

第 12 回視覚科学フォーラム抄録集

日時：平成 20 年 8 月 28－29 日
会場：大阪大学共通教育棟 B118

世話人：佐藤宏道
大阪大学大学院医学系研究科



第12回視覚科学フォーラム

<http://www7.bpe.es.osaka-u.ac.jp/vision/forum2008/>

開催日：平成20年8月28日（木）午前9:00～29日（金）午後6:20

会場：大阪大学豊中キャンパス大阪大学 共通教育B棟118号教室

連絡先：佐藤 宏道（世話人）又は 七五三木（しめぎ）聡

大阪大学大学院医学系研究科認知行動科学研究室

所在地：〒560-0043 大阪府豊中市待兼山町1-17

TEL：06-6850-6021（佐藤） 06-6850-6022（七五三木）

FAX：06-6850-6021（佐藤）

第12回視覚科学フォーラム専用メールアドレス：shikakuforum@vision.hss.osaka-u.ac.jp

発表に関する注意事項

- 発表時間：15分（口演12分 質疑応答3分）
- 発表はPowerPoint、Keynoteなどのプレゼンテーションソフトをご利用ください。OHP、スライド映写機は準備しておりませんのでご注意ください。
- 発表予定者は**発表原稿の動作確認を行った上でご自身のパソコンをお持ちいただくよう**お願いいたします。
- 各セッション開始前の休憩時間中にスライド確認テストを行ってください。午前第一セッション発表の方は8時45分までにスライド確認テストをお済ませいただきますようお願いいたします。

大阪大学豊中キャンパスへのアクセス方法

新幹線および電車をご利用の場合：JR 新大阪駅からJR 大阪駅へ乗り継ぎ。JR 大阪駅から阪急梅田駅へ徒歩移動し、阪急電車宝塚線へ乗り継ぎ。石橋駅（特急・急行停車）下車後東へ徒歩10 - 15分。

大阪空港からモノレールをご利用の場合：大阪モノレール大阪空港駅から乗車し、柴原駅下車。徒歩約7 - 15分

駐車場が不足しているため、お車ではご来場いただけません。ご注意ください。



フォーラム会場（共通教育 B 棟 118 号教室）へのアクセスとレストラン情報

フォーラム会場及びレストランは下記キャンパスマップを参照してください。付属図書館（地図番号 1）地下にも生協食堂および購買部があります。併せてご利用ください。

豊中キャンパス

TOYONAKA CAMPUS



- | | | |
|------------------|------------------|--------------------------------|
| 01. 附属図書館本館 | 12. サイバーメディアセンター | 28. 総合学術博物館 |
| 02. 文学研究科 | 13. サイバーメディアセンター | 29. 豊中阪大内郵便局 |
| 03. 法学研究科 | 19. 総合学術博物館 | 39. 健康体育研究棟 |
| 04. 経済学研究科 | 20. 豊中学生センター | 20. 学生交流棟（レストラン・ミニコンビニ） |
| 05. 理学研究科 | 21. 学生会館 | 35. 待兼山会館（レストラン等） |
| 06. 基礎工学研究科 | 22. 明道館（サークル棟） | 36. 福利センター（レストラン・売店） |
| 07. 言語文化研究科 | 23. 清明寮（学生寮） | 37. カフェテリアらふおれ（レストラン） |
| 08. 国際公共政策研究科 | 24. 刀根山寮（学生寮） | 38. DonDon（レストラン） |
| 09. 共通教育本館（イ号館） | 25. 国際交流会館 | |
| 10. 教育実践センタ管理講義棟 | 26. 保健センター豊中本室 | |
| 11. 共通教育講義棟（ロ号館） | 27. 基礎工学部国際棟 | |

プログラム

8月28日(木)

9:00-9:05 視覚科学フォーラム会長挨拶

9:05-9:10 世話人挨拶

座長：河村 悟 (大阪大・院生命機能)

9:10-9:25

1. 桿体・錐体視細胞の応答の違いを生み出す分子機構

橋本修志^{1,2}・松川淑恵¹・有信大輔¹・宮園貞治¹・竹本訓彦¹・越谷祐貴²・瀬野亜希²・河村悟² (
¹大阪大学大学院生命機能研究科・²理学研究科)

9:25-9:40

2. 霊長類光受容タンパク質の性質

今井 啓雄¹・針貝 美樹¹・今元 泰²・七田 芳則²
(¹京都大学霊長類研究所・²京都大学大学院理学研究科)

9:40-9:55

3. 網膜杆体系ON型双極細胞の受容野中心部の光応答特性

日高 聡¹・海野 修²
(¹藤田保健衛生大学 医学部 生理学・²東邦大学 理学部 情報科学科)

9:55-10:10

4. 網膜双極細胞の発現する TRPM1 の機能解析

古川 貴久¹・小池 千恵子¹・小原 武久²・瓜生 幸嗣³・近藤 峰生⁴・森 泰生³・
立花 政夫²(¹(財)大阪バイオサイエンス研究所 発生生物学部門・²東京大学大学院人文社会系
研究科・³京都大学大学院工学研究科・⁴名古屋大学医学部眼科)

10:10-10:25

5. mGluR6 欠損網膜双極細胞における軸索指向性タンパクの異所性発現

石井昌明^{1,2}・森際克子³・高雄元晴⁴・中西重忠⁵・福田 淳⁶・三村 治²・塚本吉彦¹
(¹兵庫医科大学生物学科¹・眼科学²・EW89 シンクロシティ研究所³・東海大学情報理工学部⁴・
大阪バイオサイエンス研究所⁵・大阪大学大学院医学系研究科情報生理学⁶)

10:25-10:40 - - - - - 休憩 - - - - -

座長：渡部 眞三 (発達障害研・周生期学部)

10:40-10:55

6. 形態学的&生理学的手法による新しいタイプのウサギ網膜神経節細胞の解析

Hideo Hoshi and Stephen L. Mills (Department of Ophthalmology and Visual Science, University of Texas Medical School at Houston)

10:55-11:10

7. H^+ ポンプ阻害剤は水平細胞から錐体視細胞への負帰還信号を抑制する

山田雅弘^{1,2}・山本一徳^{1,2}・城宝浩³・金子章道⁴ (¹首都大学東京、²理研脳科学研究センターニューロインフォマティクス技術開発チーム・³アステラス製薬・⁴畿央大学)

11:10-11:25

8. 網膜外網状層におけるV-ATPase (H^+ ポンプ) の局在

城宝浩¹・中野健二^{1b}・石川修司^{1b}・佐野孝一^{1b}・穴戸隆男^{1b}・山本一徳²・山田雅弘²・金子章道³ (¹アステラス製薬 安全性研究所・^{1b}アステラス リサーチ テクノロジー - 病理担当・²理研脳科学研究センター・³畿央大学)

11:25-11:40

9. マウス網膜コリン作動性アマクリン細胞のコリン電流

金田 誠 (慶應義塾大学医学部生理学教室)

11:40-11:55

10. 単離網膜神経細胞上の抑制性シナプス前終末

本村珠美・林田祐樹 (熊本大学大学院自然科学研究科)

11:55-13:15

- - - - - 昼食 (運営委員会) - - - - -

座長：七五三木 聡 (大阪大・院医)

13:15-13:30

11. ネコ外側膝状体ニューロンにおける刺激方位選択性の時間的变化

岡本正博¹・内藤智之²・原真一郎¹・七五三木聡²・佐藤宏道²
(¹大阪大学大学院生命機能研究科・²大阪大学大学院医学系研究科)

13:30-13:45

12. 網膜障害誘発外側膝状体(LGN)の形態的・経時的変化

伊藤保志¹・嶋澤雅光¹・陳 逸寧²・山嶋哲盛³・新家眞²・原英彰¹ (¹岐阜薬科大学薬効解析学・²東京大学大学院医学系研究科眼科学・³金沢大学大学院医学系研究科再生脳外科学)

13:45-14:00

13. ラット外側膝状体における VGlut1 と mGluR1 の活動依存的制御

吉田三穂¹・佐藤武正²・中村公一³・金子武嗣³・畠 義郎¹ (¹鳥取大学大学院医学系研究科・²鳥取大学医学部生命科学科・³京都大学大学院医学研究科)

14:00-14:15

14. 薬理的に抑制された視覚野で見られる軸索退縮の年齢依存性
森島 佑・樋川正仁・渡邊佳奈・畠 義郎
(鳥取大学大学院医学系研究科生体高次機能学部門)

14:15-14:30

15. 一次視覚野のT型Ca²⁺チャネル依存性長期増強と眼優位可塑性
吉村由美子¹・稲葉美枝^{1,2}・山田和政¹・黒谷亨¹・丸山拓郎¹・小松由紀夫¹
(¹名古屋大学環境医学研究所・²京都府立医科大学)

14:30-14:45 - - - - - 休憩 - - - - -

座長：田村 弘 (大阪大・院生命機能)

14:45-15:00

16. ネコ一次視覚野ニューロンの刺激サイズに依存した空間周波数選択性の変化
尾崎弘展¹・内藤智之¹・定金理²・岡本正博³・佐藤宏道¹
(¹大阪大学大学院医学系研究科・²基礎生物学研究所・³大阪大学大学院生命機能研究科)

15:00-15:15

17. 初期視覚野細胞の時空間周波数に対する選択性
佐々木耕太・大澤五住 (大阪大学大学院生命機能研究科 JST CREST 吉岡プロジェクト)

15:15-15:30

18. 初期視覚野細胞でのスパイク変動解析
木村 壘・大澤 五住 (大阪大学大学院生命機能研究科)

15:30-15:45

19. マルチユニットレコーディングにおける発火数変動と相関係数の刺激依存性
圓山由子・伊藤浩之 (京都産業大学大学院工学研究科)

15:45-16:00 - - - - - 休憩 - - - - -

座長：田中 宏喜 (大阪大・院生命機能)

16:00-16:15

20. 無相関ノイズ刺激による両眼方位選択性の検証
青山めぐみ¹・田淵有香²・大澤五住¹ (¹大阪大学大学院生命機能研究科・²シスメックス株式会社)

16:15-16:30

21. 細かい相対奥行き弁別における局所視差信号の空間統合

土井隆弘¹・岡田貴裕¹・藤田一郎¹（¹大阪大学大学院生命機能研究科）

16:30-16:45

22. 両半球の初期視覚野から同時記録されたニューロン活動の相関解析

朝田雄介・大澤五住（大阪大学大学院生命機能研究科）

16:45-17:00

23. 抑制性シナプス伝達が視覚野神経回路中の信号伝播に与える影響

小山内 実・田中 哲史・武野 祐介・八木 哲也（大阪大学大学院工学研究科）

17:00-17:05

- - - - - 休憩 - - - - -

17:05-18:05 特別講演

24. 日本における網膜研究の黎明期

金子章道（畿央大学）

18:20-

懇 親 会

8月29日(金)

座長：金田 誠 (慶応大・医学部)

9:00-9:15

25. 桿体視細胞における all-trans レチナールで誘発される光毒性

中谷 敬¹・Yiannis Koutalos²・Rosalie K Crouch²・増富康亮¹

(¹筑波大学大学院生命環境科学研究科・²Medical University of South Carolina)

9:15-9:30

26. NMDA 毒性に対するネコ網膜神経節細胞のタイプによる感受性の違い：視神経切断との比較

渡部眞三¹・中澤徹²・工藤英代²(¹発達障害研究所周生期学部・²東北大学医学部眼科)

9:30-9:45

27. 網膜の再生過程における微小管脱安定化タンパク質の解析

長谷川明之・長谷川浩二・徳永史生・久富修(大阪大学大学院理学研究科)

9:45-10:00

28. アカゲサルにおける黄斑部 PhNR の記録と非対称性

近藤峰生・栗本幸英・寺崎浩子(名古屋大学大学院医学系研究科 眼科)

10:00-10:15

----- 休憩 -----

座長：阪口 豊 (電気通信大・院情報システム学)

10:15-10:30

29. 網膜桿体ネットワークのシミュレーション解析

宮本侑典・神山 育己(愛知県立大学大学院情報科学研究科)

10:30-10:45

30. 網膜双極細胞ニューラルイメージの実時間再構築

長谷川 潤・八木 哲也(大阪大学大学院工学研究科)

10:45-11:00

31. 網膜神経節細胞モデルによるスパイク発火特性の解析

桜木雄一郎・松井遼・神山育己(愛知県立大学大学院情報科学研究科)

11:00-11:15

----- 休憩 -----

座長：畠 義郎 (鳥取大・院医)

11:15-11:30

32. マカクサル V1 と TE 第 3 層錐体細胞の電気生理学的特性
石川理子¹・丸山敦子²・細山大輔³・吉村由美子⁴・田村弘³・佐藤宏道²・藤田一郎³ (¹大阪大学大学院医学系研究科・²JST/CREST・³大阪大学大学院生命機能研究科・⁴名古屋大学環境医学研究所)

11:30-11:45

33. サル V1 および TE 野における錐体細胞の膜特性の生後発達
丸山敦子¹・石川理子²・細山大輔³・吉村由美子⁴・田村弘³・佐藤宏道²・藤田一郎³ (¹JST/CREST・²大阪大学大学院医学系研究科・³大阪大学大学院生命機能研究科・⁴名古屋大学環境医学研究所)

11:45-12:00

34. マカクサル大脳皮質におけるスパイン新生と刈り込み
小賀智文¹・岡本嗣久¹・Guy N. Elston^{2,4}・藤田一郎^{3,4} (¹大阪大学基礎工学部・²Centre for Cognitive Neuroscience, Australia・³大阪大学大学院生命機能研究科・⁴CREST/JST)

12:00-13:00 - - - - - 休憩 - - - - -

座長：内藤 智之 (大阪大・院医)

13:00-13:15

35. サル二次視覚野における輪郭線の折れ曲がり表出
伊藤南^{1,2} (¹大生理学研究所・²総合研究大学院大学)

13:15-13:30

36. 変換領域逆相関法を用いた初期視覚野ニューロンの曲率選択性解析
新井稔也¹・伊藤南^{2,3}・浅川晋宏^{2,4}・大澤五住¹ (¹大阪大学大学院生命機能研究科・²自然科学研究機構生理学研究所・³総合研究大学院大学生命科学研究科・⁴東京慈恵会医科大学)

13:30-13:45

37. サル下側頭皮質電気刺激による色知覚のバイアス
鯉田孝和^{1,2}・小松英彦^{1,2} (¹生理学研究所・²総合研究大学院大学)

13:45-14:00

38. 視覚グルーピング課題時のサル頭頂葉ニューロン活動
横井功¹・小松英彦^{1,2} (¹自然科学研究機構生理学研究所感覚認知情報部門・²総合研究大学院大学)

14:00-14:15

39. サル側頭葉皮質顔画像反応性細胞の空間周波数選択性：画像基準 vs. 網膜基準
稲垣未来男・藤田一郎 (大阪大学大学院生命機能研究科)

14:15-14:20

視覚科学フォーラム会長 閉会の辞

抄 録

桿体・錐体視細胞の応答の違いを生み出す分子機構

橘木修志^{1, 2}・松川淑恵¹(非会員)・有信大輔¹・宮園貞治¹(非会員)・竹本訓彦¹(非会員)・越谷祐貴²(非会員)・瀬野亜希²(非会員)・河村悟²

(¹大阪大学大学院生命機能研究科・²理学研究科)

Key words: 錐体視細胞、桿体視細胞、光応答

目的

脊椎動物の視細胞には、桿体と錐体の二種類の視細胞が存在する。いずれの視細胞も光を受容すると電気的応答を発生し、光刺激を神経情報へと変換する働きを担っている。桿体と錐体とは、光に対する応答の仕方が主に二つの面で異なる。一つは光に対する感度の違いである。桿体は光感度が高く、微弱な光に対しても応答する。その一方、錐体は感度が低く、強い光でないと応答しない。もう一つの違いは、応答の持続時間の違いである。フラッシュ光のごく短い光刺激に対して、桿体の応答は長く持続するが、錐体の応答は短時間の間に終了する。従って、桿体と比べると、錐体の時間分解能は高い。以上のような応答の性質の違いがあるので、桿体は薄暗いところで働くのに適しているが、時間分解能は低いので、速い光情報の変化にその応答が追従できない。一方、錐体は明るいところで働くのに適しており、また、時間分解能がよいので、素早く動く物体を検出できる。すなわち、応答の仕方の異なる二種類の視細胞をもつので、様々な光環境で物を見ることが出来る。我々は、桿体と錐体とで、なぜこのように応答の仕方が違うのか、その分子メカニズムを検討している。

方法

我々は、数年前に、コイ (Cyprinus carpio) の網膜から、桿体・錐体視細胞を、生化学的な実験が出来るレベルの量で分離・精製することに成功した(Tachibanaki et al, 2001)。両者の間では、細胞の比重が異なることから、視細胞を網膜から脱離した後、密度勾配遠心法によってそれぞれを分離できる。この方法により分離精製した桿体・錐体視細胞の破碎試料を使って、各種の生化学的な解析を行うことにより、どのような分子メカニズムによって桿体・錐体の応答の仕方が異なってくるのかを検討した。

結果

光を受容した後、視細胞が応答を引き起こす分子機構と、応答が終息する分子機構を図1に示す。

応答を引き起こす分子機構は太矢印で示した反応(反応1~4)から成り立っている。光によって視物質が活性化された後(反応1)、活性型視物質によってG蛋白質が活性化される(反応2)、さらに、活性型G蛋白質によってPDEが活性化される(反応3)。その結果、活性型PDEによって細胞内のセカンドメッセンジャーであるcGMPが分解され、cGMPの濃度が減少する(反応4)ので、形質膜に存在するcGMP依存性力カチオンチャンネルが閉じ、過分極性の応答が生じる。

一方、応答が終息する分子機構は、図1の細矢印で示した反応から成り立っている。活性型視物質の不活性化(反応5)、活性型G蛋白質の不活性化(反応6)によってcGMPの分解反応が停止した後、GTPからcGMPが合成される(反応7)ことにより、減少していたcGMPの濃度が元の状態にまで回復し、応答が停止する。

我々は、これらの酵素反応の効率が、桿体と錐体とでどれくらい異なるのかを測定した。その結果、錐体においては、桿体と比べて、応答を引き起こす2つの反応(反応2および

反応3)の効率が低いことが解った。また、錐体では、反応5、反応6、反応7の効率が桿体よりも著しく高いことが解った。

考察

図1における反応2、反応3は、視細胞が応答を引き起こす分子機構の反応であり、特に反応2は、光シグナルが増幅される重要な反応であると考えられている。これらの反応の効率が、錐体では低かった。このことは、桿体と比べて錐体の光に対する感度が低い原因のひとつであると考えられる。

また、図1における反応5、6、7の反応は、細胞の応答が終息するための反応であるが、これらの反応の効率がいずれも錐体では高かった。このことが、桿体と比べて錐体で応答の持続時間が短い原因となっていると考えられる。我々は、さらに、これらの反応効率の違いがなぜ生じるのか、その分子メカニズムを検討してきた。これまでに得られた知見について発表する。

引用文献

Tachibanaki, S., Tsushima, S. and Kawamura, S. (2001) Low amplification and fast visual pigment phosphorylation as mechanisms characterizing cone photoresponses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 98, 14044-14049

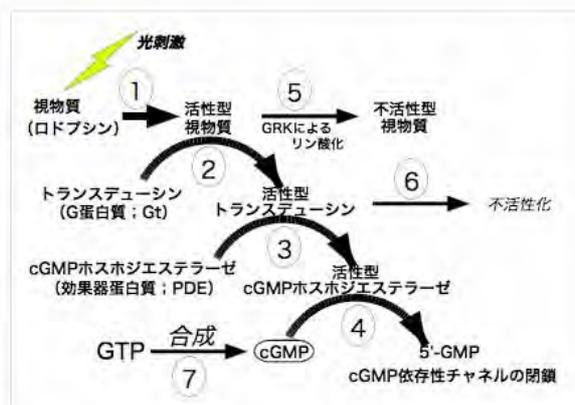


図1: 視細胞が応答を引き起こす分子機構と、応答が終息する分子機構。それぞれ、太矢印、細矢印で表す。矢印の横の番号は、反応を識別するために便宜的につけた。

霊長類光受容タンパク質の性質

—ヒドロキシルアミン感受性と視細胞ノイズに関する考察—

○今井 啓雄¹・針貝 美樹¹・今元 泰²・七田 芳則²

(¹京都大学霊長類研究所・²京都大学大学院理学研究科)

Key words: 視細胞ノイズ・錐体・桿体

目的

霊長類の視細胞応答に関する研究は古くから行われている (Baylor et al., 1984; Schnapf et al., 1990 など) が、その分子基盤にまで言及した研究は数少ない。これは、ロドプシンなどのタンパク質の調製が困難なためであった。

近年の遺伝子工学の進展により、ゲノムまたは mRNA から調製した cDNA を用いて、タンパク質を培養細胞などで発現させ、その機能解析を行うことが可能になっている (Onishi et al., 1999)。霊長類についてもゲノム研究が進展し、さらに mRNA などの生体由来の試料が調整可能である当研究所の特性を生かして、霊長類の感覚受容細胞の分子レベルでの記述を行うことを始めている (今井, 2007)。本発表では、桿体および赤色感受性錐体視細胞にそれぞれ含まれる光受容蛋白質である monkey rhodopsin と monkey red、そして、立体構造情報が豊富な bovine rhodopsin の特性を比較することにより、これらのタンパク質によって影響を受ける視細胞の特性との対応付けを行うことを目指した。特に、タンパク質の安定性の指標であるヒドロキシルアミンに対する耐性に注目することにより、タンパク質の自発的な活性化に由来すると考えられる視細胞ノイズの発生源をアミノ酸残基レベルで同定することを目指した。

方法

Monkey rhodopsin, monkey red の cDNA は、サル網膜 mRNA より RT-PCR によって調製した。発現ベクターに組み込んだこれらの cDNA を元に、HEK293T 細胞を用いてタンパク質を発現させ、11-cis-retinal と結合・dodecylmaltoside による可溶化を行った後、C 末端に付加した 1D4 タグに対する抗体カラムを用いてタンパク質を精製した。これらのタンパク質の部位特異的変異体は、In vitro mutagenesis kit (Stratagene) を用いて cDNA を構成し、野生型と同様に発現・精製した。

ヒドロキシルアミンに対する耐性は、暗中で高濃度 (200 mM) のヒドロキシルアミンと混合した後の光受容タンパク質の吸光度減少を指標として評価した。具体的には吸光度減少の時間変化を指数関数により近似し、その時定数を比較した。

結果

Monkey rhodopsin は 500nm、monkey Red は 560nm に吸収極大波長を示す。それぞれの発現量は、bovine rhodopsin の約 2 分の 1、10 分の 1 であった。タンパク質の安定性の指標の一つとして、ヒドロキシルアミンに対する安定性を比較したところ、Monkey rhodopsin、monkey Red の安定性はそれぞれ bovine rhodopsin の約 1.5 分の 1、25 分の 1 であった。Bovine rhodopsin と monkey rhodopsin はアミノ酸残基レベルで 15 カ所が異なっている。Bovine rhodopsin の立体構造を参照して、これらの部位を比較すると、bovine rhodopsin の膜貫通領域に存在する疎水性アミノ酸残基が、monkey rhodopsin や monkey red、その他の錐体光受容蛋白質で他の残基に置換されていることがわかった。そこで、この部位を置換した bovine rhodopsin、monkey rhodopsin、そして monkey red の変異体を調製し、ヒドロキシルアミンに対する耐性を比較した。その結果、変異によって bovine rhodopsin の安定性は

低下する一方、monkey rhodopsin や monkey red の安定性は上昇することがわかった。すなわち、これらの安定性を制御しているのは膜貫通領域に存在する疎水性アミノ酸残基であることが示された。

考察

我々は、ノックインマウスを用いた研究により、光受容蛋白質の性質が視細胞の応答特性に大きくかわることを報告している (Imai et al., 2007)。特に、錐体光受容タンパク質をノックインした桿体視細胞の暗ノイズが有意に上昇する (Sakurai et al., 2007) ことから、光受容タンパク質の安定性が視細胞ノイズの発生源の一つであることが示唆される。この傾向はヒトの赤色感受性錐体光受容タンパク質をトランスジェニックしたマウスの桿体視細胞でも観察される (Fu et al., 2008) ため、錐体光受容タンパク質に共通の性質であると推定される。今回発見したアミノ酸残基は、桿体と錐体の光受容タンパク質の安定性を変化させると共に、視細胞ノイズの発生に対する一つの原因となると考えられる。

引用文献

Baylor, D.A., Nunn, B.J. and Schnapf, J.L. The photocurrent, noise & spectral sensitivity of rods of the monkey *Macaca fascicularis*. J. Physiol. (Lond.) 357, 575607 (1984).

Schnapf, J.L., Nunn, B.J., Meister, M. and Baylor, D.A. Visual transduction in cones of the monkey *Macaca fascicularis*. J. Physiol. (Lond.) 427, 681713 (1990).

Onishi, A., Koike, S., Ida, M., Imai, H., Shichida, Y., Takenaka, O., Hanazawa, A., Komatsu, H., Mikami, A., Goto, S., Suryobroto, B., Kitahara, K., and Yamamori T. (1999) Dichromatism in Macaque Monkeys. Nature 402, 139-140.

今井啓雄 (2007) 感覚受容体の退化と進化「霊長類進化の科学」(京都大学霊長類研究所編) pp476-486, 京都大学出版会.

Imai, H., Kefalov, V., Sakurai, K., Chisaka, O., Ueda, Y., Onishi, A., Morizumi, T., Fu, Y., Ichikawa, K., Nakatani, K., Honda, Y., Chen, J., Yau, K.-W., and Shichida, Y. (2007) Molecular properties of rhodopsin and rod function. J. Biol. Chem. 282, 6677-6684.

Sakurai, K., A. Onishi, A., Imai, H., Chisaka, O., Ueda, Y., Usukura, J., Nakatani, K. and Shichida, Y. (2007) Physiological properties of rod photoreceptor cells in green-sensitive cone pigment knock-in mice. J. Gen. Physiol. 130, 21-40.

Fu, Y., Kefalov, V., Luo, D.G., Xue, T. and Yau, K.W. (2008) Quantal noise from human red cone pigment. Nat Neurosci. 11, 565-571.

