidal cells, via axo-axonic ionotropic glutamate receptor-mediated excitation of nerve terminals of inhibitory interneurons, which connect to the target pyramidal cells. In this study, I further investigated the mechanism of this new form of synaptic transmission. In addition to AMPA/kainite receptors, an analysis of the miniature inhibitory synaptic currents recorded from pyramidal neurons demonstrated the presence of NMDA receptors on the inhibitory terminals that targeted the recorded neuron. Dual whole-cell recording from adjacent pyramidal neurons showed that those NMDA receptors contributed to the excitatory synaptic transmission from the axon terminals of the pyramidal neuron to the inhibitory nerve terminals, which initiated GABA release from the latter terminals to the target pyramidal neuron.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：大脳皮質、局所神経回路

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系の神経回路を構成するニューロンは、その樹状突起・細胞体で受けたシナプス入力を統合し、その結果軸索起始部に生じる脱分極の程度に応じた頻度で活動電位を発生する。活動電位は軸索に沿ってその終末に伝わり、シナプスを介して他のニューロンに信号を伝える。ニューロン間の信号伝達は基本的にはこの様式によっている。我々は、視覚野のスライス標本を用いて GABA 作動性抑制性シナプスに長期増強と長期抑圧が感受性期に起こることを見出し、その特性や分子機構を調べる研究を行ってきた。近年、様々な脳領域でイオン・チャネル型グルタミン酸受容体が抑制性シナプスの前終末に存在することが示唆されており、視覚野の抑制性シナプスにもそのような受容体が存在するか、もし存在すれば抑制性シナプス伝達とその可塑性にどのような影響を与えるかを調べていた。その際に、興奮性細胞の軸索終末が抑制性シナプス前終末を直接興奮させて、抑制性シナプス伝達を引き起こす可能性があることに気づいた。この可能性を検討した結果、2/3 層錐体細胞（興奮性細胞）の軸索終末が、抑制性細胞の軸索終末にシナプス結合を作り、その軸索・軸索シナプスを介して他の錐体細胞に強い抑制性シナプス反応を誘発することを発見した。

大脳皮質においては、興奮性細胞から抑制性細胞への興奮性シナプス後電位は小さく、単一の興奮性細胞が活動電位を発生しただけでは、抑制性細胞に活動電位が生じないので、他の細胞に抑制をかけることはできないと推測されてきた。従って、複数の興奮性細胞が抑制性細胞にほぼ同時に入力を送り、抑制性細胞への興奮性入力の空間加重により活動電位が発生する場合に限って抑制反応を誘発できると考えられてきた。最近、皮質錐体細胞が単独で活動する場合でも、高頻度で活動電位を発生すると、他の錐体細胞に抑制性シナプス反応を誘発できることを示す論文が2つの研究グループからほぼ同時に発表された。錐体細胞から Martinotti と呼ばれる抑制性細胞への興奮性シナプス結合では、錐体細胞が短い間隔で連続して発火すると興奮性シナプス後電位が次々と増大・加算され、Martinotti 細胞に大きな脱分極が生じて活動電位が発生する。その結果、その抑制性細胞が支配する錐体細胞に抑制性シナプス後電位が発生する。この場合は、空間加重ではなく、時間加重により、単一の錐体細胞が他の細胞に抑制をかけている。我々が見

出した錐体細胞間抑制は、空間加重も、時間加重も必要とせず、錐体細胞があたかも抑制性細胞のように振舞い、抑制性細胞の樹状突起・細胞体をバイパスし、その軸索終末に直接働きかけて、迅速で強力な抑制作用を他の錐体細胞に及ぼす。

2. 研究の目的

このように錐体細胞間抑制は、これまで知られていた抑制とは異なる信号伝達様式によっているので、その特性と機能的役割を明らかにすることは、皮質における情報処理機構の解明に重要である。従って、本研究では、この新しいタイプの抑制の特性と伝達の仕組みを視覚野 2/3 層においてさらに解析した。

3. 研究の方法

生後 20-30 日齢のマウス視覚野切片標本を用いて、2/3 層細胞よりホール・セル記録を行った。パッチ内液には Cs⁺を主たる陽イオン組成とするものを用いた。抑制性シナプス後電流は(IPSC)は、興奮性シナプス後電流の逆転電位(0 mV)で記録した。微小 IPSC (mIPSC)を記録する際には、灌流液に Na⁺チャネル阻害薬のテトロドトキンを加えて活動電位により引き起こされる伝達物質の放出を阻止した。錐体細胞間抑制の解析には 2 個の錐体細胞から同時ホール・セル記録を行い、一方の細胞に活動電位を発生させて、他方の細胞に錐体細胞間 IPSC (ip-IPSC)を誘発した。

CCK(cholecystokinin)、PV(parvalbumin)、PV(parvalbumin)、VGluT1、GAD65/67 の局在は免疫組織染色により検索した。

4. 研究成果

錐体細胞間抑制性シナプス後電流(ip-IPSC)は、錐体細胞の細胞体・近位樹状突起に結合する抑制性シナプス終末を介して発生すると考えられる。その様な結合様式を持つ CCK 陽性と PV 陽性の 2 種類の抑制性介在細胞のどちらのシナプス終末を介して ip-IPSC が生じるかを、GABA 終末のマーカーである GAD65/67 と錐体細胞の軸索終末のマーカーである VGluT1 と PV または CCV に対する抗体による 3 重免疫組織染色により調べた。その結果、VGluT1 陽性終末は PV 陽性終末と CCK 終末のどちらとも隣接して存在することが分かった。したがって、ip-IPSC は PV 陽性細胞と CCK 陽性細胞の両者の軸索終末を介して生じる可能性が強いと考えられる。

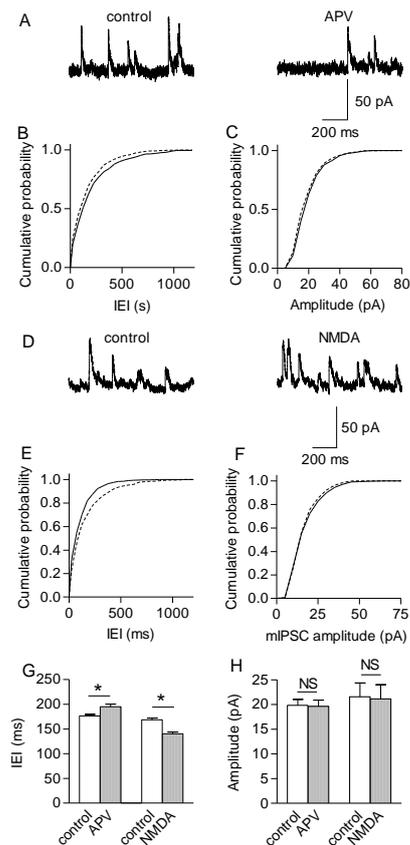


図 1

錐体細胞軸索終末から抑制性細胞軸索終末への興奮性伝達にはkainate受容体とAMPA受容体が関与するが、NMDA受容体も関与するか調べた。錐体細胞よりホール・セル記録法によりmIPSCを記録し、NMDA受容体の阻害剤と活性化剤の効果を調べた。NMDA受容体阻害剤のAPV(100 μM)を加えると、mIPSCの振幅には変化が見られなかったが、発生頻度は有意に低下した(図1A)。NMDA(1 μM)を加えると、mIPSCの振幅に変化は見られなかったが、発生頻度は有意に増加した(図1B)。AMPA/kainate受容体阻害薬NBQX(10 μM)の存在下では、APVもNMDAもmIPSCの頻度に影響を与えなかった。また、細胞外のMg²⁺を除いて、NMDA受容体の膜電位依存性を消失させた条件下では、mIPSCの頻度はAPVにより低下したが、NBQXによっては影響を受けなかった。これらのmIPSC解析は、抑制性シナプス終末には、AMPA/kainate受容体に加えて、NMDA受容体も存在することを示している(図2)。シナプス後細胞に見られるNMDA受容体と同様に、シナプス前部に存在するNMDA受容体の活性化にもAMPA/kainate受容体の活性化による脱分極が必要である。

抑制性シナプス前終末に存在するNMDA受容体がip-IPSCに寄与するか検討した。全て

の例でip-IPSCの振幅がAPVにより減少した。潜時の短い(< 3 ms) ip-IPSCでは30%程度の減少が起こり、潜時の長い(> 3 ms) ip-IPSCでは80%程度の顕著な減少が見られた。APVはip-IPSCの振幅を顕著に減少させたが、その潜時にはほとんど影響を与えなかった。したがって、NMDA受容体もAMPA/kainate受容体と共に錐体細胞軸索終末から抑制性細胞軸索終末への興奮性伝達とそれに伴う抑制性終末からのGABA放出に寄与すると考えられる(図2)。

以上の結果は、錐体細胞間抑制における錐体細胞軸索終末から抑制性細胞軸索終末への興奮性伝達にはAMPA/kainate受容体と共にNMDA受容体も重要な貢献をしていることが分かった。テトロドトキンを灌流液に加えて活動電位が発生しない状況で、mIPSCの頻度をAPVが減少させたので、神経活動がない状態の低い濃度レベルの細胞外グルタミン酸が終末のAMPA/kainate受容体とNMDA受容体を少なくともあるレベルの活性化を引き起こしていることになる。シナプス前部のNMDA受容体の膜電位依存性が通常のものとは異なり、静止膜電位に近い電位でも活性化されるか、あるいは、静止状態でも抑制性神経終末がかなり脱分極した状態にあることが推測される。NMDA受容体のGABA放出に対する寄与は、脱分極によりCa²⁺チャネルの活性化を引き起こすことと、NMDA受容体チャンネルを介するCa²⁺流入の2つが考えられるが、現在のところどちらの可能性が正しいか分からない。

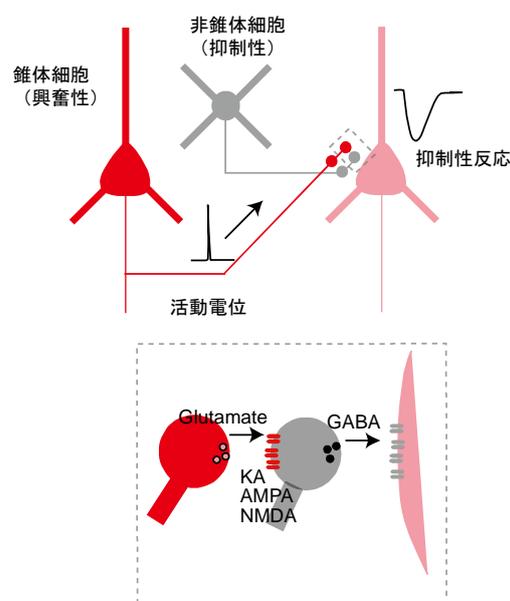


図 2

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 7件)

- ① Mie Inaba, Takuro Maruyama, Yumiko Yoshimura, Hajime Hosoi and Yukio Komatsu, Facilitation of low-frequency stimulation-induced long-term potentiation by endogenous noradrenaline and serotonin in developing rat visual cortex. *Neurosci. Res.* 査読有, 64, 2009, 191-198
- ② Yumiko Yoshimura, Mie Inaba, Kazumasa Yamada, Tohru Kurotani, Tahamina Begum, Faruque Reza, Takuro Maruyama and Yukio Komatsu, 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.* 査読有, 28, 2008, 730-743
- ③ Tsuyoshi Inagaki, Tahamina Begum, Faruque Reza, Shoko Horibe, Mie Inaba, Yumiko Yoshimura and Yukio Komatsu, Brain-derived neurotrophic factor-mediated retrograde signaling required for the induction of long-term potentiation at inhibitory synapses of visual cortical pyramidal neurons. *Neurosci. Res.* 査読有, 61, 2008, 192-200
- ④ 黒谷亨、小松由紀夫、睡眠と抑制性シナプス電達、*生体の科学*、査読無、60巻4号、2009、269-275
- ⑤ 小松由紀夫、長期増強の維持に必要なシナプス前性活動と Ca^{2+} チャンネル、*生体の科学*、査読無、59巻、2008、553-560

[学会発表] (計 7件)

- ① Reza Faruque, Begum Tahamina, Yoshimura Yumiko, Yanagawa Yuchio, Komatsu Yukio, Reduced long-term potentiation at visual cortical inhibitory synapses in dark-reared and GAD65 knockout mice. 第31回日本神経科学大会、2008年7月、東京

[図書] (計 1件)

- ① Komatsu Y and Yoshimura Y, Long-Term Modification at Inhibitory Synapses in Developing Visual Cortex. "Inhibitory Synaptic Plasticity"

Woodin M. A., Maffei A. (eds.) Springer, 2011, pp. 17-27

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小松由紀夫 (KOMATSU YUKIO)

研究者番号：90135343

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：