

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31日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300148

研究課題名（和文） 視覚系における初期情報処理機構の研究

研究課題名（英文） Neural mechanisms in early visual information processing

研究代表者

立花 政夫（TACHIBANA MASAO）

東京大学・大学院人文社会系研究科・教授

研究者番号：60132734

研究成果の概要（和文）：

網膜における視覚情報処理機構を検討した。第2次ニューロンである双極細胞は同じサブタイプの双極細胞と樹状突起間でギャップ結合を介して電氣的に結合していた。また、双極細胞の軸索終末部にはアマクリン細胞を介する反回性の局所抑制入力と広い領域からの側抑制入力があった。いずれの入力も同じ化学伝達物質を介していたが、シナプス伝達特性は異なっていた。側抑制の活性化には電氣的に結合した双極細胞群の興奮が必須であった。

研究成果の概要（英文）：

We examined the visual information processing in the retina. Bipolar cells, the second order neurons, were electrically coupled with each other through gap junctions at their dendrites. At the axon terminal these cells received reciprocal inhibitory inputs and wide-field lateral inhibitory inputs from amacrine cells. Both inputs were GABAergic but their synaptic properties were different. Excitation of electrically-coupled multiple bipolar cells was essential for the activation of lateral inhibition.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

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：神経科学、生理学、脳・神経、シグナル伝達、視覚、網膜、電気シナプス、抑制性シナプス

1. 研究開始当初の背景

網膜は、大量の光情報を各種の神経回路網（輝度・色・動きなどを検出するフィルター群）で並列的に処理し、複数の視覚中枢にそ

れぞれ対応する情報を送るといった特徴がある。眼球の角膜やレンズといった光学系によって網膜上に投影された光パターンは2次元的に配列された視細胞群によって受容さ

れ、各種介在ニューロンによる情報処理を経た後、出力細胞である神経節細胞でスパイク列に変換され、視神経を介して脳の視覚中枢に送られる。脳のニューロンとは異なり、網膜の視細胞や介在ニューロンはナトリウムスパイクによる情報伝達を行わず、緩電位やそれに重畳した持続時間の長いスパイクによるアナログ的な情報伝達を行う。したがって、網膜では、各種の視覚情報処理に適した神経回路網が構築され、そこでのシナプス伝達特性も最適化されていると考えられる。

最近、申請者らは、視細胞からの入力を受けとる第2次ニューロンの双極細胞に直接電流を注入して数十ミリ秒間脱分極させると、シナプス後ニューロンである神経節細胞が数百ミリ秒にもわたって興奮することを見出した。予備的な実験から、この現象は網膜外網状層において、双極細胞の樹状突起間に電気シナプスが形成されているためであることが示唆された。しかし、このようなシナプス機構が、網膜における視覚情報処理に果たす機能に関しては不明であった。

2. 研究の目的

網膜外網状層における双極細胞間の電気シナプスが内網状層における視覚情報処理にどのように関与しているのかを解析すると共に、内網状層におけるアマクリン細胞の働きを明らかにすることを目的とする。

具体的には、(1) 双極細胞間の電気シナプス特性の解析、(2) 双極細胞に対する局所的・大域的抑制性入力の解析、(3) 動きの検出に関与する網膜内神経回路網の検索、を行う。

3. 研究の方法

実験には、成熟キンギョの網膜スライス標本及び剥離網膜標本を用いた。パッチクランプ法を適用して、双極細胞（巨大な軸索終末部を持つ Mb1 型双極細胞）ペアからの同時記録を行った。

また、動きの検出に関与する網膜内神経回路網を検索するために、越シナプス性トレーサー（狂犬病ウイルス）や蛍光トレーサーをラットの視覚中枢（medial terminal nucleus 等）に注入して逆行性に網膜神経細胞を標識し、オン型方向選択性に関与する網膜神経節細胞とアマクリン細胞を同定し、これらの神経細胞の性質を解析した。

