

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300147

研究課題名（和文）in vivo ホールセル記録による頭部回転刺激に対する前庭ニューロンの反応特性

研究課題名（英文）In vivo whole-cell recording analysis of response properties of vestibular nucleus neuron to head rotation

研究代表者

齋藤 康彦（SAITO YASUHIKO）

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70290913

研究成果の概要（和文）：ラット in vivo 標本において内側前庭神経核（MVN）ニューロンからホールセル記録を行い、頭部回転方向に対するニューロンの発火頻度の変化を調べた。その結果、記録した MVN ニューロンの多くは記録側と同側方向への回転のときに発火頻度を上昇させる反応を示し、そのニューロンのほとんどは 2 相性のスパイク後過分極を示しスパイク間隔がほぼ一定で持続的な発火パターンを示すものであった。このことから、MVN には特定方向への頭部回転に反応するニューロン群が存在することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We investigated the response properties of neurons in the medial vestibular nucleus (MVN) to head rotations using whole-cell recordings in in vivo preparations of rats. Most MVN neurons tested increased the firing frequency in response to the head rotation to the recording side. Furthermore, the neurons showed an afterhyperpolarization with dual components and a repetitive firing pattern with relatively constant interspike intervals. This finding suggests that MVN neurons that show specific intrinsic properties respond to the head rotation to a specific direction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：前庭神経核、眼球運動、膜特性、パッチクランプ、舌下神経前位核

1. 研究開始当初の背景

前庭神経核ではネコやサル of in vivo 標本における細胞外ユニット記録による研究が

古くからなされ、頭部回転や視線の固定、眼球運動などに関連した活動様式を示すニューロン群が明らかにされた。一方で、近年、水平性眼球運動に関与する内側前庭神経核

(medial vestibular nucleus, MVN) を含む脳幹のin vitroスライス標本を用いた研究方法が確立され、MVNには膜特性の異なるニューロン群が存在することが明らかになり、膜特性をもとにしたMVNニューロンの分類が試みられた。フランスのグループを中心に行われた研究では、スパイク後の一過性の過分極(afterhyperpolarization, AHP)の違いをもとに、MVNニューロンはType A、Bの2種類に分類された(Serafin et al., Exp. Brain Res. 84: 417-425, 1991)。申請者らは、ホールセルパッチクランプ記録によりMVNニューロンの膜特性を詳細に調べたところ、AHPのみならず、発火パターンや過分極応答においても分類できることを見出し、この3種類の膜特性をもとにMVNニューロンは多数のサブタイプに分類されることを明らかにした。さらに、記録したニューロンから単一細胞RT-PCR解析を行ったところ、申請者らが提唱した分類方法は神経伝達物質関連マーカーの発現パターンとの対応関係が明確であり、膜特性をもとにした興奮性、抑制性ニューロンの同定が可能となった(Takazawa, Saito et al., J. Neurophysiol 92: 3106-3120, 2004)。

また、研究代表者らは、MVNとともに視線制御に関与する舌下神経前位核(prepositus hypoglossi nucleus, PHN)のニューロン特性についても、ラット脳幹スライス標本においてホールセル記録とRT-PCR法によって調べた結果、スパイクの発生が遅れる発火パターンを示すニューロンの多くがGABA作動性ニューロンであり、スパイク頻度の低い発火パターンを示すニューロンはグルタミン酸作動性ニューロンであることが明らかになった。

このように、MVNやPHNにおけるニューロン特性についての研究が進められているが、一方で、膜特性が明らかになったニューロン群が眼球運動機能においてどのような役割を持つのかについては依然不明のままである。申請者らはこの問題を解決するためにはin vivo標本での研究が不可欠と考え、in vivo標本でのホールセルパッチクランプ記録を行うプロジェクトに着手し、MVNニューロンからのin vivoホールセル記録を世界に先駆けて成功し、MVNニューロンを上記の3種類の膜特性をもとに分類可能であることがin vivo標本においても確認された。(Saito & Ozawa, Neurosci Res 59: 215-223, 2007)。さらに、この知見をもとに、前庭神経核ニューロンの自発発火特性に着目し、膜特性との関係について調べた結果、自発発火の規則性が異なるニューロン群が確認された。さらに、自発発火の規則性は3種類の膜特性のうちAHPのタイプによって異なっており、時間経過の遅いAHPを示すニューロン群において規

則的な自発発火を示し、一方、時間経過の速いAHP、またはスパイク後脱分極を示すニューロン群は不規則な自発発火をすることが明らかになった(Saito et al. Eur. J. Neurosci 28: 288-298, 2008)。

以上のように、申請者らは、これまでの研究において、1) in vitro標本でMVNやPHNニューロンを膜特性をもとにした分類、2) 分類されたニューロンの生化学的特徴による興奮性、抑制性ニューロンの同定、3) in vivo標本におけるMVNニューロンの膜特性、4) MVNニューロンの自発発火特性とAHPのタイプとの関係、について明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究代表者の成果を土台に、MVNやPHNにおける水平性眼球運動、視線制御機構をさらに明らかにするため、

(1) in vivo標本においてMVNニューロンの回転刺激に対する応答特性と膜特性との関係を明らかにする、(2) PHNにおける視線制御に関連した興奮性シナプス伝達様式を明らかにする、(3) 遺伝子改変ラットを用いてPHNの抑制性ニューロンの同定とその特性を明らかにすることを研究目的とする。

(1)では、頭部回転方向(記録側と同側または対側)によって反応選択性の違うニューロンが示されている(Type 1とType 2, Duensing and Schaefer, Arch Psychiatr. Nervenkr. Z. Gesamte Neurol. Psychiatr. 198: 225-252, 1958)ので、頭部回転方向とニューロンの活動様式の違いを検討し、膜特性の異なるニューロン群とType 1またはType 2ニューロンとの関係を明らかにする。

(2)では、PHNでみられる眼球位置情報に比例する持続的な神経活動の生成がどのようなシナプス伝達機構によるものかを、薬理学的研究により明らかにする。(3)については、脊髄や脳幹のスライス標本では、大脳皮質や海馬などと異なり、組織学的、解剖学的手がかりからニューロンの同定が困難である。そこで、抑制性ニューロンがヴィーナスという黄緑色の蛍光分子を発現するトランスジェニックラットを用いて解析を行う。

3. 研究の方法

<in vivo標本での解析>

体重200-300gのラットをイソフルレンにより吸引麻酔し、十分に麻酔が効いた状態で、動脈、静脈血管を確保し、気管切開しカニューレを取り付けた。回転台に取り付けた脳定位固定装置に動物をセットした後、開頭して、デンタルドリルで小脳を覆っている頭蓋を取り除いた。硬膜を切除した後、小脳虫部を

吸引除去し、前庭神経核を露出させた。筋弛緩剤を静脈から投与することで不動化し、人工呼吸器に接続し、低容量、高頻度の換気を行なった。血圧、心拍等をモニターしながらウレタンを腹腔内投与し、その後、イソフルレンの吸引麻酔を停止した。パッチ電極に陽圧をかけながらマニピュレータでMVNへパッチ電極を導入させ、電極抵抗をオシロスコープでモニターしながら、MVNニューロンからギガオームシールを形成させた。そのままの状態（セルアタッチモード）で回転台を回転させ、回転方向に対するニューロンの発火応答を調べた。その後、パッチ内の膜を破ってホールセルモードにし、膜電流固定下において、脱分極性通電に対する活動電位の発生パターン、過分極通電に対する応答を記録することによりそのニューロンの膜特性を調べた。

〈スライス標本を用いた解析〉

生後約3週齢のラットからスライス標本作製し、PHNニューロンからホールセル記録を行ない、ニューロンの近傍に微小ガラス管により一過性のバースト刺激（100 Hz、20パルス）を与えたときの自発性興奮性シナプス後電流（EPSC）の頻度、大きさを調べ、AMPA型またはNMDA型グルタミン酸受容体の阻害剤の投与により頻度や大きさがどのように変わるかを調べた。

トランスジェニックラットを用いた研究では、上記と同じようにスライス標本作製し、蛍光顕微鏡下で蛍光タンパクの発現がみられるニューロンからホールセル記録を行うことで膜特性を明らかにするとともに、RT-PCR法によって記録したニューロンがGABA作動性であるかグリシン作動性であるかを調べた。

4. 研究成果

（1）in vivo 標本におけるMVNニューロンの回転刺激に対する応答特性と膜特性との関係

頭部回転に対する発火頻度の変化をセルアタッチモードで調べたところ、記録したMVNニューロンの多くは記録側と同側方向への回転のときに発火頻度を上昇させるType 1の反応を示した。また、記録側と反対方向への回転時に発火頻度を上昇させるType 2の反応を示すニューロンはわずかながら観察された。さらにホールセル記録によって電流通電に対する応答を調べたところ、Type 1の反応を示すニューロンのうちほとんどは2相性のスパイク後過分極を示すスパイク間隔がほぼ一定で持続的な発火パターンを示すものであった。また、電流通電に対して発火

頻度があまり上昇しない発火パターンを示すニューロンも観察された。これらの特徴を示すニューロンは、我々のこれまでのin vitroの研究により、グルタミン酸作動性ニューロンであることが示されている。一方で、Type 2反応を示すニューロンはホールセル記録を行うことが容易ではなかったため、膜特性の解析には至らなかった。

（2）PHNにおける視線制御に関連した興奮性シナプス伝達様式

PHNニューロンからホールセル記録を行ない、ニューロンの近傍に一過性のバースト刺激を与えたところ、自発性EPSCの頻度が刺激前に比べ増大し、それが数秒間持続される現象を見出した。持続的なEPSC頻度増加を担うシナプス伝達について薬理的に調べた結果、カルシウム透過型AMPA受容体の活性化が重要であることが明らかになった。そこで、カルシウム透過型AMPA受容体をもつニューロンが実際にPHN内に存在するのかを調べるために、記録しているPHNニューロンにカイニン酸を電気泳動により投与し、膜電位を -60 mVと $+40$ mVに保持したときの電流応答比（Rectification Index, RI）を求めた。カルシウム透過型AMPA受容体を持つニューロンのRI値は1以下であることが知られており、解析の結果、半数以上のPHNニューロンにおいてRI値が1以下であった。さらに、ナトリウムを含まずカルシウム濃度を高くした細胞外液中で、PHNニューロンのカイニン酸投与に対する電流応答を調べたところ、RI値が1以下であるニューロンは1以上であるニューロンに比べ、カルシウム透過性が高いことが確認された。さらに選択的阻害剤を用いた薬理的解析によりカルシウム透過型AMPA受容体を介した細胞内のカルシウム上昇はカルシウム依存性非選択的カチオン（CAN）チャネルの活性化を導くことが示唆された。以上の結果から、持続的なEPSC応答は、PHNニューロンが脳幹ニューロンからバースト入力を受けると、カルシウム透過型AMPA受容体が活性化されて細胞内カルシウム濃度の上昇がおこり、CANチャネルが活性化されることによってPHNニューロンに持続的な脱分極が生じた結果、PHN内の興奮性神経回路が持続的に活性化されることによって生じることが示唆された。

（3）遺伝子改変ラットを用いたPHNの抑制性ニューロンの同定とその特性

まず、蛍光を発するニューロンと発しないニューロンのAHPと発火パターンについて調べたところ、蛍光を発するニューロンでは一相性のAHP、スパイクの生成が遅れる発火パ

ターンや発振を示す発火パターンが占める割合が高く、一方、蛍光を発しないニューロンでは二相性のAHPと発火頻度の低いパターンが多く観察された。PHNにはGABA作動性ニューロンのみならずグリシン作動性ニューロンの存在が知られていることから、ホールセル記録後RT-PCR解析を行ったところ、PHNの抑制性ニューロンはGABA作動性ニューロンかGABAとグリシン両方を持つニューロンがほとんどで、グリシン作動性ニューロンが少ないことがわかった。この結果は、GAD67とグリシントランスポーター2のプロンプを用いて行ったin situ hybridization解析によっても支持された。GABA作動性ニューロンとGABAとグリシン両方を持つニューロンとの膜特性の違いを検討したところ、「初めのスパイク間隔が後のスパイク間隔より広い特徴を持つ」発火パターンを示すニューロンのほとんどはGABAとグリシン両方を持つニューロンであることが明らかになった。

