

機関番号：12601
 研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21700428
 研究課題名 (和文) *In vivo* パッチクランプ法と2光子観察による発達期シナプス刈り込み機能の
 解明
 研究課題名 (英文) The elucidation of developmental synaptic elimination mechanisms
 using *in vivo* patch-clamp methods and two-photon imaging
 研究代表者
 河村 吉信 (KAWAMURA YOSHINOBU)
 東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員
 研究者番号：30397179

研究成果の概要 (和文)：

中枢神経系の機能的な神経回路網は、発達初期の一過性の過剰シナプス結合の形成、その後、神経活動依存的に必要な結合の強化、不必要な結合の弱化・除去の過程を経て、形成される (シナプス刈り込み)。本課題では、発達期小脳登上線維-プルキンエ細胞シナプスを対象にし、どのような神経活動パターンがシナプス刈り込みに関わるか、*In vivo* パッチクランプ法と2光子観察を用いて検討した。複数登上線維シナプスの同期入力で発生するバースト発火が細胞内カルシウム上昇を引き起こすこと、このバースト発火の直前に入力するシナプスの強度が選択的に発達に伴い、増強することを明らかとした。

研究成果の概要 (英文)：

Development of functional neuronal circuits involves initial formation of supernumerary synaptic connections followed by strengthening of necessary synapses and elimination of redundant ones in early postnatal life. How neuronal activity contributes to this developmental process still remains unknown. We examined activities of Climbing-fiber (CF)-Purkinje cell (PC) synapses in intact cerebellum of developing rat by *in vivo* whole-cell recordings and two-photon Ca^{2+} imaging. We found that burst spiking (BS) of immature PC required summation of multiple CF inputs. Importantly the CF-EPSP just before the BS onset was selectively strengthened during postnatal development. Since BS elicited Ca^{2+} transients in PCs, the CF-EPSP synchronous to the BS-induced Ca^{2+} rise appeared to be potentiated. Thus, spike timing-dependent mechanisms involving synchronous CF inputs and postsynaptic Ca^{2+} elevation appear to underlie the selection of single CFs and the establishment of mature CF-PC connections in individual PCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：神経科学、脳・神経、小脳、プルキンエ細胞、登上線維、発達、シナプス、*in vivo*

1. 研究開始当初の背景

生後発達期中枢神経系では、初期に一過性に過剰なシナプス結合が形成され、その後、神経活動依存的に必要な結合は強化され、不必要な結合は弱化、および除去される（シナプスの刈り込み）。このような過程を経て適正な機能的神経回路網が形成されると考えられている。これまで、実際の脳においてどのような神経活動パターンがこのシナプスの刈り込みを誘導する活動実態であるかはほとんどわかっていなかった。小脳プルキンエ細胞は生後発達初期において、複数の登上線維と結合しているが、発達に伴い、必要な結合の強化、不必要な結合の除去が起き、最終的に一本の結合のみが残る。また、この過程を観察する手法が電気生理学的、もしくは、形態学的解析により詳細に解析されてきた。この発達段階は、1) 生後の一週間までに、最終的に残る登上線維がそれ以外の線維よりも結合強度が増す、“機能的な分離期”、2) その後の不必要な結合の弱化、除去の過程が、関わる分子の違いにより前期、3) 後期に分けられている。このように、発達段階が詳細に記述され、分子生物学的な技術の発達に伴い、この神経回路網の発達に関わる分子の実体が明らかになる一方で、各発達段階を誘導している活動実態はほとんどわかっていなかった。このような活動実体が明らかされてこなかった理由として、生きている動物(*in vivo*)から神経細胞の活動を記録する方法が確立されていなかったことがあげられる。従来の古典的な電気生理学的な方法と

して、細胞外電位記録や、微小電極を用いた細胞内電位記録があるが、どちらも、記録の安定性や精度、さらに、細胞へのダメージといった点で詳細な解析が困難であった。しかし、近年に急性脳切片標本で多く適用されてきたホールセルパッチクランプ法が、生きている動物の神経細胞に適用できることが報告され、神経細胞の詳細な電気活動を長時間、安定して記録できることが示された(*in vivo* ホールセルパッチクランプ法)。さらに、二光子励起レーザー顕微鏡と *in vivo* ホールセルパッチクランプ法を組み合わせることで、単一細胞の形態イメージングやカルシウム蛍光指示薬を用いた、細胞内カルシウムイメージングも、同時に行える技術が確立されてきた。これらの方法を生後発達期の動物に適用することで、神経回路発達の各段階を追って、どのように神経活動が変化していくかを詳細に観察することが可能であると考えられた。研究代表者は、本研究課題開始以前に、発達期の麻酔下ラットにおける、小脳プルキンエ細胞から、*in vivo* ホールセルパッチクランプ法によって電気活動を計測する技術を確立させた。

2. 研究の目的

生後発達期における、生きている動物の小脳プルキンエ細胞の電氣的な活動、および細胞内カルシウム動態を、発達段階を追って記録・解析し、シナプスの刈り込みに関わる神経活動実態を明らかとする。

3. 研究の方法

生きている動物の単一神経細胞から電氣的な記録をするために *in vivo* ホールセルパッチクランプ法を生後4日から17日齢の麻酔下ラット小脳プルキンエ細胞に適用した。また、単一細胞のカルシウム動態を観察するために二光子励起レーザー顕微鏡と *in vivo* ホールセルパッチクランプ法を組み合わせた。

4. 研究成果

(1) 複数の登上線維支配をうける発達期小脳における単一プルキンエ細胞から自発的、および、感覚入力依存的な電気活動を記録することを確立させた。これによって、この生後発達期のプルキンエ細胞に複数のシナプスが同期的に入力することを明らかとした。また、この同期的な入力によってプルキンエ細胞がバースト発火を引き起こすことが明らかになった。ここで、登上線維の起始細胞の下オリーブ核細胞の活動を亢進する薬剤である、“ハルマリン”の腹腔投与が、この同期的な入力活動を増強した。これは、同期的な入力活動が複数登上線維シナプス伝達に起因することを示した。

(2) 二光子励起レーザー顕微鏡とホールセルパッチクランプ法を組み合わせる実験を、生後発達期の幼若期のラットに適用する実験を確立させた。パッチ電極にカルシウム蛍光指示薬を含んだ細胞内液を充填し、二光子顕微鏡によって、プルキンエ細胞を同定して、パッチクランプ法が適用できる。この方法によって、複数登上線維シナプスの同期入力で発生バースト発火が細胞内カルシウム上昇を引き起こすことを明らかにした。これは複

数登上線維の同期入力によってシナプスの刈り込みが誘導されることを支持している。

(3) 電流固定下で記録できる、シナプス電位と、同一細胞から膜電位固定下で記録できる、シナプス電流を詳細に解析したところ、複数登上線維の入力の強度と入力のタイミングに法則性があることを見出した。複数登上線維の同期的な入力で引き起こされたバースト発火の前に入力するシナプス応答の強度とバースト発火からの入力タイミングは負の相関を示した。さらに、バースト発火の直前に入力するシナプスの強度が選択的に発達を追って増強することを明らかとした。これは、タイミング依存的なシナプス可塑性が登上線維シナプスの発達を促すメカニズムであることを支持する重要な知見である。

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)

[学会発表] (計 1件)

河村吉信、ANALYSIS OF CLIMBING FIBER INPUTS TO PURKINJE CELLS IN THE DEVELOPING RAT CEREBELLUM *IN VIVO*、36TH International Congress of Physiological Sciences、平成21年7月27日、京都府 国立京都国際会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河村 吉信 (KAWAMURA YOSHINOBU)

東京大学・大学院医学系研究科・特任研究
員

研究者番号：30397179

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし