HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	中枢神経系における軸索の興奮性制御機構に関する研究
Author(s)	大浦, 峻介
Description	配架番号：2442
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13428号
Issue Date	2019-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13428
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74236
Type	doctoral thesis
File Information	Shunsuke_Oura.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

中枢神経系における軸索の興奮性制御機構に関する研究

（Studies on regulatory mechanisms of axonal excitability in central nervous system）

2019 年 3 月

北海道大学

大浦　峻介

Shunsuke Ohura

学位論文

中枢神経系における軸索の興奮性制御機構に関する研究

（Studies on regulatory mechanisms of axonal excitability in central nervous system）

2019 年 3 月

北海道大学

大浦　峻介

Shunsuke Ohura

目　次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1 頁
要旨・・ 3 頁
略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6 頁
序章・・ 7 頁

第一章　海馬苔状線維終末における後脱分極の発生機構
緒言・・ 9 頁
材料と方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 10 頁
結果・・ 13 頁
考察・・ 27 頁
結論・・ 30 頁

第二章　軸索活動電位の活動依存的な制御における後脱分極の役割
緒言・・ 31 頁
材料と方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 32 頁
結果・・ 32 頁
考察・・ 49 頁
結論・・ 50 頁

第三章　海馬苔状線維終末への Ca^{2+}流入に対する後脱分極の役割
緒言・・ 51 頁
材料と方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 51 頁
結果・・ 52 頁
考察・・ 55 頁
結論・・ 56 頁

総括および結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 57 頁
謝辞・・ 59 頁
利益相反・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 59 頁
引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 60 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Shunsuke Ohura, Haruyuki Kamiya.
   Short-term depression of axonal spikes at the mouse hippocampal mossy fibers and sodium channel-dependent modulation.
   eNeuro, 5(1): ENEURO.0415-17, (2018).

2. Shunsuke Ohura, Haruyuki Kamiya.
   Sodium channel-dependent and -independent mechanisms underlying axonal afterdepolarization at mouse hippocampal mossy fibers.
   eNeuro, 5(4): ENEURO.0254-18, (2018).

関連する研究領域に関して以下の総説論文を発表した。

3. Shunsuke Ohura, Haruyuki Kamiya.
   Excitability tuning of axons in the central nervous system.
   J. Physiol. Sci., 66(3): 189-196, (2016).

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Shunsuke Ohura, Haruyuki Kamiya.
   High fidelity spike propagation along single axon of hippocampal mossy fiber.
   第 93 回日本生理学会大会、2016 年 3 月 22 日、札幌（ポスター）

2. Shunsuke Ohura, Haruyuki Kamiya.
   Analog modulation of axonal spikes in the hippocampus.
   第 94 回日本生理学会大会、2017 年 3 月 29 日、浜松
   （シンポジウム口演、招待講演）

3. Shunsuke Ohura, Haruyuki Kamiya.
   Peak reduction of axonal spikes in the hippocampal mossy fibers during the high frequency stimulation.
   第 47 回北米神経科学大会、2017 年 11 月 13 日、ワシントン DC（ポスター）

4. Shunsuke Ohura, Haruyuki Kamiya.
   Sodium channel-dependent short-term depression of axonal spikes at the hippocampal mossy fibers.
   第 41 回日本神経科学大会、2018 年 7 月 27 日、神戸（口演）

要旨

【背景と目的】

軸索は、神経細胞の出力として重要な役割を担っている。これまで、軸索は軸索起始部で発生した活動電位を減衰させることなく終末部まで伝播させる構造と考えられてきた。一方で、特に中枢神経系の軸索では、活動電位を伝播させる過程でその振幅や持続時間に変調が起こると報告されている。この軸索活動電位の変調は、シナプス強度に影響を与えると考えられる。軸索の機能解析には電気生理学的計測が有効な手法の１つである。しかし、中枢軸索の径はきわめて細く、活動電位の直接記録は困難とされてきた。本研究では、例外的に大型の軸索終末を有する海馬苔状線維終末から軸索活動電位の直接記録を試みることによって、軸索における興奮性の制御機構の解明を目指した。海馬苔状線維は形態的ならびに機能的特性に関する知見が蓄積し、中枢神経系の軸索研究のモデル系の一つと考えられている。第一章では、軸索の活動電位に特徴的な後脱分極の発生機構の検討を行った。第二章では、新たに見出した活動依存的な軸索活動電位の抑圧現象における後脱分極の役割について検討した。第三章では、後脱分極が軸索終末への Ca^{2+}流入に与える影響について検討した。

第一章　海馬苔状線維終末における後脱分極の発生機構

【材料と方法】

C57BL/6J マウスの海馬から急性スライス標本を作製した。微分干渉顕微鏡下にて直径 3～5 μm の苔状線維終末を同定した。苔状線維の起始細胞である顆粒細胞への電気刺激、もしくは苔状線維終末への電流注入によって活動電位を誘発し、ホールセル電流固定法にて苔状線維終末から軸索活動電位を記録した。また、記録部位周辺に局所的な薬液投与を行うことで、軸索での薬物作用を評価した。これに加え、シミュレーションにより後脱分極の発生機構について解析を行った。