そこで、GABAとグリシン両方を持つニューロンに特徴的な初めのスパイク間隔が広い発火パターンのイオンメカニズムを明らかにするため、ラット脳幹スライス標本においてホールセル記録を行い、電気生理学的、薬理的解析を行った。その結果、この発火パターンの生成には減衰の時間経過が遅いA型カリウムチャンネルとT型カルシウムチャンネルや持続性ナトリウムチャンネルの活性化が必要であることが明らかになった。

以上の研究成果によって、MVNの特定の膜特性を示すニューロン群の機能的役割が示され、PHNについては局所興奮性神経回路の存在が明らかになり、また抑制性ニューロンの同定とその特性について明確になった。これらの成果は視線制御のみならずニューロン特性や神経回路特性についての研究全般に大きく貢献するものと考えられる。

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 4 件)

① Saito Y., Shino M, and Yanagawa Y. Characterization of ionic channels underlying the specific firing pattern of a novel neuronal subtype in the rat prepositus hypoglossi nucleus. *Neuroscience Research* 73: 32-41, 2012. 査読有

② Shino M, Kaneko R, Yanagawa Y, Kawaguchi Y, and Saito Y. Electrophysiological characteristics of inhibitory neurons of

the prepositus hypoglossi nucleus as analyzed in Venus-expressing transgenic rats. *Neuroscience* 197: 89-98, 2011. 査読有

③ Saito Y. and Yanagawa Y. Synaptic mechanism for the sustained activation of oculomotor integrator circuits in the rat prepositus hypoglossi nucleus: Contribution of Ca^{2+} -permeable AMPA receptors. *Journal of Neuroscience* 30: 15735-15746, 2010. 査読有

④ Wang Y., Kakizaki T., Sakagami H., Saito K., Ebihara S., Kato M., Hirabayashi M., Saito Y., Furuya N., and Yanagawa Y. Fluorescent labeling of both GABAergic and glycinergic neurons in VGAT-Venus transgenic mouse. *Neuroscience* 164: 1031-1043, 2009. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

① Saito Y. and Yanagawa Y. Activation of ryanodine receptors control spontaneous discharge of inhibitory neurons in the rat prepositus hypoglossi nucleus. 北米神経科学学会 2011年11月16日、Washington D.C. (USA)

② Saito Y. and Yanagawa Y. Spontaneous outward currents expressed preferentially in inhibitory neurons in the rat prepositus hypoglossi nucleus. 第34回日本神経科学大会 2011年9月16日、横浜

③ Shino M, Kaneko R, Yanagawa Y, and Saito Y. Electrophysiological properties of inhibitory neurons in prepositus hypoglossi nucleus in the vesicular GABA transporter (VGAT)-Venus transgenic rats. XVIIIth International Workshop on Genetic Systems in the Rat, 2010年12月1日、京都

④ Saito Y. and Yanagawa Y. Expression of Ca^{2+} -permeable AMPA receptors in rat prepositus hypoglossi nucleus neurons. Neuro2010 2010年9月4日、神戸

⑤ Saito Y., Shino M, and Yanagawa Y (2009) Local excitatory network in rat prepositus hypoglossi nucleus. 第32回日本神経科学大会 2009年9月17日、名古屋

⑥ Saito Y., Shino M, and Yanagawa Y Contribution of Ca^{2+} -permeable AMPA receptor to activation of excitatory

network in prepositus hypoglossi nucleus.
XXXIV International Congress of
Physiological Sciences (IUPS 2009)
2009年7月29日、京都

[その他]
ホームページ等

http://genbehavneuro.dept.med.gunma-u.ac.jp/Yanagawa_Lab/Home.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 康彦 (SAITO YASUHIKO)
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：70290913

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし