

## 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 25 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300125

研究課題名（和文） シナプス前細胞の生後発達がシナプス結合の再編成に与える影響

研究課題名（英文） Roles of maturation of presynaptic functions in the postnatal refinement of neuronal circuits.

## 研究代表者

橋本 浩一 (Kouichi Hashimoto)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：00303272

## 研究成果の概要（和文）：

下オリーブ核神経回路の電気生理学的特性の生後発達変化を解析した。下オリーブ核ニューロンに脱分極性・過分極性の刺激を与え、活動電位の発生と入力抵抗の生後発達変化を解析した。その結果、生後 7 日～15 日にかけて活動電位閾値の増大と、入力抵抗の低下が起こることが分かった。この変化は、下オリーブ核ニューロン間における gap junction の形成と同時期に起こったため、gap junction の形成による膜特性の変化を反映するものであることが示唆される。また、下オリーブ核細胞の特徴である、閾値下の周期的膜電位揺動（subthreshold oscillation, STO）の生後発達変化の解析も行った。生後 7 日齢の下オリーブ核ニューロンは STO を示さないが、生後 10 日前後から STO を示す細胞が増加する傾向があることが分かった。これらの結果は、成熟動物の下オリーブ核ニューロンを特徴づける電気生理学的特性は、生後 7 日から 15 日にかけて獲得されることを示している。

## 研究成果の概要（英文）：

Postnatal changes of electrophysiological properties of inferior olivary (IO) neurons are examined by the patch clamp recording using slices prepared from mouse medulla. The threshold of action potential was increased and input resistance was decreased from postnatal day 7 (P7) to P15. These developmental changes proceeded coincident with the formation of the gap junction. Moreover, the subthreshold oscillation also started during this postnatal period. These results suggest that IO neurons gain their adult type membrane properties from P7 to P15.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2011 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2012 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：脳神経科学 神経・筋肉生理学

キーワード：ニューロン・シナプス・神経回路

## 1. 研究開始当初の背景

成熟動物のプルキンエ細胞は、ほとんどが一本の登上線維により支配されているが、誕生直後のプルキンエ細胞は複数の弱い登上線維により多重支配されている。生後発達に伴いプルキンエ細胞を支配する登上線維の数が減少し、マウスでは生後3週目までに一本支配に移行する。

シナプスの刈り込みは神経活動依存的であるため、登上線維の起始核である、下オリーブ核神経回路の成熟に伴う活動パターンの生後変化が、登上線維の発達に影響を与えている可能性が考えられる。しかし、これまでの登上線維刈り込みの研究は、ほとんどが登上線維とプルキンエ細胞のシナプス部位で行われているため、下オリーブ核の神経回路の発達と、登上線維-プルキンエ細胞シナプスの刈り込みを統合的に解析した研究はいまだなされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、下オリーブ核神経回路と、その活動パターンの生後発達変化を明らかにする。

## 3. 研究の方法

延髄のスライスを作成し、スライス上の下オリーブ核ニューロンからホールセル法で電気記録をおこなった。生後日齢を変えて同様の解析を行い、生後発達に伴う電気生理学的特性の変化を解析した。

## 4. 研究成果

下オリーブ核ニューロンに脱分極刺激を与え、発生した活動電位の生後発達変化を解析したところ、生後7日から15日にかけて振幅は徐々に増大するが、閾値が高くなることが分かった。活動電位の持続時間は全体的に短くなる傾向があった。

また、下オリーブ核細胞の特徴である、閾値下の周期的膜電位揺動 (Subthreshold oscillation, STO) の生後発達変化の解析も行った。現在の所、生後7日齢の下オリーブ核ニューロンはSTOを示さないが、生後10日前後からSTOを示す細胞が増加する傾向があることが明らかになってきている。

さらに、Gap junctionを通過する蛍光指示薬を電極内液に加えてパッチクランプを行い、神経細胞間のGap junctionの形成過程を調べた。その結果、生後7日前後では、神経細胞間にGap junctionはほとんど形成されていないが、生後10日目前後からGap junctionの形成が始まること分かった。

## 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9件)

1. Uesaka, N., Mikuni, T., Hashimoto, K., Hirai, H., Sakimura, K. & Kano, M. Organotypic Coculture Preparation for the Study of Developmental Synapse Elimination in Mammalian Brain. *J Neurosci.* 32, 11657-11670 (2012) 査読有
2. Tanimura, A., Uchigashima, M., Yamazaki, M., Uesaka, N., Mikuni, T., Abe, M., Hashimoto, K., Watanabe, M., Sakimura, K. & Kano, M. Synapse type-independent degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol after retrograde synaptic suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109, 12195-12200 (2012) 査読有
3. Nakayama, H., Miyazaki, T., Kitamura, K., Hashimoto, K., Yanagawa, Y., Obata, K., Sakimura, K., Watanabe, M. & Kano, M. GABAergic inhibition regulates developmental synapse elimination in the cerebellum. *Neuron* 74, 384-396 (2012) 査読有
4. Miyazaki, T., Yamasaki, M., Hashimoto, K., Yamazaki, M., Abe, M., Usui, H., Kano, M., Sakimura, K. & Watanabe, M. Cav2.1 in cerebellar Purkinje cells regulates competitive excitatory synaptic wiring, cell survival, and cerebellar biochemical compartmentalization. *J. Neurosci.* 32, 1311-1328 (2012) 査読有
5. Kano, M., Hashimoto, K. Activity-Dependent Maturation of Climbing Fiber to Purkinje Cell Synapses during Postnatal Cerebellar Development. *Cerebellum.* 11, 449-450 (2012) 査読有
6. Ichikawa, R., Yamasaki, M., Miyazaki, T., Konno, K., Hashimoto, K., Tatsumi, H., Inoue, Y., Kano, M. & Watanabe, M. Developmental switching of perisomatic innervation from climbing fibers to Basket cell fibers in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci.*

31, 16916-16927 (2011) 査読有

7. Hashimoto, K., Tsujita, M., Miyazaki, T., Kitamura, K., Yamazaki, M., Shin, H.S., Watanabe, M., Sakimura, K. & Kano, M Postsynaptic P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels in cerebellar Purkinje cells mediate synaptic competition among multiple climbing fiber inputs during postnatal development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 108, 9987-9992 (2011) 査読有
8. Miyata, M., Kishimoto, Y., Tanaka, M., Hashimoto, K., Hirashima, N., Murata, Y., Kano, M. & Takagishi, Y. A Role for Myosin Va in Cerebellar Plasticity and Motor Learning: A Possible Mechanism Underlying Neurological Disorder in Myosin Va Disease. J Neurosci. 31, 6067-6078 (2011) 査読有
9. Yamazaki, M., Fukaya, M., Hashimoto, K., Yamasaki, M., Tsujita, M., Itakura, M., Abe, M., Natsume, R., Takahashi, M., Kano, M., Sakimura, K. & Watanabe, M. TARPs  $\gamma$ -2 and  $\gamma$ -7 are essential for AMPA receptor expression in the cerebellum. Eur. J. Neurosci. 31, 2204-2220 (2010) 査読有

[学会発表] (計 16 件)

1. K. Hashimoto: 「Postnatal refinement of the cerebellar climbing fiber to Purkinje cell synapse」、第 90 回 日本生理学会、2013 年 3 月 27 日～29 日、東京
2. 川田 慎也、橋本 浩一、山崎 真弥、宮崎 太輔、山崎美和子、三國貴康、渡辺 雅彦、崎村 健司、狩野 方伸：「小脳登上線維-プルキンエ細胞シナプスの発達において競合する登上線維間の相対的な強度の差と登上線維の絶対的な強度がそれぞれ異なる段階に寄与している」、第 90 回日本生理学会大会、2013 年 3 月 27 日～29 日、東京
3. Tanimura A., Uchigashima M., Yamazaki M., Uesaka N., Mikuni T., Hashimoto K., Watanabe M., Sakimura K., Kano M. : 「 Synapse type-independent degradation of 2-arachidonoylglycerol after

retrograde synaptic suppression in the cerebellum.」、Annual meetnig of Society for Neuroscience, Oct. 13-17, 2012, New Orleans, USA