【結果】

顆粒細胞層を電気刺激すると、軸索活動電位とそれに引き続く後脱分極が誘発された。また、苔状線維終末への電流注入によっても同様の波形が記録された。膜電位を -80 mV から軽度脱分極させると、後脱分極の振幅が減少した。この結果は、電位依存性チャネルの活性化が後脱分極に関与することを示唆する。電位依存性チャネルの候補として、先行研究にて後脱分極発生に関与しているとされた電位依存性 Na^{+}チャネルの関与を検討した。電位依存性 Na^{+}チャネルの活性化薬として働くベラトリジンを投与すると後脱分極の振幅は増加し、Na^{+}チャネルの阻害薬であるテトロドトキシン（TTX）を投与すると減弱した。これらの結果から、ある種の Na^{+}チャネルが後脱分極に寄与すると考えられた。一方で、TTX によって電位依存性 Na^{+}チャネルを阻害

した条件において後脱分極の残存を認めたことから、Na^+チャネル以外の機構によっても後脱分極が制御されていると考えられた。TTX に加え、電位依存性 K^+チャネルの阻害薬である 4-aminopyridine（4-AP）を投与したところ、脱分極の振幅と持続時間の増加が認められ、電位依存性 K^+チャネルが後脱分極を制御している可能性が示された。これに加え、シミュレーションを用いた解析から、後脱分極は近位軸索の活動電位が受動的に伝播した容量性成分を反映すると推定された。

【考察】

本研究ではこれまで詳細に検討されていなかった後脱分極の発生機構の解明を目指した。Na^+チャネルは機能的に、不活性化が速い transient 型と、活性化状態が持続する persistent 型、膜電位の再分極に応じて再び活性化する resurgent 型に分類される。近年、persistent 型、resurgent 型の Na^+チャネルが後脱分極発生に関与する可能性が報告されている。今後は苔状線維終末からの Na^+電流を記録し、後脱分極に関与する電位依存性 Na^+チャネルを検索することが必要である。

【結論】

後脱分極の発生機構には軸索細胞膜の容量性成分に加え、電位依存性 Na^+チャネルと K^+チャネルが関与していることが示された。

第二章　軸索活動電位の活動依存的な制御における後脱分極の役割

【材料と方法】

ルースパッチクランプ法を用いて、単一の苔状線維終末から活動電位を記録した。

【結果】

苔状線維終末からルースパッチクランプ法により記録した活動電位は短い間隔で二回刺激を加えると二発目の軸索スパイクの振幅が軽度減弱する二発刺激抑圧（paired-pulse depression: PPD）を示し、この現象は 200 ミリ秒ほど持続した。活動電位による電位依存性 Na^+チャネルの不活性化は、膜電位の再分極に応じて十ミリ秒程度で解除されることから、PPD には Na^+チャネルの不活性化の蓄積以外のメカニズムが関与すると推定した。PPD の持続時間は、第一章で示した後脱分極の時間経過に相当することから、緩徐な脱分極に従い電位依存性 Na^+チャネルの定常的な不活性化が生じ、二発目の活動電位が減弱するという可能性が想定された。後脱分極の振幅を増加させるベラトリジンを投与したところ、PPD が亢進した。また、後脱分極の振幅を低下させる低濃度の TTX は PPD を軽度に減弱させた。これらの所見から、後脱分極が PPD のメカニズムに関与していると考えられた。

【考察】

苔状線維軸索における活動電位の PPD は、後脱分極の緩徐な脱分極による電位依存性 Na^+チャネルの定常的な不活性化によって生じると推定された。これに加え、後

脱分極は電位依存性 Na^+チャネルを制御することで活動電位発生までの潜時を調整すると考えられた。

【結論】

二発刺激によって軸索での活動電位が減少する二発刺激抑圧（PPD）を発見し、後脱分極による電位依存性 Na^+チャネルの定常的な不活性化が関わると推定した。

第三章　海馬苔状線維終末への Ca^{2+}流入に対する後脱分極の役割

【材料と方法】

ホールセルパッチクランプ法を用いて、苔状線維終末から Ca^{2+}電流の測定を行った。

【結果】

後脱分極が神経伝達物質放出の調節に関与する可能性を検討するため、軸索終末部への Ca^{2+}の流入量に与える後脱分極の影響について検討を行った。二発刺激により Ca^{2+}の流入量は軽度に増加することが示された。一方で、後脱分極を抑止すると Ca^{2+}の流入量に増加を認めなかった。この結果から、後脱分極は Ca^{2+}の流入量を活動依存的に増加させると考えられた。

【考察】

後脱分極は引き続く活動電位に伴う Ca^{2+}の流入量を増大させることが示された。軸索終末への Ca^{2+}流入量の増加は神経伝達物質の放出量を増加させるため、後脱分極は短期シナプス可塑性の一因を担う可能性が想定された。

【結論】

後脱分極は活動依存的に Ca^{2+}の流入量を増加させると考えられた。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

4-AP	4-aminopyridine
aCSF	artificial cerebrospinal fluid
ADP	afterdepolarization
NMDG	N-methyl-D-glucamine
PPD	paired-pulse depression
QX-314	lidocaine N-ethyl bromide quaternary salt
TEA	tetraethylammonium chloride
TTX	tetrodotoxin

序章

脳では多数の神経細胞が複雑なネットワークを形成し、膨大な量の情報処理を行う。脳の基本的な動作原理の解明には、細胞レベルでの信号処理機構の理解が必要である。神経細胞は、樹状突起、細胞体、軸索、軸索終末部によって構成されている。樹状突起から受け取った神経情報は、軸索を経由して軸索終末部から下流の細胞に伝えられる。軸索終末部と樹状突起で構成されるシナプスは、神経細胞間の情報伝達を行う構造である。このシナプスでは、情報伝達の効率が活動依存的に変化するシナプス可塑性と呼ばれる現象が生じ、学習や記憶の細胞レベルのメカニズムとして研究が進められている。

一方で、神経軸索は信号情報である活動電位を不減衰性に伝播させる。神経軸索における活動電位発生の様式は、Hodgkin と Huxley によるイカの巨大軸索を用いた研究によって解明された（Hodgkin and Huxley, 1952）。

中枢神経系の軸索は、分岐や通過型軸索などの特徴的な構造をもつ。また、活動電位発生に関与する電位依存性ナトリウムイオン（以下 Na^+と記す）チャネルやカリウムイオン（以下 K^+と記す）チャネルの分布や密度が軸索の領域ごとに異なることが報告されている（Debanne et al., 2011）。

これに加え、軸索を伝播する過程で活動電位が微調整される例が報告されている。その一例として、活動依存的な活動電位幅の増加（Geiger and Jonas, 2000）、活動電位振幅の変調（Alle and Geiger, 2006; Rama et al., 2015）、神経細胞の周辺に存在する介在神経やグリア細胞から放出される伝達物質による軸索の興奮性制御（Alle and Geiger, 2007; Sasaki et al., 2011; Uchida et al., 2012）が挙げられる。このような軸索の興奮性の変化は、シナプス前終末から放出される神経伝達物質の量を調整し、シナプス伝達の効率に変化をきたすと考えられる（Debanne et al., 2011）。

神経機能の *in vitro* での解析には、脳スライス標本を使用した電気生理学的記録が一般的に用いられている。電気的な記録は時間分解能が高いため、高速な神経応答を精度よく記録すること可能である。しかし、中枢神経系軸索の径は極めて細いため、活動電位の直接記録は困難だとされてきた。近年、中枢軸索において例外的に大型の軸索終末構造から、活動電位の直接記録が試みられている。先駆的な研究として、哺乳類脳幹の聴覚中継核に存在するヘルド萼状シナプスの軸索終末からの活動電位記録が行われた（Forsythe, 1994）。また、海馬苔状線維における軸索終末からの活動電位記録が行われた（Geiger and Jonas, 2000; Bischofberger et al., 2006）。これらの軸索終末からの記録法に加え、脳スライスを作成する過程で軸索

切断端からの活動電位の記録法や（Shu et al., 2006）、軸索本幹からの直接記録法も開発されている（Sasaki et al., 2011; Zorrilla de San Martin et al., 2017）。

本研究では、海馬苔状線維終末から軸索活動電位の直接記録を行い、興奮性の制御機構について検討した。海馬苔状線維は、これまでに形態的および電気生理学的な知見が蓄積し（Acsády et al., 1998; Engel and Jonas, 2005; Schmidt-Hieber et al., 2008）、中枢神経系の軸索研究に最適な実験系の一つと考えられる。第一章では、軸索活動電位に引き続く後脱分極の発生機構を検討した。第二章では、これまで全か無かの法則に従い振幅が不変と考えられてきた軸索活動電位の活動依存的な抑圧現象を発見し、その特性を調べた。さらに、後脱分極が活動電位を制御する可能性について検討した。第三章では、後脱分極が軸索終末へのカルシウムイオン（以下 Ca^{2+} と記す）の流入に与える影響について検討した。

第一章　海馬苔状線維終末における後脱分極の発生機構

緒言

神経軸索の活動電位に引き続いて、数十から数百ミリ秒にわたり持続する緩徐な脱分極応答がみられることが多い。この応答は、後脱分極（afterdepolarization）と呼ばれ、聴覚系の大型シナプスであるヘルド萼状シナプスの軸索終末、海馬苔状線維終末や小脳のバスケット細胞の軸索終末などいくつかの軸索終末の活動電位において報告されている（Borst et al., 1995; Geiger and Jonas, 2000; Begum et al., 2016）。

これまで後脱分極の発生機構については、ヘルド萼状シナプスの軸索終末を中心に研究が進められてきた。先行研究にて、軸索細胞膜の容量性放電が後脱分極の遅い脱分極の形成に関与すると報告されている（Borst et al., 1995）。脂質二重層からなる細胞膜は絶縁体であり、電気的に容量成分としてふるまう（Cole, 1968）。Borst らは、電位依存性 Na^+チャネルの阻害薬であるテトロドトキシン（以下 TTX と記す）の投与によりヘルド萼状シナプスの軸索終末で記録した後脱分極の振幅が変化しないことから、軸索細胞膜の容量性放電が後脱分極を形成していると報告した（Borst et al., 1995）。この後脱分極の容量性成分は細胞膜の受動的な性質により規定されるため、膜電位を変化させても後脱分極の振幅は一定と想定される。これに対し、同じヘルド萼状シナプスの軸索終末において、低濃度の TTX の投与により後脱分極が完全に消失することから、電位依存性 Na^+チャネルによって後脱分極が制御されているという相反する可能性が提唱されている（Kim et al., 2010）。これらの相反する先行研究の結果から、後脱分極の発生機構について統一的に理解するためには更なる検討が必要と考えられる。

本研究では、顕著な後脱分極が生じる海馬苔状線維終末において（Geiger and Jonas, 2000）、ホールセル電流固定法を用いた活動電位の記録を行った。後脱分極の発生機構は、軸索細胞膜の容量性放電に伴う成分に加え、電位依存性 Na^+チャネルおよび電位依存性 K^+チャネルによる成分が関与していることが示された。

実験方法

1. 海馬スライス標本

実験は、14～29 日齢の C57BL/6J マウスを用いて行った。全ての実験は、「北海道大学動物実験に関する規程」に従い、北海道大学動物実験委員会によって承認された動物実験計画に基づいて実施した（承認番号 13-0060）。マウスに約 0.2 ml のジエチルエーテルを与えて麻酔を施し、全脳を取り出した後、左右の海馬を摘出し、マイクロスライサー（VT1200S, Leica Biosystems, Nussloch, Germany）により厚さ 300 μm の急性海馬スライスを作成した。このとき、興奮性細胞障害を最小にするため、氷冷した高濃度スクロース溶液を用いた（Geiger et al., 2002）。高濃度スクロース溶液の組成を以下に示す。NaCl 40, $NaHCO_3$ 25, Glucose 10, Sucrose 150, KCl 4, NaH_2PO_4 1.25, $CaCl_2$ 0.5, $MgSO_4$ 7（単位は mM）。スライス作成直後の細胞障害を最小にするために、作成したスライスを含む溶液を NMDG 溶液に置換し、30℃にて 15 分間加温した（Ting et al., 2014）。NMDG 溶液の組成を以下に示す。NMDG 93, $NaHCO_3$ 30, Glucose 25, HEPES 20, KCl 2.5, NaH_2PO_4 1.2, Na-ascorbate 5, thiourea 2, Na-pyruvate 3, $CaCl_2$ 0.5, $MgSO_4$ 10 (mM)。その後 95% O_2 と 5% CO_2 の混合ガスで飽和した人工脳脊髄液（artificial cerebrospinal fluid, 以下 aCSF と記す）を満たしたインターフェース型保存箱内で室温にて 45 分間以上静置して活性を回復させた後、測定に用いた。aCSF の組成を以下に示す。NaCl 127, KCl 1.5, KH_2PO_4 1.2, $NaHCO_3$ 26, Glucose 10, $CaCl_2$ 2.4, $MgSO_4$ 1.3 (mM)（Kamiya, 2012）。

2. 電気生理学的記録

海馬スライスを鏡筒上下式正立型近赤外線微分干渉顕微鏡（BX51WI, オリンパス, 東京, 日本）下に置いた灌流槽に固定した。本実験では、周辺の細胞からのシナプス入力を抑制し、神経細胞の内在的な膜電位応答の検出を行うため、スライスは特に記載がない場合、95 % O_2 と 5 % CO_2 で飽和した Ca^{2+}濃度が 0 mM の細胞外液（$CaCl_2$ 0 mM, $MgSO_4$ 3.7 mM に調整した）を流速およそ 2 ml/分にて灌流した。加えて、口径 250 μm のチューブにマイクロ灌流システム（Valve Bank, Automate Scientific, Berkeley, California, USA）を接続し、流速およそ 0.2 ml/分にて細胞外液および薬液を記録部位に灌流することで、記録部位周辺での迅速で局所的な薬液投与を行った。測定中、灌流液の温度は恒温装置（TC-324B, Warner Instruments, Hamden, Connecticut, USA）により 25 ± 1 ℃に維持した。同心円形双極金属電極を顆粒細胞層に刺入し、定電流/定電位アイソレーター（ISO-Flex, AMPI, Jerusalem, Israel）を用いて 0.2 ms の矩形波を 10 秒ごと、もしくは 30 秒ごとに与

えて苔状線維を電気刺激した。記録電極は、電極作成装置（P-97, Sutter Instrument, Novato, California, USA）を用いてガラス管（GC150F-7.5, Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA）から作成した。電極内液を充填して電極ホルダーにセットした。顕微鏡下で直径 3-5 μm の苔状線維終末を同定し（Geiger and Jonas, 2000）、電動マニピュレーター（MPC-200, Sutter Instrument, Novato, California, USA）を用いて電極先端を細胞膜表面に密着させた。

3. 苔状線維終末からの活動電位記録

記録電極は、電極内液を充填した状態で 8-14 メガオーム（以下 MΩ と記す）になるように電極作成装置で作成した。記録電極は、K-gluconate 140, KCl 10, EGTA 0.2, MgATP 2, HEPES 10（KOH で pH を 7.2 に調整した。単位は mM）からなる細胞内液で満たした。液間電位差は pCLAMP10 ソフトウェア（Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA）を使用して算出した-15 mV として電極電位を補正した。直径 3-5 μm 程の構造を視覚的に同定し、電極ホルダーにつなげた注射筒を介して電極先端に陽圧をかけながらアプローチした。陽圧を解除して、電極と細胞間でギガオームシール状態を形成した。その後、陰圧をかけることで細胞膜を破り、ホールセル記録を行った。ホールセル記録の開始直後の静止膜電位が-60 から-85 mV である例でのみで記録を行い、電流を注入して保持電位を-80 mV に設定した。入力抵抗は-10 pA、300 ミリ秒（以下 ms と記す）の矩形波電流を実験プロトコールの 1000 ms 前に注入し膜電位応答をモニターすることで、継続的に計測した。入力抵抗が 800 MΩ 以上かつアクセス抵抗が 70 MΩ 以下の記録のみを実験に使用した。アクセス抵抗が初期値から 20 %以上変動した場合は、解析から除外した。軸索活動電位は特に記載がない場合 10 秒ごとに誘発し、電位測定にはパッチクランプ増幅器（Multiclamp 700B, Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA）を用いて記録した。膜電位応答は 20 kHz でサンプリングし、内蔵されている低域通過フィルター（4 極ベッセルフィルター）により遮断周波数 10 kHz で濾波し、アナログ/デジタル変換装置（Digidata 1322A, Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA）を介してコンピューターに記録した。コマンド波形の作成と制御には pCLAMP10 ソフトウェア（Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA）を用いた。

4. 歯状回顆粒細胞からの活動電位記録

記録電極は、電極内液を充填した状態で 4-8 MΩ になるように電極作成装置で作成した。ホールセル記録の開始直後の静止膜電位が-60 から-85 mV である例のみで実験を行い、電流を注入して保持電位を-80mV に設定した。アクセス抵抗が 15-30

MΩ であるものを実験に使用し、初期値から 20 %以上変動した場合は解析から除外した。

5. シミュレーション

シミュレーションは汎用シミュレーションプラットフォームである NEURON（ver.7.5）を用いて行った（Hines and Carnevale, 1997）。苔状線維の形態や膜特性などのパラメーターは先行研究で報告されているモデルの値を使用した（Engel and Jonas, 2005）。苔状線維は細胞体（直径 10 μm）に軸索本幹（直径 0.2 μm、長さ 100 μm）と苔状線維終末（直径 4 μm）の円筒状コンパートメントを 10 個ずつ直列に接続したものを作成した。受動的な細胞膜の特性は全領域で、膜容量を 1 μF/cm^2、膜の比抵抗を 10000 Ω・cm^2、細胞内の比抵抗を 110 Ω・cm に設定した。電位依存性 Na^+チャネル、K^+チャネル、リークチャネルは細胞体、軸索本幹、軸索終末にそれぞれ導入した。Na^+チャネルのコンダクタンスは軸索本幹と苔状線維終末において 50 mS/cm^2、細胞体において 10 mS/cm^2 に設定し、K^+チャネルのコンダクタンスは全領域 36 mS/cm^2 に設定した。Na^+、K^+の平衡電位はそれぞれ+50 mV、-85 mV に設定した。リークチャネルの平衡電位は-81 mV に設定した。

6. 薬物

ベラトリジン、QX-314、sodium ascorbate、sodium pyruvate、thiourea は Sigma-Aldrich（St. Louis, Missouri, USA）から購入した。テトロドトキシン（TTX）はフナコシ（東京, 日本）から購入した。Tetraethylammonium chloride (TEA)、4-aminopyridine (4-AP)、は和光純薬（東京, 日本）から購入した。

7. 統計解析

すべてのデータは平均値 ± 標準誤差でデータ数（n）と共に記載した。二群間の平均値の差の検定には、Wilcoxon signed-rank test 並びに、Mann-Whitney U test を使用し、有意水準を 5 %とした。統計解析には汎用ソフトウェアである R version3.4.1（R Core Team, 2015）を使用した。グラフ作成及び解析は、Origin8J、Origin2015（OriginLab, Northampton, Massachusetts, USA）を用いて行った。図において提示している代表波形は、特に記載がない場合 10 回分の波形を加算平均したものである。

実験結果

1. 海馬苔状線維終末からの活動電位と後脱分極の直接記録

マウス海馬スライス標本を使用し、苔状線維終末から軸索活動電位の直接記録を行った。顆粒細胞層に刺激電極を配置し、苔状線維の走行する CA3 野透明層の記録部位周辺に口径 250 μm の局所灌流用チューブを設置した（図 1A）。近赤外線微分干渉顕微鏡で観察し、直径 3-5 μm の苔状線維終末を形態的な特徴から同定した（図 1B）。スライス最表層は切断によるダメージがある可能性があり、生理的な条件で測定を行うために、スライス表面から 50 μm ほど深層の苔状線維終末から記録を行った。電流固定法を用いて 20 pA 刻みで-20 pA から 120 pA までの矩形波電流を与え、膜電位応答を記録した。先行研究と同様に、500 ms の持続的通電に対して単発の活動電位を発生させる発火特性が確認された（図 2A）（Geiger and Jonas, 2000; Bischofberger et al., 2006）。次に、-10 pA、300 ms の矩形波電流を注入した際の膜電位応答から入力抵抗並びに、細胞膜の時定数を算出した。その結果、入力抵抗は 1.06 ± 0.06 GΩ、時定数は 36.4 ± 3.3 ms と算出され、この点でも先行研究で報告されていた苔状線維終末における膜特性と相同であることが示された（Bischofberger et al., 2006; Szabadics and Soltesz, 2009）。

次に、歯状回顆粒細胞層を電気刺激することで（以下、入力刺激と記す）、軸索活動電位を誘発したころ、振幅 114.5 ± 2.4 mV、半値幅 863 ± 34 μs の活動電位波形が記録された（図 2B 左, n = 20）。一方で、記録部位に 500-800 pA の矩形波電流を 1 ms 加えたところ（以下、電流注入と記す）、振幅が 113.8 ± 2.6 mV、半値幅が 918 ± 26 μs の活動電位が記録された（図 2B 右, n = 6）。入力刺激、電流注入の二群間で振幅及び減衰の時定数に統計的な差は認めなかった（振幅：P = 0.700, 半値幅：P = 0.422）。入力刺激、電流注入で誘発した活動電位のいずれにおいても、数十ミリ秒持続する軽度な脱分極応答が確認された（図 2B 矢頭）。入力刺激による後脱分極の振幅は 15.3 ± 1.3 mV、減衰の時定数は 41.6 ± 3.8 ms であった（n = 20）。一方で、電流注入によって誘発された後脱分極の振幅は 13.0 ± 1.3 mV、減衰の時定数は 43.6 ± 5.5 ms であった（n = 6）。入力刺激、電流注入群の間で振幅および減衰の時定数の間に統計的な差は認めなかった（振幅：P = 0.494, 図 2C, 減衰の時定数：P = 0.700, 図 2D）。これらの結果から、入力刺激、電流注入で同等の軸索活動電位および後脱分極が誘発されることが確認された。

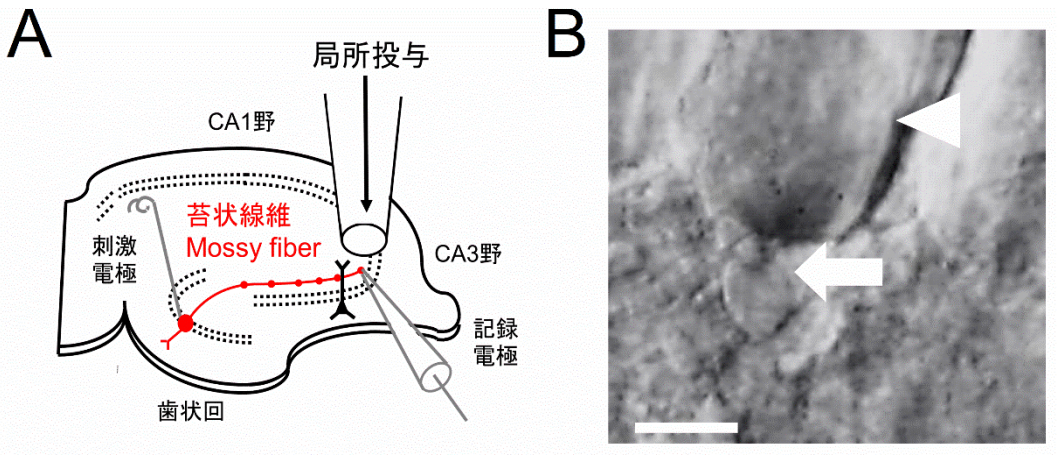


図 1. 苔状線維終末からの直接記録

A. 実験の模式図。苔状線維終末からホールセル記録を行った。記録部位周辺に薬物を局所的に投与した。

B. 近赤外線微分干渉法で観察した苔状線維終末（矢印）と CA3 野の錐体細胞（矢頭）。スケールバーは 5 μm を示す。

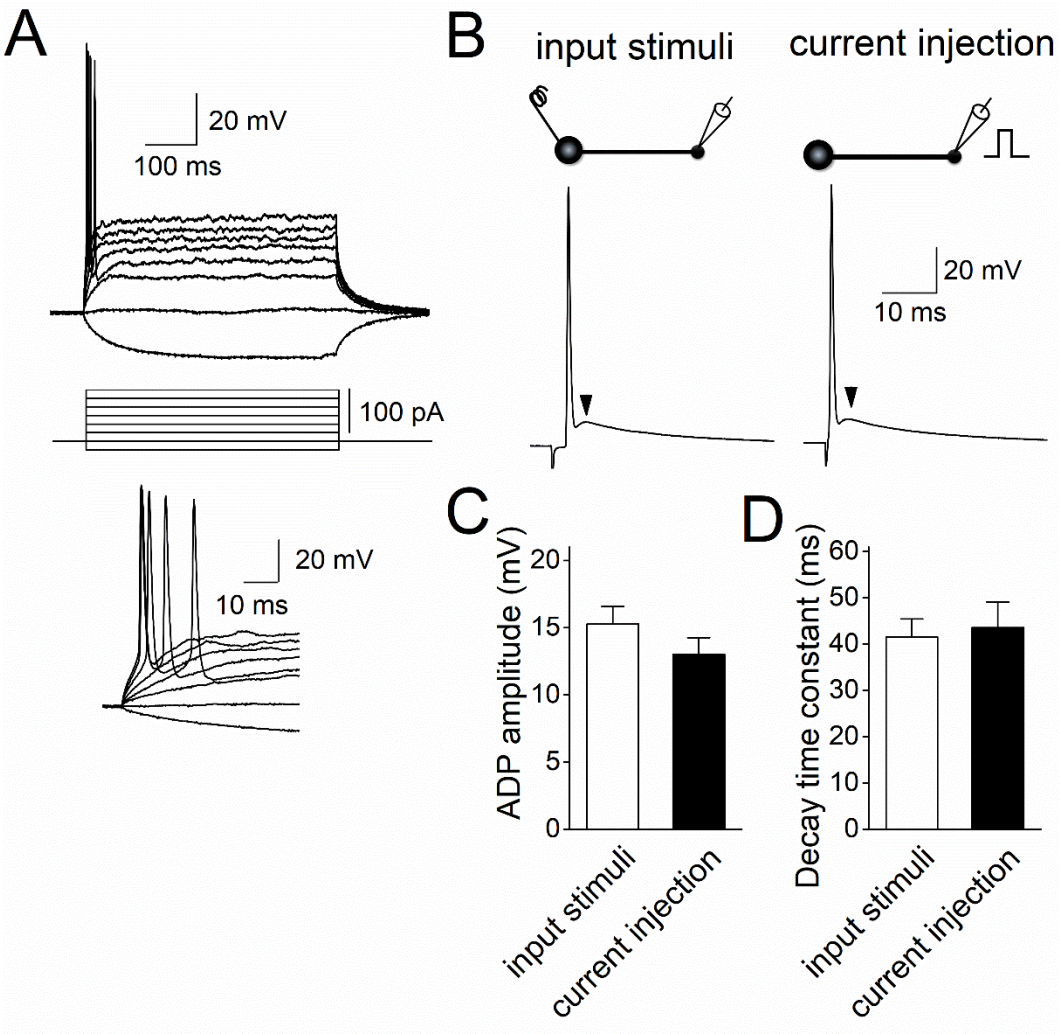


図 2. 苔状線維終末の活動電位と後脱分極

A. ホールセル電流固定法で矩形波電流を苔状線維終末に注入した際の膜電位応答（上段、加算平均していない 1 試行ごとの波形）。20 pA 刻みで-20 pA から 120 pA までの矩形波電流を 500 ms 間加えた（中段）。下段は電流注入開始後 60 ms の拡大図。

B. 顆粒細胞層を細胞外刺激する（入力刺激、input stimuli）ことで誘発された軸索活動電位（左）と 500-800 pA、1 ms の矩形波電流を苔状線維終末に与えて（電流注入、current injection）誘発された軸索活動電位（右）。上図は実験の概要図。いずれの刺激法においても、後脱分極（矢頭）が検出された。

C, D. 後脱分極の振幅（C）と減衰の時定数（D）。n = 20（入力刺激）、n = 6（電流注入）。

2.　Ca^{2+}の後脱分極への影響

本実験では、周辺の細胞からのシナプス入力を抑制し、神経細胞の内在的な膜電位応答の検出を行うために、Ca^{2+}を除いた細胞外液（$CaCl_2$ 0 mM, $MgSO_4$ 3.7

mM）を用いた。近年、電位依存性 Ca^{2+}チャネルが後脱分極発生に寄与することが示されている。電位依存性 Ca^{2+}チャネルは薬理学的特性により P/Q 型、N 型、R 型に分類され、このうち R 型 Ca^{2+}チャネルが海馬 CA1 領野錐体細胞の後脱分極の発生に関与していることが報告されている（Metz et al., 2005）。海馬苔状線維終末には、R 型 Ca^{2+}チャネルが存在し（Gasparini et al., 2001; Li et al., 2007）、Ca^{2+}チャネルにより後脱分極が生じる可能性が考えられる。細胞外液を Ca^{2+}を含まない溶液から Ca^{2+}を含む溶液に置換したところ、活動電位の振幅に有意な変化を認めなかった（無 Ca^{2+}液：111.3 ± 2.5 mV, 標準 Ca^{2+}液：110.5 ± 2.3 mV, n = 8, P = 0.742, 図 3A,B）。後脱分極の振幅にも有意な変化を認めなかった（無 Ca^{2+}液：13.5 ± 1.0 mV, 標準 Ca^{2+}液：13.4 ± 1.1 mV, n = 8, P = 0.742, 図 3A,C）。これらの結果から、Ca^{2+}の除去は、後脱分極に影響を与えないと考えられた。以下の実験は特に記載のない場合、Ca^{2+}濃度が 0 mM の細胞外液を使用した。