4. 研究成果

(1) 双極細胞間の電気シナプス特性の解析

キンギョ網膜の Mb1 型双極細胞にホールセルクランプ法を適用して双極細胞間のギャップ結合の機能を検討した。

その結果、①Mb1 型双極細胞同士は樹状突起間でギャップ結合していること（図 1、2）、

②ギャップ結合には整流性や電位依存性はなく、ローパスフィルタの特性を示すこと、③比較的近距离にある Mb1 型双極細胞同士は膜電位変動が同期しており、ノイズの低減に貢献していること、④脱分極性電流を Mb1 型双極細胞に注入すると軸索終末部で Ca スパイクが発生し、ギャップ結合した隣接の Mb1 型双極細胞を電気緊張性に脱分極させ、約 10 ms の遅延後に軸索終末部に Ca スパイクを発生させること、⑤Mb1 型双極細胞に短い脱分極パルスを与えると神経節細胞から時間経過の非常に長い興奮性シナプス後電流が誘発されるが、ギャップ結合の阻害剤を投与すると短縮されること、⑥この長い興奮性シナプス後電流は、Mb1 型双極細胞間のギャップ結合を介した電氣的ネットワークを Ca スパイクが遅延を伴いながら波及していくことによって生成されること、がわかった。したがって、ギャップ結合を介して電氣的に結合している Mb1 型双極細胞ネットワークは、膜電位変動の同期やノイズの低減に寄与するのみならず、Ca スパイクを介した側方情報伝達にも関与していると結論した。

これまで脳・神経系の様々な部位でギャップ結合の存在が報告されている。しかし、神経細胞の突起間における小面積のギャップ結合がどのような機能的意味を持っているのかについては、ノイズの低減や細胞間での同期の発生といった、受動的な機能しか考えられていなかった。本研究は、小面積のギャップ結合でも、各神経細胞の能動的な性質（例えば持続時間の長い Ca スパイクの発生）によって、広範囲にわたる積極的な情報伝達が行われることを明らかにした。

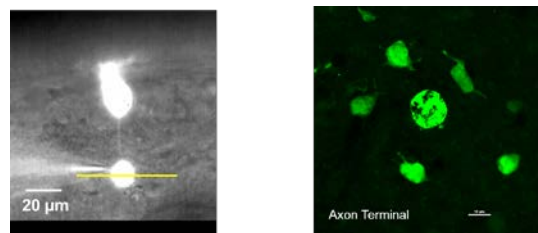


図 1. キンギョ網膜の Mb1 型双極細胞。(左) 網膜スライス標本で Mb1 型双極細胞の軸索終末部にあつたパッチ電極（左側に円錐状に見えるもの）から Lucifer yellow を注入した。この蛍光色素は、負に荷電し分子量が大きいためギャップ結合を通過できず、隣接する Mb1 型双極細胞には拡散しない。蛍光顕微鏡画像。(右) 剥離網膜標本で 1 個の Mb1 型双極細胞の軸索終末部に分子量の小さな neurobiotin を注入すると樹状突起間のギャップ結合を介して周辺の Mb1 型双極細胞の軸索終末部にも拡散した。軸索終末部が位置する内網状層（左図の黄色線のレベル）における共焦点顕微鏡画像。

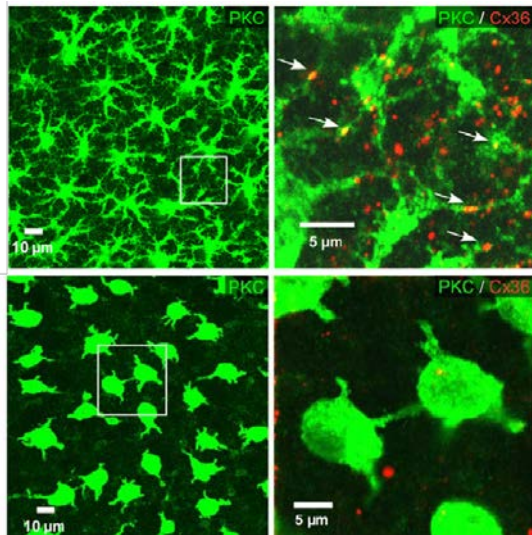


図2. ギャップ結合はMb1型双極細胞の樹状突起に存在する。キンギョ網膜のホールマウント標本を、PKC α の抗体と connexin (Cx) 35/36の抗体で処理し、それぞれ蛍光性のAlexa488(緑)とCy3(赤)で可視化し、共焦点顕微鏡で観察した。

(上図) Mb1型双極細胞の樹状突起画像(左)。白い四角の内部を拡大すると、一部の樹状突起間の接合部にCx35/36の信号が重なっていた(右)。

(下図) Mb1型双極細胞の軸索終末部の画像(左)。白い四角の内部を拡大したが、軸索終末部から延びているプロセス間にはCx35/36の信号は重なっていなかった(右)。

(2) 双極細胞に対する局所的・大域的抑制性入力への解析

キンギョ網膜のMb1型双極細胞の軸索終末部には、シナプスリボン近傍にアマクリン細胞との間に反回性相互シナプスがあり、また、シナプスリボンからやや離れた部位にアマクリン細胞からの通常型抑制性シナプス入力が存在する。そこで、網膜スライス標本にホールセルクランプ法を適用して、Mb1型双極細胞の細胞体から標本作成時に離断された軸索終末部や、外網状層において樹状突起が電気的ネットワークで結合されているMb1型双極細胞の軸索終末部から記録を行った。

その結果、①軸索終末部には局所的で速い抑制性シナプス入力と大域的で時間遅れのある抑制性シナプス入力のあること、②いずれもGABA作動性であり、グリシン作動性ではないこと、③両者のシナプスでは、GABA受容体のサブタイプや性質が異なること、④大域的抑制(=側抑制)はギャップ結合の阻害剤によって消失すること、⑤軸索終末部に注入したケージドCaをUV光で解裂させて1個のMb1型双極細胞のみからグルタミン酸を放出させた場合は局所抑制のみが活性化され側抑制は活性化されないこと等、が明らかとなった。したがって、局所入力シナプスリボン近傍にあるアマクリン細胞との反回

性相互シナプスを介しており、一方、大域的抑制は多数のMb1型双極細胞からの入力を受けるアマクリン細胞を介す通常型抑制性シナプス入力であり、内網状層における側抑制を構成していると考えられる(図3)。

従来、広い受容野を持つアマクリン細胞や電気的に結合したアマクリン細胞が側抑制に関与しているのではないかと考えられていたが、本研究は、電気的に結合した双極細胞が内網状層における側抑制に関与していることを初めて明らかにした。今後は、双極細胞軸索終末部への2種類の抑制入力があるような機能を担っているのかを明らかにするために、モデルを構築しコンピュータシミュレーションを行う予定である。

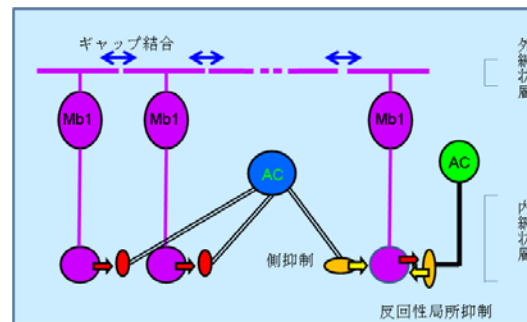


図3. キンギョ網膜の外網状層におけるMb1型双極細胞(Mb1)間のギャップ結合と内網状層における2種類の抑制性入力(側抑制と反回性局所抑制)。アマクリン細胞(AC)はMb1からグルタミン酸作動性の興奮性入力を受け取り、GABA作動性シナプスを介してMb1に抑制をかける。

(3) 運動の検出に關与する網膜内神経回路網の検索

キンギョの剥離網膜標本にパッチクランプ法を適用して神経節細胞の光応答特性と細胞形態との対応関係を調べた。

その結果、①神経節細胞の形態、光応答、電流刺激に対するスパイク発火応答との間に、明確な対応関係を見いだすには至らなかったこと、②受容野サイズと樹状突起の広がる面積との間には高い相関があり、とりわけ円形から外れた樹状突起をフェレ径(射影幅)で記述すると両者の相関は0.97と極めて高くなること、③動くバー刺激に対する応答から、運動方向選択性や運動方位選択性を示す神経節細胞が存在すること(図4)、が明らかとなった。

神経節細胞には数多くのサブタイプがあるので、今後は、それぞれがどのような特徴抽出を行っているのかを明らかにするために、最適光刺激の検討や古典的受容野概念の再検討が必要である。