4. 川田慎也、橋本浩一、山崎真弥、宮崎太輔、渡辺雅彦、崎村健司、狩野方伸：「小脳プルキンエ細胞特異的 $\gamma$ 2 ノックアウトマウスにおける登上線維の刈り込み及び樹状突起への伸展の異常」、第 35 回日本神経科学学会大会、2012 年 9 月 18 日～21 日、名古屋
5. 中山寿子、宮崎太輔、橋本浩一、柳川右千夫、小幡邦彦、崎村建司、渡辺雅彦、狩野方伸：「発達期小脳登上線維-プルキンエ細胞間シナプス除去への抑制性シナプス伝達の関与」、第 63 回 日本生理学会中国四国地方会、2011 年 10 月 23 日、広島
6. 谷村あさみ、山崎真弥、内が島基政、上阪直史、三國貴康、橋本浩一、渡辺雅彦、崎村建司、狩野方伸：「2-アラキドノイルグリセロールリパーゼは小脳皮質においてシナプス非特異的に分解される」、第 34 回 日本神経科学学会大会、2011 年 9 月 15 日、横浜
7. 橋本浩一、辻田実加、宮崎太輔、喜多村和郎、山崎真弥、Shin Hee-sup、渡辺雅彦、崎村建司、狩野方伸：「登上線維の生後発達における P/Q 型電位依存性カルシウムチャネルの役割」、第 34 回 日本神経科学学会大会、2011 年 9 月 17 日、横浜
8. 橋本浩一：「プルキンエ細胞選択的 Cav2.1 (P/Q 型電位依存性カルシウムチャネル) ノックアウトマウスにおける登上線維-プルキンエ細胞シナプスの生後発達過程の異常」、包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 夏のワークショップ、2011 年 8 月 21 日(日)～24 日、神戸
9. 橋本浩一：「生後発達期小脳における神経回路の再編成」、包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 夏のワークショップ、2011 年 8 月 21 日(日)～24 日、神戸
10. 橋本 浩一、辻田 実加、喜多村 和郎、宮崎 太輔、山崎 真弥、Hee-Sup Shin、渡辺 雅彦、崎村 建司、狩野 方伸：「登上線維の発達過程における P/Q 型電位依存性カルシウムチャネルの役割」、第 33

回日本神経科学大会、第 53 回日本神経化学会大会および第 20 回日本神経回路学会大会、2010 年 9 月 2 日～9 月 4 日、神戸

11. Yamazaki M, Fukaya M, Hashimoto K, Yamasaki M, Itakura M, Takahashi M, Kano M, Watanabe M, Sakimura K: 「TARPs  $\gamma$ -2 and  $\gamma$ -7 are functional components of cerebellar AMPA receptor.」、第 33 回日本神経科学大会、第 53 回日本神経化学会大会および第 20 回日本神経回路学会大会 合同大会、2010 年 9 月 2 日～4 日、神戸
12. Abe M, Hashimoto K, Miyazaki T, Azechi H, Natsume R, Watanabe M, Kano M, Sakimura K: 「Analysis of physiological functions of cerebellar AMPA receptor subunits using a Purkinje cell-selective gene targeting system.」、第 33 回日本神経科学大会、第 53 回日本神経化学会大会および第 20 回日本神経回路学会大会 合同大会、2010 年 9 月 2 日～4 日、神戸
13. Tanimura A, Yamazaki M, Hashimotodani Y, Uchigashima M, Kawata S, Abe M, Kita Y, Hashimoto K, Shimizu T, Watanabe M, Sakimura K, Kano M : 「2-Arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase  $\alpha$  mediates retrograde suppression of synaptic transmission in the CNS.」、第 33 回日本神経科学大会、第 53 回日本神経化学会大会および第 20 回日本神経回路学会大会 合同大会、2010 年 9 月 2 日～4 日、神戸
14. Yamazaki M, Fukaya M, Hashimoto K, Kano M, Watanabe M, Sakimura K : 「 Transmembrane AMPA receptor regulatory protein gamma-2 and gamma-7 are essential for cerebellar AMPA receptor complex.」、7th FENS forum of European Neuroscience、July 3-7, 2010、Amsterdam, Netherlands
15. Tanimura A, Yamazaki M, Hashimotodani Y, Uchigashima M, Kawata S, Abe M, Kita Y, Hashimoto K, Shimizu T, Watanabe M, Sakimura K, Kano M : 「 Retrograde synaptic suppression in the cerebellum, hippocampus and striatum is mediated by 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase alpha.」、7th FENS forum of European

Neuroscience、July 3-7, 2010、Amsterdam, Netherlands

16. 橋本 浩一、辻田 実加、宮崎 太輔、山崎 真弥、喜多村 和郎、Hee-Sup Shin、渡辺 雅彦、崎村 建司、狩野 方伸: 「小脳登上線維-プルキンエ細胞シナプスの生後発達における P/Q 型電位依存性カルシウムチャネルの役割」、第 87 回 日本生理学会大会、2010 年 5 月 21 日、盛岡

[その他]

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/physiol2/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橋本 浩一 (Kouichi Hashimoto)  
広島大学・医歯薬保健学研究院・教授  
研究者番号：00303272

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：