

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700398

研究課題名(和文) In vivoパッチクランプ法による発達期シナプス刈り込みに関わる活動実態の解明

研究課題名(英文) The elucidation of actual activity related to developmental synapse elimination using in vivo patch-clamp method

研究代表者

河村 吉信 (Kawamura, Yoshinobu)

広島大学・医歯薬保健学研究院・特任助教

研究者番号：30397179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：生後発達期の登上線維-プルキンエ細胞シナプスにおけるシナプス刈り込みに関わる神経活動の実態を明らかにするため、麻酔下の生後発達期マウスにおける登上線維起始核である下オリーブ核神経細胞の電気活動をホールセルパッチクランプ法によって測定する方法を確立した。自発的な発火活動、発火閾値下の膜電位変動の生後発達変化を詳細に解析したところ、生後2～3週齢を境に発火閾値下の膜電位振動を基盤とする約10Hzの発火パターンが発生することが明らかになった。この下オリーブ核神経細胞の発火活動が観察され始める時期は登上線維-プルキンエ細胞シナプスの刈り込み過程に重なり、その関連が示唆された。

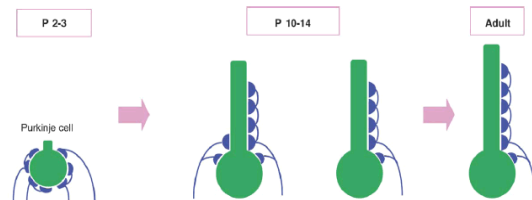
研究成果の概要(英文)：Formation of functional neural circuits in developing brain involves activity-dependent refinement of supernumerary connected synapses during early phase of development (synapse elimination). However it is not still completely understand what actual activity of presynaptic neurons in vivo relates to the synapse elimination. Thus, this study focused on the developing "inferior olivary neuron (ION)", which is a presynaptic neuron in climbing fiber (CF) to Purkinje cell (PC) synapse. To reveal activities of developing IONs in vivo, I established whole-cell patch-clamp recordings from developing IONs in anesthetized mice. And then, I found that around 10 Hz rhythmic firings based on subthreshold membrane oscillations, which have been well known in mature IONs, were observed from 2-3 postnatal weeks. This period involves in the CF-synapse elimination phase, suggesting that the rhythmic activity of ION may be implicated as the potential substrate for CF-synapse elimination.

研究分野：神経生理学

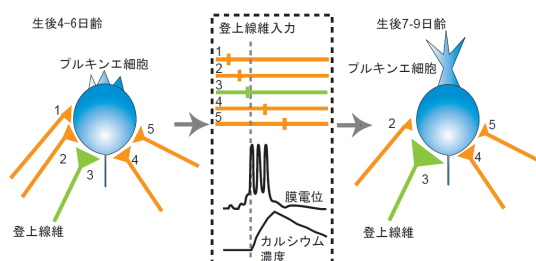
キーワード：ニューロン シナプス 神経回路 生後発達 オリーブ小脳路

1. 研究開始当初の背景

成熟動物において、個々の小脳プルキンエ細胞(Purkinje cell)は、延髄下オリブ核神経細胞を起始細胞とする一本の登上線維(Climbing fiber)によって支配されているが、誕生直後には一過性に複数の登上線維により支配されている。生後7日目までに1本の登上線維のみが選択的に強化される。その後、その線維の強化が引き続く一方で、不必要な入力線維が弱化・除去され、マウスでは生後3週目までに単一支配になる(下図: **登上線維のプルキンエ細胞への投射様式の生後発達変化**: 生後2-3日(P2-3): 多数の結合力の弱い登上線維入力を受けている、生後10-14日(P10-14): 1本か2本の結合力に強弱の付いた登上線維入力を受けている、成熟期(Adult): 1本の登上線維のみから入力を受けている) [Kano, M. and K. Hashimoto, *Curr Opin Neurobiol*, 2009.]



申請者はこれまで、生後発達期小脳の登上線維-プルキンエ細胞シナプスをモデルとして、生体ラットおよびマウスにおいて、*in vivo* パッチクランプ法と *in vivo* 二光子カルシウムイメージング法を組み合わせ、単一プルキンエ細胞における膜電位およびカルシウム動態の同時計測を行い、生体内で実際に起こる活動を観察した。通常、生体内における成熟動物ではプルキンエ細胞を支配する1本の登上線維シナプス入力によって、1Hz前後の頻度で大きな脱分極とそれに伴う細胞内 Ca^{2+} 上昇を引き起こしている。申請者は、生後4~10日の若いプルキンエ細胞では、複数登上線維が同期的に入力することにより、バースト発火とそれに伴う細胞内 Ca^{2+} 上昇を引き起こしていることを明らかにした(Society for Neuroscience abstract, 2008)。また、シナプス伝達強度と発火タイミングを詳細に解析したところ、バースト発火の直前に入力した登上線維シナプスが選択的に強化することを示唆する結果を得た(下図: 第36回国際生理学大会抄録、2009)。



急性小脳スライス標本を用いたこれまでの報告から、登上線維-プルキンエ細胞シナプスでは Ca^{2+} 依存性なシナプス可塑性が起こることが知られている[Bosman, L.W., et al., *J Neurosci*, 2008.]. また、プルキンエ細胞特異的に P/Q 型電位依存性カルシウムチャンネルが欠損したマウスでは、将来残存する1本の登上線維の選択的強化のプロセスが障害されることが報告されている[Hashimoto, K., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011.]. これらの結果から、申請者が見出した複数登上線維の同期活動は、細胞内の Ca^{2+} 上昇を引き起こし、特定のシナプスに可塑性を誘導し、将来残存する登上線維の選別・強化に働いている可能性が考えられる。

上記の結果は、登上線維の活動パターンの中に、特定のシナプス強化・弱化的アルゴリズムが含まれている可能性を示唆する。しかし、プルキンエ細胞からの記録では複数の登上線維の活動から個々の線維それぞれの活動を分離できないため、各々の下オリブ核-登上線維の活動パターンについては明らかにすることができなかった。また、幼弱期の下オリブ核における神経活動の発火パターンやその成因についてはほとんどわかっていない。成熟動物における下オリブ核神経間の活動はギャップジャンクション(電気的神経結合)によって同期することが知られており、また、この同期性は興奮性および抑制性シナプス入力によって調節される[De Zeeuw, C.I., et al., *Trends Neurosci*, 1998.]. しかし、生体内において、登上線維の刈り込みが起こる生後発達期のギャップジャンクションや興奮性・抑制性シナプス伝達の活動状況はほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、生後発達期のマウスにおけるオリブ小脳路の *in vivo* および脳スライス標本にパッチクランプ法を適用し、以下のことを明らかにする。

- (1) 生後発達期下オリブ核細胞の活動パターンの解析
麻酔下の生後発達期マウスにおける下オリブ核神経細胞から *in vivo* パッチクランプ法を用いて自発性、および感覚入力活動を記録することにより、生後発達期における下オリブ核神経細胞へシナプス入力を含む膜電位応答パターンと発火パターンの実態を明らかにする。
- (2) 下オリブ核神経回路の生後発達過程の解析
下オリブ核を含む脳幹スライス標本を用いて、ギャップジャンクシ

- ン、興奮性・抑制性シナプス伝達、Glomerulus 構造の生後発達などを解析し、下オリブ核神経細胞の発火パターンの成熟の基盤となる神経回路の成熟プロセスを明らかにする。
- (3) 下オリブ核神経細胞の発火パターンの成熟がシナプス刈り込みに与える影響の解析

プルキンエ細胞からの *in vivo* パッチクランプ法を用いて、下オリブ核へのギャップジャンクション、シナプス伝達阻害薬投与による、複数登上線維同期活動への阻害効果を明らかにする。さらに、登上線維-プルキンエ細胞シナプスの刈り込みへの影響を明らかにする。

3. 研究の方法

生後発達期下オリブ核神経細胞から *in vivo* パッチクランプ記録を効率的に測定する技術を確認し、膜電位応答と発火応答の記録、及び、その記録から生後発達変化の解析をした。また、*In vivo* 記録後、記録細胞の脳部位、および、種類を同定するため、記録電極内にバイオサイチンを含ませておき、バイオサイチンに対する蛍光免疫染色によって記録細胞を可視化・同定した。下オリブ核神経細胞活動に対するギャップジャンクションの寄与を検証するため、記録前に下オリブ核へ阻害剤を投与し、その効果を解析した。

4. 研究成果

生後4日から一か月齢の C57BL/6 マウスを用いて、イソフルラン麻酔下における下オリブ核神経細胞からホールセルパッチクランプ記録を行う方法を確認した。神経細胞の同定は、記録時においては電気的特性、及び、神経活動パターンによって行い、さらに、記録後、細胞内に注入したバイオサイチンに対する蛍光免疫染色により、記録細胞の可視化に成功した。細胞の電気特性、発火、及び、発火閾値下の膜電位活動は、生後2週齢を境に急激に変化することが分かった。また、同時期から下オリブ核神経細胞の特徴である発火閾値下の膜電位オシレーション (Subthreshold oscillation : STO) が観察された。STO が示す周波数は発達に伴って増大し、成熟動物で報告されている ~10Hz の STO は生後17日齢の細胞から観察されはじめた。また、STO の発生や調節に必要とされるギャップジャンクションを通じた細胞間同期活動と生体内で観察された STO の関連を検証するため、阻害剤 (Carbenoxolone/Mefloquine) 投与後に、*in vivo* ホールセル記録を行った。観察された膜

電位変動における高速フーリエ変換によるパワースペクトラム解析によって、コントロール条件下で観察された約 8 Hz のパワーピークは阻害剤投与後に記録した細胞では減弱することが明らかとなった。STO が観察され始める時期は登上線維-プルキンエ細胞シナプス刈り込みにおける後期過程と重なることから、STO がシナプス刈り込みと関連することが示唆された。本研究課題で確立した生後発達期マウスにおける延髄下オリブ核の生体内での *in vivo* パッチクランプ法を用いた膜電位変動計測は、国内外を含め、初めての報告である。これまでの多くの研究が下オリブ核への線維入出力を失った急性スライス標本を用いていたため、本来の生体内での活動が観察・解析できなかった。本研究で確立した *in vivo* 計測の技術をさらに発展させることで、シナプス刈り込みに関する活動実態の詳細、および、その活動を誘起、及び、調節する因子群の同定につながることが期待される。

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 1件)

- 1、河村吉信、中山寿子、橋本浩一、崎村建司、喜多村和郎、狩野方伸、Spike timing-dependent selective strengthening of single climbing fibre inputs to Purkinje cells during cerebellar development, *Nature Communications*, 4巻、査読有、2013年、2732頁

[学会発表](計 3件)

- 1、河村吉信、橋本浩一、*In vivo* ホールセルパッチクランプ法を用いた発達期下オリブ核神経細胞からの膜電位記録、平成26年度包括脳ネットワーク冬のシンポジウム、2014年12月11日-13日、東京都文京区 東京医科歯科大学
- 2、河村吉信、生後発達期小脳プルキンエ細胞における登上線維の選択的シナプス強化は発火タイミング依存的に起きる、平成26年度生理学研究所研究会、2014年6月5日6日、愛知県岡崎市 生理学研究所
- 3、河村吉信、中山寿子、橋本浩一、崎村建司、喜多村和郎、狩野方伸、Selective strengthening of single climbing fiber inputs to Purkinje cells during postnatal development *in vivo*、北米神経科学学会、2013年11月9日-13日、アメリカ サンディエゴ

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

広島大学 医歯薬保健学研究院 神経生理学教室

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

河村 吉信 (KAWAMURA YOSHINOBU)

広島大学・医歯薬保健学研究院・特任助教

研究者番号：30397179

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし