

37. 軸索起始部の活動依存的制御機構の解明

久場 博司

名古屋大学 医学部 細胞生理学講座

Key words : 聴覚神経回路, 軸索起始部, 活動電位, Na⁺チャネル, 可塑性

緒言

神経細胞の軸索起始部 (axon initial segment, AIS) は活動電位の発生部位であり、神経活動決定の要である。これは、この部位に電位依存性の Na⁺チャネルが高密度に集積し、活動電位の閾値がこの部位で最も低いことによる。近年、AIS の空間分布 (軸索上の位置、長さ) は細胞毎に異なり、このことが神経回路の適切な動作に重要なことが分かってきた¹⁾。さらに、AIS は可塑性を有し、その分布が神経活動依存的に変化することも知られている²⁻⁵⁾。しかしながら、個々の神経細胞がどのようなしくみで最適な AIS 分布を獲得するのかは明らかでない。本研究課題では、AIS の空間分布が同一神経核内の領域毎に異なることで知られるニワトリ脳幹の聴覚神経核 (大細胞核, nucleus magnocellularis, NM) を対象に、AIS の形成過程とその神経活動依存性を調べることで、AIS 分布の決定原理の解明を目指した。

方法、結果および考察

1. 生体内での解析

NM には周波数局在構造があり、細胞が特徴周波数 (characteristic frequency, CF) 毎に配置されている。さらに、NM では CF 領域に応じて AIS の長さが異なり、高い CF 領域の細胞ほど短い。そこで、この CF 領域特異的な AIS 分布が形成される過程を明らかにするために、発達期の NM 細胞における AIS の形態と機能を経時的に解析した (図 1)。まず、Na⁺チャネルの免疫染色を行うことで、NM 細胞の AIS 分布を調べたところ、NM 細胞の AIS は聴覚入力開始前後 (胚齢 15 日) には長く、その長さに CF による違いはみられなかった。一方、この AIS 分布は胚齢 15 日以降、長さが短縮し、その程度は高い CF 領域ほど大きく、この結果、孵化直前 (胚齢 21 日) には CF 領域に応じた AIS 長の違いが顕著になった。実際、急性切片標本を用いて NM 細胞の Na⁺電流を記録したところ、発達に伴う Na⁺電流の増加は高い CF 領域の細胞ほど小さく、胚齢 21 日には CF 領域間で差がみられた。さらに、活動電位の閾値も、この時期には高い CF 領域の細胞で高くなった。

次に、発生初期に聴覚原基を除去することで発達期の聴覚入力を遮断することを行い、その AIS に対する効果を検討した (図 2)。聴覚原基の除去により、発達期にみられる AIS の短縮が減弱するとともに、CF 領域間での長さの違いは縮小した。これらの結果は、NM における CF 領域に応じた AIS 分布の違いに、聴覚入力依存的な AIS の変化、すなわち AIS の可塑性が関わることを示している。

そこで、さらに聴覚入力による神経活動のうちシナプス前後のいずれの活動が重要であるかを検討した。電気穿孔法を用いて発生初期の NM 細胞へ synapsin プロモーター下に K⁺チャネル (Kir2.1) を導入し、発達期におけるシナプス後の神経活動を抑制することを行った。これまでの結果では、Kir2.1 の導入により NM 細胞の AIS 長に大きな変化はみられなかった。このことは、発達期における CF 領域特異的な AIS の短縮には NM 細胞の活動電位ではなくシナプス入力自体が重要である可能性を示唆する。しかし、今回用いた synapsin プロモーターでは、Kir2.1 の発現量が不十分で NM 細胞の活動電位を十分に抑えきれていない可能性も考えられるため、現在 tet-off 下に Kir2.1 を過剰発現させることを行っている。

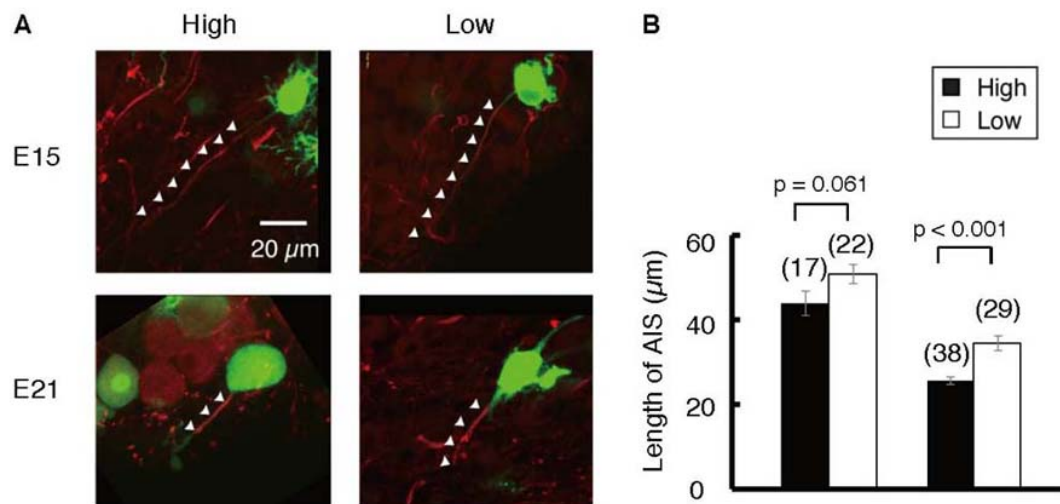


図1. CF領域に応じたAIS分布の違いは胚齢15日以後に作られる

(A) 発達期NMの各CF領域におけるAIS分布。Nav pan免疫陽性のAIS(赤)がAlexa488で標識されたNM細胞(緑)の軸索上に認められる(矢頭)。高いCF領域(左)、低いCF領域(右)。胚齢15日(上段)、胚齢21日(下段)。(B) AIS長の発達変化。t検定。

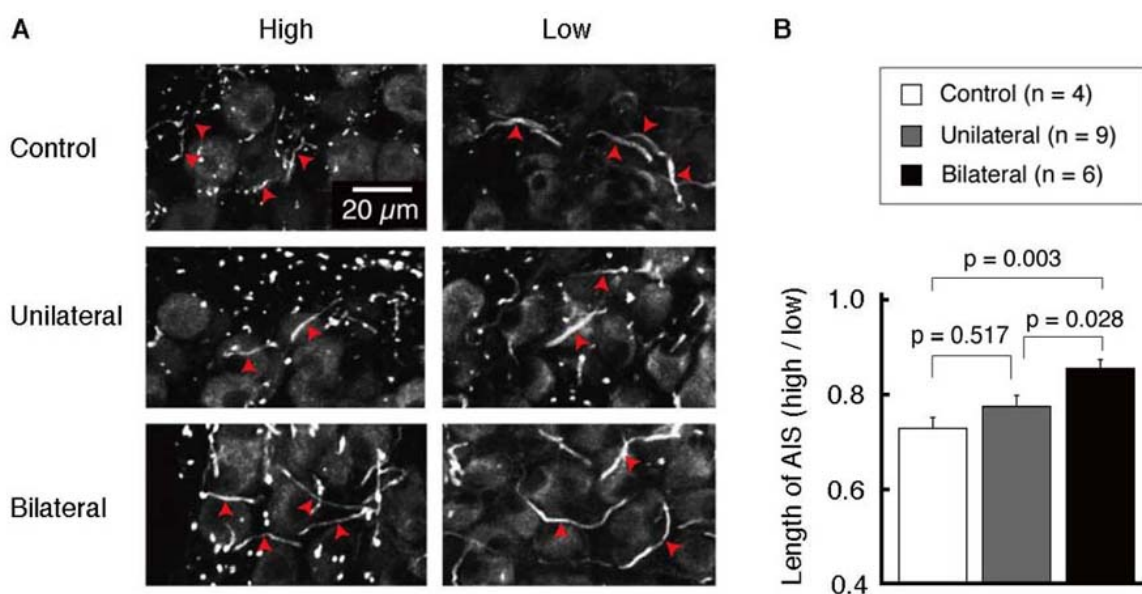


図2. 発達期の聴覚入力遮断によりCF領域に応じたAIS分布の違いは減弱する

(A) 胚齢21日のNMにおけるNav panの免疫染色像(矢頭)。胚齢2日に片側(中段)、もしくは両側(下段)の聴覚原基を除去することで聴覚入力の遮断を行った。高いCF領域(左)、低いCF領域(右)。(B) AIS長に対する聴覚原基除去の効果。NMにおけるCF領域に応じたAIS分布の違いは聴覚原基除去により減弱する。t検定。

2. 切片培養標本での解析

AISの分布と神経活動との関係をより詳細に解析するために、NM細胞の切片培養標本を確立した。まず、培養14日目（孵化後3日相当）の標本を用いて、培養NM細胞の特性を調べた（図3）。培養NM細胞は、通電刺激に対して通電開始時のみ発火し、これは急性切片標本での所見と同様であった。このことは、NM細胞の基本的な性質が、培養環境下でも保たれることを示している。そこで、この培養NM細胞のAIS分布を含めた細胞特性についてCF領域間での比較を行なったところ、大きな違いを認めなかった。一方、培養NM細胞で認められる自発活動の頻度はCF領域によらず一定である。これらの結果は、AISの分布が神経活動レベルによって決められている可能性を示唆する。

そこで、さらに培養NM細胞において、この自発活動を阻害することでAISの長さが増加するか否かを検討した（図4）。DNQX（20 μ M、グルタミン酸受容体阻害剤）もしくはTTX（1 μ M、Naチャンネル阻害剤）を7日間投与したところ、いずれもAISの長さは約1.2~1.4倍に延長した。また、上記薬剤投与により活動電位の閾値は低下し、サイズも増加した。つまり、AISの長さは神経活動によりネガティブフィードバックの制御を受けており、このことがAISの分布決定に重要だと考えられた。以上、AISの分布決定には聴覚入力依存的なAISの可塑性機構が関わり、このことがNMにおけるCF領域特異的なAIS分布の形成に重要なことを明らかにした。

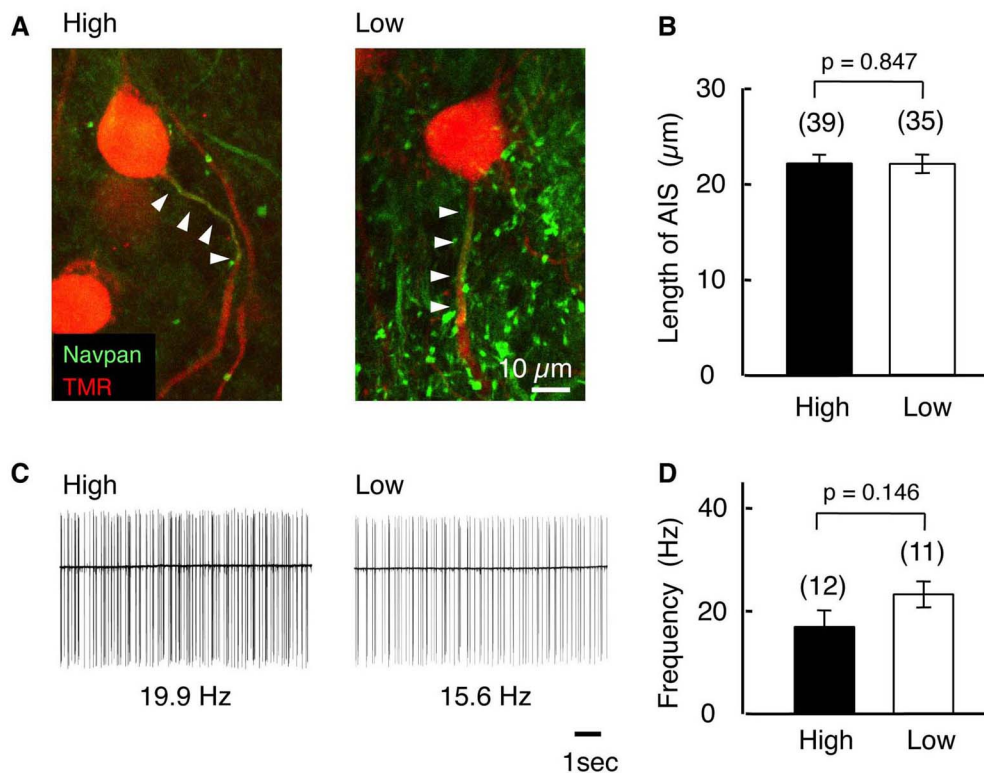


図3. 培養NM細胞ではCF領域に応じたAIS分布の違いが消失する

(A) 培養14日目のNM細胞におけるAIS分布。Navpan免疫陽性のAIS（緑）がRhodamineで標識されたNM細胞（赤）の軸索上に認められる（矢頭）。高いCF領域（左）、低いCF領域（右）。(B) 各CF領域のAIS長さ。t検定。(C) 培養14日目のNM細胞における自発神経活動。(D) 各CF領域の自発神経活動の頻度。t検定。

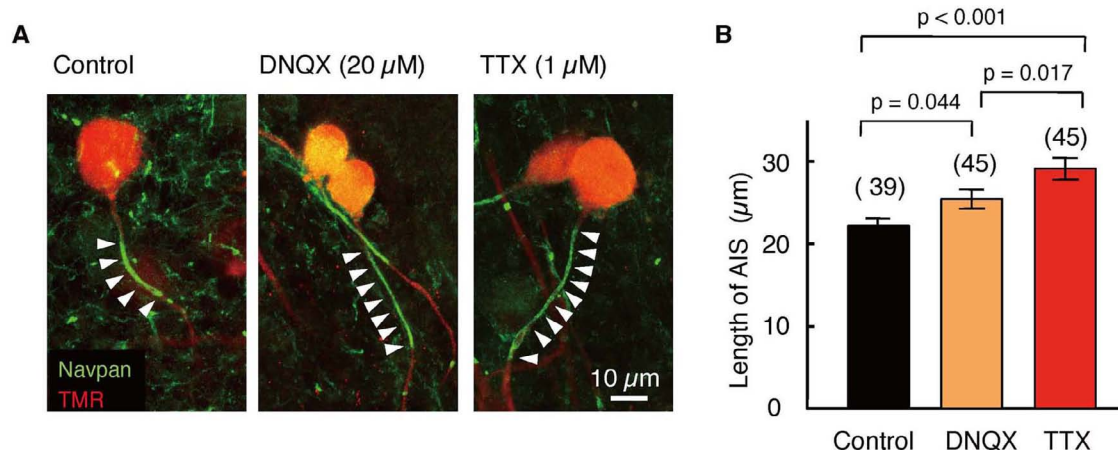


図4. 培養NM細胞では自発神経活動の阻害によりAISが延長する

(A) 培養NM細胞における自発神経活動阻害後のAIS分布。Nav pan 免疫陽性のAIS (緑)、Rhodamine で標識されたNM細胞 (赤)。DNQX (20 μ M、中) もしくはTTX (1 μ M、右) 存在下ではAIS (矢頭) が延長する。(B) 自発神経活動阻害後のAIS長。t検定。

シナプス入力は細胞の脱分極を引き起こし、脱分極は細胞内のCa²⁺濃度を増加させる。さらに、細胞内Ca²⁺濃度の変化はAISの構造変化を引き起こすことも報告されている。従って今後は、この培養NM細胞において、高濃度K⁺溶液やK⁺チャネル阻害剤によるNM細胞活動増強の効果を調べるとともに、Ca²⁺チャネルの阻害剤を含めた薬理的解析を行うことで、AIS可塑性の誘導因子と下流の分子経路を明らかにする。さらに、上記薬理的な解析で明らかになった候補分子をknock downすることでシグナル経路を同定する予定である。

共同研究者

本研究の共同研究者は、名古屋大学医学系研究科細胞生理学教室の安達良太とNargis Akterである。最後に、本研究にご支援を賜りました上原生命科学財団に深く感謝いたします。

文献

- 1) Kuba H. J Physiol. Structural tuning and plasticity of the axon initial segment in auditory neurons. 2012;590(22):5571-9. doi: 10.1113/jphysiol.2012.237305.
- 2) Kuba H, Adachi R, Ohmori H. J Neurosci. Activity-dependent and activity-independent development of the axon initial segment. 2014;34(9):3443-53. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4357-13.2014.
- 3) Adachi R, Yamada R, Kuba H. Neuroscientist. Plasticity of the axonal trigger zone. 2015;21(3):255-65. doi: 10.1177/1073858414535986.
- 4) Kuba H, Yamada R, Ishiguro G, Adachi R. Nat Commun. Redistribution of Kv1 and Kv7 enhances neuronal excitability during structural axon initial segment plasticity. 2015;6:8815. doi: 10.1038/ncomms9815.
- 5) Susuki K, Kuba H. J Physiol Sci. Activity-dependent regulation of excitable axonal domains. 2016;66(2): 99-104. doi: 10.1007/s12576-015-0413-4.