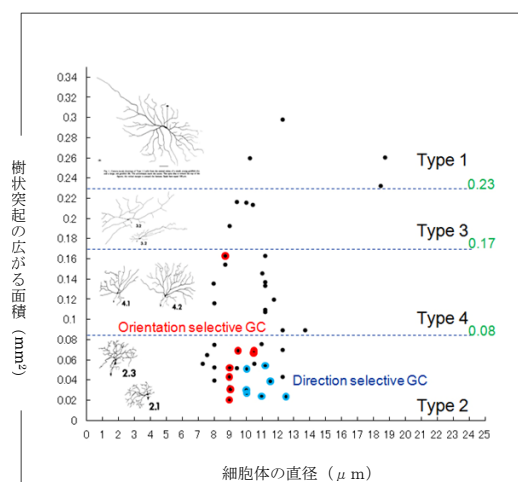


図4. 神経節細胞の細胞体の直径(円換算した直径)、樹状突起の広がる面積、特徴的な光応答との関係。Type 1からType 4は、Hitchcock (1987)、Hitchcock (1989)、Hitchcock and Easter (1986) の分類に依拠した。左側に代表的な細胞形態を示す。図中の黒点は記録した神経節細胞のデータを示す。それらのうちで赤丸は方位選択性神経節細胞を、青丸は方向選択性神経節細胞を示す。

運動方向選択性を示す神経節細胞にはON-OFF型とON型が存在する。ON-OFF型ではスターバーストアマクリン細胞が関与していることが明らかにされているが、ON型に関しては関与するアマクリン細胞のサブタイプが明確ではない。哺乳類ではON型運動方向選択性神経節細胞は3つの終止核(medial, dorsal, and lateral terminal nuclei: MTN, DTN, LTN)に投射することが知られている。そこで、ON型運動方向選択性神経節細胞がどの種類のアマクリン細胞とシナプス結合しているのかを、ラットのMTNに越シナプス性トレーサー(狂犬病ウイルス)や蛍光色素を注入し、ラベルされた網膜細胞を形態学的に検討した。

その結果、①標識された神経節細胞はON型運動方向選択性を示すこと、②越シナプス性にラベルされたアマクリン細胞は、スターバーストアマクリン細胞以外のGABA作動性アマクリン細胞も関与している可能性のあること、がわかった。そこで、GABA作動性ニューロンが選択的に標識されたVGAT-Venusラットを用いて、神経節細胞層に細胞体が異所的に存在するGABA作動性アマクリン細胞の光応答を調べた。今後は、これらのアマクリン細胞とON型方向選択性神経節細胞とのシナプス結合を詳細に解析する予定である。

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1件)

- ① Itaru Arai, Masashi Tanaka, Masao

Tachibana (2010) Active roles of electrically coupled bipolar cell network in the adult retina, The Journal of Neuroscience, 査読有, 30 (27): 9260-9270.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.1590-10.2010

[学会発表] (計6件)

- ① Masao Tachibana, Functional significance of gap junctions among retinal bipolar cells, IUPS2009, 平成21年7月29日, 国立京都国際会館(京都府)
- ② Masao Tachibana, Synaptic transmission from bipolar cells to ganglion cells in the goldfish retina, Workshop "Active Zones as Organizers of Neuronal Communication", 平成21年9月23日, Baeza, Spain
- ③ 立花 政夫, 網膜における情報処理と逃避行動, 日本基礎心理学会, 平成21年12月6日, 日本女子大学目白キャンパス(東京都)
- ④ Masao Tachibana, Reciprocal and lateral inhibitory inputs at the axon terminal of goldfish retinal bipolar cells, 5th Asia and Oceania Conference for Photobiology, 平成23年8月1日, 奈良県立新公会堂(奈良県)
- ⑤ Masao Tachibana, Itaru Arai, Masashi Tanaka, Lateral inhibition through electrically-coupled bipolar-cell network in the retina, 第34回日本神経科学大会(日本・中国神経科学学会合同シンポジウム) 平成23年9月15日, パシフィコ横浜(神奈川県)
- ⑥ Tanaka Masashi, Masao Tachibana, Local and global inhibition at the axon terminal of goldfish retinal bipolar cells. 第34回日本神経科学大会, 平成23年9月16日, パシフィコ横浜(神奈川県)

[その他]

ホームページ等

<http://www.l.u-tokyo.ac.jp/psy/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立花 政夫 (TACHIBANA MASAO)

東京大学・大学院人文社会系研究科・教授

研究者番号: 60132734

(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：