網膜杆体系ON型双極細胞の受容野中心部の光応答特性

- 双極細胞間の homologous な電気シナプスとの関係 -

○日 高 聰¹・海 野 修²(¹藤田保健衛生大学 医学部 生理学 ・ ²東邦大学 理学部 情報科学科)

Keywords: electrical synapse, gap junction, retinal bipolar cell, photoresponse, receptive field

【目的】双極細胞は、網膜内で縦の情報伝達経路上に位置し、視細胞の錐体と杆体から興奮性シナプスを受け、網膜神経節細胞やアマクリン細胞に興奮性シナプスを形成している。硬骨魚類の双極細胞は錐体と杆体の両方の視細胞から入力を受ける。光応答様式から、受容野中心部へのスポット光刺激に対して、脱分極するON中心型と、中心部への光刺激に対して、過分極するOFF中心型の細胞がある。硬骨魚のON中心型双極細胞には、主に杆体視細胞から入力を受ける巨大型(type I)がある。このtype I型の杆体系ON中心型双極細胞は、抗プロテインキナーゼ (α サブユニット) 抗体で染色されることが知られている。また、硬骨魚の双極細胞では、同じ型の細胞同士がお互いにギャップ結合を形成している (homologous coupling) ¹。今回、コイ網膜の杆体系ON中心型双極細胞における受容野中心部の応答特性を解析し、受容野中心部の光応答と、杆体視細胞から双極細胞へのシナプス、および、この型の双極細胞間でのhomologousなギャップ結合・電気シナプスとの関係^{2, 3}を検討した。

【方法】暗順応したコイの剥離網膜を用いて、杆体系ON中心型双極細胞からガラス管微小電極法によって細胞内応答を記録した。CRTディスプレイを用いた光刺激装置により、幅50 μ m-長さ200 μ mのスリット光で双極細胞の受容野中心部内をステップ状に捜査して、以下の3点を調べた。① 測定した受容野は、スリット光の光刺激強度を変えることによって生じた応答の振幅にどのように依存するか、② 受容野は、背景光照射により変化するか。また、③ スリット光照射の時間間隔を変えて行くと、受容野領域における応答の振幅は、①の実験に比べて変化するか。生じた変化は、杆体視細胞と双極細胞との間のシナプス伝達がどのように調節されたためかについて解析した。

【結果】コイ網膜の杆体系ON中心型双極細胞の1個の細胞の樹状突起野の広がり直径30~40 μ mであるが、受容野中心部は直径200~400 μ mほどである。この双極細胞の密度は1,000 cells/mm²、平均の細胞間距離は31 \pm 7 μ mである。① 測定された受容野中心部は、スリット光で生じた応答振幅に依存して広がる例が見られた。即ち、光強度が弱い場合、受容野中心部は

狭かったが、光強度を強くすると、受容野中心部は広がった。② 背景光照射により、受容野中心部は大きくなった。なお、スリット光に対する応答時間を解析した結果、受容野の中心部の中央部が最も応答の立ち上がりが早く、周辺に行くに従って遅くなっていた。③ 強い光強度の場合に、①と同じ時間間隔でスリット光照射を行うと、受容野中心部の中央部での応答の振幅は減少した。一方、スリット光の照射の時間間隔を長くして、ゆっくりとスリット光刺激すると、受容野中心部の中央部での応答は回復して、応答振幅が最大を示した。

【考察】杆体系ON中心型双極細胞の受容野中心部は、1個の細胞の樹状突起野の広がりよりはかなり大きい。この型の双極細胞の間には、樹状突起にギャップ結合がある¹。受容野中心部での応答の立ち上がりが、中央部で早く、周辺に行くに従って遅くなる性質は、樹状突起間にある電気シナプスが、受容野中心部の拡大を制限することを示唆しているのではないか。外界からの光景が処理される視覚系の初期の段階で光環境に適応させて、コントラスト形成 (エッジ検出) の受容野特性を調節することは合理的であるので、その詳細なメカニズムを解明して行きたい。

【文献】

- 1) Umino, O., Maehara, M., Hidaka, S., Kita, S., Hashimoto, Y. (1994) The network properties of bipolar-bipolar cell coupling in the retina of teleost fishes. *Visual Neuroscience*, 11(3):533-548.
- 2) Hidaka, S., Akahori, Y., Kurosawa, Y. (2004) Dendrodendritic electrical synapses between mammalian retinal ganglion cells. *Journal of Neuroscience*, 24 (46): 10553-10567.
- 3) Hidaka, S., Kato, T., Hashimoto, Y. (2005) Structural and functional properties of homologous electrical synapses between retinal amacrine cells. *Journal of Integrative Neuroscience*, 4 (3): 313-340.

網膜双極細胞に発現する TRPM1 の機能解析

古川 貴久¹, 小池 千恵子¹, 小原 武久², 瓜生 幸嗣³, 近藤 峰生⁴, 森 泰生³, 立花 政夫²

(¹ (財)大阪バイオサイエンス研究所 発生生物学部門,

²東京大学大学院人文社会系研究科, ³京都大学大学院工学研究科, ⁴名古屋大学医学部眼科)

Key words: 網膜双極細胞、TRP、チャンネル

目的

我々は、脊椎動物において中枢神経系由来である網膜の発生や維持機構について、視細胞と双極細胞の細胞運命決定、網膜前駆細胞の増殖機構、視細胞の細胞極性の形成と層構造の構築、視細胞の神経終末の形成といった様々な面から研究を行ってきた (Nishida et al., 2003; Koike et al., 2005, Sato et al., 2008)。我々は網膜に特異的あるいは高レベルで発現する分子群のスクリーニングから、感覚受容に関わるカチオンチャンネルとして知られる Transient receptor potential family の1つである TRPM1 が網膜に強く発現することを見出し、マウス TRPM1 の long form の cDNA を初めてクローニングした。TRPM1 は TRPM サブファミリーで最も早く同定された分子であるが、その生体での機能は発見以来 10 年近く経つにもかかわらず明らかとなっていない。我々は TRPM1 のノックアウトマウスを作成し、機能解析を行った。

方法

TRPM1 ノックアウトマウスの解析を通じて TRPM1 の機能を解明したい。(1)TRPM1 蛋白質の組織レベルならびに細胞レベルでの局在の詳細を明らかにする。(2)TRPM1 のチャンネルとしての機能を解析する。mGluR6 や Kainate 型、AMPA 型 GluR との機能的相互作用の有無を検討する。(3)TRPM1 KO マウス網膜での双極細胞の生理学的機能を検定する。(4)TRPM1 KO マウスの視覚機能を生理学的に解析する。

結果

TRPM1 のノックアウトマウスを作成し、網膜電位

図を測定したところ、暗順応 (主に杆体) 条件下、明順応 (主に錐体) 条件下でともに b 波が完全に消失しており、双極細胞の光応答が消失している可能性が強く示唆され、視覚情報系において重要な役割を果たすことが示された。また網膜スライス標本にホールセルクランプ法を適応した結果、TRPM1 ノックアウトマウス網膜においては ON 型双極細胞のみが光刺激に応答しなかった。

考察

マウス網膜双極細胞に強く発現する TRPM1 の生体レベルでの解析を行うことで、TRP ファミリーの光感覚における新たな機能や双極細胞における神経情報伝達の新たなメカニズムを明らかにすることができると考えられる。

引用文献

- Nishida, A., Furukawa, A., Koike, C., Tano, Y., Aizawa, S., Matsuo, I. & Furukawa, T. Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nature Neurosci.* **6**, 1255-1263 (2003).
- Koike, C., Nishida, A., Akimoto K., Nakaya, M., Noda, T., Ohno, S. & Furukawa, T. Function of aPKC λ in differentiating photoreceptors is required for proper lamination of mouse retina. *J. of Neurosci.*, **25**, 10290-10298 (2005).
- Sato, S., Omori, Y., Katoh, K., Kondo, M., Kanagawa, M., Miyata, K., Funabiki, K., Koyasu, T., Kajimura, N., Miyoshi, T., Sawai, H., Kobayashi, K., Tani, A., Toda, T., Usukura, J., Tano, Y., Fujikado, T. & Furukawa, T. An essential role of pikachurin, a novel dystroglycan-binding protein, in bipolar dendrite apposition to photoreceptor ribbon synapse in the retina. *Nat Neuroscience*, *in press* (2008).

mGluR6 欠損網膜双極細胞における軸索指向性タンパクの異所性発現

○石井昌明^{1,2}・森際克子³・高雄元晴⁴・中西重忠⁵・福田 淳⁶・三村 治²・塚本吉彦¹
 (¹兵庫医科大学生物学科¹・眼科学²・EW89 シンクロニシティ研究所³・東海大学情報理工学部⁴・
 大阪バイオサイエンス研究所⁵・大阪大学大学院医学系研究科情報生理学⁶)

Key words: 代謝型グルタミン酸受容体、リボンシナプス、軸索輸送

目 的

代謝型グルタミン酸受容体サブタイプ6 (mGluR6) は、ON型双極細胞の樹状突起に分布し、視細胞から放出されるグルタミン酸を受容している。光 ON 刺激に対して、視細胞からのグルタミン酸放出は抑制され、ON 型双極細胞は sign-inverting に電位変化させ、ON 情報を伝達している。

mGluR6 を欠損させたマウス (mGluR6-KO) 網膜では、ERGの b-wave の消失や上丘からの Field Potential 記録での ON-response の消失¹⁾ など、視機能が著しく障害されているにも関わらず、光顕レベルの観察では、OPL・IPLにおける層構造にほとんど異常は認められなかった²⁾。

しかし、我々は mGluR6-KO の ON 型錐体双極細胞において、mGluR7 が異所性に出現する異常な現象について報告した³⁾。

さらに、電顕レベルの観察では、本来軸索にしか出現しないはずのシナプスリボンが樹状突起にも出現することが解った。この機構について、電顕、免疫組織化学を用いて、詳細に調べたことを今回は報告する。

方 法

mGluR6 欠損マウス、および野生型マウスの成体 (8~50 週齢) を用いて、2% paraformaldehyde と 2% glutaraldehyde を含む Cacodylate buffer を用いて、灌流固定の後、網膜組織を取り出し浸漬固定した。その後、エタノール脱水、プロピレンオキシドを経てアラルダイトに包埋した。その樹脂ブロックから約 0.09 μ m の連続超薄切片を作成した。観察には透過型電子顕微鏡 JEM1220 型を用いた。

免疫組織化学には、4% paraformaldehyde 溶液で灌流、浸漬固定したマウス網膜について凍結切片を作成した。免疫染色を行った。観察には、共焦点レーザー顕微鏡 LSM510Meta (Zeiss, Ger) を用いた。

桿体双極細胞 (RBC) の単離は、深麻酔下でマウス網膜を取り出し、Papain (12units) を含む Ames Medium で 60 分処理し、poly-L-lysine でコートしたスライドガラス上に播種した。その後、4% paraformaldehyde 溶液で固定し、組織の場合と同様の方法で免疫染色を行った。

結 果

OPL において、電子顕微鏡の観察で、mGluR6-KO RBC の樹状突起は桿体視細胞の軸索終末に陥入しているが、陥入突起部において、異所性にリボン構造が見られた。異所性に現れているリボンは、様々な形態を呈していた。その異所性リボンは、マウスが成長するにつれて増加していた。Goa 欠損網膜においても、同様の異所性発現が見られた。

シナプスリボンの構成タンパクである RIBEYE に対する抗体を用いて、単離した RBC について染色すると、mGluR6-KO では軸索終末だけでなく樹状突起の先端にも免疫陽性が見られ、野生型では見られなかった。免疫電顕では、視細胞のシナプスリボンだけでなく、陥入突起内にも出現している異所性リボン上にも免疫シグナルが分布した。単離した RBC でも同様に、mGluR6-KO では軸索終末だけでなく樹状突起の先端に RIBEYE が分布した。

さらに mGluR6-KO がどのような状態にあるかを調べるため、mGluR6-KO と WT マウスに対し、日周リズムを考慮した上、明順応においては室光 (0.5klux) に強い光 (2klux) を 2 時間追加照射した。その後固定した網膜で、RBC の形態を比較した。WT の明順応群では、軸索終末は円形に近くかつ膨化しているのに対して、暗順応群では不規則かつ細身の形態を呈していた。mGluR6-KO では、明・暗順応にかかわらず、形態は明順応群と同様な円形かつ膨化した形態を呈した。

一方、連続切片電顕法で 3 次元構築した OFF 型双極細胞についても調べたところ、驚くべきことに、樹状突起に異所性リボンがみられた。ただし、異所性リボンがみられたのは、軸索におけるもっともリボンシナプスが多いタイプのみであった。

考 察

mGluR6 はグルタミン酸を受容すると Go α を介した伝達系を経て陽イオンチャンネルを閉じる。発達期に L-AP4 を投与すると IPL の層構造に異常が現れるのは、L-AP4 がグルタミン酸の類似物として恒常的な暗順応 (過分極) 状態をもたらすからだと考えられている。しかし、Tagawa ら²⁾ は逆に、mGluR6-KO の IPL の層構造に異常が見られないことを報告している。今回の我々の結果からも、RBC の軸索終末の形態は mGluR6-KO と強い明順応状態にある野生型の間で同等な特徴を示した。従って、mGluR6-KO の RBC は恒常的な明順応 (脱分極) 状態にあると考えられる。

mGluR6 の機能については、視細胞からの光 ON 情報の伝達と、mGluR6-KO における c-fos 発現の上昇にみられるような転写調節などがある。今回の我々の研究では mGluR6-KO した場合の軸索指向性タンパクの異所性発現は、過分極できない状態による過剰な輸送による可能性が示唆されることから、mGluR6 は軸索指向性タンパクの適切な輸送の調節を行っている可能性が示唆される。

引用文献

- 1) Masu M, Iwakabe H, Tagawa Y, Miyoshi T, Yamashita M, Fukuda Y, Sasaki H, Hiroi K, Nakamura Y, Shigemoto R. (1995). Specific deficit of the ON response in visual transmission by targeted disruption of the mGluR6 gene. *Cell* 80, 757-765.
- 2) Tagawa Y, Sawai H, Ueda Y, Tauchi M, Nakanishi S. (1999). Immunohistological studies of metabotropic glutamate receptor subtype 6-deficient mice show no abnormality of retinal cell organization and ganglion cell maturation. *J Neurosci* 19, 2568-2579.
- 3) Tsukamoto Y, Morigiwa K, Ishii M, Takao M, Iwatsuki K, Nakanishi S, Fukuda Y. (2007). A novel connection between rods and ON cone bipolar cells revealed by ectopic metabotropic glutamate receptor 7 (mGluR7) in mGluR6-deficient mouse retinas. *J Neurosci* 27, 6261-6267.

形態学的&生理学的手法による新しいタイプのウサギ網膜神経節細胞の解析

Hideo Hoshi and Stephen L. Mills

(Department of Ophthalmology and Visual Science, University of Texas Medical School at Houston)

Key words: ganglion cell, synapse, gap junction

目的

ウサギ網膜 Ganglion cell は Rockhill ら (2002) や Roska ら (2006) によって既に 13-15 個のサブタイプに分類されている。この分類上、bistratified ganglion cell は ON-OFF directionally selective ganglion cell の唯一つだけであった。しかし、私たちは未分類の bistratified ganglion cell を同定した。今回の研究の目的は、この未分類の bistratified ganglion cell の網膜局所回路を形態学的、生理学的に明らかにすることである。

方法

Ganglion cells は acridine orange で前可視化した後、目的の細胞に (1) Lucifer yellow/Neurobiotin を注入し、染色した。(2) Spot/Annuli 光刺激をし、Loose-patch technique を用いて細胞外記録をした。目的の細胞を確認後、免疫組織化学的手法により、bipolar cell と amacrine cell との chemical および electrical シナプス結合を調べた。

結果

この Ganglion cell は以下のように形態学的、生理学的に ON-OFF directionally selective ganglion cell とは全く異なった未分類の細胞であった。(1) IPL の sublamina a の dendritic arbor は常に sublamina b よりも小さかった。(2) OFF arbor と ON arbor の樹状突起を比較すると、ON arbor で樹状突起の占有密度が高く、スパインが顕著に確認された。(3) OFF arbor は sublamina a の cholinergic band よりも distal 側に、一方 ON arbor は sublamina b の cholinergic band よりも proximal part 側にあった。(4) この Ganglion cell の OFF arbor の樹状突起は突然 ON 層に折れ込むように足を伸ばし、最終的に全ての dendrite が ON 層を走行する形態を保有していた。(5) 2つのタイプの amacrine cell と Tracer coupling していた。これらの amacrine cells は GABA を持っていた。

免疫組織化学の結果、この ganglion cell は intrinsic-photosensitive retinal ganglion cell (ipRGC; melanopsin-containing ganglion cell) と異なるものであった。Spot/Annuli の光刺激により、この細胞は ON center response を示した。驚くこと bistratified 構造を持っているにも関わらず、APB (mGluR6 agonist) 投与によって、全ての response が消失した。さらに興味深いことに APB+SR95531 (GABA_A receptor antagonist) 投与では ON center response が、一方 APB+Strychnine (Glycine receptor antagonist) 投与では OFF center response が再び現れた。尚、ニコチン投与による response の増加は見られなかった。また Calbindin と RIBEYE を用いた免疫組織化学の実験により、calbindin positive ON cone bipolar cell がこの ganglion cell と直接シナプス結合していることが明らかになった。

考察

私たちはウサギ網膜において ON-OFF directionally selective ganglion cell や melanopsin-containing ganglion cell とは異なった新しいタイプの bistratified ganglion cell を同定した。この細胞の一部は、一旦 OFF 層に樹状突起を伸ばしているにも関わらず、最終的に全ての樹状突起が ON 層を走行していることが形態学的に明らかになった。さらに光刺激 response は ON cone bipolar cell を介した ON pathway により独占的に得られるものであった。

形態学的&生理学的手法の両実験結果から、この新しいタイプの bistratified ganglion cell は、ON cone bipolar cell とは直接シナプス結合を持つのに対し、OFF cone bipolar cell とは間接的に amacrine cell を介して結合していることが示唆される。

引用文献

Rockhill RL, Daly FJ, MacNeil MA, Brown SP, and Masland RH (2002) The diversity of ganglion cells in a mammalian retina. *J. Neurosci.* 22: 3831-3843.

Roska B, Molnar A, Weblin FS (2006) Parallel processing in retinal ganglion cells: how integration of space-time patterns of excitation and inhibition form the spiking output. *J. Neurophysiol.* 95: 3810-3822.

H⁺ポンプ阻害剤は水平細胞から錐体視細胞への負帰還信号を抑制する

○山田雅弘^{1,2}、山本一徳^{1,2}、城宝浩³、金子章道⁴

(¹首都大学東京、²理研脳科学研究センター・ニューロインフォマティクス技術開発チーム*、

³アステラス製薬、⁴畿央大学) *現在の address Key words: V-ATPase、水平細胞、視細胞

目的

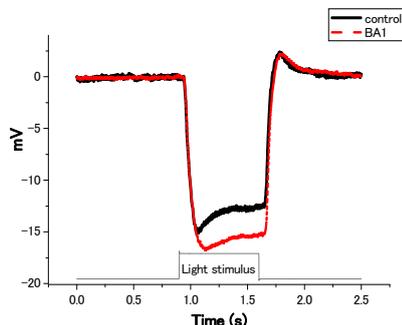
網膜の受容野周辺は水平細胞から視細胞への抑制性フィードバックによって形成されている。そのフィードバック機構に関してはGABAの関与が否定され、代わりに水平細胞から放出されるプロトン(H⁺)によって行われているとする仮説が提唱された(Hirasawa & Kaneko, 2003)。われわれはさきにH⁺放出の本態はプロトンポンプ(V-ATPase)であること、脱分極によって水平細胞からH⁺が放出されることを実証した(Jouhouら、2007a)。魚類網膜では、水平細胞のタイプによって錐体入力と桿体入力とが分離し、錐体入力型と桿体入力型水平細胞とに分かれている。H1型水平細胞は赤錐体を主入力とし、全ての波長に対し過分極性の光応答を示す。H2型水平細胞は、短波長光に対しては過分極性応答であるが、赤色に対しては脱分極性応答を示す。この脱分極応答はH1型水平細胞から緑感受性錐体へのフィードバックによって発生するものと考えられている。本研究では、V-ATPaseによるH⁺負帰還信号を阻害した際に、水平細胞の光応答がどのように変化するかを調べた。

方法

明順応状態のコイの剥離網膜を用いて、2チャンネルの光刺激装置で矩形波の光照射をし、H1とH2型水平細胞の光応答を記録した。リンゲル液にV-ATPaseの特異的阻害剤であるbafilomycin A1を0.4μM、あるいは非特異的阻害剤であるN-ethylmaleimideを0.5mM添加して光応答などの変化を調べた。Bicarbonateに基づくコントロールリンゲル液と阻害剤添加のリンゲル液のpHは、7.60で、pHメーターで常時モニターし、±0.01 pH unitの変動幅で、実験を行った。

結果

リンゲル液のpHを一定の値に保ちながら、0.4μMのbafilomycin A1含有リンゲル液の灌流に変えることより、明順応鯉網膜のH1型水平細胞の暗時の膜電位は、(1)脱分極し、(2)赤色光に対する応答振幅は増大した。また、(3)光応答の動特性は、遅くなった。



応答波形におけるsag(roll-back)と言われる応答ピークから潜時を伴った脱分極成分に基づき応答波形の戻り(跳ね返り)が、抑制された。0.5mM N-ethylmaleimideのリンゲル投与でも、同様の実験結果であった。図は、矩形波状の光刺激に対する光応答波形(数回の加算平均したもの)を示す。

H2型水平細胞も0.4μM bafilomycin投与で、(4)暗時の膜電位が脱分極した。また(5)短波長成分(過分極応答)が増大した。(6)H2型水平細胞の赤色光応答が相対的に減少した。すなわち、赤色光応答の相対的な応答振幅：赤色光応答/緑色光応答=R/G比は、bafilomycin投与により相対的に減少した。R/G比の減少幅は、1回目投与では余り大きくなかったが、頻回投与でさらに大きく減少した。

考察

これらの結果は、水平細胞からの負帰還が、プロトンポンプ阻害剤により抑制されたことを示唆している。すなわち、1)暗時膜電位の脱分極は、阻害剤非存在時には錐体視細胞からの伝達物質放出をH1とH2型水平細胞が抑制している。2)H1とH2型水平細胞の過分極応答増大は、負帰還の抑制により応答振幅が増大した。3)ノーマルリンゲル時には、負帰還に基づき、応答波形におけるsag成分により、応答振幅の減弱と動特性が速いが、プロトンポンプ阻害剤の投与により、sagの減少により応答振幅が増大し、動特性が遅くなったと考えられる。4)H2型水平細胞の赤色光応答が減少したのは、H1型水平細胞からの負帰還信号を抑制したことによると考えられる。

引用文献

- Hirasawa H, Kaneko A (2003) pH changes in the invaginating synaptic cleft mediate feedback from horizontal cells to cone photoreceptors by modulating Ca²⁺ channels. *J Gen Physiol* 122: 657-671
- Jouhou H, Yamamoto K, Homma A, Hara M, Kaneko A, Yamada M (2007a) Depolarization of isolated horizontal cells of fish acidifies their immediate surrounding by activating V-ATPase. *J Physiol* 585: 401-412
- Jouhou H, Yamamoto K, Iwasaki M, Yamada M (2007b) Acidification decouples gap junctions but enlarges the receptive field size of horizontal cells in carp retina. *Neurosci Res* 57: 203-209
- Yamamoto, K., Jouhou, H., Iwasaki, M., Kaneko, A. and Yamada, M. (2008). Strongly pH-buffered Ringer's solution expands the receptive field size of horizontal cells in the carp retina. *Zoological Science* 25, 419-427

網膜外網状層におけるV-ATPase (H⁺ポンプ) の局在

○ 城宝浩¹, 中野健二^{1b}, 石川修司^{1b}, 佐野孝一^{1b}, 宍戸隆男^{1b}, 山本一徳², 山田雅弘², 金子章道³
 (¹アステラス製薬・安全性研究所, ^{1b}アステラス リサーチ テクノロジー・病理担当, ²理研脳科学研究センター, ³畿央大学)

Key words: V-ATPase, 水平細胞, 免疫電顕

目 的

網膜細胞の受容野周辺部は、従来より水平細胞から錐体視細胞へのnegative feedbackによって形成されると理解されている。この側抑制機構はpicROTOXINでは阻害できないことからGABAがそのメディエーターであるとする仮説は否定された。代わりにHirasawaとKaneko (2003)は、イモリ網膜スライス標本を用いた実験で錐体視細胞のCa電流が周辺部照射によって増大すること、この現象は pHクランプ条件下では見られないことから、水平細胞から放出されるH⁺こそがnegative feedbackの主要なメディエーターであるとする「プロトン負帰還説」を提唱した。また同年Jouhouらはコイ剥離網膜で水平細胞の色応答におけるpH依存性から色情報変換に関しても水平細胞からのH⁺による制御機構の可能性を示唆した。さらに昨年pH感受性色素を用いて単離水平細胞の細胞膜外側のpH測定を行い、水平細胞にはH⁺を変える能力があり脱分極により酸性化が起きること、この本態はH⁺ポンプ (V-ATPase) であることを示唆した (Jouhouら, 2007)。

今回、我々は組織化学的手法により網膜におけるV-ATPaseの局在証明を行うことで、このシナプス間隙を舞台とした水平細胞から錐体視細胞へのfeedback機構の解明を目指した。

方 法

網膜標本：約50gのキンギョ34匹及び約6kgのサル4頭の網膜を各々標本作製に用いた。V-ATPaseのB1/B2-サブユニット(56-58kDa)に対する抗体(H-180: sc-20943, Santa Cruz Biotechnology, USA)を用いて、免疫組織化学的な検証をWestern blot法、光顕及び電顕で行った。

結 果

Western blot法によりV-ATPaseのB1/B2 subunit抗体で同蛋白の存在を確認したのち、キンギョ網膜のパラフィン切片を用いて同抗体の免疫染色を行い、蛍光顕微鏡及び共焦点顕微鏡により外網状層においてV-ATPaseの発現を確認した。錐体視細胞終末では強く、そして水平細胞様の細胞で弱く発現していた。さらに水平細胞を特定する目的で、H1型水平細胞

での発現が知られているGAD (glutamic acid dehydroxylase, GABAの合成酵素)抗体との二重染色を行い、外網状層の特に水平細胞と視細胞におけるV-ATPaseの局在を蛍光顕微鏡及び共焦点顕微鏡にて確認した。次にシナプス部における詳細なV-ATPaseの局在をみるために水溶性樹脂を用いた免疫電顕を行い、キンギョ水平細胞の細胞体の細胞膜面にV-ATPaseの発現を確認した。また錐体視細胞終末及び陥入型シナプスのGAD抗体で特定した水平細胞の樹状突起先端においてもV-ATPase発現を確認した。同様にサルのリボンシナプスでもlateral elementにV-ATPaseの局在を確認した。

以上、キンギョ及びサル網膜において外網状層の錐体終末の陥入シナプス部位で、前シナプス側の小胞由来のV-ATPaseと共に、後シナプス側にも水平細胞の樹状突起部位でV-ATPaseの局在を確認した。

考 察

Jouhouら(2007)は、水平細胞のV-ATPaseを介し錐体視細胞終末のCaチャンネルに対してプロトンによるnegative feedbackが行われる可能性を示唆した。そして今回、我々は電顕と光顕を用いて組織化学的に、錐体視細胞終末の陥入型シナプスへ伸ばしている水平細胞の樹状突起においてV-ATPaseの存在を証明した。

これらの結果は、プロトン負帰還説において重要な錐体視細胞終末のシナプス間隙への水平細胞からのプロトン放出の分子機構であるV-ATPaseの局在を示すものである。

引用文献

- Hirasawa H, Kaneko A (2003) pH changes in the invaginating synaptic cleft mediate feedback from horizontal cells to cone photoreceptors by modulating Ca²⁺ channels. *J Gen Physiol* 122: 657-671
- Jouhou H, Yamamoto K, Homma A, Hara M, Kaneko A, Yamada M (2007) Depolarization of isolated horizontal cells of fish acidifies their immediate surrounding by activating V-ATPase. *J Physiol* 585: 401-412
- Jouhou H, Nakano K, Ishikawa S, Sano K, Shishido T, Yamamoto K, Kaneko A and Yamada M (2008) Immunohistological localisation of vacuolar-type adenosine triphosphatase in the outer retinae of goldfish and monkey. 投稿審査中

マウス網膜コリン作動性アマクリン細胞のコリン電流

金田 誠

(慶應義塾大学医学部生理学教室)

Key words: ATP, purinergic receptor, amacrine cell

目的

P2X2 型プリン受容体陽イオンチャネルは、N-methyl-D-glucamine のような巨大な陽イオンに対してもイオン透過性を有することが報告されている (Fujiwara et al., 2004)。

マウス網膜では、OFF 型コリン作動性アマクリン細胞に P2X2 型プリン受容体が存在すること (Kaneda et al., 2004)、また OFF 型コリン作動性アマクリン細胞では ATP を投与すると P2X2 型プリン受容体が活性化されて陽イオン電流が生じることが報告されている (Kaneda et al., 2008)。

本研究では、コリン作動性アマクリン細胞に存在する P2X2 型プリン受容体チャネルが、細胞外コリンに対する透過性を有するかどうかについてパッチクランプ法を用いて検討した。

方法

実験には GFP がコリン作動性アマクリン細胞特異的に発現する遺伝子改変マウス網膜を用いた。酵素処理を行って作製した単離網膜神経細胞標本にホールセルパッチクランプ法を適用し、ATP 投与で誘発される P2X2 プリン受容体を流れる陽イオン電流を記録し、解析に用いた。コリン作動性アマクリン細胞は、蛍光顕微鏡下で GFP 蛍光像陽性の細胞として同定した。逆転電位の観察は、電位依存性イオンチャネルをブロックする条件 (30mM tetraethylammonium Cl, 3mM 4-aminopyridine, 100 μ M cdCl₂) で行った (Kaneda et al., 2007)。ATP は bath application 法を用いて投与した。

結果

ホールセル条件下に細胞を -70 mV に保持して 100 μ M の ATP を投与すると内向き電流が観察された。この内向き電流は、細胞外液中の NaCl を choline Cl に置換した条件でも choline acetate に置換した条件でも観察された。細胞外液中の choline acetate を等浸透圧の sucrose に置換して逆転電位を観察すると逆転電位の移動が観察された。ATP で誘発されるコリン電流の濃度反応曲線は EC₅₀ が 4.6 μ M、Hill 係数が 1.9 の曲線でフィットできた。これらの値は NaCl 溶液を用いたときに ATP で誘発される陽イオン電流の EC₅₀ (3.6 μ M)、Hill 係数 (1.8) に近い値を示した。しかしながら最大応答値は NaCl 存在下に ATP で誘発される陽イオン電流の 30% であった。コリン電流は ATP- γ -S で誘発することができたが、 α 、 β -methylene ATP や benzoyl, benzoyl ATP の投与では誘発されなかった。また ATP で誘発される choline 電流は PPADS 存在下では誘発されなかった。これらの薬理学的性質はマウス網膜 P2X2 型プリン受容体の薬理学的性質と一致するものであった (Kaneda et al., 2008)。

考察

P2X2 型プリン受容体はコリンに対してイオン透過性を有することが明らかになった。コリンはアセチルコリン合成の前駆体であることから OFF 型コリン作動性アマクリン細胞では、P2X2 型プリン受容体の活性化にともなってコリンが細胞内に取り込まれる機構が存在する可能性が示唆された。

参考文献

Fujiwara, Y., and Kubo, Y. (2004) Density-dependent changes of the pore properties of the P2X2 receptor channel. *J Physiol (Lond)* 558, 31-43.

Kaneda, M., Ishii, K., Morishima, Y., Akagi, T., Yamazaki, Y., Nakanishi, S., and Hashikawa, T. (2004) OFF-cholinergic-pathway-selective localization of P2X2 purinoceptors in the mouse retina. *J Comp Neurol* 476, 103-111.

Kaneda, M., Ito, K., Morishima, Y., Shigematsu, Y., and Shimoda, Y. (2007) Characterization of voltage-gated ionic channels in cholinergic amacrine cells in the mouse retina. *J Neurophysiol* 97, 4225-4234.

Kaneda, M., Ishii, T., and Hosoya, T. (2008) Pathway-dependent modulation by P2-purinoceptors in the mouse retina. *Eur J Neurosci*, in press.

単離網膜神経細胞上の抑制性シナプス前終末

○本村珠美・林田祐樹

(熊本大学大学院自然科学研究科)

Key words: 網膜, 単離細胞, シナプス終末

目的

電気生理学的計測に用いる単一神経細胞試料を作成する際、一般的にはタンパク質分解酵素が用いられるが、今回は、機械的振動を用いた単離法をラット網膜に適用し、神経節細胞層より単離細胞を得た。これらの細胞試料にシナプス前終末が保持されているかを、蛍光染色及び穿孔パッチ計測により検討した。

方法

図1に単離操作の手順を示す。P7-16のWistarラット眼球より網膜を剥離し、二等分した網膜片を、神経節細胞層が上になるように培養ディッシュ内に置く。網膜片を試料押さえ(図中TH)で固定し、 low-Na^+ , Ca^{2+} 溶液に3分間浸す(図左下)。その後、熱加工して先端を滑らかにしたガラス電極を、神経節細胞層の表面に軽く接触させ、50-100 Hzで水平振動させる事により細胞を単離する(図右)。単離された細胞をディッシュ底面に定着させる為、ディッシュを除振台上に静置した後(>1.5 hr)、実験に用いた。

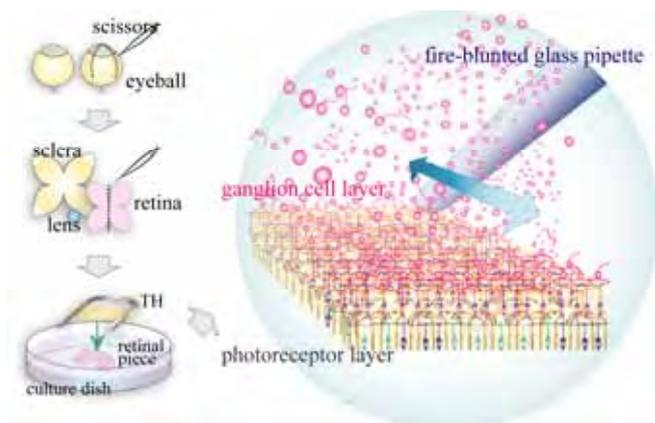


fig.1 網膜神経細胞の機械的振動単離法

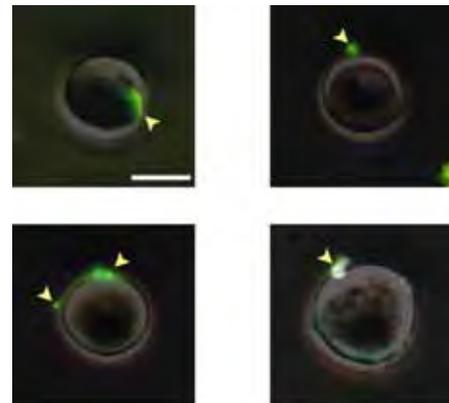
穿孔パッチ記録により電圧/電流固定実験を行った。細胞外溶液の組成は(mM); NaCl 140, KCl 3.5, MgCl_2 1, CaCl_2 2.5, D-glucose 10, HEPES 5 (~pH7.3)。電極内液の組成は(mM); K-gluconate 110, KCl 15, NaOH 15, MgCl_2 0.34, EGTA 1, HEPES 10 (~pH7.2)。穿孔剤としてamphotericin B (0.27 g/l) を用いた。今回の計測には、細胞体直径が十数 μm 以上で、かつ細胞内電流注入に対する活動電位応答の振幅が70 mV以上の細胞を用いた。

後述する自発性膜電位変化が確認された細胞に対し、FM1-43による染色を行った。FM1-43 (3 μM)を含む high-K^+ 溶液中で10-30分間インキュベートした後、20分程度の low-K^+ 溶液灌流により細胞外液中及び細胞膜上の染色剤を洗い流し、蛍光観察を行った。

結果

機械的振動単離法により得られた単離神経細胞に対し、穿孔

パッチ記録による電圧/電流固定下で膜電流/膜電位計測を行ったところ、急性単離細胞においては過去に報告の無い、自発的な一過性の電流/電位変化が観測された(図無し)。それらの細胞に対し、FM1-43による染色を行ったときの蛍光像を図2に示す。細胞体上にスポット状の蛍光が見られ(図中矢頭)、記録を行った単離細胞上にシナプス前終末部が残存していることが示唆された。

fig.2 単離細胞膜上シナプス前終末の FM1-43 蛍光染色. 位相差顕微鏡による透過像と、蛍光像を重ねた写真. 図中スケールは10 μm .

上述の一過性電流/電位変化の反転電位は約-80 mVにあり、また-50 mV以下の膜電位範囲においては振幅に内向き整流性が見られた。さらに細胞外に Ba^{2+} 0.3 mMを投与すると、一過性電流/電位変化の振幅は減少したものの、その発生頻度には変化が認められなかった。同様に、GABA受容体の選択的拮抗剤であるCGP-55845 (20 μM)を投与した場合も、一過性電流/電位変化の振幅は減少したが、発生頻度に変化は見られなかった。これらの結果から、記録細胞の細胞体上に残存するGABA作動性のシナプス前終末部からGABAが放出され、後膜上のGABA受容体を介して内向き整流性 K^+ 電流が賦活されることが分かった。

考察

今回単離した網膜神経細胞上にはシナプス前細胞の終末部のみが、伝達物質機能を保持したまま残存していることが強く示唆された。今後、この抑制性シナプス前終末部に局在するイオンチャンネル等を調べるのが今後の課題である。

ネコ外側膝状体ニューロンにおける刺激方位選択性の時間的变化

○岡本正博¹・内藤智之²・原真一郎¹・七五三木聡²・佐藤宏道²
(¹大阪大学大学院生命機能研究科・²大阪大学大学院医学系研究科)
刺激方位選択性、外側膝状体、皮質下メカニズム

目的

大脳皮質一次視覚野 (V1) ニューロンは、受容野に呈示された特定の傾き (方位) の刺激に最も良く応答する性質 (刺激方位選択性) を示す。この刺激方位選択性は、方位選択性のない外側膝状体 (LGN) の複数のニューロンが、その受容野が一定の傾きをなすように配列し V1 ニューロンに投射することによって形成され、さらに V1 内の神経回路によって、その選択性が増強されると考えられてきた。しかし、我々の先行研究によって高空間周波数を持ち受容野内外を覆う大きな刺激を用いると LGN ニューロンも刺激方位選択性を示すことが明らかになった。また、V1 ニューロンの反応は受容野内外に呈示する刺激の大きさやコントラスト・空間周波数・時間周波数に依存してダイナミックに変化することも知られている。この刺激文脈に依存したニューロン活動の修飾は V1 内の水平結合や抑制性神経回路を介して生じると考えられてきた。しかし、我々がおこなった V1 内抑制性神経伝達を遮断する実験では、V1 ニューロンの文脈依存的反応修飾に変化が見られず、LGN から V1 への入力段階において反応修飾の基本的性質が形成されていることが示唆された。従って我々は、視床-皮質間結合のあり方や、刺激特徴選択性・文脈依存的反応修飾の形成メカニズムにおける LGN と V1 の関係を見直す必要があると考え、LGN ニューロンの反応における刺激方位選択性の時間的变化を解析した。

方法

麻酔非動化したネコの LGN において微小金属電極を使った単一ニューロン活動の細胞外記録を行った。記録ニューロンの受容野より大きく、かつそのニューロンの最適空間周波数よりも高い空間周波数でサイン波状に輝度変化するグレイティング刺激を 500 ミリ秒間静止して呈示したときのニューロン応答を記録し、刺激方位選択性の時間的变化を調べた。

結果

多くの LGN ニューロンにおいて刺激方位選択性が見られたが、V1 のそれと比較すると弱い傾向にあった。また、V1 ニューロンの平均最短応答潜時 (36.4 ± 9.9 msec) よりも早い潜時で優位な刺激方位選択性を示すニューロンがあった (8/27 個)。

考察

本実験の結果は LGN ニューロンにおける刺激方位選択性の形成に皮質下のフィードフォワード入力に関与していることを示唆する。

網膜障害誘発外側膝状体(LGN)の形態的・経時的変化

伊藤保志¹・嶋澤雅光¹・陳逸寧²・山嶋哲盛³・新家眞²・原英彰¹(¹岐阜薬科大学薬効解析学・²東京大学大学院医学系研究科眼科学・³金沢大学大学院医学系研究科再生脳外科学)

Key words: 緑内障、マウス、サル

目的

外側膝状体 (LGN) は網膜神経節細胞(RGC)からの視覚信号を視覚野へと中継している領域である。近年、緑内障患者において 50%以上の網膜神経節細胞死が惹起されて視野欠損が生じること (Quigley et al., 1989) さらには LGN の神経障害も引き起こされていることが報告されている (Gupta et al., 2006)。このことから、緑内障病態を解明するためには、網膜だけでなく LGN についても検討することが重要である。しかしながら、緑内障における LGN の神経変性機序については十分に解明されていない。そこで今回、*N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 誘発マウス網膜障害モデル及びアルゴンレーザー誘発サル高眼圧モデルを用いて、網膜障害時の LGN の経時的変化を検討した。

方法

1) 雄性 C57BL/6J マウス左眼硝子体内に NMDA を投与し網膜神経障害を誘発した。NMDA 投与 1~180 日後に眼球及び脳を経時的に摘出し、切片を作製した。網膜はヘマトキシリン・エオジン染色を行い RGC 数及び内網状層厚の測定を行い、視索は厚み及び面積を測定した。LGN は免疫染色 [neuronal nuclei (NeuN), glial fibrillary acidic protein (GFAP), brain-derived neurotrophic factor (BDNF)] し、経時的に光学顕微鏡を用いて比較検討した。また NeuN/BDNF, GFAP/BDNF 二重免疫蛍光染色は共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

2) サル左眼にアルゴンレーザーの隅角照射を行い、眼圧上昇を誘発した。レーザー照射 0~48 週間後に眼底写真の撮影を行った。視神経及び脳を経時的に摘出し、切片を作製した。視神経 (ON) 線維数はトルイジンブルー染色を行い測定し、LGN 神経細胞数及び細胞体の面積はクレシルバイオレット染色を行い測定した (Fig. 1)。

結果

1) マウス網膜組織障害は NMDA 投与 1 日後から観察され、その障害の大半は 7 日後までに観察された。視索は NMDA 投与 7 日後から厚み及び面積に有意な減少が認められた。NMDA 投与 7 日以降に、対側の LGN において特異的に NeuN 陽性細胞の細胞体の収縮 (soma size の減少) が認められ、投与 90 日以降に細胞死が認められた。また、この LGN 領域における神経変性過程において NMDA 投与 7 及び 30 日後に GFAP 陽性細胞の有意な増加が認められ、BDNF 陽性細胞の発現の上昇が対側の LGN で NMDA 投与 7、90 及び 90 日後に認められた。しかしながら、同側の LGN において有意な変化は認められなかった。

2) 高眼圧サル眼の眼底写真において視神経乳障害はレーザー照射 2 週間後から観察され、時間依存的に障害の進行が認められた。また高眼圧サル眼の視神経において断面積及び視神経線維数の減少が認められ、その視神経投射領域 (同側の LGN の 2、3、5 層及び対側の LGN の 1、4、6 層) において神経細胞体の収縮 (soma size の減少) 及び神経細胞数の減少が経時的に認められた。

考察

マウス及びサル網膜障害後の LGN の時間依存的な変化はこれまでに報告されていたヒト、アカゲサル、ラットの結果 (Weber et al., 2000; Wang et al., 2000; Yücel et al., 2001) と同様に、網膜、視索及び LGN の神経障害が経時的に進行していた。また、マウス LGN の神経変性機構には GFAP 及び BDNF が関与していることが示唆された。しかしながら、その詳細なメカニズムについては解明されておらず、本実験における結果を基に更なる検討を行うことにより緑内障における LGN 障害の分子メカニズムを解明することが期待される。また、本モデルを用いて神経保護薬の眼及び脳 (LGN 領域) における効果についても検討することが可能である。

引用文献

Gupta, N., Ang, L.C., Noel, de, Tilly, L., Bidaisee, L., Yücel, YH. (2006). Human glaucoma and neural degeneration in intracranial optic nerve, lateral geniculate nucleus, and visual cortex. *Br J Ophthalmol.* 90, 674-678.

Quigley, HA., Dunkelberger, GR., Green, WR. (1989). Retinal ganglion cell atrophy correlated with automated perimetry in human eyes with glaucoma. *Am J Ophthalmol.* 107, 453-464.

Wang, X., Tay, S, S-W., Ng, Y-K. (2000). Nitric oxide, microglial activities and neuronal cell death in the lateral geniculate nucleus of glaucomatous rats. *Bain Res.* 878, 136-147.

Weber, A.J., Chen, H., Hubbard, W.C., Kaufman, P.L. (2000). Experimental glaucoma and cell size, density, and number in the primate lateral geniculate nucleus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41, 1370-1379.

Yücel, YH., Zhang, Q., Weinreb, R.N., Kaufman, P.L., Gupta, N. (2001). Atrophy of relay neurons in magno- and parvocellular layers in the lateral geniculate nucleus in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42, 3216-3222.

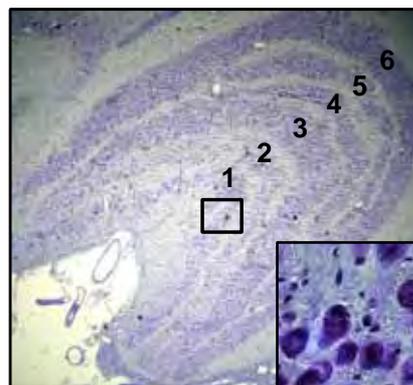


Fig. 1 The left LGN from control Japanese monkeys

ラット外側膝状体における VGluT1 と mGluR1 α の活動依存的制御

○吉田三穂¹・佐藤武正²・中村公一³・金子武嗣³・畠 義郎¹

(¹鳥取大学大学院医学系研究科・²鳥取大学医学部生命科学科・³京都大学大学院医学研究科)

Key words: LGN, mGluR1 α , VGluT1

目的

哺乳類視覚系は発達期に視覚経験依存的な可塑性を示す。この時、外側膝状体 (LGN) から一次視覚野 (V1) への入力投射が大きな形態変化を示すことは既に明らかとなっているが、皮質内神経回路や V1 から LGN へのフィードバック投射など、それ以外の神経回路の形態変化については未だほとんど明らかとされていない。神経活動の変化により視覚系神経回路のどの部分に可塑的变化が生じるかを明らかにし、機能的变化を保存する神経結合を特定することは、視覚野だけでなく大脳皮質神経回路の基本的な発達機構を理解する上で重要な情報となる。

そこでまず我々は、V1 から LGN へのフィードバック投射に注目した。多くの哺乳類において、LGN ニューロンへのシナプス結合は、網膜からの投射よりも、多くは V1 からのフィードバック投射によるものである。理論的にもこのようなループ型の情報処理経路の重要性が指摘されていることから、この経路の変化は、視覚系の機能に大きく影響すると予想できる。そこで、V1 から LGN へのフィードバック投射のプレシナプス、ポストシナプスに特異的に発現している小胞性グルタミン酸トランスポーター 1 (VGluT1) と、代謝型グルタミン酸受容体 1 型 α (mGluR1 α) に注目し、それらが神経活動依存的に変化するかどうかを検討した。

方法

まず、皮質損傷によりフィードバック投射を除去し、VGluT1 と mGluR1 α がフィードバック投射シナプスを反映するかどうかを確かめた。ラット右脳の V1 に、興奮毒性をもつカイニン酸を注入し、14 日間生存の後、LGN の VGluT1 と mGluR1 α を免疫組織化学染色法により調べた。さらに、神経活動依存的にフィードバック投射シナプスが変化するかどうかを検討するために、浸透圧ミニポンプ付きカニューレを発達期、及び成熟期のラット右脳 V1 に留置し、GABAA 受容体のアゴニストであるムシモールをさまざまな期間継続投与した。

結果

V1 に、興奮毒性を持つカイニン酸と、逆行性トレーサーであるフルオロゴールドを同時注入したラットの LGN において、フルオロゴールド標識部位で、VGluT1 の免疫組織化学染色性の減弱が確認された。また、V1 の破壊範囲と LGN の VGluT1 の減弱領域の広さに相関が見られたことから、VGluT1 シグナルは V1 から LGN へのフィードバック投射のプレシナプスを反映することが確認された。さらに、VGluT1 減少領域で mGluR1 α も減少していたことから、mGluR1 α シグナルはフィードバック投射のポストシナプスを反映することが確認された。

フィードバック投射シナプスが神経活動依存的に制御されるかどうかを確かめるために、発達期ラットの V1 に 2 日、7 日、14 日、28 日間のムシモール継続投与を行った。14 日、28 日群のムシモール投与側の LGN で、VGluT1 の染色性は有意に増加したが、mGluR1 α は全ての群で有意に減少した。これらの変化が発達期に特異的かどうかを検討するため、成熟期

ラットの V1 に 2 日、7 日、14 日間のムシモール継続投与を行った。VGluT1 には有意な変化は見られず、mGluR1 α は 7 日群でのみ有意に減少した。

考察

発達期の V1 の活動抑制は、フィードバック投射のポストシナプスに発現している受容体、mGluR1 α のダウンレギュレーションをもたらし、さらに長期の抑制は、プレシナプストランスポーター、VGluT1 の代償的なアップレギュレーションをもたらした。この結果は LGN から V1 への求心性投射と同様に、フィードバック投射もまた発達期に神経活動依存的にその機能が変化することを示唆している。

ラット新皮質の培養細胞において、VGluT1 の発現が神経活動の阻害により増大することが報告されている (De Gois et al., 2005)。この変化が 48 時間で引き起こされたのに対して、今回の結果は 14 日、または 28 日という長期の抑制の効果であるので、各シナプスでの VGluT1 タンパクの増加以外にも、フィードバック投射軸索の増加の可能性が考えられる。これらの制御は発達期に特有のものであるが、発達期において一定のフィードバック入力を保とうとする恒常的な仕組みが機能しているのかもしれない。

引用文献

De Gois, H., Schafer, MK., Defamie, N., Chen, C., Ricci, A., Weihe, E., Varoqui, H., and Erickson, JD. (2005). Homeostatic Scaling of Vesicular Glutamate and GABA Transporter Expression in Rat Neocortical Circuits. *J Neurosci* 25(31), 7121-7133.

薬理的に抑制された視覚野で見られる軸索退縮の年齢依存性

○森島 佑・樋川正仁・渡邊佳奈・島 義郎

(鳥取大学大学院医学系研究科生体高次機能学部門)

Key words: visual cortex, ocular dominance plasticity, muscimol

目 的

発達初期の臨界期と呼ばれる時期の大脳皮質一次視覚野では、視覚入力¹の量またはパターンを実験的に操作することにより、両眼反応性の発達が大きな影響を受ける。例えば、一方の眼に視覚遮断を行うと、大脳皮質視覚野のニューロンは両眼反応性を失い、健常眼にのみ反応するようになる(Wiesel and Hubel, 1963)。これを眼優位可塑性と呼ぶ。また形態学的にも、遮蔽眼からの入力軸索が退縮する(Antonini and Stryker, 1993, 1996)。しかし、皮質内での抑制性伝達物質GABAのA型受容体作動薬であるmuscimolを持続的に投与し、視覚野の活動を抑制した状態で片眼遮断を行うと、視覚野ニューロンは遮蔽眼により強く反応するようになる(逆向きの眼優位可塑性)(Reiter and Stryker, 1988)。またこの時、健常眼からの投射軸索が退縮する(Hata et al., 1999)。このことは、視覚野ニューロンの神経活動が、眼優位可塑性に重要な役割を果たしている事を示唆している。

しかし、逆向きの眼優位可塑性が、通常の眼優位可塑性のように、発達期にのみ発現する可塑性メカニズムを反映するものなのかは明らかでない。そこで、我々は逆向きの眼優位可塑性の年齢依存性を検討した。

方 法

発達期、成熟期のネコの一次視覚野に、muscimolが入ったポンプに接続したカニューレを埋め込み、視覚野の活動を持続的に抑制した。また同時に、反対側の眼からの投射を受けている外側膝状体のA層に順行性のトレーサーであるビオチン化デキストラミンを注入し、さらに対側眼を遮蔽した。6日間の片眼遮断の後、神経活動が抑制されていた皮質領域の広さを電気生理学的に調べてから、muscimol投与を中止し、視覚野ニューロンの眼優位性を調べた。

その後、脳をパラホルムアルデヒドで固定し、ABC法で軸索を可視化した。コンピュータ上で軸索分枝を3次元的に再構築し(Neurolucida system, Microbrightfield社)、その形態を定量的に評価した。

結 果

成熟したネコの一次視覚野では、通常の眼優位可塑性も逆向きの眼優位可塑性も観察されず、逆向きの眼優位可塑性は通常の可塑性と同じく、発達期特有の現象であるということが明らかとなった。しかし、発達期においては、通常の眼優位可塑性が最も顕著である臨界期のピーク時期(生後24-28日)には逆向きの眼優位可塑性は観察されず、臨界期の後期(生後40日以降)の動物で観察された。

また、形態学的にも、臨界期後期の動物の入力軸索では、その全長と分岐点の数が、同年齢にあたる生後50日齢の正常動物のもの²と比べて有意に減少していたのに対して、臨界期ピークの動物のものは正常動物と比べて有意な差は見られなかった。

考 察

通常の眼優位可塑性が視覚野のII/III層で急速に進行するのに対して(Daw and Czeppita, 1992; Trachtenberg et al., 2000)、逆向き³のものは第IV層で強く見られることが報告されている(Shimegi and Daw, 2003)。この第IV層は、入力軸索の標的であり、逆向きの眼優位可塑性は入力軸索の退縮を伴うことが今回の実験でも確認された。これらのことから、逆向きの眼優位可塑性は、発達期の後期で見られる経験依存的な入力軸索の再編成の過程を強く反映したものであると考えられる。

引用文献

Antonini A, Stryker MP (1993) Rapid remodeling of axonal arbors in the visual cortex. *Science* 260:1819-1821.

Antonini A, Stryker MP (1996) Plasticity of geniculocortical afferents following brief or prolonged monocular occlusion in the cat. *J Comp Neurol* 20:369:64-82.

Daw NW, Fox KD, Sato H, and Czeppita D (1992) Critical period for monocular deprivation in the cat visual cortex *J Neurophysiol* 67:197-202.

Hata Y, Tsumoto T, Stryker MP (1999) Selective pruning of more active afferents when cat visual cortex is pharmacologically inhibited. *Neuron* 22:375-381.

Reiter HO, Stryker MP (1988) Neural plasticity postsynaptic action potentials: less-active inputs become dominant when kitten visual cortical cells are pharmacologically inhibited. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85:3623-3627.

Shimegi S, Fischer QS, Yang Y, Sato H, Daw NW (2003) Blockade of cyclic AMP-dependent protein kinase does not prevent the reverse ocular dominance shift in kitten visual cortex. *J Neurophysiol* 90:4027-4032.

Trachtenberg JT, Trepel C, Stryker MP (2000) Rapid extragranular plasticity in the absence of thalamocortical plasticity in the developing primary visual cortex. *Science* 287:2029-2032.

Wiesel TN, Hubel DH (1963) Single-cell responses in striate cortex of kittens deprived of vision in one eye. *J. Neurophysiol* 26:994-1002.

一次視覚野のT型Ca²⁺チャンネル依存性長期増強と眼優位可塑性

○吉村由美子¹・稲葉美枝^{1,2}・山田和政¹・黒谷亨¹・丸山拓郎¹・小松由紀夫¹

(¹名古屋大学環境医学研究所・²京都府立医科大学)

Key words: visual cortex, ocular dominance plasticity, T-type Ca²⁺ channel

目的

大脳皮質一次視覚野ニューロンにみられる視覚反応選択性は生まれた時点では未熟で、発達期の視覚入力による神経活動に基づいて視覚野神経回路が精緻化されて成熟すると考えられている。シナプスの可塑的变化は経験依存的な神経回路調整の重要な基盤であることが報告されている。これまでに我々の研究室では、ネコやラット視覚野の2/3層錐体細胞において、シナプス前線維に2Hz刺激を15分間与えると、NMDA受容体の活性化を必要としない、興奮性シナプス伝達の長期増強が起こることを見出した^{1,2)}。この長期増強の誘発には、低濃度(50 μM)のNi²⁺によりブロックされるCa²⁺チャンネルの活性化とそれに伴うシナプス後細胞内Ca²⁺濃度の上昇が必要であった。またこの長期増強誘発の年齢依存性を調べた結果、視覚反応可塑性の感受性期に限局して起こることを見出した。今回、我々は、この長期増強の特性をさらに同定するとともに、感受性期の視覚反応可塑性における役割について解析したので報告する。

方法

スライス標本による長期増強の解析

実験には生後14-16日齢、20-30日齢、60-90日齢のLong-Evansラットを用いた。深麻酔したラットより視覚野スライス標本を作成した。2対の双極性タングステン電極を4層に刺入し、その電気刺激によって誘発される興奮性シナプス後電位を、ホールセルパッチクランプ法を用いて2/3層錐体細胞より記録した。一部の実験では4層刺激により誘発される電場電位を2/3層より記録した。長期増強の誘発には2Hz、15分の条件刺激を、一方の刺激電極を用いて与えた。

眼優位可塑性の解析

眼優位可塑性の感受性期である生後25,26日齢のLong-Evansラットの片眼を6日間遮蔽した。実験群では片眼遮蔽中に、浸透圧ミニポンプを用いてT型Ca²⁺チャンネル阻害剤のmibefradilを視覚野に持続投与した。眼優位性を調べるために、ウレタン麻酔下のラット視覚野の両眼投射領域より視覚誘発電位(VEP)を記録した。VEPの誘発には、高コントラストで正弦波の縦縞を1Hzで反転させる刺激を用いた。この視覚刺激を左右それぞれの眼に150-200回与え、そのVEPの平均振幅を測定した。

結果

視覚反応感受性期のラットより作成した視覚野スライス標本では、条件刺激に伴い顕著なLTPが観察された。感受性期以前の視覚野、および成熟した視覚野ではLTPは全く観察されなかった。しかし、生後直後から成熟するまでの暗室飼育により視覚反応の感受性期が延長した動物では、感受性期と同様なLTPが観察された。このLTPは低濃度のNi²⁺投与により阻害された。この濃度のNi²⁺で阻害されるCa²⁺チャンネルにはT型とR型が考えられる。T型Ca²⁺チャンネルに比較的选择性の高いmibefradil投与によりLTPは阻害された。また、別のT型Ca²⁺チャンネル阻害剤のKurtxinあるいはEfonidipine投与によってもLTPは阻害され、またR型Ca²⁺チャンネル阻害剤である

SNX-482を投与してもLTPが発生したことから、このLTPはT型Ca²⁺チャンネルの活性化に依存すると考えられる。

そこで感受性期のラットを用いて眼優位可塑性に対するT型Ca²⁺チャンネル阻害剤の効果を調べた。これまでの報告と同様に、コントロールのラット視覚野においては、記録している視覚野に対して対側の眼を刺激した時のVEPの振幅は、同側眼刺激によるVEPと比べて2倍程度大きかった。対側眼を6日間片眼遮蔽した後VEPを記録すると、遮蔽眼刺激によるVEPは減弱し、非遮蔽眼刺激によるVEPは増大した。Mibefradilを片眼遮蔽中持続投与した実験群では、遮蔽眼刺激に対するVEPの減弱はみられたものの、非遮蔽眼のVEPの増大は阻害されていた。

考察

T型Ca²⁺チャンネルの活性化を必要とする興奮性シナプスのLTPは、視覚反応可塑性の感受性期に限局して観察された。これまでの研究により、NMDA受容体依存性の興奮性シナプスのLTPは感受性期より前の非常に未熟な時期の視覚野において最も高頻度でみられたことから、感受性期の経験依存的な視覚機能の発達には、T型Ca²⁺チャンネルLTPが関与していると考えられる。実際、本解析において、片眼遮蔽に伴う非遮蔽眼からの反応の増大にはT型Ca²⁺チャンネルの活性化が必要であるという結果が得られたので、このチャンネル依存性LTPは視覚野の経験依存的発達に重要なメカニズムであることが強く示唆された。一方、短期間(1日程度)の片眼遮蔽を行なうと、遮蔽眼の反応の減弱は生じるが、非遮蔽眼の反応の増大は観察されないことが報告されており、これはNMDA受容体依存性であることが示唆されている。したがって、複数のシナプス可塑性が発達段階に依存して誘導され、神経回路形成や視覚反応選択性の向上に寄与していると考えられる。

引用文献

1. Yoshimura Y, Ohmura T and Komatsu Y, Two forms of synaptic plasticity with distinct dependence on age, experience, and NMDA receptor subtype in rat visual cortex. *Journal of Neuroscience* 23:6557-6566, 2003.
2. Ohmura T, Ren M, Yoshimura Y and Komatsu Y, Age and experience dependence of N-methyl-D-aspartate receptor-independent long-term potentiation in rat visual cortex. *Neuroscience Letter*, 341: 95-98, 2003.
3. Yoshimura Y, Inaba M, Yamada K, Kurotani T, Begum T, Reza F and Komatsu Y. Involvement of T-type Ca²⁺ channels in the potentiation of synaptic and visual responses during the critical period in rat visual cortex. *European Journal of Neuroscience*, in press

ネコ一次視覚野ニューロンの刺激サイズに依存した空間周波数選択性の変化

物体との距離変化を踏まえた情報処理

○尾崎弘展¹・内藤智之¹・定金理²・岡本正博³・佐藤宏道¹

(¹大阪大学大学院医学系研究科・²基礎生物学研究所・³大阪大学大学院生命機能研究科)

Key words: 一次視覚野、空間周波数、イメージ周波数

目的

ネコ一次視覚野(V1)ニューロンは、刺激の方位、時空間周波数に選択的な応答を示す。しかしながら、これらの刺激特徴に対する選択性は刺激サイズに依存して変化するのか、あるいは固定不変の性質であるのかは明らかでない。刺激サイズによって刺激特徴選択性が変化するならば、それは合目的的な知覚を生じさせるための視覚情報処理機能のダイナミックな側面を示唆すると共に、初期視覚系の構築メカニズムを理解する上でも重要な手がかりとなろう。

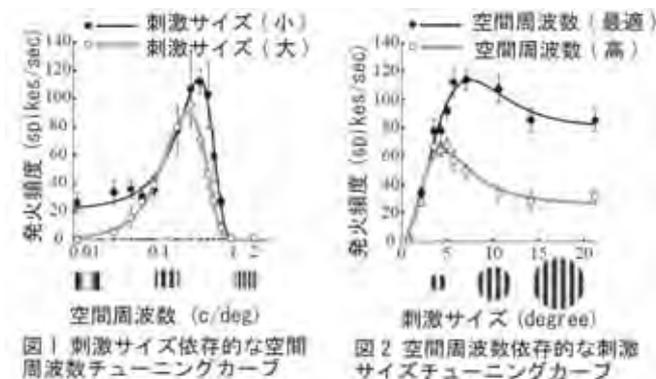
本研究では、V1ニューロンの空間周波数選択性の刺激サイズ依存性を調べ、さらにそのメカニズム、及び、そこから示唆される新たなV1ニューロンの機能的役割を検討した。

方法

タングステン電極を用いて麻醉非動化した7頭のネコV1から93個の単一ニューロン応答を細胞外記録した。刺激としてドリフトする正弦波縞刺激を単眼提示した。複数刺激サイズ条件下における空間周波数チューニングカーブ、および複数刺激空間周波数条件下におけるサイズチューニングカーブを計測した。

結果

刺激サイズの拡大に伴い、空間周波数選択性は変化し、最適空間周波数は低周波数側に変化した(図1に例)(N=77)。さらにそのメカニズムを調べるために、刺激サイズチューニングカーブを計測し、高空間周波数側で受容野周囲抑制が強くなることを確かめた(図2に例)(N=55)。このことは刺激サイズ増大に伴う最適空間周波数の低周波数側への変化が、高空間周波数側での受容野周囲抑制の増大であることを示唆している。



さらに、その低空間周波数側への最適空間周波数の変化の機能的役割を検討するために、刺激のサイズと空間周波数からイメージ周波数(刺激サイズ(degree)×空間周波数(cycles/degree))の変化を計算した。その結果、刺激サイズ増大に伴う、最適空間周波数の低周波数側への変化は、イメージ周波数を一定に保つ方向への変化であった。

考察

本実験における刺激サイズの変化は、物体の距離の変化に置き換えて考えることができる。同一物体が眼球から異なる距離に存在する場合、その網膜像は異なる。近傍に存在する物体は遠方に存在する物体より、網膜像は大きく、その空間周波数は低くなる(図3)。同一物体の距離に応じた網膜像の「大きさ」と「空間周波数」の変化は、イメージ周波数を一定にする方向で起こる。

今回、我々は刺激サイズが増大すると最適空間周波数が低周波数側へ変化することを確かめ、それはイメージ周波数(刺激サイズ×空間周波数)を一定にする方向であることを示した。これは、物体の距離が変化しても、ある範囲内では同じV1ニューロンがその物体情報をコードしているということの意味している。このことは、物体と眼球との距離が絶えず変化するような視覚条件においても、安定的に情報処理を行うために重要な役割を果たしていると考えられる。

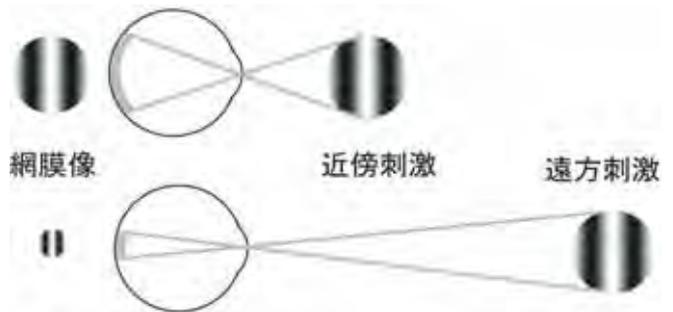


図3 眼球からの距離に依存した物体の網膜像の変化

初期視覚野細胞の時空間周波数に対する選択性

○佐々木耕太・大澤五住

(大阪大学大学院生命機能研究科・JST CREST 吉岡プロジェクト)

Key words: 視覚運動処理、速度選択性、逆相関法

目的

視覚運動処理の目的のひとつは、運動する対象の速度や運動方向を決定することである。一定の速度を検出するような神経細胞は(もしあるとすれば)、大脳皮質のどの領野に見つかるだろうか?

運動する正弦波グレーティング刺激は時空間周波数領域におけるもっとも単純な刺激であり、神経細胞の時空間周波数応答特性を調べるのによく用いられてきた。しかしながら、神経細胞が一定の速度に選択的に応答するか否かを検証するには3次元の時空間周波数領域をくまなく走査したうえで、最適時間周波数が空間周波数に比例することを示さなくてはならない。このためには、膨大な数のグレーティング刺激を用いなければならない、すなわち、膨大な時間を費やさなければならないということになる。

そこでこれに代わる方法として、刺激として2次元のダイナミックノイズ刺激を用い、逆相関法により時空間周波数領域での応答特性を計測する方法を提案する。まずは計算機シミュレーションによって方法の妥当性を検証し、さらに、ネコ大脳皮質17野及び18野の神経細胞が速度に選択性があるか否かを検討する。

方法

動物の飼養、管理、及び実験はすべて、米国国立衛生研究所が定めたガイドラインに従い、大阪大学動物実験委員会によって承認されたものである。

麻酔・不動化したネコの大脳皮質17野及び18野において、タングステン電極による単一ユニット記録を行った。単一ユニットを単離した後、まず、その優位眼と、優位眼における受容野のおおよその位置をバー刺激やグレーティング刺激を用いて決めた。フラッシュグレーティング刺激や運動するグレーティング刺激を用いて最適方位、最適運動方向、及び最適空間周波数を計測した。フラッシュグレーティング刺激に対する位相選択性、ならびに運動するグレーティング刺激に対するF1応答とF0応答の比から、神経細胞を単純型細胞と複雑型細胞とに分類した。

そして、受容野の2倍から4倍程度の範囲に2次元のダイナミックノイズ刺激を呈示し、スパイクを記録した。ノイズの刺激フレームは51x51のドットからなり、ドットの大きさは神経細胞の最適空間周波数をもとに、最適グレーティング刺激の明領域ないしは暗領域(つまり半周期)にドットが2個から4個程度入るように決めた。刺激フレームは2ビデオフレーム毎、38Hzで更新した。これは26ミリ秒ごとの更新に相当した。

スパイクをトリガーとしてその直前の8刺激フレームを取り出し、これを3次元フーリエ変換して振幅スペクトルを求め、すべてのスパイクに対して加算することで、時空間周波数領域での応答特性を求めた。

結果

まず、この方法の妥当性を検証するために、計算機上でのシミュレーションを行った。モデル神経細胞として、運動方向に選択性のない単純型細胞、運動方向に選択性のある単純型細胞、運動方向に選択性のある複雑型細胞、そして、速度に選択性のある複雑型細胞を用いた。速度に選択性のある複雑型細胞は、運動方向に選択性のある複雑型細胞を複数、最適空間周波数と最適時間周波数とが比例する組み合わせにし、これらから入力を受け取るものとしてつくった。どのモデル神経細胞においても、時空間周波数領域で期待したとおりの応答が得られた。

ネコの大脳皮質17野及び18野において、515個の神経細胞から単一ユニット記録を行った。これらのうち、212個が単純型細胞、303個が複雑型細胞であった。単純型細胞においても複雑型細胞においても、最適運動方向、及び最適空間周波数は、フラッシュグレーティング刺激や運動するグレーティング刺激で計測したものと一致した。また、時空間周波数領域における応答プロファイルは2次元の空間周波数平面上の関数と時間周波数軸上の関数の積でよく表せるようなものであった。

したがって、ネコの大脳皮質17野及び18野において、神経細胞の最適時間周波数は空間周波数に依存しない、すなわち、一定の速度を検出するようなチャンネルとしてははたらかないことがわかった。

考察

複雑型細胞はその定義上、非線形な応答特性を示す。時空間領域における、線形受容野を求める従来の逆相関法では細胞の応答特性は計測することができなかった。ここで開発した、時空間周波数領域における逆相関法では、そういった非線形性によらず、神経細胞の応答特性を計測することができた。

ネコの大脳皮質17野及び18野において、神経細胞の最適時間周波数は空間周波数によらないこと、すなわち、一定の速度を検出するようなチャンネルとしてははたらかないことがわかった。一定の速度を検出するようなチャンネルは(もしあるとすれば)、ネコ大脳皮質視覚野の高次領野にあると考える。

引用文献

- Adelson & Bergen J Opt Soc Am A 2: 284-99(1985)
Nishimoto et al. J Neurophysiol 93: 3524-36(2005)
Priebe et al. J Neurosci 26: 2941-50(2006)
Watson & Ahumada J Opt Soc Am A 2: 322-41(1985)

初期視覚野細胞におけるスパイク発火変動解析

○木村 壘¹・大澤 五住¹(¹大阪大学大学院生命機能研究科)

Key words: 活動電位(スパイク)、類似度、初期視覚野

目 的

視覚野にある神経細胞は、それぞれ固有の視野領域を持ち、その領域内に提示された視覚刺激の方位、空間周波数などに選択的に反応することが知られている。神経細胞の発火パターンにはばらつきがあるため、細胞の反応特性を決定するためには視覚刺激を複数回提示する必要がある。神経細胞の発火パターンのばらつきは網膜、外側膝状体、初期視覚野と視覚経路を進むにつれて増加することが知られている(Kara et al., 2000)。一般に皮質内細胞の発火頻度は、その分散の値に比例することが知られている(Shadlen and Newsome 1998)が、全ての細胞が同じばらつきで発火しているわけではない。そこで本研究では、大脳皮質における視覚情報の最初の領野である初期視覚野の細胞から活動電位(スパイク)を記録し、同じ刺激列に対する発火パターンの変動を解析した。個々の細胞で見られるスパイク変動が、細胞固有の反応特性(単純型細胞か複雑型細胞か)とどのような関係にあるか検証した。さらに、信頼性の高い発火パターンを示したスパイク列にはどのような時間的構造があるかに関する検討も行った。具体的には、バースト発火(短い時間間隔での連続スパイク)の有無が信頼性の向上に寄与しているのかどうか検討した。

方 法

麻酔不動化したネコの初期視覚野細胞から細胞外電位記録により活動電位(スパイク)を記録した。同じ刺激列を繰り返し提示し、神経細胞の発火パターンのばらつきを調べた。視覚刺激には一次元のデンスノイズ刺激を用いた。細胞の最適方位に傾いた白、黒、灰色の線分が細胞の受容野を覆う位置に提示される。26msごとに線分のパターンをランダムに変え合計10秒間提示した。このような刺激列を二種類用意し、交互に50回ずつ提示した。同じ刺激列に対するスパイク活動から反応のばらつき(類似度)を計算し以下の解析を行った。スパイク列は10msのビン幅で計算し、同じ刺激に対するスパイク発火列の類似度をSI(Similarity Index)という値で定量化した。これは以下の式で定義される。

$$SI_{i,j} = \frac{Raster_i(t) \times Raster_j(t)}{|Raster_i(t)| |Raster_j(t)|}$$

この値は二つのスパイク列の内積を意味している。もし二つのスパイク列が完全に同じパターンで発火しているならば、この値は1になり、全く関係がないときには0になる。合計69個の初期視覚野の細胞から記録を行い、二種類の刺激に対する個々の細胞の類似度を計算した。二種類の刺激列に対する類似度はほぼ同じ値であったため、片方の刺激列に対する類似度の平均値をその細胞の類似度とした。

バースト発火の有無が類似度に影響を与えるかどうかに関する解析も行った。今回はスパイク間間隔(スパイクとスパイクの間の時間)が5ms以内のものを、バースト発火と定義した。全てのスパイク間間隔を計算し、その間隔が5ms以内であったものが全体に占める割合をバースト発火率として定義した。

結 果

一次元のデンスノイズ刺激に対し、平均発火頻度が3(spikes/sec)以上だったものに対して以下の解析を行った。全ての細胞(n=69)の中で最も高い類似度(SI)の値は0.71で、最も低い類似度(SI)の値は0.03であった(平均値:0.27、標準偏差:0.15)。全体としては、単純型細胞のほうが複雑型細胞より類似度(SI)の値が高くなる傾向が見られた。単純型細胞の類似度(SI)は 0.34 ± 0.15 (平均±標準偏差)で、複雑型細胞では 0.22 ± 0.11 であった。

始めに、発火頻度が類似度に影響を与えるかどうかを調べた。その結果、発火頻度の高いものほど類似度(SI)の値が高くなるという傾向があり($r=0.42$, $p < 0.01$)、この傾向は単純型細胞と複雑型細胞で異なっていることが明らかになった。単純型細胞は発火率に対する類似度の増加率が急で、スパイク数をそれほど必要とせず高い類似度を示していることがわかった。二つの関係を直線で近似すると、単純型細胞の傾きは $0.2/10\text{spikes}$ であり、複雑型細胞では $0.06/10\text{spikes}$ であった。複雑型細胞での発火頻度の上昇は、類似度の上昇にあまり寄与しないと考えられる。

次に、発火パターンの中にある構造が類似度の値に寄与しているかどうかを調べた。スパイク列の中にあるバースト発火が類似度に関与しているかを解析した。その結果、バースト発火の割合が高いほど、類似度が高くなる傾向が見られた($r=0.46$, $p < 0.05$)。単純型細胞と複雑型細胞の間でこの傾向に違いは見られなかった。

以上の結果から、初期視覚野細胞のなかでも同じ刺激に対して類似度の高いものから低いものまで存在することがわかった。この傾向は、単純型細胞と複雑型細胞では異なっていることが明らかになった。さらにバースト発火は、類似度(SI)を高くすることに寄与していることが明らかになった。

考 察

網膜や外側膝状体の細胞は皮質の細胞よりも、同じ刺激に対する発火パターンの類似度が高いことが知られている。今回見られた類似度の高い細胞が、視覚野の入力層である4層に多く見られるかどうかの層解析を行う必要がある。

発火頻度は細胞が固有に持っている性質とはいえないので、同一細胞で、異なる発火頻度での類似度の関係をみる必要があると考える。このために、異なるコントラストを用いた視覚刺激に対する同様の解析を行う必要があると考えている。

引用文献

- Kara P, Reinagel P, Reid RC. (2000) Low response variability in simultaneously recorded retinal, thalamic, and cortical neurons. *Neuron*, 27, 412-4.
- Shadlen MN, Newsome WT (1998) The variable discharge of cortical neurons: implications for connectivity, computation, and information coding. *J Neuroscience*, 18, 3870-96.

マルチユニットレコーディングにおける発火数変動と相関係数の刺激依存性

圓山由子(非会員)・伊藤浩之
(京都産業大学大学院工学研究科)

Key words: variability, multi-neuron, correlation

目的

ネコ第一次視覚野において多細胞同時記録を行い、1 試行のスパイクデータから提示刺激の方位を推定するアルゴリズム開発を目指している。単一 unit の活動は大きな試行間変動を示すため、同時記録される多数の unit の活動を平均する Population coding の復号化が必要となる。Population coding では、<刺激 多細胞活動>のデータベースと記録した複数 unit の発火数パターンとのマッチングにより刺激推定を行う。しかし、Population Coding による信頼性の向上の前提には、各 unit の試行間変動が独立である必要がある。今回は準備的な研究として、以下の特性の解析を行なった。

1) unit の発火数の試行間変動の定量化、2) 同時記録された unit pair の試行間変動性の独立性の解析(相関係数)、3) unit pair の試行間変動性に相関が存在する場合、相関係数の刺激方位依存性の統計解析。

方法

麻酔不動化ネコ第一次視覚野より多細胞同時記録を行う。記録にはすべての電極がsingle hyper column内(1mm²)に収まる2種類の高密度多電極アレイ(4 Tetrodes array, 8 Single electrodes array)を使用した。刺激は受容野内に16方位光バー刺激をランダムな順番に1回ずつ提示するsessionを40回繰り返した。記録データから複数のsingle unitを抽出し、有意に刺激反応を示すunit(Wilcoxon test)に対して、平均発火率から方位チューニング曲線を計算した。また、各unitの発火数試行間変動および同時記録されたunit pairの発火数変動の相関係数を計算した。発火数変動に関しては平均発火率と標準偏差の対応関係をグラフとしてプロットした。相関係数は各unit pair、各刺激反応について計算し、試行シャッフルによるbootstrap法(P<0.01)を用いて有意性検定を行った。少なくとも1つの刺激方位で有意に相関しているペアに対しては、相関係数の刺激方位依存の有意性を調べた(Kruskal-Wallis法, P<0.05)。

結果

総unit数165個の各刺激における発火数変動の標準偏差と平均発火率の対応関係を両対数でプロットし最小二乗法でfittingしたところべき関数上に乗っていることが分かった(Fig1、べき0.6)。また総unit pair数598ペアの相関係数の有意性検定では、少なくとも1つの刺激で有意に相関しているペアは459ペア存在した(77%)。また、有意に相関しているペアのうち、60ペア(13%)が相関係数に刺激依存性があると分かった(代表例:Fig2)。今回の解析から以下の結論が得られた。1) 従来の報告と整合した発火数の試行間変動を確認した。2) 同時記録されたunit pairの多くは相関した発火数変動性を持つため、Population Codingの前提は単純には成立しない。3) 視覚皮質におけるunit pairの試行間変動は一定強度の相関ノイズではなく、刺激方位に依存する機能的構造を持っている可能性がある。

考察

今後の研究においては、unit pair間の発火数変動の相関係数のSignal Correlation、及びunit間距離との関係を解析する必要がある。また、実際にPopulation codingの考え方に基づいた推定アルゴリズムを構築し、発火数変動の相関による情報の損失と相関係数の刺激依存性による付加的な情報の定量化が必要である。

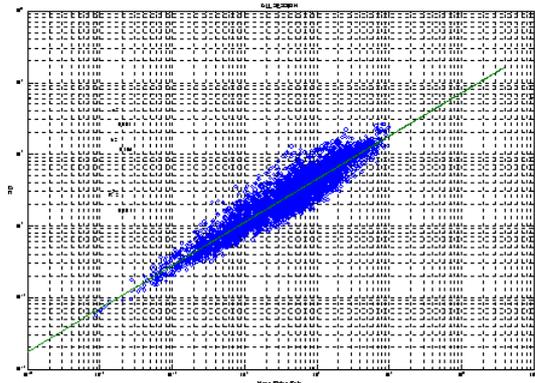


fig1

$$SD = 2.4M^{0.6}$$

SD : Deviation of mean firing rate (縦軸)

M : Mean firing rate(横軸)

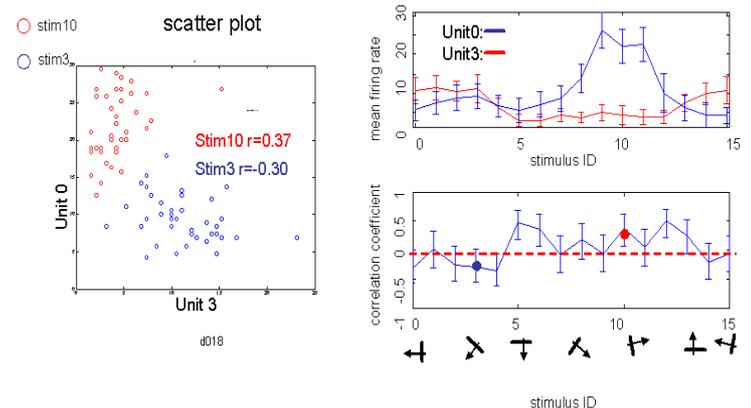


Fig2: 相関係数に刺激依存性が有意に認められた unit pair の例

左図が2種の刺激でのscatter plot
右上はunitのTuning Curve
右下は相関係数の刺激間変動を示す

無相関ノイズ刺激によるネコ初期視覚野神経細胞の 両眼方位視差選択性の検証

青山めぐみ¹・田淵有香²・大澤五住¹

(¹大阪大学大学院生命機能研究科・²シスメックス株式会社)

Key words: binocular disparity, stereopsis,

目的

奥行き検出するための神経機構には様々な可能性があり、中でも初期視覚野細胞の両眼視差選択性はよく知られている。しかし、両眼視差の他にも奥行き方向の傾き検出に役立つ両眼方位視差選択性を持つニューロンを考えることができる。そこでわれわれは初期視覚野ニューロンが両眼方位視差に選択性を持つかどうかを調べた。

方法

麻酔不動化したネコの初期視覚野から単一ニューロン応答を細胞外記録した。

視覚刺激：左右眼で無相関のダイナミックノイズ刺激を用いた。この視覚刺激では、黒、灰色、白の3種類の輝度のパッチがすべて同じ確率でランダムに現れる (white noise)。刺激の大きさはニューロンの受容野を十分覆うように設定し、この領域を 36 x 36 のパッチに分割した。1 回の計測に必要な刺激提示時間は約 30 分である。

解析：この刺激の各フレームをフーリエ変換し、周波数空間での表現に変換することにより、視覚刺激に含まれる周波数成分が求められる。従来の刺激の STA (spike-triggered average) による受容野解析ではなく、各刺激フレームのスペクトルの STA を求めることにより、スパイクを誘発する刺激方位スペクトルの平均像として両眼方位視差選択性を測定した。

結果

左右で無相関の両眼ノイズ刺激を提示した時の反応を記録し、複雑型細胞と単純型細胞の合計 36 個からデータを得た。このうち有意な両眼方位視差選択性を示した細胞は 3 個のみだった。図 1 の左側に示すように、両眼方位選択性を持つニューロンでは、方眼の最適方位が変化するのにしたがい、他方の最適方位も変化するはずである。しかし多数のニューロンは図 1 の右に示すように、左右の最適方位は独立であり変化しなかった。両眼方位視差選択性を示したニューロンは、図 2 の 印によって示され、左右 10 [degree] 付近にデータ点がある。

考察

今回記録されたニューロンを解析した結果、大多数のネコ初期視覚野ニューロンでは両眼方位視差選択性は見られなかった。各方位に関する左右眼入力のみを和で考えた場合、記録されたすべてのニューロンについて両眼方位視差選択性は見られなかった。しかし組み合わせを積で考えた場合でも、両眼方位視差選択性を持つニューロンは 3 個という少数しか観察されなかった。また、両眼方位視差に強い選択性を持つが絶対方位には比較的広い選択性を持つような細胞は見られなかった。このような両眼方位視差選択性を持つ細胞は、より高次領野で多く見られるかもしれない。

先行研究では最大反応付近での反応の強さの詳細な変化を判断することができなかったが、今回の研究手法ではピーク付近の変化を詳細に調べることができた。これが本研究の 1

つの新たな成果である。

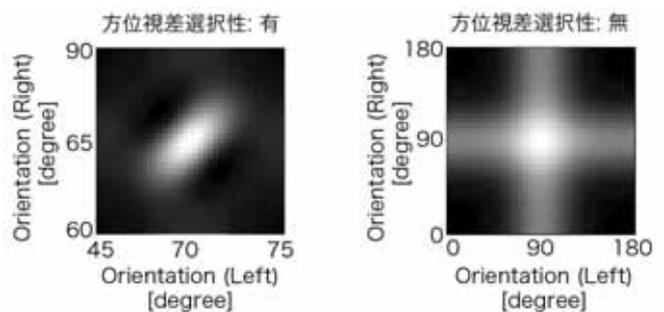


図 1 両眼方位領域における反応を方位視差選択性を持つニューロンと持たないものの反応の予測図を示した。横軸を左眼に提示した視覚刺激の方位、縦軸を右眼刺激の方位にとった (Bridge and Cumming 2001)。

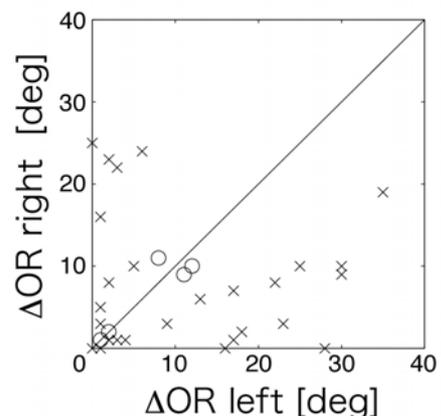


図 2 両眼方位視差選択性の評価結果。横軸に左眼の最適方位の変化量、縦軸に右眼の最適方位の変化量を表した。

○: 左眼と右眼の方位差で作る角度が 30° から 60° に収まっていた細胞を示す。x: 左眼と右眼の方位差の比が 0.5 の範囲を超えていたもの。すべてのデータは左右の方位成分の積として計算されている。

引用文献

- 1) Barlow HB, Blakemore C, and Pettigrew JD. "The neural mechanism of binocular depth discrimination." J physiol, vol.193, pp.327-342, 1967.
- 2) Blakemore C, Fiorentini A, Maffei L. A second neural mechanism of binocular depth discrimination. J Physiol (Lond) 226:725-749, 1972.
- 3) Bridge H and Cumming BG. "Responses of Macaque V1 Neurons to Binocular Orientation Differences." J Neurosci, vol.21, pp.7293-7302, 2001.

細かい相対奥行き弁別における局所視差信号の空間統合

～心理学的リバースコリレーション法による検討～

○土井隆弘¹・岡田貴裕¹・藤田一郎¹

(¹大阪大学大学院生命機能研究科)

Key words: 両眼立体視, Stereoacuity, 相対視差

目的

奥行きを細かく判断する能力は、奥行き判断の対象であるテスト刺激の近傍に、奥行きの基準となる参照刺激があると、飛躍的に向上する (Prince et al., 2000). このことは、細かい奥行きの知覚判断が、空間的に異なる位置にある、テスト刺激と参照刺激の両方の両眼視差に依存することを示唆する。一方で、初期視覚野の細胞は、視野の限られた小領域内の視差にのみ感受性を示す (Cumming et al., 1999). 従って、初期視覚野細胞が伝える局所的な視差信号を、空間的に統合してより大域的な情報を導く過程が、細かい奥行き判断のために必要である。今回われわれは心理物理学的リバースコリレーション (逆相関) 法を用い、細かい奥行き判断のために、脳がどのように局所視差信号を空間統合しているのか検討した。

方法

細かい奥行き判断課題を解くために、被験者が、刺激のどの部分からの信号を用いたのか調べた。被験者 (n = 4) は、上下領域に分かれたランダム・ドット・ステレオグラムを見て、2 領域のどちらが手前であるか判断した。上下領域間の相対的な視差は -0.03 deg もしくは 0.03 deg であった。試行ごとに、刺激全体の絶対視差は -0.1 deg から 0.1 deg の範囲内でランダムに選ばれた。したがって、上下領域どちらか一方の視差信号のみで、この課題を解くことはできない。

各領域はさらに 5 つの小領域から成る。試行ごとに、ランダムに選んだ小領域を、両眼間で相関の無いドットに置き換え、視差信号を失くした (以下、ノイズ面と呼ぶ)。被験者に 10,000 回以上の試行を行わせ、小領域ごとに、視差信号の有無 (奥行き面かノイズ面か) と被験者の答え (正答か誤答か) の相関を計算した。高い相関は、被験者がその小領域からの視差信号を利用していただことを示唆する。この相関値を、上下領域間の視差境界からの距離の関数としてガウス関数で表し、重み関数と呼ぶ。

結果

いずれの被験者においても、重み関数は、上下領域の境界近傍を最大として、ピーク位置から離れるに従って小さくなった。被験者間で平均して、ピークは刺激上下領域の境界よりも 0.34 deg 上にあり (SEM, 0.080 deg), 1.6 deg 離れると半減した (SEM 0.25 deg; 刺激の偏心度, 3.5 deg)。

不思議なことに、被験者は 2 領域間の相対視差だけではなく、2 領域のどちらが奥行き面よりもノイズ面を多く含むか、にも依存して奥行き判断を行っていた。具体的には、2 領域間の相対視差にかかわらず、奥行き面を多く含む領域を、ノイズ面を多く含む領域に比べて、手前であると判断した。この錯視的な奥行き判断も、空間的に異なる 2 領域からの信号に依存する。そこで同様の解析をし、この奥行き判断を導く空間統合の重み関数を推定した。錯視的奥行き判断の重み関数は、相対視差奥行き判断の重み関数よりも小さい振幅を持っていた。振幅比は、0.49 であった (SEM, 0.10)。半値幅は、1.4 deg (SEM, 0.17 deg) であり、相対視差重み関数とよく似ていた。ピーク位置は、視差境界よりも 0.33 deg 下であり

(SEM, 0.12 deg), 相対視差重み関数とは反対方向であった。

推定した 2 つの重み関数を用い、奥行き判断モデルを構築した。このモデルは、モデル推定に用いていない新たな刺激に対する被験者の応答をよく予測した。

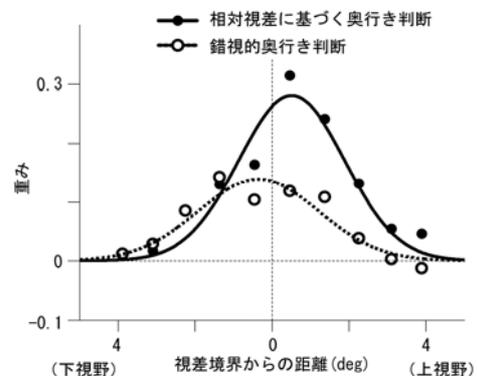
考察

推定した 2 種類の重み関数は、細かい奥行き判断のために、視差境界付近の信号が選択的に空間統合されることを示唆する。これまでの生理学的研究は、腹側視覚経路を進むにしたがって、初期視覚野細胞が表現する局所的な絶対視差から、より大域的な相対視差の情報が導かれることを示唆する (Umeda et al., 2007). 腹側経路高次領野細胞が、細かい奥行き知覚のために、初期視覚野の出力を統合する空間範囲は大きくないのかもしれない。

相対視差に基づく奥行き判断が、境界から遠い場所からの信号を利用しないことは、この課題の正答率を下げる要因である。また、錯視的な奥行き知覚も、課題の正答とは無関係のため、正答率を下げる要因である。この課題においては非最適であるこれらの行動戦略が、自然視状況下において、何らかの意味を持つかは不明である。

引用文献

- Prince, S.J., Pointon, A.D., Cumming, B.G., and Parker, A.J. (2000). The precision of single neuron responses in cortical area V1 during stereoscopic depth judgments. *J Neurosci* 20, 3387-3400.
- Cumming, B.G., and Parker, A.J. (1999). Binocular neurons in V1 of awake monkeys are selective for absolute, not relative, disparity. *J Neurosci* 19, 5602-5618.
- Umeda, K., Tanabe, S., and Fujita I. (2007). Representation of stereoscopic depth based on relative disparity in macaque area V4. *J Neurophysiol* 98, 241-252.



一人の被験者の 2 種類の重み関数

横軸は視差境界からの距離であり、左側が上視野方向に対応する。各点は得られたデータであり、線はガウス関数によるフィットである。

両半球の初期視覚野から同時記録されたニューロン活動の相関解析

○朝田雄介¹・大澤五住¹

(¹大阪大学大学院生命機能研究科)

Key words: 受容野、初期視覚野、脳梁

目的

ネコやサルなどの高等動物の視覚系では、左視野は右半球で、右視野は左半球で処理されている。脳の中では左右視野が別々の半球で処理されているにも関わらず、私たちの知覚において、視野は左右半視野の境界で断絶することなく連続している。これは、脳梁を介して神経結合をもつニューロンが視野の情報の共有を行うことで、脳が視野を切れ目なく連続的につなぎ合わせているためだと考えられている ([1])。

視野位置と皮質が活動する領域が1対1の対応関係にあり、このことを視野再現と呼ぶ。左右視野の境界である視野中心を通る垂直線周辺(Vertical Meridian : VM)は、大脳皮質17野と18野の境界線領域(Transition Zone : TZ)に対応し、TZに分布する第2/3層のニューロンは、大脳皮質内と脳梁を介して対側の大脳皮質へ軸索を投射している。また、TZに分布する左右半球のニューロンの受容野は、視野の水平位置0° から±5° 付近で重なっている。これらからTZに分布するニューロンは、脳梁を介して対側の半球の細胞へ入力を与えることで、左右視野をつなぎ合わせる役割を担っていると示唆されてきた。しかし、脳梁を介した視野継ぎ合わせ機構の受容野レベルでの詳細は不明である。

本研究では、相互相関解析と受容野解析を併用し、半球を隔てたニューロンペアにおける受容野と反応特性について検討した。特に、脳による視野をつなぎ合わせは、網膜像の特徴を受容野の中で検出できるよう、方位や空間周波数選択性の類似したニューロンが脳梁を介した神経結合に基づいている、と仮説を立てることができる。この仮説を検証するために、刺激を提示し、初期視覚野 TZ の両半球で同時に活動するニューロンの受容野を計測し、その特徴が仮説と一致するかどうかを調べた。

方法

麻酔不動化したネコの大脳皮質 17/18 野の境界領域の左右半球から神経活動を同時記録した。直径 200 μm のタングステン電極を用いて細胞外電位を計測した。ニューロンの受容野を計測するために、観測されているニューロンの最適な方位や空間周波数を調べ、2次元ダイナミックデンスノイズ刺激を提示した。各電極から観測される複数のスパイク波形をテンプレートマッチング法により、単一ニューロン由来のスパイクとして分離検出した。

同時に記録されたニューロンが神経結合の特性を調べるために、ニューロン間の神経活動の相互相関ヒストグラムを求める。同時に記録されているニューロンは視覚刺激に同期して反応する。もし、同時に記録しているニューロンが神経結合を持つならば、両者の反応の相互相関は2つの成分、視覚刺激に基づく相関成分(刺激相関)と両者の神経結合に基づく相関成分(神経結合相関)を含むことになる。

この両者は、繰り返し同じ刺激系列を提示し、異なるトリアル間で2つのスパイク時系列の相互相関を求めることにより分離することができる ([2])。本研究では、神経結合相関が統計的に有意であるニューロンペアを解析の対象とした。

受容野に刺激を提示すると、視覚野のニューロンはスパイクを発火する。刺激提示後 τ ms の時間遅れでニューロンがスパイクを誘発したとする。ここで、スパイクが発火した時

刻から τ ms 前に提示された刺激をすべてのスパイクについて加算平均することでニューロンの受容野の時空間構造を定量的かつ精密に計測することができる。([3])

結果

同時に記録されたニューロンがどのような神経結合を持つかを調べるために、繰り返し視覚刺激を提示しニューロン間の神経活動の相互相関ヒストグラムを求めた(図 1-B)。この例では、正の相関が原点に対して非対称で、時刻 0ms より急激に増加し 4ms のときに最大となったあと、再び減少していた。スパイク発火が一方向に促進されることを意味している。この結果は、同時記録されたニューロンのうち、脳梁を介し、反対半球へ入力を与えていることを示唆している。

神経活動に相関のあるニューロンの受容野の空間構造および位置を比較するために、逆相関法によって得られた線形受容野をそれぞれガボール (Gabor) 関数で近似し、重ね合わせた(図 1-A)。この受容野の位置は空間的に重なっており、それぞれの方角が一致していた。しかしながら、2つの細胞間で ON 領域と OFF 領域が互いに反転していた。

考察

本研究では、相互相関解析と受容野解析を併用し、半球を隔てたニューロンペアにおける反応特性について検討した。記録されたニューロンの中には、相互相関解析において共通の興奮性入力に由来すると思われる正の原点について対称な相関ピークを持つものもあった。また、それぞれのニューロンの最適方位がほぼ直交していた。このように最適な方位の異なるニューロンに共通の興奮性入力源はどこにあるのだろうか。視覚経路の投射構造から考えると皮質下からの入力を受け取っていると推測することができる。

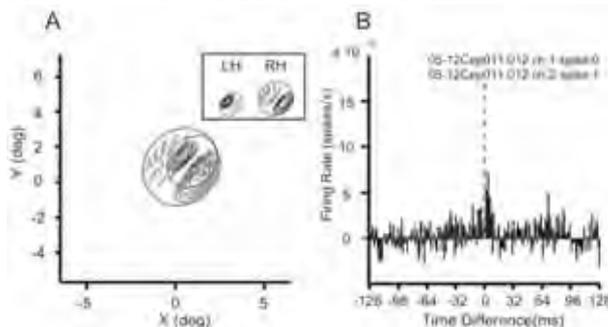


図 1-A 両半球から得られた線形受容野

図 1-B 相互相関ヒストグラム

引用文献

- [1] J. C. Houzel, M. L. Carvalho, and R. Lent, Interhemispheric connections between primary visual areas: beyond the midline rule, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 35(12), 1441-53, 2002
- [2] K. Toyama, M. Kimura, K. Tanaka, Organization of cat visual cortex as investigated by cross-correlation technique, *J. Neurophysiol.*, 46(2), 202-14, 1981
- [3] G. C. DeAngelis, I. Ohzawa, and R. D. Freeman, Spatiotemporal organization of simple-cell receptive fields in the cat's striate cortex. I. General characteristics and postnatal development, *J. Neurophysiol.* 69(4), 1091-117, 1993

抑制性シナプス伝達が視覚野神経回路中の信号伝播に与える影響

○小山内 実・田中 哲史・武野 祐介・八木 哲也

(大阪大学大学院工学研究科)

Key words: 抑制性シナプス、カルシウムイメージング、局所回路

目的

視覚野ではカラム構造に代表される機能単位があり、刺激に対して同様の応答特性を持った細胞集団が、皮質の層構造に対して垂直方向に集まっていることが知られている。このことは、入力信号が皮質の層構造に対して垂直に伝達しているからであると考えられているが、どのような神経回路構造によりその特徴が実現されているのかは明らかになっていない。神経細胞の細胞体の細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) は活動电位により上昇することが知られている。そこで我々は局所神経回路の探索を目的として、 Ca^{2+} イメージング法を用い、マウス視覚野における信号伝播の時空間特性を測定、解析し、抑制性シナプス伝達が信号伝播に与える影響を調べた。

方法

標本には生後 2-3 週齢のマウス (C57BL/6J) の厚さ約 $300\mu\text{m}$ の大脳皮質一次視覚野冠状断スライスを用いた。視覚野スライスに対して、 Ca^{2+} 感受性蛍光色素 (Oregon Green 488 BAPTA-1) のアセトキシメチルエステル体を細胞外より負荷し、冷却 CCD イメージングシステムを用いて、サンプリングレート 100 Hz で蛍光測定を行った。画像取得領域は $640\mu\text{m} \times 640\mu\text{m}$ で、解像度は 256×256 pixels であった。刺激前の蛍光強度に対する相対蛍光強度変化 ($\Delta F/F$) を算出し、 $[Ca^{2+}]_i$ 変化を見積もった。直径 5-20 μm のガラス管微小電極を用い、持続時間 200 μs 振幅 40-240 μA の二相性電流を視覚野 4 層に与えることにより、刺激を行った。

結果

4 層に電流刺激を与えた結果、刺激電極近傍で $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が起こり、皮質の層に垂直 (特に 2/3 層方向) に $[Ca^{2+}]_i$ が上昇した領域が広がった (Fig. 1A)。この際、水平方向への信号伝播は局限していた。この $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、グルタミン酸受容体の阻害剤である CNQX 10 μM 、AP5 50 μM の投与により刺激電極周囲に同心円状に局限し、TTX 投与により全く観測されなくなった。これらの結果から、シナプス伝達を介して神経回路中を活動電位が伝播していくことにより $[Ca^{2+}]_i$ が上昇した領域が広がっていった、と示唆される。

視覚野局所神経回路における、抑制性シナプスの関与を調べるために、GABA_A 受容体の阻害剤である bicuculline を投与して同様の実験を行った。低濃度 (2 μM) の bicuculline 投与により、刺激に対する $[Ca^{2+}]_i$ 濃度上昇の大きさが大きくなり、特に 2/3 層で $[Ca^{2+}]_i$ 濃度上昇の水平方向への広がりが観測された (Fig. 1B)。高濃度 (5 μM) の bicuculline 投与により、 $[Ca^{2+}]_i$ が高くなった領域は、control 時と同様に 4 層から 2/3 層に伝播したが、2/3 層で水平方向に大きく広がり、次いで皮質の層全体に広がっていった (Fig. 1C)。これらの結果は、視覚野局所神経回路において、興奮性のシナプス結合様式により水平方向への信号伝播が制限されていたのではなく、抑制性ニューロンにより水平方向の信号伝播が制限されていたことを示唆している。

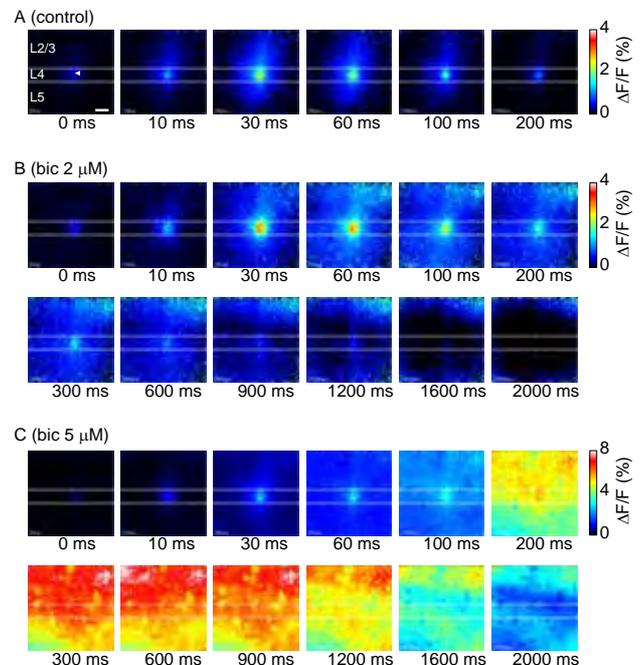


Fig.1 Time lapse images of the $[Ca^{2+}]_i$ transients in control condition (A), during application with 2 μM (B), and 5 μM (C) bicuculline. 80 μA stimulation was applied at layer 4 (white arrowhead in the first panel in A). At the bottom of each panel are the times after the application of the stimulation. The number of cortical laminae is shown at the left side in the first panel in A. Scale bar, 100 μm (A).

考察

本研究では、4 層を刺激することにより、皮質の層構造に対して垂直方向の信号伝播に比べ水平方向の信号伝播が局限していることが分かった。また、抑制性シナプス伝達を阻害することにより、2/3 層で高い $[Ca^{2+}]_i$ 濃度の領域が水平方向に広がり、次いで皮質全体に信号が伝播していくことを示した。この結果は 2/3 層に強い抑制が働いていることを示唆している。この抑制性結合様式が、フィードバック結合が主なものだとすると、興奮が先に伝播してしまい、信号伝播を制御することは難しい。また、フィードフォワード抑制が主なものであったとしても、抑制性細胞が狭い領域にしか投射していない場合には、興奮伝播に先んじて信号伝播を抑制することは困難であると思われる。つまり、視覚野神経回路には、フィードフォワード抑制が存在し、抑制性神経細胞は広い範囲の興奮性細胞 (主に 2/3 層の錐体細胞) に投射していることが示唆される。また、抑制性シナプス伝達の阻害により、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の time to peak が非常に遅くなったが、これは、一次視覚野にはリカレントな興奮性結合が存在し、通常は抑制性シナプスによりリカレントな信号伝播が起こらないように制御されている結果である、と考えられる。

桿体視細胞における all-*trans* レチナールで誘発される光毒性

○中谷 敬¹, Yiannis Koutalos², Rosalie K. Crouch², 増富康亮¹
 (¹ 筑波大学大学院生命環境科学研究科・ ² Medical University of South Carolina)
 Key words: retinal rod, all-*trans* retinal, phototoxicity

目 的

All-*trans* レチナールは視物質の再生に関わる視覚サイクル(visual cycle)における重要な中間産物である。ロドプシンが光を吸収するとレチナールは11-*cis*からall-*trans*に異性化される。続いてall-*trans* レチナールはオプシンから離れ、レチノール脱水酵素によって all-*trans* レチノールに還元される。All-*trans* レチノールは桿体外節から網膜色素上皮へと運ばれ、そこで11-*cis* レチナールへと再生されたあと再び外節に戻されてロドプシンが再生される。

All-*trans* レチナールのクリアランス異常が、加齢黄斑変性症、シュタルガルト病、黄色斑眼底、そして劣性遺伝性網膜色素変性症を含むさまざまな網膜の疾患に関係することが示唆されている。All-*trans* レチナールの細胞毒性の原因として、光感受性物質としてはたらき(Delmelle, 1978; Krasnovsky et al., 1979)、網膜色素上皮のリポフツシンの有害成分であるA₂Eの生成(Liu et al., 2000)など、いくつかの可能性が提唱されている。All-*trans* レチナールの吸収極大は約 380nmなので、その吸収域は可視光にまで広がっている。視細胞外節は多価不飽和脂肪酸が多いので、特に酸化ダメージを受けやすい(Fliesler and Anderson, 1983)。したがって、all-*trans* レチナールが、視細胞外節で光によって引き起こされる障害の原因となり、網膜の疾患の発生に重要な役割を果たしている可能性が高い。

今回は、視物質による光検出の副産物として必ず生じる、生理的に産生されたall-*trans* レチナールの光毒性を明らかにする目的で実験をおこなった。

方 法

材料には、カエル(*Rana pipiens*)あるいはマウスの網膜から単離した桿体視細胞を用いた。脂質の酸化の観察は、蛍光プローブBODIPY C-11を用い、細胞イメージング法により行った。単離した細胞は10 mM BODIPY C-11中で30分間インキュベートした後、Ringer液で洗浄することによって余分な色素を除去した。レチノールの蛍光は360 nmの光で励起し、蛍光イメージ(発光 >420 nm)はHamamatsu C4742 CCDカメラを用いて取り込んだ。インタクトなBODIPY C-11の蛍光は555 nmで励起し、617nmで記録した。また、酸化したBODIPY C-11の蛍光は490 nmで励起し、528 nmで記録した。

桿体外節膜はウシの網膜から精製した。光酸化は360 nmのUV光で誘発した脂質の過酸化として測定した。脂質の過酸化の測定は、精製外節膜を用いたチオバルビツール酸アッセイによる方法、およびBODIPY C-11を用いた方法で行った。BODIPY C-11の酸化は、この色素のインタクトな型と酸化した型から生じる蛍光シグナルの比を測定することによって求めた。

結 果

あらかじめ退色させた桿体外節膜に外からall-*trans* レチナールを加えると光酸化が増大した。暗順応させた桿体外節

膜では、ロドプシンの退色から1時間後に光酸化が最大になった。暗順応した桿体外節膜では、光酸化は退色後1時間で最大となった。単離した視細胞では、代謝機能が損なわれた外節のみの標本で、ロドプシンの退色から1時間後に光酸化が最大となった。外節と内節を持ったインタクトな桿体視細胞では、光酸化は起こりにくかった。これは、代謝機能が損なわれた桿体外節では、レチノール脱水酵素によるall-*trans* レチナールからレチノールへの効率的な変換ができなためであると考えられる。

考 察

以上の結果から、退色したロドプシンから放出されたall-*trans* レチナールは、精製した外節膜と生きた単離桿体視細胞の両方で、光誘発性の脂質過酸化を引き起こすことが明らかになった。また、レチノール脱水酵素の作用でレチノールへと変換されることによってall-*trans* レチナールが減少することで、光によって誘発される細胞の変性を防ぐことができる。

引用文献

- Delmelle M. Retinal sensitized photodynamic damage to liposomes. *Photochem Photobiol* 28:357-60. 1978.
 Fliesler SJ, Anderson RE. Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. *Prog Lipid Res* 22:79-131. 1983.
 Krasnovsky AA, Jr., Kagan VE. Photosensitization and quenching of singlet oxygen by pigments and lipids of photoreceptor cells of the retina. *FEBS Lett* 108:152-4. 1979.
 Liu J, Itagaki Y, Ben-Shabat S, Nakanishi K, Sparrow JR. The biosynthesis of A₂E, a fluorophore of aging retina, involves the formation of the precursor, A₂-PE, in the photoreceptor outer segment membrane. *J Biol Chem* 275:29354-60. 2000.

NMDA 毒性に対するネコ網膜神経節細胞のタイプによる感受性の違い: 視神経切断との比較

○渡部眞三¹・中澤徹²・工藤英代²

(¹発達障害研究所周生期学部・²東北大学医学部眼科)

Keywords: 緑内障, ON 中心型細胞, OFF 中心型細胞

背景と目的

虚血による網膜神経節細胞 (RGCs) の障害は、主として NMDA 受容体を介して生じる。また NMDA 毒性は RGC 障害を生じ (Nakazawa et al., '05), 緑内障の病因の一つと見なされている。一方、視神経切断は緑内障のモデルと考えられ、神経保護の方法を検討するために広く用いられている。ネコ RGCs の、NMDA 毒性と軸索切断に対する感受性を比較した。

方法

- 動物と麻酔: 成ネコを用いた。ケタミンで導入し、笑気とハロセンの自発吸入で麻酔を維持した。
- Dil 標識: 5 mg/ml Dil 懸濁液を両側の視索と外側膝状体に、10-14 箇所注入した。この標識方法で 10-14 日後に両眼のほぼ全部の RGCs が標識された。
- NMDA 眼球内注入: 麻酔導入 1 から 1.5 時間後、NMDA 溶液 10 μ L を硝子体内に注入した。ネコ眼球の硝子体の平均体積を 2.7 mL として、注入する NMDA 溶液の濃度を決定した。
- RGCs タイプ: Lucifer Yellow 細胞内注入により樹状突起の形態を求め、タイプを決定した。 α 細胞と β 細胞における ON-細胞, OFF-細胞の識別は、IPL 内の樹状突起分布から求めた。

結果

- NMDA 毒性の濃度依存性: NMDA 注入後 14 日の RGCs 生存率は、NMDA 終濃度 0.2 mM から 0.6 mM まで濃度依存性が認められ、0.8 mM では 0.6 mM と変わりなかった (図 1)。視神経切断後の生存率は 0.6 mM と同程度であった。NMDA 注入網膜における生存 RGCs の密度分布は、中心野では正常網膜と同程度で、周辺で低くなる傾向を示した。視神経切断した網膜における生存 RGCs の密度分布は、全域で一様にならなくなり、NMDA 障害の網膜の密度分布と異なっていた。
- NMDA 毒性に対する RGC タイプによる感受性の差 (図 2): 0.2 mM では α 細胞の感受性が β 細胞より高いのに対し、0.8 mM では β 細胞の感受性が高かった。Not α/β 細胞の感受性は 0.2 mM では α 細胞と β 細胞よりも高く、0.8 mM では α 細胞と同程度であった。以上の結果は視神経切断に対する感受性 (図 2, 黒の Bar) と異なっており、NMDA 毒性による細胞死が軸索切断による細胞死と同一でないことを示している。
- ON-細胞と OFF-細胞の NMDA 毒性の感受性: 視神経切断に対する感受性は OFF-細胞が高い (Yata et al., '07)。しかしながら NMDA 毒性に対する感受性には、両者で差が認められなかった (図 3)。

考察

低濃度の NMDA 毒性に対する感受性は、 α 細胞と β 細胞で異なっているだけでなく、視神経切断による感受性と逆転していた。ON-細胞と OFF-細胞で NMDA 毒性に対する感受性に違いが認められないことから、NMDA 毒性による細胞死は、視神経 (軸索) 切断による apoptosis の場合とは異なった細胞内シグナル伝達経路を介する可能性が高い。

NMDA 毒性と視神経切断の、どちらが緑内障のモデルとなりうるかが今後の課題である。

引用文献

Nakazawa T, Shimura M, Endo S, Takahashi H, Mori N, Tamai M. 2005. N-Methyl-D-Aspartic acid suppresses Akt activity through protein phosphatase in retinal ganglion cells. *Mol Vis* 11:1173-1182.

Yata T, Nakamura M, Sagawa H, Tokita Y, Terasaki H, Watanabe M. 2007. Survival and axonal regeneration of off-center retinal ganglion cells of adult cats are promoted with an anti-glaucoma drug, nipradilol, but not BDNF and CNTF. *Neuroscience* 148:53-64.

図 1 NMDA と視神経切断 14 日後の RGC 生存率

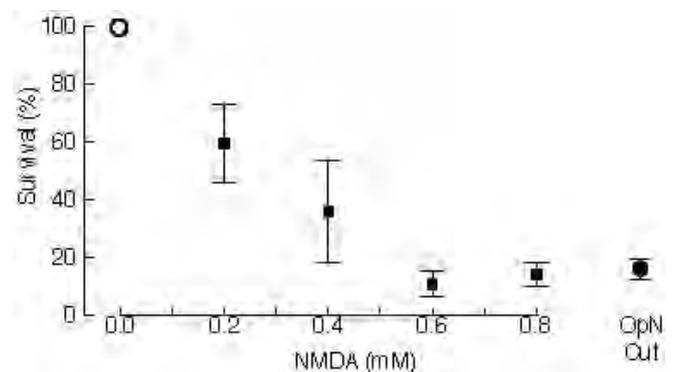


図 2 NMDA と視神経切断に対する生存率の RGC タイプによる違い

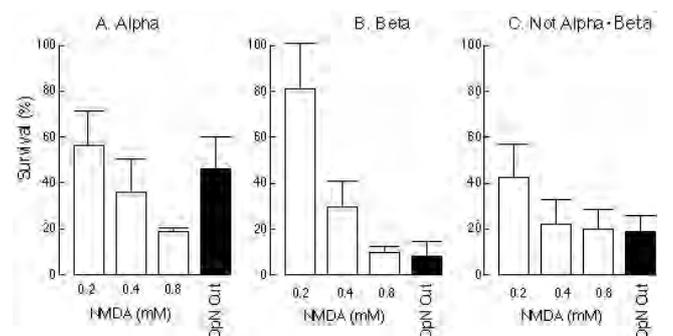
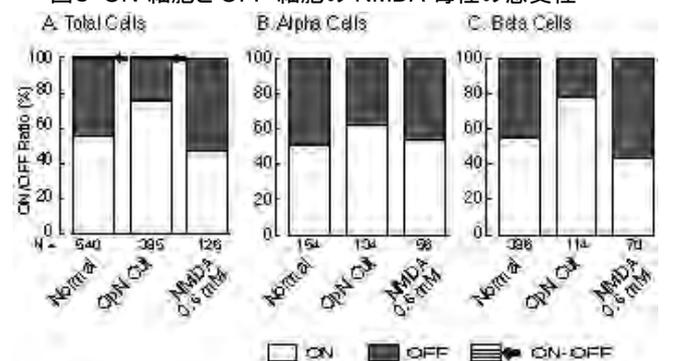


図 3 ON-細胞と OFF-細胞の NMDA 毒性の感受性



網膜の再生過程における微小管脱安定化タンパク質の解析

長谷川明之・長谷川浩二・徳永史生・〇久富修
(大阪大学 大学院理学研究科)

Keywords: regeneration, microtubule, stathmin

目 的

イモリは成体においても高い組織再生能を持ち、中枢神経系組織である網膜を完全に除去しても、元通りに網膜を再生して視覚を回復することができる。彼らはどのような機構で網膜を再生するのであろうか？ 網膜再生の過程では、色素上皮細胞が脱分化・増殖して網膜前駆細胞が形成される。さらに、その前駆細胞が分化して神経性網膜が再構築される。我々は、イモリの網膜再生過程を調べることで、中枢神経系神経組織の形成を理解するとともに、傷ついたヒトの網膜組織を再生させるための基礎的な知見を得ることを目的として研究を進めている。

スタスミンは、微小管脱安定化タンパク質で、ショウジョウバエを含めた様々な動物種に広く分布している。脊椎動物には4種のスタスミンファミリータンパク質（スタスミン、SCG10、SCLIP、RB3）が存在しており、スタスミン以外は膜結合領域を持っていて、生体膜上に存在すると考えられている。スタスミンファミリータンパク質は、微小管のスクラップ&ビルドを活性化することで細胞の増殖や神経回路形成に影響を与えるとされており、スタスミンと SCG10 はラット嗅上皮の発生とアクソンの再生に対応して発現するという報告がある (Pellicier-Monnin et al., 2001)。そこで本研究では、スタスミンファミリータンパク質に着目し、それらが色素上皮細胞の脱分化や網膜の形成とどのように関連しているかを調べた。

方 法

イモリ成体の網膜（正常網膜）を手術により除去し、神経性網膜に由来する正常網膜 cDNA ライブラリーと、網膜再生過程で形成される網膜前駆細胞に由来する再生網膜 cDNA ライブラリーを作製した。これらのライブラリーから約千クローンを無作為に単離し、コードする遺伝子の解析を行った (Hasegawa et al., 2007a)。

4種のスタスミンファミリータンパク質に関しては、遺伝子の全長を単離し、半定量的PCRによって各組織や網膜再生過程での発現パターンを調べた。また、スタスミンおよび SCG10 に関しては、単離した遺伝子を用いて組換えタンパク質を作成し、チューブリンの脱重合活性を調べた。さらに、それら組換えタンパク質を抗原として、スタスミンおよび SCG10 を特異的に認識する抗血清を作成した。これらの抗血清を用いて、網膜再生過程でのスタスミンおよび SCG10 の発現のタイミングや局在を調べた。

結 果

作成した cDNA ライブラリーから無作為にクローンを抽出して塩基配列を解析したところ、細胞骨格に関連したタンパク質遺伝子が数多く見られた。その中で微小管の脱安定化タンパク質であるスタスミンファミリータンパク質に関して、遺伝子の全長を単離し、各組織での発現分布を調べた。その結果、スタスミンがほとんどの組織に広く分布しているのに対し、SCG10 は神経組織特異的に発現しており、SCLIP と RB3 はその中間の分布を示した。そこで、スタスミンと SCG10 に関して、再生過程での発現変化を調べたところ、いずれも再生過程で発現量が増加するが、そのタイミングが異

なることが明らかになった。

さらに、タンパク質レベルでスタスミンと SCG10 を調べるために、それらの組換えタンパク質を大腸菌で発現させた。得られた組換えタンパク質はいずれもチューブリンを脱重合させる活性を持っていた。これらの組換えタンパク質を抗原として抗血清を作成し、スタスミンと SCG10 の局在を調べた。正常網膜においては、スタスミンは視細胞内節、内・外網状層、神経線維層、ならびに Müller 細胞に存在していることが示唆された (Hasegawa et al., 2007b)。一方、SCG10 はスタスミンと異なり、視細胞の外節にも強い反応性を持っていたが、Müller 細胞には存在が認められなかった。また、網膜再生過程のごく初期、すなわち色素上皮細胞の脱分化過程で、スタスミンの強い発現が認められたのに対し、SCG10 の発現が見られたのは網膜前駆細胞が層状に配列した時期であった。

考 察

イモリには哺乳類と同様、4種のスタスミンファミリータンパク質が存在している。網膜の再生過程では、スタスミンファミリータンパク質の発現量変化が見られたことから、これらのタンパク質が網膜組織の構築に深く関わっていることが示唆された。正常網膜では、スタスミンと SCG10 も視細胞および神経線維層に存在するが、スタスミンは Müller 細胞にも存在しており、両者の発現の違いにより、神経細胞とグリア細胞を分別できると期待される。色素上皮細胞の脱分化過程において、スタスミンの発現量は増加し、網膜前駆細胞中でも強い発現が認められた。このことは、脱分化した色素上皮細胞で、微小管の再構築が行われていることを示唆している。一方、SCG10 の発現は、脱分化過程では認められず、網膜前駆細胞が層状に配列する時期に認められるようになることから、この時期に神経細胞としての分化が始まることが考えられた。

引用文献

Pellicier-Monnin, V., Astic, L., Bichet, S., Riederer, B. M., and Grenningloh, G. (2001) Expression of SCG10 and Stathmin Proteins in the Rat Olfactory System During Development and Axonal Regeneration. *J. Comp. Neurol.*, 433, 239–254.

Hasegawa, A., Goto, T., Hasegawa, K., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Kobayashi, H., Komaya, R., Tokunaga, F., and Hisatomi, O. (2007a) Comparison of genes expressed in normal and regenerating newt retinas. In: "Strategies for Retinal Tissue Repair and Regeneration in Vertebrates: from Fish to Human" ed. By Chikafumi Chiba, pp. 63-76, Research Signpost, India.

Hasegawa, A., Hisatomi, O., Yamamoto, S., Ono, E., and Tokunaga, F. (2007b) Stathmin expression during newt retina regeneration. *Exp. Eye Res.*, 85, 518-527.

アカゲサルにおける黄斑部 PhNR の記録と非対称性

○近藤峰生・栗本幸英・寺崎浩子
(名古屋大学大学院医学系研究科 眼科)

Keywords: photopic negative response, inner retina, monkey, asymmetry

目的

錐体 ERG の b 波に続く緩やかな陽性成分は photopic negative response (PhNR) とよばれ、この中には網膜内層の spiking neuron (神経節細胞を含む) の活動電位が含まれることが知られている (Vishwanathan et al. 1999)。PhNR は青色背景のもとで赤色刺激を用いて記録するとより大きな電位が記録され (Rangaswamy et al. 2007)、実際の臨床研究でも種々の視神経疾患で PhNR の電位が低下することが知られている。しかしこれまで PhNR は全視野刺激で記録されており、黄斑部局所からの PhNR 記録の報告はない。そこで今回我々は、赤外線眼底カメラに青色背景光と赤色刺激を組み込み、アカゲサルの黄斑部から PhNR を記録する試みを行なった。また、直径 15 度の半円刺激を用いて、黄斑部の PhNR に耳-鼻側および上-下側の非対称が存在するかどうかを調べた。

方法

我々は、赤外線眼底カメラに背景光として青色 LED ($\lambda=450$ nm) を、また刺激スポットとして赤色 LED ($\lambda=627$ nm) を組み込んで、局所 PhNR の専用記録装置を試作した。5 匹のアカゲサルから ERG を記録した。背景光の強度は杆体活動を抑制するのに十分な $3.7 \log \text{scot-td}$ とし、赤色刺激スポットの強度を様々に変えて PhNR を記録した。また、硝子体内に TTX を注入して内層の活動電位をブロックして黄斑部局所 PhNR がどう変化するかを観察した。さらに 5 匹のアカゲサルから直径 15 度の半円刺激を用いて耳-鼻側および上-下側の PhNR を記録した。

結果

サルの黄斑部をレーザーで凝固し、その部分を刺激することによって反応が局所である条件がわかった。b 波の振幅と PhNR の振幅の比を調べると、黄斑部では PhNR の振幅が比較的大きいことがわかった。TTX を硝子体内注射すると、黄斑部局所 PhNR の振幅は著明に減弱した。また、半円刺激で記録すると PhNR は耳側網膜よりも鼻側網膜の方が有意に大きかった。例えば 150 ms 刺激では、耳側が $4.4 \pm 0.8 \mu\text{V}$ であるのに対し、鼻側は $5.5 \pm 1.4 \mu\text{V}$ であった ($P=0.04$)。また、PhNR は下側網膜よりも上側網膜の方が有意に大きかった。例えば 150 ms 刺激では、下側が $4.5 \pm 1.2 \mu\text{V}$ であるのに対し、上側は $5.4 \pm 1.5 \mu\text{V}$ であった ($P=0.04$)。

考察

赤外線眼底カメラを改良した装置で、眼底を直視しながら青色背景下に赤色スポット刺激で局所 PhNR が記録できることがわかった。また、PhNR の耳鼻側および上下側での非対称は神経節細胞の密度分布特性と一致していることがわかった。

引用文献

Viswanathan, S., Frishman, L.J., Robson, J.G., Harwerth, R.S., Smith III, E.L., 1999. The photopic negative response of the macaque electroretinogram: Reduction by experimental glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 1124-1136.

Rangaswamy, N.V., Shirato, S., Kaneko, M., Digby, B.I., Robson, J.G., Frishman, L.J., 2007. Effects of Spectral Characteristics of Ganzfeld Stimuli on the Photopic Negative Response (PhNR) of the ERG. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 4818-4828.

Kondo, M., Kurimoto, Y., Sakai, T., Koyasu, T., Miyata, K., Ueno, S., Terasaki, H., 2008. Recording focal macular photopic negative response (PhNR) from monkeys. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* in press.

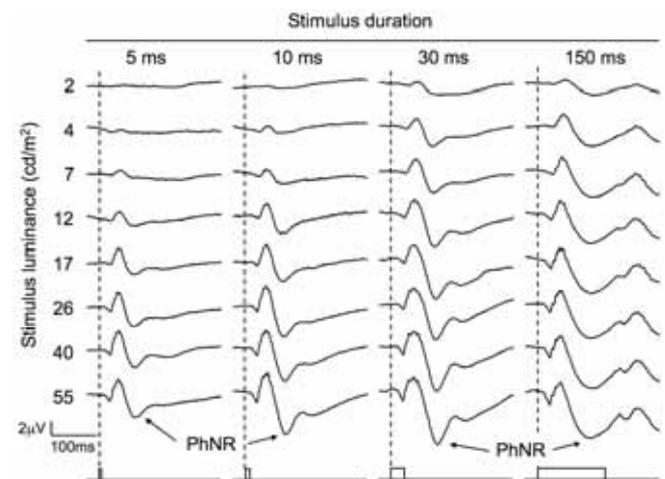


図 1: サルの黄斑部から記録した PhNR

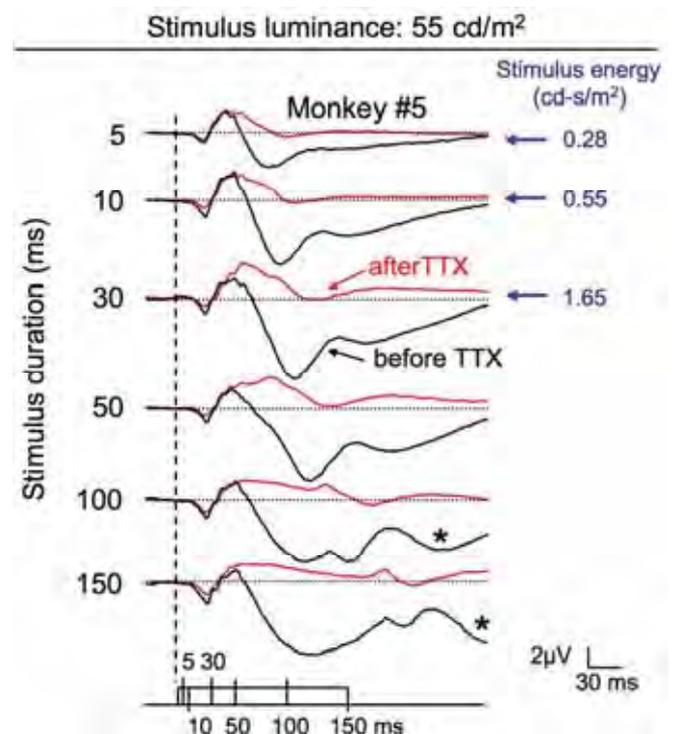


図 2: TTX 注入前後の PhNR の変化

網膜桿体ネットワークのシミュレーション解析

宮本 侑典, 神山 齊己

(愛知県立大学大学院情報科学研究科)

Keywords: mathematical model, rod network, computer simulation

1. はじめに

桿体視細胞はギャップジャンクションによって電的に結合し、ネットワークを形成している。こうした構造は、視覚情報処理における SN 比の向上や 2 次ニューロンへの効率的な信号伝達を担う役割をもつと考えられている。しかし、光-電気信号変換機構、イオン電流機構、細胞内カルシウム機構など、桿体視細胞の情報処理に関わる機構は、動的かつ非線形的で複雑な特性を備えており、これらが組み合わされて実現される桿体視細胞ネットワークの働きを理解することは非常に困難である。本研究では、桿体視細胞に関する神経生理学的な知見に基づいた、リアリスティックな 2 次元モデルを構築し、桿体での視覚情報処理に関するシミュレーションによって、桿体視細胞の様々な光応答を作りだすメカニズムを解析することを目的としている。

2. 網膜桿体ネットワークのモデル化

単一桿体における細胞膜の電気的特性は、5 つのイオン電流成分 ($I_h, I_{Kv}, I_{Ca}, I_{K(Ca)}, I_{Cl(Ca)}$) と、光-電気信号変換機構 (I_{photo})、細胞内カルシウムシステムからなるパラレルコンダクタンス型の電氣的等価モデルとしてモデル化した [1]。

また、解剖学的知見から、1 つの桿体は大体 4 つの桿体とネットワークを構成しているものとして、正方形格子結合型のネットワークモデルを構築した [2]。

構築したモデルを用いて、様々な強度の光刺激を大小それぞれのスポット光として網膜に照射したときの光応答シミュレーションを行ったところ、刺激の中心からある程度離れた桿体ほど、より早く応答のピークに到達する、大きいスポットに対する電圧応答は小さなスポットに対する応答よりも大きくなる、スポットを与える面積によって応答波形のダイナミクスが異なるといった、桿体ネットワーク特有の現象が再現された。このことから、本研究で構築したモデルは、桿体視細胞ネットワークの生理学的特性を備えているといえる。

3. 各イオンチャンネルが応答に与える影響のシミュレーション解析

Fig. 1(Ctrl) は単一桿体に対して振幅 1 ~ 200[pA] の刺激電流を、周波数 0.1 ~ 200[Hz] の正弦波として加えたときの利得を記録したものであり、軸はそれぞれ、入力電流の振幅 ([pA]), 入力電流の周波数 ([Hz]), 入力電流に対する出力電圧の利得 ([mV/pA]) を示している。このように、単一桿体はバンドパス型の周波数特性を持っていることがわかってきている。こうした特性は、細胞膜上のイオンチャンネルによるものであると考えられる。そこで、モデルを用いて、各イオンチャンネルのパラメータを変化させたときの応答をシミュレーション解析することにより、どのチャンネルの影響が大きいかを調べた。

各イオンチャンネルのパラメータを変更するシミュレーション

を行ったところ、特に Ca チャンネル (I_{Ca}) の時定数に関するパラメータを変更したとき、大きな特性の変化があった。

Fig. 1 より、Ctrl 状態での周波数特性は、バンドパス型の周波数特性を持っており、特に小さい振幅の入力電流に対しては 1[Hz] 付近で大きな利得が得られていることがわかる。しかし、Ca チャンネルのパラメータを変更すると、低周波数帯域での利得は 0.5 程度から 0.8 程度まで大きくなるが、入力電流の振幅が小さいときの 1[Hz] 付近での大きな利得が無くなっている。

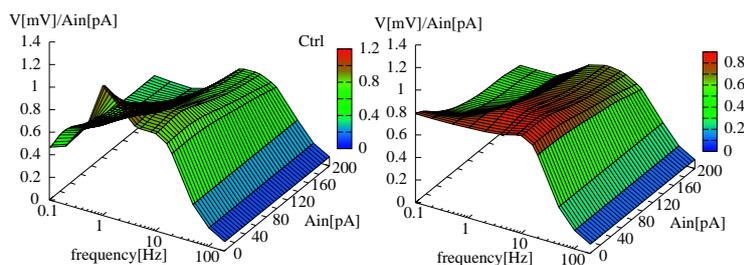


Fig.1 パラメータ変更による周波数特性の変化

4. まとめと考察

本研究では、神経生理学的な知見に基づいた、リアリスティックな桿体ネットワークの 2 次元モデルを構築し、刺激に対する応答のシミュレーションを行った。本モデルの特徴として、イオンチャンネルやカルシウムシステム、光変換機構などに対するパラメータの詳細な解析が可能であることが挙げられる。これにより、生理学的実験では実現が難しかった条件下での桿体応答をシミュレーション解析することができる。

各イオンチャンネルのパラメータを変更しシミュレーションを行ったところ、Ca チャンネルが桿体の周波数特性に与える影響が明らかとなった。我々の先行研究より、刺激の中心からある程度離れた桿体ほど、より早く応答のピークに到達するという桿体ネットワーク特有の応答特性は、単一桿体自身の持つバンドパス的な周波数特性によるものであると考えてきたが、何故そうした周波数特性が生み出されるのか、その詳細は明らかになっていなかった。今回の結果から、そうした周波数特性のメカニズムには Ca チャンネルが大きく関係しているのではないかと考えられる。

引用文献

- [1] Kamiyama, Y., Ishihara, A., Aoyama, T. and Usui, S. (2005) "Simulation analyses of retinal cell responses", Modeling in the Neurosciences (Edited by Reeke, G.N., Poznanski, R.R., Lindsay, K.A., Rosenberg, J.R. and Sporns, O.), 313-338., Taylor & Francis.
- [2] Zhang, J. and Wu, S. M. (2004), "Connexin35/36 gap junction proteins are expressed in photoreceptors of the tiger salamander retina", J. Comp. Neurol., 470, 1-12.

網膜双極細胞ニューラルイメージの実時間再構築

○長谷川 潤・八木 哲也
(大阪大学大学院工学研究科)

Key words: Retina, Neural image, Real-time Emulator

目的

外界から網膜に入力する視覚刺激は、時空間的に常に変化する複雑な情報である。こうした自然画像によって惹起される網膜細胞のニューラルイメージ (NI) を計算機によって再構築することは、視覚システム全体における網膜の機能を解析する上で重要である。しかしながら、膨大な数の細胞から成る神経回路の NI を再現しようとする場合、従来の逐次計算をベースとした計算機を用いて、自然画像入力に対する応答を実時間で処理することは容易ではない。

本研究では、網膜神経細胞受容野の空間特性をアナログ集積回路によって模倣するシリコン網膜[1]と従来の逐次演算型デジタル計算機を組み合わせた、神経模倣型アーキテクチャを有する計算システムにより、自然画像に対する双極細胞ネットワークの NI を実時間で再構築し、双極細胞の視覚機能について考察を加えた。

方法

本計算システムはシリコン網膜[1]および制御用 Field Programmable Gate Array (FPGA)、Ethernet インターフェイス、デジタルコンピュータから構成される。シリコン網膜は 16,384 個 (128x128 ピクセル) の Active Pixel Sensor (APS) と二層の抵抗回路網を備え、網膜の双極細胞に見られる中心・周辺拮抗型の受容野を模倣することができる。FPGA によりシリコン網膜を制御し毎秒 60 フレームで連続画像を取得、Ethernet 経由でデジタルコンピュータに画像データを伝送する。デジタルコンピュータでは任意の時間フィルタの畳み込み演算を実行する。

双極細胞受容野の空間特性は、tiger salamander を用いた細胞内記録法による生理学実験を参考にした[2]。Fig. 1 は、シリコン網膜にスリット刺激を与えたときの応答をスリットからの距離に対してプロットした結果である (小円)。生理学実験の結果 (実線) との比較から、シリコン網膜が実験結果に近い空間特性を再現していることが分かる。受容野の時間特性に関しては、tiger salamander 網膜の Sustained 型および Transient 型それぞれの On 型双極細胞の細胞内記録データ[3]を基に決定した (Fig. 2)。

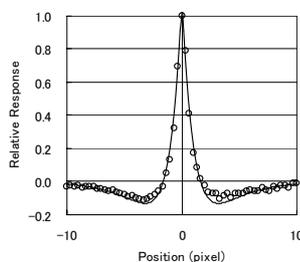


Fig. 1 空間特性

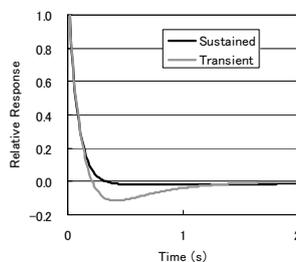


Fig. 2 時間特性

結果

シリコン網膜の前方 50cm の位置で画面上部から下方向に 12cm/s の速度で手を動かしたときの双極細胞のエミュレーションの結果を Fig. 3 に示す。それぞれ (a) 時間フィルタなし (静止背景)、(b) 時間フィルタなし (手が中央にあるときのフレーム)、(c) Sustained 型 On 双極細胞、(d) Transient 型 On

双極細胞のエミュレート結果を表す。Sustained 型 On 双極細胞 (Fig. 3 (c)) では手の領域に背景の静止像の反転画像が重なって現れている。また Transient 型 On 双極細胞 (Fig. 3 (d)) では、輝度変化のない画面下部では出力が見られないものの、手の領域内部に背景反転画像が、さらに手が通過した領域に尾を引くように背景画像が現れる点に注目して欲しい。従来、視覚情報処理において Sustained 応答は、静止画像を捉え、Transient 応答は、動画像部分を捉えるという単純な解釈が行われてきた。本研究から、網膜細胞受容野の時空間特性を考慮すると、Sustained および Transient 応答チャネルの機能についてより深い議論が必要であることが浮き彫りになった。

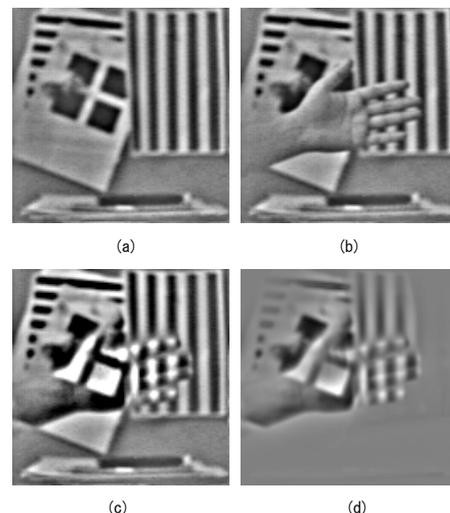


Fig. 3 双極細胞エミュレーション結果

考察

網膜細胞の NI を実時間でエミュレートすることの意義はこれまで強調されることはなかった。従来の生理学実験では、スポット光などの単純な光刺激、あるいはピンクノイズ刺激などを網膜に与えることによって、単一細胞の受容野を解析し、網膜の機能について考察を加えている。しかし、生理学実験データから演繹して今回得られた様な結果を予想することは難しく、本システムが網膜の機能を研究する上で有力な手段となることが期待できる。今後は、これらの結果を生理学実験と心理物理学実験へフィードバックし、自然画像処理における網膜の機能を明らかにすることが課題である。

引用文献

- 1) Kameda, S. & Yagi, T. (2003). IEEE Trans. on Neural Networks, vol.14, no.5, 1405-1412.
- 2) Hare, W. A., Owen, W. G. (1990). Journal of Physiology, 421, 223-245.
- 3) Awatramani, G. B. & Slaughter, M. M. (2000). Journal of Neuroscience, 20(18), 7087-7095.

網膜神経節細胞モデルによるスパイク発火特性の解析

桜木雄一郎・松井遼・神山斉己
(愛知県立大学大学院情報科学研究科)

Keywords: RGC, Spike timing, Stochastic model

1. 背景

網膜神経節細胞においてこれまで構築されてきたイオン電流モデルの多くは、イオンチャネルの動作をその全体的特性で表現した決定論的モデルであった [1]。一方、実際のイオンチャネルは個々のチャネルが確率的に開閉していることから、このような個々のチャネルの確率的開閉特性を再現したより詳細な神経節細胞モデルの構築がなされた [2]。このモデルでは、従来のモデルでは説明でき得なかった、神経節細胞のスパイク発火タイミングが同一の刺激に対してばらつくことや、刺激のタイプによって発火タイミングのばらつきが異なるといった特性 [3] の再現が可能である。これより、神経節細胞のスパイク発火タイミングに対して、個々のイオンチャネルの確率的開閉特性が重要な役割を持つ可能性が示唆された [2]。しかしながら、スパイク発火に対して、それぞれのイオンチャネルの確率的開閉がどう機能しているかという解析はまだ行われていない。

本研究では、各イオンチャネルがスパイクタイミングにどのような影響を与えているかを明らかにするために、イオンチャネルの確率的開閉機構を備えたモデルを用いてシミュレーション解析を行った。

2. シミュレーション方法

シミュレーションに用いた神経節細胞モデルは、 Na , $Ca(T)$, $Ca(L)$, K_v , K_A , K_{Ca} , h の 8 つのイオンチャネルを含み、それぞれのチャネルはマルコフ過程に従う状態遷移により確率的な開閉動作を行う [1, 4]。それぞれのイオンチャネルがスパイク発火タイミングに及ぼす影響を明らかにするため、特定のイオンチャネル密度を変化させた際の発火タイミングへの影響を解析した。ただし、膜全体のコンダクタンスは一定に保つことで、膜の電気的特性には変化が生じないようにした。このような操作を各種類のイオンチャネルに施し、パルス入力を用いてスパイクを周期的に 10 回発火させるシミュレーションを 20 トライアル行った。Fig.1. は上からパルス入力、これに対するスパイク応答、スパイク応答のラスタプロット表示である。イオンチャネル操作は各チャネルに対してチャネル密度を 100 分の 1、単一チャネルコンダクタンスは 100 倍とした。

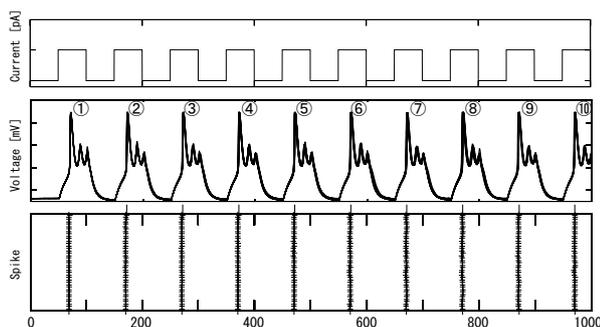


Fig.1 Spike responses to pulse stimuli

こうして得られたラスタプロットから、各スパイクごと

(① ~ ⑩) のスパイクタイミングのばらつきを測定した。スパイクの番号が同一のラスタプロット列中においても、トライアル間で僅かに発火タイミングに差が生じている。そこで、各ラスタプロット列中で、一番始めに立ち上がったスパイクの発火時刻を基準に他のスパイクが発火した時刻との差を求めた。この発火時刻差の分布が大きい程、それらのスパイク発火タイミングがばらついていると言え、このばらつきを control 状態と比較した。

3. 解析結果

シミュレーション結果から、スパイクタイミングに主に影響を与えたのは K_A , K_v チャネルの 2 種類であった。 K_A チャネルを操作した場合は、control 状態に比べて 1 発目のスパイクから発火タイミングに大きなばらつきが見られた。一方、 K_v チャネルを操作した場合は、1 発目のスパイク発火タイミングにはばらつきは生じず、2 発目以降の後続の発火タイミングには大きな乱れが生じた。これらの違いから、チャネルごとにスパイク発火に異なった影響を与えていることがわかる。つまり、1 発目のスパイクから最も大きな発火タイミングのばらつきを生じさせた K_A チャネルは個々のスパイクの発火タイミングに大きな影響を与えると考えられる。また、2 発目以降のスパイクの発火タイミングのみに影響を与えた K_v チャネルは個々のスパイクのタイミングよりもむしろ連続したスパイク発火に関与しており、これは、スパイク間隔を左右する要因であると考えられる。

4. まとめ

本研究では、イオンチャネルの確率的開閉動作を導入した網膜神経節細胞モデルを用いて、スパイク発火タイミングの解析を行った。各イオンチャネルごとのスパイク発火タイミングへの影響の解析から、個々のスパイク発火タイミングに最も影響を与える要因となるのは K_A チャネルであるという結果が得られた。また、スパイク間隔は K_v チャネルにより影響を受けるということが示唆された。網膜神経節細胞により出力されるスパイクの情報は、スパイクタイミングやスパイク間隔により左右される。そのため、このようなイオンチャネルの特性は、スパイク符号化に関与する重要な要素であると言える。

今後の課題としては、スパイクタイミングに影響を与える要因のより詳細な解析と、モデルの細胞形状やシナプス入力特性 [5] がスパイク発火特性に与える影響の解析が挙げられる。

引用文献

- [1] 井脇. 他.: 電子情報通信学会, NC99-77, 11-1947, 1999
- [2] Kamiyama et al.: Modeling in the Neurosciences., 2005
- [3] Keat, J. et al.: Neuron, Vol.30, 803-817, 2001
- [4] Matsui, Kamiyama: FIT2007, Vol.6, 487-488, 2007
- [5] Van Rossum et al.: J Neurophysiol., Vol.89, 2406-2419, 2003

マカクサル V1 と TE 第 3 層錐体細胞の電気生理学的特性

○石川理子¹・丸山敦子²・細山大輔³・吉村由美子⁴・田村弘³・佐藤宏道²・藤田一郎³
 (¹大阪大学大学院医学系研究科・²JST/CREST・³大阪大学大学院生命機能研究科・⁴名古屋大学環境医学研究所)

Keywords: V1, TE, Membrane properties

目 的

サル視覚関連皮質は機能的・構造的に異なる多くの領野に分かれている。初期視覚野である一次視覚野 (V1) と形態視情報処理の最終段にある下側頭皮質 (TE 野) は、視覚応答性が異なる。V1 細胞は、非常に小さい受容野をもち、特定の方位、空間周波数、時間周波数に対し選択的に応答する。TE 細胞は、非常に大きな受容野をもち、複雑な視覚刺激に対して選択的に応答する。また、V1 細胞と TE 細胞はその神経細胞の形態的特徴も異なる (Elston et al., 1999)。しかし、それらの領野における細胞の電気生理学的性質については十分な比較検討がなされていない。本研究は、大脳皮質視覚野の情報処理機能の根拠となる細胞レベルの電気生理学的特性を明らかにすることを目的とし、V1 と TE の第 III 層錐体細胞からホールセルパッチクランプによる記録を行い、それぞれの特性を比較した。

方 法

成マカクザル計 3 頭より麻酔下において V1 および TE 野を摘出し、厚さ 300 μm のスライス切片を作成した。近赤外微分干涉顕微鏡下で細胞の形態・位置を観察しつつ、第 III 層錐体細胞に対し、ガラス微小電極 (電極抵抗 5-10M Ω) によるホールセルパッチクランプ記録を行った (図 1)。1) 500 ms の矩形波電流注入を過分極、脱分極方向ともに段階的に電流量を変化させて行い、それに対する膜電位応答、2) 時間周波数を可変とし正弦波状に変化する電流注入を行い、それに対する膜電位応答を記録した。



図 1. V1 三層錐体細胞 (左) と TE 三層錐体細胞 (右)

結 果

V1 細胞と TE 細胞の矩形波電流通電に対する膜電位応答を比較したところ、膜の受動的性質に有意な違いが観察された。入力抵抗は V1 細胞のほうが、TE 野細胞より大きく、膜の時定数は、V1 細胞のほうが TE 野細胞より小さかった。

膜の能動的性質において、V1 細胞と TE 細胞の間には、以下の点で有意な違いが観察された。過分極性通電に対する内向き整流性は、V1 細胞のほうが TE 野細胞より大きかった。矩形波状の脱分極性通電に対する瞬間発火頻度の時間減衰 (spike frequency adaptation) の程度は、V1 細胞のほうが TE 細胞より大きく、減衰の時定数は、V1 細胞のほうが TE 細胞より小さかった。脱分極性通電に対する最大発火頻度は V1 細胞が TE 細胞より大きかった。

単一活動電位の形においても、V1 細胞と TE 細胞の間では、

有意な違いが観察された。活動電位の幅 (活動電位の陽性成分の幅) は、V1 細胞のほうが TE 野細胞より狭かった。また活動電位の閾膜電位は V1 細胞のほうが TE 細胞より深かった正弦波状に変化する電流注入に対する膜電位および発火応答を調べた結果 (図 2)、同じ強度の電流通電に対して、V1 細胞は TE 野細胞より高い時間周波数特性を示した。

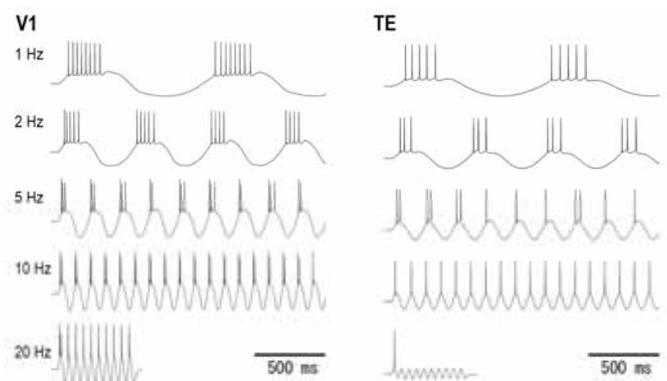


図 2. V1 細胞 (左) と TE 野細胞 (右) の正弦波状電流注入に対する膜電位応答

考 察

マカクサルの一次感覚野である V1 の III 層錐体細胞と側頭連合野である TE 野 III 層錐体細胞の膜の電気生理学的特性は異なった。V1 第 III 層錐体細胞は入力に対する時間分解能が高く、高い時間周波数の入力に反応するのに適しているのに対し、TE の第 III 層錐体細胞は、時間的に幅をもつ入力を統合するのに適しており、低い時間周波数の入力に対してよく反応することが示された。以上の結果より、機能的に異なる V1 と TE 野は、異なる電気生理学的特性を持つ神経細胞により構築されていることが明らかとなった。V1 細胞は視覚世界を詳細に再構築するフィルターとして働いていること、一方、TE 細胞が様々な領野からの入力を統合し、複雑な刺激に対して選択性を持つことから、それぞれの神経細胞は、領野の機能特性を支える上で適した電気生理学的特性をもつ可能性が示唆された。

引用文献

Elston G.N., Tweedale R., Rosa M.G. (1999) Cortical integration in the visual system of the macaque monkey: large-scale morphological differences in the pyramidal neurons in the occipital, parietal and temporal lobes. Proc. Biol. Sci. 266:1367-1374.

サル V1 および TE 野における錐体細胞の膜特性の生後発達

○丸山敦子¹・石川理子²・細山大輔³・吉村由美子⁴・田村弘³・佐藤宏道²・藤田一郎³
 (¹JST/CREST・²大阪大学大学院医学系研究科・³大阪大学大学院生命機能研究科・⁴名古屋大学環境医学研究所)

Key words: Monkey, Membrane property, Development

目的

ヒトやサルの視覚機能は出生時には未熟な状態にあり、早期には空間的・時間的解像度の低い視覚情報しか知覚することができないが、成長とともに解像度の高い、より複雑な情報に対応できるようになる。視覚情報のうち形、色、両眼視差に関する情報が第一次視覚野 (V1 野) から V2、V4 といった領野を通して下側頭葉にいたる経路 (腹側視覚経路) で階層的に処理される。下側頭葉の TE 野はこの経路の後期段階である。これらの領野での視覚刺激に対するニューロンの応答性も生後に発達が見られる。

またこれらの領野において主要な出力細胞である第3層錐体細胞は生後に形態面 (樹状突起の広がり、スパイン数等) で発達による変化が見られる (Oga et al., 2008)。発達に伴う細胞レベルでの変化は形態のみ留まらず、電気生理学的性質に関しても生じうるものであり、それが視覚機能の発達に寄与している可能性が考えられる。

本研究では異なる年齢のサルにおいて V1 と TE の第3層錐体細胞に対しホールセルパッチクランプによる記録を行い、初期および高次視覚野においてそれぞれ膜の電気生理学的性質がどのように変化するかを調べた。

方法

異なる5つの発達段階のマカクザル計6頭 (生後10日、3週、7ヶ月、1年各1頭、および成体2頭) より麻酔下において V1 および TE 野を摘出し、厚さ 300 μm のスライス切片を作成。近赤外微分干渉顕微鏡下で細胞の形態・位置を観察しつつ、第3層錐体細胞に対しガラス微小電極 (電極抵抗 5-10MΩ) によるホールセルパッチクランプを行った。500 ms の矩形波電流注入を過分極、脱分極方向ともに段階的に電流量を変化させて行い、それに対する膜電位応答を記録した。

膜電位応答より得られた膜特性の各種パラメータに対し領野と年齢に関する 2-way ANOVA による統計検定を行い、発達面で有意な変化 ($p < 0.05$) を示したパラメータに関しては各群の平均値を比較することによりその変化のパターンを評価した。

結果

膜の受動的な性質のうち、静止膜電位と入力抵抗は発達に伴う有意な変化を生じなかった。膜の時定数は V1、TE ともに生後10日では各領野の成体での値の倍以上と高く、発達とともに減少した。またその減少のしかたは V1 では生後7ヶ月以前がそれ以後に比べて大きく、TE は7ヶ月以後により大きく減少した (Fig. 1)。

過分極によって活性化するカチオンチャネル (HCN チャネル) により過分極中に緩徐に生じる内向き整流性は V1、TE とも生後10日では乏しく、発達により顕著にみられるようになったが、V1 では各年齢間で段階的に増加したのに対し、TE では生後1年以前には全く増加が見られなかった。

脱分極刺激により活動電位を生じる際の個々の活動電位の時間幅は各領野で発達とともに短縮した。またその変化は膜の時定数と同様、V1 で7ヶ月以前、TE で7ヶ月以後に大きかった。閾膜電位は発達により変化が見られなかった。

500 ms の脱分極電流注入に対し、活動電位の発火頻度は発火の初期には比較的高く、その後減少し一定の頻度に落ち着くという現象がみられた。この spike frequency adaptation は発達とともに、より大きくより短時間で起こるようになった。

注入電流量を増加した際に発火頻度が増加しうる上限 (最大発火頻度) は発達とともに高くなり、その変化のしかたは膜の時定数などと同様 V1 で7ヶ月以前、TE で7ヶ月以後に顕著であった。

考察

サルの視覚皮質において初期領野である V1 野、高次領野である TE 野とも第3層錐体細胞は発達とともに、入力の変化に対しより敏感に素早く応答を変化させることができるよう、膜特性のさまざまな要素が系統的に変化した。このような変化は視覚情報処理の時間的信頼性を向上させるのに寄与していると思われる。

また発達進む時期は領野によって違いがあり、V1 の発達は TE に比べより早い時期に進行した。このことより視覚皮質の発達は細胞レベルにおいて、単純な情報を処理する初期視覚野から、より複雑な情報を処理する高次領野へと階層的に進むことが示唆される。

引用文献

Tomofumi Oga, Guy N. Elston, Ichiro Fujita. (2008) Hierarchical development in macaque visual cortex. 第31回日本神経科学大会 (東京) P1-j05

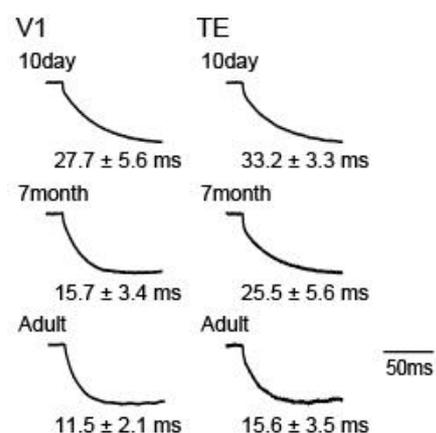


Fig. 1 Membrane time constant calculated from the time course of potential change in response to -0.1 nA current injection (mean ± SD)

マカクサル大脳皮質におけるスパイン新生と刈り込み

○小賀智文¹・岡本嗣久¹・Guy N. Elston^{2,4}・藤田一郎^{3,4}(¹大阪大学基礎工学部・²Centre for Cognitive Neuroscience, Australia・³大阪大学大学院生命機能研究科・⁴CREST/JST)

Keywords: Monkey, Dendrite, Spine, Postnatal development

目的

大脳皮質の発達過程におけるスパイン新生と刈り込みは、細胞レベルでの領野特異的な情報処理特性の獲得基盤になっていると考えられている。成体サルの大脳皮質において、樹状突起形態とスパイン密度、スパイン総数に顕著な領野間差異があることが先行研究により示されている(Elston GN et al., 1998, 2000)。本研究では、この差異が生後どのように形成されていくかを、第一次視覚野(V1)、視覚連合野(cytoarchitectonic area TE)、多感覚性連合野(PFC, area 12vl)の3領野に着目し、調べた。

方法

生後2日齢から4歳齢までの計5頭のカニクイザルを用いた。4% PFA(paraformaldehyde)で固定した脳からV1野、TE野、PFCを含むブロックを取り出し、脳表を平坦化した後、脳表と平行に250 μ mのスライス切片を作成した。作成したスライスの中から3層を含むスライス切片を選択し、DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole)を用いて細胞核を可視化した。蛍光顕微鏡下で個々の錐体細胞に8% Lucifer Yellowを注入し、ビオチン化抗 Lucifer Yellow 抗体を用いてDAB(3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride)標本を作成した。可視化した750細胞の内、516の錐体細胞の樹状突起形態を、細胞形態解析ソフトウェアNeuroLucidaを用いて再構築した。また、樹状突起スパイン密度を解析する為に、染色された錐体細胞の樹状突起から、スライス切片に対して平行に伸びている樹状突起を選び、100倍対物レンズ(NA=1.40)を用いてカメラルシーダ上で定量化した。

結果

樹状突起野の発達においてV1野と連合野(TE野およびPFC)では異なる発達過程が認められた。V1野では生後、樹状突起野の大きさが減少したが、連合野では上昇した。また、生後2日齢ではV1野とTE野の間に樹状突起野の大きさに差が認められなかった(Fig. 1 B)。

スパイン新生と刈り込みは3ヵ月齢まで3つの領野間で共時的に起こった。スパイン密度の領野間差異は7ヵ月齢以降に認められ、PFC、TE野そしてV1野の順にスパイン密度が高かった(Fig. 1 C)。

錐体細胞の基底樹状突起スパインの総数は、最大値に達するまで継続的に上昇し、その後減少していった。スパインの総数が最大値に達したときの各領野での値は、それぞれ、V1野(3,900)、TE野(11,500)、そしてPFC(15,900)であった。その後のスパインの総数の減少数はそれぞれ、3,000、5,300そして、7,400であった。成体におけるスパインの総数はそれぞれ900、6,200そして、8,500であった(Fig. 1 D)。

考察

先行研究では霊長類において、シナプスの過剰形成が共時的に起こることが示されていたが(Rakic P et al., 1986)、我々はこの知見に加え、錐体細胞の基底樹状突起スパインの総数が最大に達した後の刈り込み過程が領野間で大きく異なることを示した。また、スパイン獲得と刈り込みの程度は大脳皮質の機能的階層に相関することを示した(「高次」の領野

ほど多くのスパインを過剰形成し、その後、多くのスパインを削除する)。生後にスパインの獲得と刈り込みが起こることは、以前より知られているが、1個のPFC(12vl)細胞がその発達過程で、成体のV1細胞8個分にも相当する数のスパインを廃棄するという大規模な刈り込みが起きていることは今回初めて明らかとなった。われわれは、この発達過程の領野間差異が各領野における情報処理の機能形成に重要な貢献をしていると提唱する。

引用文献

Elston GN, and Rosa MG. (1998). Morphological variation of layer III pyramidal neurones in the occipitotemporal pathway of the macaque monkey visual cortex. *Cerebral Cortex* 8, 278-294.

Elston GN. (2000). Pyramidal cells of the frontal lobe: all the more spinous to think with. *J Neurosci* 20, RC95

Rakic P, Bourgeois JP, Eckenhoff MF, Zecevic N., and Goldman-Rakic PS. (1986). Concurrent overproduction of synapses in diverse regions of the primate cerebral cortex. *Science* 232, 232-235

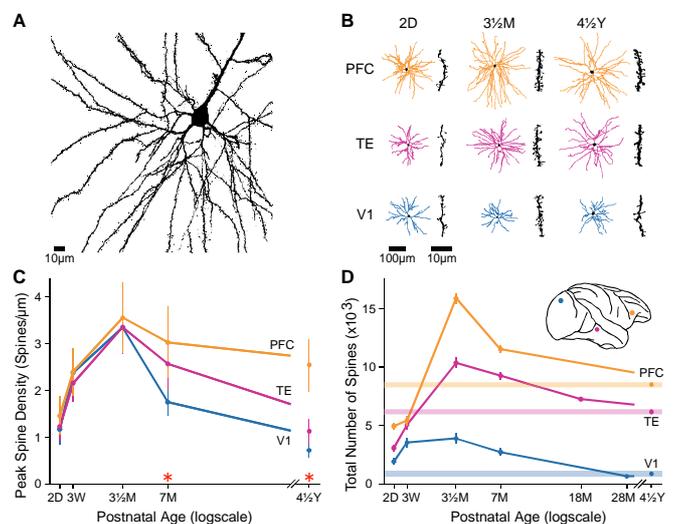


Fig. 1 (A) A partial reconstruction of the dendritic tree of a layer III pyramidal cell. (B) Skeletonized reconstructions of the basal dendritic trees of pyramidal cells sampled from V1, TE and PFC at 2 days postnatal (2D), 3½ months postnatal (3½M) and 4½ years postnatal (4½Y). The dendritic trees of the illustrated cells represent the average of all cells sampled for each cortical area/age group. Insets illustrate the spine density for cells of each cortical area/age group at 50-70 μ m from the cell body. (C) Developmental changes of spine density. (*: $p < 10^{-7}$, post-hoc Kruskal-Wallis Test) (D) Total number of dendritic spines in the basal dendritic tree of the "average" cell in each cortical area/age group.

サル二次視覚野における輪郭線の折れ曲がり表出

線形加算モデルによる刺激選択性形成メカニズムの検討

○伊藤南^{1, 2}(¹大生理学研究所・²総合研究大学院大学)

Key words: Angle, Contour, Visual cortex

目 的

大脳皮質視覚野の腹側視覚路が物体形状の知覚に深く関わっているとされている。初期視覚系の段階ではニューロンは視野上の小さな部分に受容野を持ち、受容野の大きさにより輪郭線の情報を部分ごとに切り出すと考えられているが、このような局所的な情報が腹側視覚路において領野ごとに段階を経ながら物体形状の表現へと統合されていくメカニズムについては未解明の部分が多い。我々は輪郭線中の折れ曲がりの表出を手がかりにこのようなメカニズムを明らかにしたいと考えた。輪郭線中の折れ曲がりは輪郭線のなめらかさをこわすことで輪郭線により表現される面の遮蔽関係や面の折れ曲がり方により物体の構造を表す重要な手がかりとなる。一方、折れ曲がり刺激は二本の直線成分の組み合わせで表現されるという刺激としての簡略さをあわせもつ。先行研究では第二次視覚野において受容野を横切る折れ曲がり刺激に対する反応選択性を調べ、①従来考えられていた以上に多数のニューロンが折れ曲がり刺激に対して選択性を示すこと、②折れ曲がり刺激に対する反応と個々の半直線成分に対する反応に整合性が見られことを明らかにした (Ito and Komatsu, 2004)。本研究ではこのような第二次視覚野ニューロンの折れ曲がり刺激に対する選択性を、初期視覚系において広く用いられている線形非線形モデルをもとにしたLNSモデルでどの程度説明できるかを検討し、第二次視覚野ニューロンにおける折れ曲がり表出メカニズムを検討した。

方 法

LNSモデルは最適な半直線成分を表現する興奮性サブユニットおよび均一な抑制をかける抑制性サブユニットからの入力を仮定し、線形加算によりそれらの出力を統合する。また非線形成分として興奮性サブユニット間の乗算による出力、各興奮性サブユニットにおける上限値の設定、スパイク出力におけるゲイン調節および整流作用を考慮した。先行研究では注視課題を遂行中の二頭のサルの第二次視覚野のⅡ/Ⅲ層より単一細胞記録を行った。折れ曲がり刺激は受容野の中心から外へのびる、受容野のサイズの6~8倍の長さの二本の半直線をつなぎ合わせて作成した。各半直線の角度を30度ずつ変え(12方向)、そのすべての組み合わせ(66刺激)について反応を調べた。特に刺激の折れ曲がり部分が受容野の中心に呈示されるように留意した。このようにして得られた91ニューロンの折れ曲がり刺激およびその構成要素である半直線に対する反応をもとに最適なLNSモデルをニューロンごとに求め、モデルによる折れ曲がり選択性の再現の良否や最適モデルを比較検討した。

結 果

2ないしは3個の興奮性サブユニットを含むLNSモデルによりすべてのニューロンの折れ曲がり刺激に対する選択性がよく説明された。平均して説明可能な分散のうち84%がLNSモデルで説明された。特定の折れ曲がり刺激に対して高い選択性を示す場合でも、乗算による寄与が有意に認められるのは10例のみで、他の例ではもっぱら線形加算により反応選択性全体のチューニングが説明された。また約半数のニ

ューロンで抑制性サブユニットの入力が選択性向上に寄与しており、選択性の良否と有意な相関を示した。また大多数のニューロンではゲインが0.5程度の値を示すことから総入力に基づく正規化が行われていることが示唆された。先行研究において折れ曲がり刺激に対する反応と個々の半直線成分に対する反応に整合性があることを報告したが、これは必ずしも二本の半直線成分双方に認められるわけではない。LNSモデルでは興奮性サブユニットの出力と抑制性サブユニットの組み合わせにより、単独の半直線に対しては明示的な反応を示さないが、組み合わせ刺激においては特異的な折れ曲がり刺激に対して反応を生じるようなケースを再現することができた。

考 察

これらの結果は①第二次視覚野における輪郭線中の折れ曲がり刺激の表出が比較的単純な重み付き線形加算モデルによりその概要を説明できる。②選択性形成に抑制性入力が重要な役割を果たすこと、③二本の最適な半直線成分を明示的に表す興奮性入力に加えて、受容野外からの修飾作用や方位選択的な抑制性入力が折れ曲がり選択性の形成に寄与することを示している。視覚系路の様々な段階で、隣接する領野間ないしは領野内における一ステップの情報処理であれば線形加算モデルで近似可能であることが近年報告されており、我々の結果も含めてこれらの結果は腹側視覚路における物体の脳内表現形成がパーツの組み合わせに基づくものであることを示唆する(Connor, 2004)。第一次視覚野においては線形加算モデルが受容野の構造を表すと理解されることが多い。第二次視覚においても同様な受容野の構造として理解されるのか、あるいは刺激特徴間の相互作用へとシフトしているのかは今後の研究課題である。

引用文献

Ito M. and Komatsu H. (2004) Representation of angles embedded within contour stimuli in area V2 of macaque monkeys. *J Neurosci* 24:3313-3324.

Connor C.E. (2004) Shape dimensions and object primitives. pp1080-1089. *In* The visual neurosciences, ed. by Chalupa L.M. and Werner J.S., MIT press.

変換領域逆相関法を用いた 初期視覚野ニューロンの曲率選択性解析

○新井稔也¹・伊藤南^{2,3}・浅川晋宏^{2,4}・大澤五住¹

(¹大阪大学大学院生命機能研究科・²自然科学研究機構生理学研究所・

³総合研究大学院大学生命科学研究科・⁴東京慈恵会医科大学)

Key words: Curvature Selectivity, Reverse Correlation

目的

大脳皮質の視覚経路、特に腹側経路は物体の認識に関わることが知られており、入力側から V1, V2, V4, IT と複数の領野を経て、それぞれ階層的に処理され、階層が進むにつれより複雑な情報をコードするようになる。たとえば高次視覚野にあたる IT と呼ばれる領野では、物の形に特異的に反応する神経細胞が存在し、入力側である目により近い領野では特定の傾き、太さをもつ線分によく反応することが知られている。一方で、途中段階である V2 や V4 の神経細胞は、刺激の含む曲率が重要な役割を担うということがわかってきた (Pasupathy & Connor, 1999, 2002)。

しかしながらより高次になるに従い、逆相関法などの初期視覚野で従来行われているような手法は通用しなくなってしまったため、IT 等の高次視覚野において形に対する選択的な反応特性が、低次領野からの情報をどのように用いているのか、どのようなメカニズムで実現されているのかについては、未だほとんどわかっていないというのが現状である。また、目的の特性にあわせた特定の視覚刺激のセットを用いて研究が行われてきたため、刺激が恣意的に選択されているという問題もあった。

本研究では、恣意的な視覚刺激のセットではなく、無相関なノイズ刺激から目的の特徴次元、特に曲率に関する特徴次元を抽出することにより、神経細胞の曲率応答特性を得られるような手法を開発し、中次視覚野の神経細胞における曲率選択性の解析方法として検討した。

方法

従来の逆相関法は、発火に相関のあった刺激を足し込むことで受容野の線形成分としての概形を得る手法である。今回開発した曲率領域逆相関法を含む変換領域逆相関法では、刺激を予め目的となる領域に変換し、発火と相関のある刺激について足し込むことで、その領域における反応特性を可視化するというものである。

曲率はそもそも隣り合う 2 点間での線の傾きの変化量として定義される。そこでフーリエ変換を介して、刺激内の 2 点間の局所的な方位成分を抽出し、これを組み合わせることによって曲率空間へ変換することに成功した。さらに、曲率空間に変換された刺激と、神経細胞の発火パターンとの相関から、神経細胞を発火させた刺激の平均 (Spike Triggered Average) を曲率空間でもとめることにより、神経細胞を発火させた曲線の特性を求めることができる。

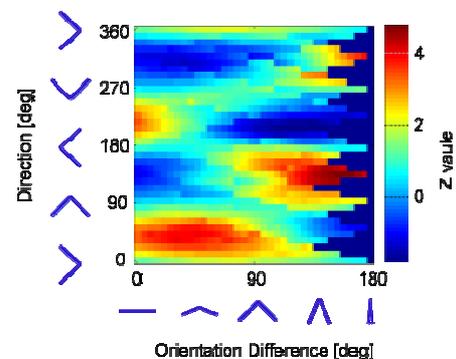
この手法の妥当性を検討するため、コンピュータによるシミュレーションを行った。また、ノイズ刺激提示下における、麻酔不動化したネコ 17, 18 野及びマカケザル V2 から、単一ニューロンの応答を細胞外記録し、従来の逆相関法、局所スペクトラム逆相関法 (Nishimoto et al. 2006)、曲率領域逆相関法を用いて解析した。

結果

初期視覚野の単純型及び複雑型細胞のモデルシミュレーション

では、曲率ゼロ、すなわち直線に対する応答特性が得られるという予測結果となった。また、V2 のニューロンを想定した位置によって方位選択性が異なる細胞のモデルによるシミュレーションでは、モデルから予測される通りの曲率応答特性が得られた。

細胞外電位記録による、実際のネコ 17, 18 野及びサル V2 ニューロンの応答での解析結果では、大半の細胞が曲率ゼロ、すなわち直線に対応する曲率に応答を示した。一方で、サル V2 における一部の細胞には、曲がった線に対応する曲率に応答を示すものが見られた。



V2 のニューロンによる曲率応答の例

考察

シミュレーション、細胞外電位記録共に、結果はこれまで報告されているような初期視覚野におけるニューロンの応答特性に矛盾しないものであり、変換領域逆相関法の信頼性を高めている。

また、今回の手法は視覚刺激に依存しないため、ひとたび視覚刺激と細胞応答のデータが得られれば、あまり実験系に左右されることなく解析が可能である。さらに、違った特徴に対する応答を新たに調べようとする際、新しく特徴にあわせて視覚刺激を作り実験をしなくとも、それまでに得られたデータについて新たに着目する特徴次元について解析を行うことが可能である。

今後は、実際に折れ線や曲線を刺激として用いた時の細胞の応答との比較も行い、高次領野における本手法の可能性についてより詳細に検討する必要があると考えている。

引用文献

- Pasupathy A, Connor CE (1999) Responses to contour features in macaque area V4. *J Neurophysiol* 82:2490-2502.
 Pasupathy A, Connor CE (2002) Population coding of shape in area V4. *Nat Neurosci* 5:1332-1338.
 Nishimoto S, Ishida T, Ohzawa I. (2006) Receptive field properties of neurons in the early visual cortex revealed by local spectral reverse correlation. *J Neurosci*. 26(12): 3269-80.

サル下側頭皮質電気刺激による色知覚のバイアス

○鯉田孝和^{1,2}・小松英彦^{1,2}(¹生理学研究所・²総合研究大学院大学)

Key words: color, monkey, microstimulation

目 的

サル下側頭皮質の前部 (TE 野) には色刺激に選択的な応答を示す神経細胞が多く見つかっており (Komatsu *et al.*, 1992)、それらは皮質上に固まって存在してパッチ構造を作り出している (in preparation)。TE 野に存在するパッチは視覚情報処理の流れにおいて最終段階にあると考えられ、色知覚と直接的な関係が予想される。近年われわれは、この領域の神経応答と色弁別行動を同時記録し、神経活動の揺らぎと判断の揺らぎに正の相関があることを確かめた (in revision)。本研究では、神経活動と色弁別行動との因果関係を示すために、微小電気刺激によって色弁別行動が影響されることを確かめる。その影響の傾向や、皮質上の分布についても検討する。

方 法

サルは 500ms 間呈示された色刺激に対して、色を判断する課題を行う。応答は左右方向のサッケードで行い、緑色なら右、黄色なら左と応答することで報酬を得る。呈示する色刺激は、わずかに色度が異なる 7 色の中からトライアルごとにランダムに選ばれる。この 7 色を 1 セットとして、黄～緑のセット、オレンジ～赤のセット、紫～青のセットの 3 種類がある。それぞれのセットで、色刺激と応答すべきサッケード方向は対応づけられている。

電気刺激はランダムに選ばれた半分のトライアルで与えられる。電気刺激は記録用電極 (FHC, 0.5~1.5M Ω) を通じて、Biphasic のパルス状の電流、振幅 20 μ A、200Hz 周期で、500ms 間、色刺激の呈示期間と同じ期間内に与えられた。

電気刺激および神経活動の記録は、TE 野の前中側頭溝近傍の約 1cm 平方の範囲にわたって行った。

結 果

電気刺激を行うことで、サルの色判断が明らかに影響を受けることが分かった。影響の大きさは刺激部位に応じて大きく異なり、大きな効果が生じる部位には、強い色選択応答を示す神経細胞が見つかることが多く、小さな効果が生じる部位では、見つかることは希であった。

サルの色判断は知覚確率曲線により定量的に表すことができる。知覚確率曲線とは順に並べた刺激の 7 色に対してそれぞれ、一方のサッケード応答の生じた割合をプロットしたものである。ロジスティック関数によりフィットすることで定量化でき、電気刺激によって生じた色判断の変化は、ロジスティック関数の水平移動の成分と傾き変化の成分として表すことができる。水平移動の成分は電気刺激によって生じる色のシグナルに対応すると考えられ、傾きの変化はノイズの量に対応すると考えられる。二つの成分の分布を調べたところ、水平移動の成分が一貫して生じるという興味深い結果が示された。移動の方向は、黄～緑のセットでは緑と判断される確率が上がる方向、オレンジ～赤のセットでは赤と判断される確率が上がる方向、紫～青のセットでは青と判断される確率が上がる方向であった。この一貫性は電気刺激が色のシグナルを生じていたことを示すが、同時に記録した神経活動の色選択応答とは単純に対応しなかった。

考 察

色選択性応答を示す領域を電気刺激することによって、色のシグナルが生じていることが示された。生じた色の方向は、緑・赤・青という色三角形の頂点側を向いており、電気刺激によって色が鮮やかに、あるいはより特徴が強調される方向に知覚されるという可能性が示唆される。これまで TE 野の色パッチには共通の色選択性を示すコラム構造は見つかっていない。これは MT での運動選択性とは対照的である。電気刺激によって生じるバイアスの方向が、同時記録された神経活動の色選択性では簡単に説明できないということからも、Newsome ら (Salzman *et al.*, 1990) が示した MT での電気刺激によって生じる知覚へのバイアスとは異なるメカニズムを考えるべきである。

また、今回の実験条件では、緑・赤・青の色方向はいずれも右側サッケード応答に対応するものであった。電気刺激は直接、右側サッケードに関係するという解釈はもっともらしくない。同様のバイアスが左右半球で生じており、大きな効果は特に右半球を電気刺激した場合に生じたからである。この傾向は、電気刺激によって生じた眼球運動コマンド、空間的注意、あるいは視覚閃光によって生じたという解釈では説明できない。

引用文献

Komatsu H, Ideura Y, Kaji S and Yamane S: Color selectivity of neurons in the inferotemporal cortex of the awake macaque monkey. *J. Neuroscience* 12: 408-424, 1992.

Salzman CD, Britten KH, Newsome WT: Cortical microstimulation influences perceptual judgements of motion direction. *Nature* 174-177, 1990.

視覚グルーピング課題時のサル頭頂葉ニューロン活動

○横井功¹・小松英彦^{1,2}

(¹自然科学研究機構生理学研究所感覚認知情報部門・²総合研究大学院大学)

Key words: visual grouping, attention, parietal cortex

目的

視覚グルーピングは視覚対象の検出に重要な働きをする。視覚グルーピングとは視野上の離散的な複数の要素をつなぎ合わせて一つのまとまった群として捕らえることである。離散的な要素は要素間の関係によってボトムアップ的につながり合わされるが、グルーピングには事前の知識や経験によるトップダウンのメカニズムも働くことも知られている。ヒトの脳損傷患者を用いた研究は頭頂葉がトップダウン的なグルーピングに関与していることを示唆している。しかしながら、トップダウン的なグルーピングがどのような神経メカニズムによって生じているのかはわかっていない。グルーピングを必要とするターゲット検出課題を設定し、サル頭頂葉の頭頂間溝皮質 (IPS) から単一細胞外記録を行った。

方法

視覚刺激は白または黒の 5 つの正方形ドット (1.2 x 1.2 deg) が十字に配置して構成される (Fig. 1)。同じコントラストのドットが水平または垂直に並んだパターンをターゲット刺激、それ以外のパターンをノンターゲット刺激とした。視覚刺激は 1 試行中に 3 回または 4 回連続的に呈示され、サルはターゲット刺激が呈示されたときにすばやくレバーを放すことで報酬を得る。ターゲット刺激には離散的なドットによって形成される方位とコントラストの特徴が含まれるが、このうち縦または横の方位に選択的な注意を向けさせて、IPS ニューロンへの注意の影響を調べた。

結果

2頭のニホンザルの IPS から 107 個の単一ニューロン活動を記録した。IPS ニューロンは視覚刺激の特徴に選択的な反応を示し、ターゲット刺激の方位の特徴についてコントラストよりも強い選択性を示した。方位選択性は注意を向けている方位とターゲット刺激の方位が一致するときに増強した。選択性強度の増強はターゲット刺激の検出時間の短縮と相関した。

考察

頭頂間溝皮質には、水平または垂直に並んだドットをグルーピングして選択的に表現するメカニズムが存在し、それらの活動によりターゲットが検出されることが示唆された。また、トップダウン制御により選択的に活動が増強または抑制されており、これらのニューロン活動により効率的にグルーピングしたターゲットの検出が行われているものと考えられる。

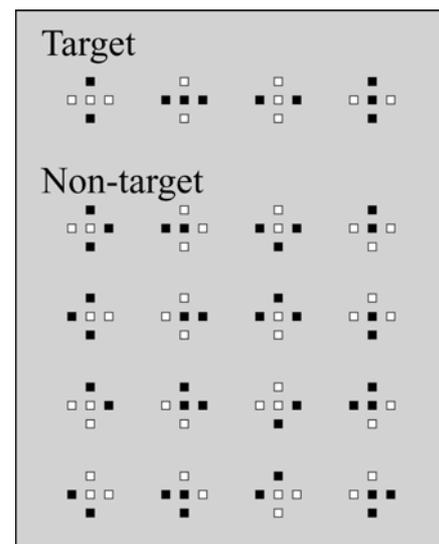


Fig. 1 ターゲット刺激とノンターゲット刺激

サル側頭葉皮質顔画像反応性細胞の空間周波数選択性: 画像基準 vs. 網膜基準

稲垣未来男¹・藤田一郎¹
 (¹大阪大学大学院生命機能研究科)

Key words: Face responsive neuron, Spatial frequency tuning, Temporal cortex

目的

空間周波数フィルタを適用した顔画像を視覚刺激に用いた研究から、側頭葉皮質の顔画像反応性細胞は空間周波数選択性を示すことが知られている (Rolls et al., 1985, 1987). 本研究は、この選択性が画像基準空間周波数 (画像の一辺の長さを基準とする空間周波数, cycles/image で定義される) に対するものなのか、それとも網膜基準空間周波数 (網膜上での視野角を基準とする空間周波数, cycles/degree で定義される) に対するものなのかを明らかにすることを目的とした。ある画像に含まれる画像基準空間周波数は画像の大きさに依存しない一方で、その画像の網膜投影像に含まれる網膜基準空間周波数は画像の大きさによって変化する。そこで、顔画像の大きさを変化させたときの同調曲線の変化を解析して、どちらの空間周波数に対する選択性なのかを調べた。

方法

注視課題遂行中のニホンザル (*Macaca fuscata*) の側頭葉皮質から、微小電極による細胞外電位計測法で単一神経細胞活動を記録した。記録部位は上側頭溝上下壁および下側頭回であった (A18 - A24)。

帯域通過フィルタの中心画像基準空間周波数を 7 段階 (2, 2.8, 4, 5.7, 8, 11.3, 16 cycles/image) 画像の大きさを 5 段階 (3.8, 5.4, 7.7, 11.0, 15.3 degrees) にそれぞれ変化させて、それらを組み合わせた 35 つの顔画像を視覚刺激セットとして用いた (図 1)。元画像には、記録中の細胞が強い反応を示した顔画像を使用した。

ガウス関数をフィットすることで、画像基準空間周波数に対する細胞の同調曲線を各大きさについて得た。本研究では大きさによる同調曲線の中心位置の変化に注目した。画像基準空間周波数に対する選択性を示す場合、中心位置は変化しないが、網膜基準空間周波数に対する選択性を示す場合、大きさと中心位置が対数軸上で比例するように中心位置は変化する。

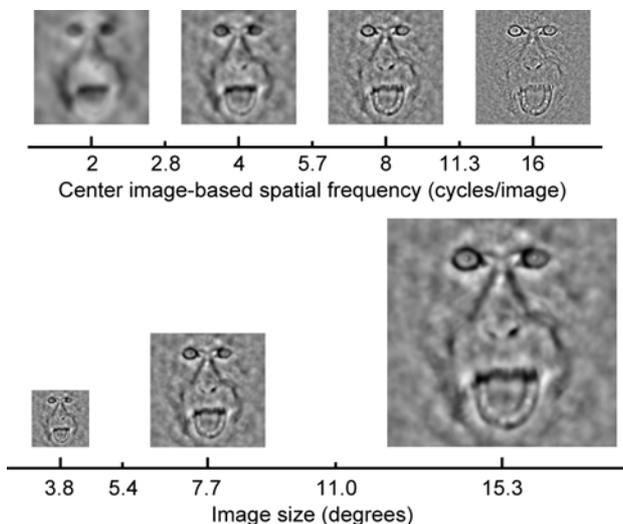


図 1 実験で用いた顔画像セットの例

結果

少なくとも 1 つの顔画像に対して視覚反応を示した 60 個の顔画像反応性細胞のうち、43 個が空間周波数選択性を示した。そのうち、精度よくガウス関数をフィットできた 37 個の細胞を解析対象とした。

個々の細胞では、大きさの変化にともなった中心位置の変化を示さなかった細胞もあれば、中心位置の変化を示した細胞もあった (図 2)。その変化の方向や程度は、細胞ごとにさまざまであった。

細胞集団全体における割合に注目すると、画像基準空間周波数に対する選択性を示す場合のように中心位置の変化を示さなかった細胞は 17 個 (46%)、網膜基準空間周波数に対する選択性を示す場合のような規則的な中心位置の変化を示した細胞は 11 個 (30%) であった。

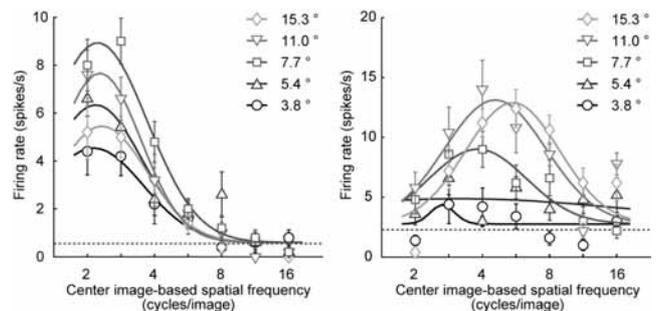


図 2 同調曲線の中心位置に変化が見られなかった細胞例 (左) と変化が見られた細胞例 (右)

考察

サル側頭葉皮質の顔画像反応性細胞が、画像基準空間周波数に対する選択性を示すのか、それとも網膜基準空間周波数に対する選択性を示すのかを調べた結果、どちらのタイプの細胞も存在することを確認した。それらの中でも、画像基準空間周波数に対する選択性を示す細胞の割合が高かった。これらの結果は、すべてではないが多くの顔画像反応性細胞が、狭い範囲の網膜基準空間周波数の情報だけにとづいて顔の脳内表現を形成しているわけではなく、比較的広い範囲の網膜基準空間周波数の情報を相互作用させることで、画像の大きさに依存しない画像基準の脳内表現を形成していることを示唆する。

引用文献

E. T. Rolls, G. C. Baylis, C. M. Leonard, Roles of low and high spatial frequencies in the face-selective responses of neurons in the cortex in the superior temporal sulcus in the monkey, *Vision Res* 25, 1021-1035, 1985

E. T. Rolls, G. C. Baylis, M. E. Hasselmo, The responses of neurons in the cortex in the superior temporal sulcus of the monkey to band-pass spatial frequency filtered faces, *Vision Res* 27, 311-326, 1987

参加者名簿 (敬称略)

青山 めぐみ	大阪大学大学院生命機能研究科
朝田 雄介	大阪大学大学院生命機能研究科
阿部 桂子	大阪大学大学院生命機能研究科
新井 稔也	大阪大学大学院生命機能研究科
池添 貢司	大阪大学大学院生命機能研究科
石井 昌明	兵庫医科大学大学院医学研究科
石川 理子	大阪大学大学院医学系研究科
伊藤 南	生理学研究所感覚認知情報部門
伊藤 保志	岐阜薬科大学薬効解析学研究室
稲垣 未来男	大阪大学大学院生命機能研究科
今井 啓雄	京都大学霊長類研究所
上田 有佳	東邦大学理学部情報科学科
上野 祐子	東邦大学理学部情報科学科
海野 修	東邦大学理学部
大澤 五住	大阪大学大学院生命機能研究科
小賀 智文	大阪大学基礎工学部
岡崎 祐香	大阪大学大学院工学研究科
岡本 正博	大阪大学大学院生命機能研究科
尾崎 弘展	大阪大学大学院医学系研究科
小山内 実	大阪大学大学院工学研究科
金子 章道	畿央大学健康科学部
金子 優子	埼玉医科大学医学部
金田 誠	慶應義塾大学医学部
神山 斉己	愛知県立大学情報科学部
河村 悟	大阪大学大学院生命機能研究科
木村 墨	大阪大学大学院生命機能研究科
國澤 啓佑	大阪大学生命機能研究科
鯉田 孝和	生理学研究所感覚認知情報部門
小松 英彦	生理学研究所感覚認知情報部門
近藤 峰生	名古屋大学大学院医学系研究科
阪口 豊	電気通信大学大学院情報システム学研究科
桜木 雄一郎	愛知県立大学大学院情報科学研究科
佐々木 耕太	大阪大学大学院生命機能研究科
佐藤 宏道	大阪大学大学院医学系研究科
塩崎 博史	大阪大学生命機能研究科
七五三木 聡	大阪大学大学院医学系研究科
下ノ村 和弘	大阪大学大学院工学研究科
城宝 浩	アステラス製薬安全性研究所
城間 晋作	大阪大学大学院工学研究科
橘木 修志	大阪大学大学院生命機能研究科
田中 宏喜	大阪大学大学院生命機能研究科
田中 慎吾	大阪大学大学院生命機能研究科
田丸 文信	埼玉医科大学医学部
田村 弘	大阪大学大学院生命機能研究科
塚本 吉彦	兵庫医科大学医学部
土井 隆弘	大阪大学大学院生命機能研究科
内藤 智之	大阪大学大学院医学系研究科
中谷 敬	筑波大学大学院生命環境科学研究科
長谷川 潤	大阪大学大学院工学研究科
長谷川 浩二	大阪大学大学院理学研究科
畠 義郎	鳥取大学大学院医学系研究科
林田 祐樹	熊本大学大学院自然科学研究科

原久 富高 日深 古星 松元 丸山 宮本 森島 山下 横井 吉村 渡部
英修 聰孝 吉貴 秀夫 崇由 敦栄 侑珠 克佑 勝雅 功三 穂美 一三
彰久 子一 典美 子 眞

岐阜薬科大学薬効解析学研究室
大阪大学大学院理学研究科
藤田保健衛生大学医学部
東京大学大学院理学系研究科
(財)大阪バイオサイエンス研究所
University of Texas Medical School
大阪大学大学院生命機能研究科
京都産業大学大学院工学研究科
JST/CREST
藤田保健衛生大学医学部生理学講座()
愛知県立大学大学院情報科学研究科
熊本大学大学院自然科学研究科
EW89 シンクウロニシテイ研究所
鳥取大学大学院医学系研究科
奈良医大第一生理
理研・脳科学総合研究センター
生理学研究所感覚認知情報部門
鳥取大学大学院医学系研究科
名古屋大学環境医学研究所
埼玉医科大学医学部
発達障害研究所周生期学部

協賛



株式会社ニコンインステック

東京営業所：〒140-8601 東京都品川区西大井 1 - 6 - 3 (株式会社ニコン大井製作所内)

TEL: 03-3773-1170

関西支店：〒532-0003 大阪府大阪市淀川区宮原 3-3-31 (上村ニッセイビル 16F)

TEL: 06-6394-8805

京都営業所：〒606-8221 京都府京都市左京区田中西樋ノ口町 80

TEL: 075-781-1170

e-mail: Nit.Adm@nikonoa.net

ホームページ: <http://www.nikon-instruments.jp/instech/index.htm>



株式会社アズバイオ

株式会社アズバイオ

大阪所在地：〒530-0043 大阪市北区天満 3-5-8

TEL: 06-6351-5351 FAX: 06-6351-5352

京阪奈営業所：〒619-0246 京都府相楽郡精華町大字菱田小字アツイ 1-2

TEL: 0774-93-2581 FAX: 0774-93-2641

東京営業所：〒113-0031 東京都文京区根津 1 丁目 1-19 根津宮本ビル 5F

TEL: 03-5685-4500 FAX: 03-5685-4501

ホームページ: <http://www.azbio.co.jp/index.html>