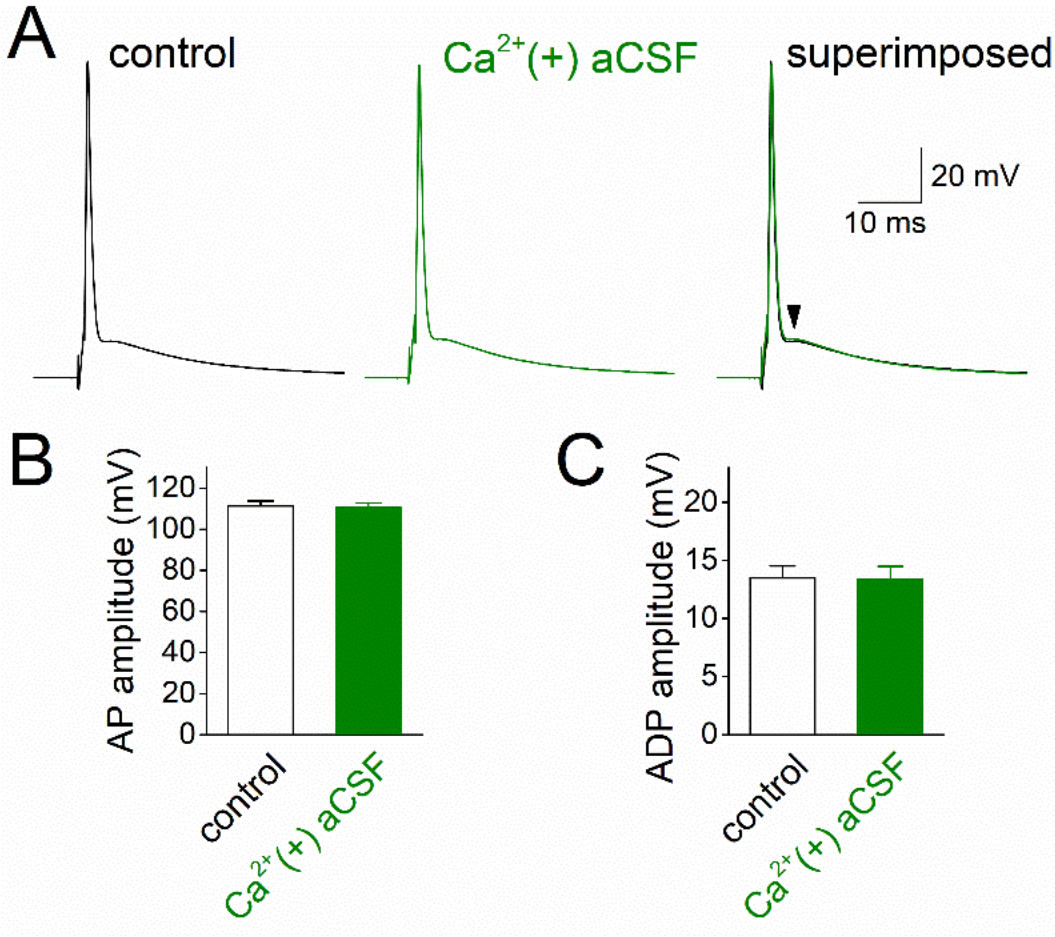


図 3. 後脱分極に対する標準 Ca^{2+}細胞外液の影響

A. 無 Ca^{2+}細胞外液中で電流注入によって誘発した活動電位（左）と、局所的に標準 Ca^{2+}細胞外液を投与した際の活動電位（中央）の重ね書き（右）。

B, C. 活動電位の振幅（B）および後脱分極の振幅（C）に対する標準 Ca^{2+}細胞外液の影響。n = 8。

3. 後脱分極の膜電位依存性の検討

後脱分極の発生機構を理解するために、まず後脱分極の膜電位依存性について検討を行った。後脱分極が電位依存性イオンチャネルの活性化により生じているのであれば、膜電位を変化させることで後脱分極の振幅が変化すると考えられる。静止電位付近（-79.1 ± 0.6 mV）では後脱分極の振幅が 16.7 ± 1.6 mV であったのに対して、保持電位を-66.2 ± 0.9 mV と脱分極させたところ後脱分極の振幅は 7.5 ± 1.1 mV と有意に低下した（n = 14, P = 0.00012, 図 4A,B）。同様な後脱分極の膜電位依存性は、ヘルド萼状シナプス（Sierksma and Borst, 2017）や小脳バスケット細胞の軸索終末（Begum et al., 2016）で報告されている。この結果から、膜電位を脱

分極させると、電位依存性イオンチャネルの状態が変化することで、後脱分極の振幅が減少すると考えられた。

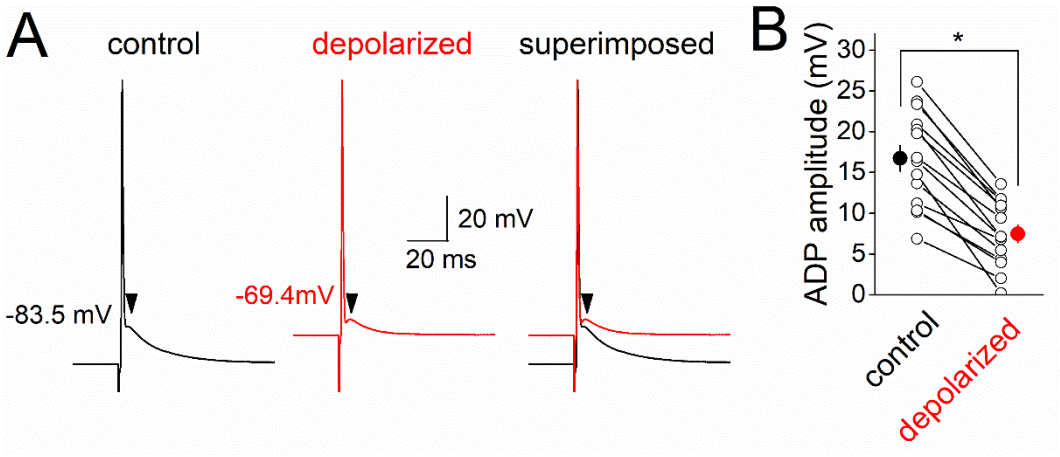


図 4. 後脱分極の膜電位依存性

A. 静止電位付近で入力刺激により誘発した活動電位（左）と、脱分極状態で記録した活動電位（中央）の重ね書き（右）。

B. 後脱分極の振幅に対する脱分極の効果。n = 14、* $P < 0.05$。

4. 後脱分極の発生機構における電位依存性 Na^+チャネルの関与

先行研究において、ヘルド萼状シナプスでは電位依存性 Na^+チャネルが後脱分極の発生機構に関与していることが示されている（Paradiso and Wu, 2009; Kim et al., 2010）。そこで、後脱分極に対する電位依存性 Na^+チャネルの関与を検討した。電位依存性 Na^+チャネルの阻害薬である TTX 0.5 μM を記録部位周辺に 10 分間投与したところ、活動電位は完全に消失し（コントロール：108.9 ± 1.6 mV, TTX：1.0 ± 0.4 mV, n = 6, P= 0.0313, 図 5A)、引き続く後脱分極も完全に消失した（コントロール：12.4 ± 1.2 mV, TTX：0.4 ± 0.2 mV, n = 6, P= 0.0313, 図 5A）。後脱分極は活動電位に引き続いて生じるため、TTX の投与下で短時間の強い電流注入により活動電位と同程度まで脱分極させることで、TTX による後脱分極の振幅の変化を検証できると考えられる（Alessi et al., 2016）。TTX の投与下で 2000-4300 pA、1 ms の矩形電流を記録部位に注入し、細胞膜をコントロールの活動電位の振幅と同程度に脱分極させた（コントロール：108.9 ± 1.6 mV, TTX 中での電流注入：103.7 ± 6.7 mV, n = 6, P= 0.249, 図 5A,C）。TTX と電流注入を組み合わせたものでは、後脱分極の振幅は有意に低下した（コントロール：12.4 ± 1.2 mV, TTX 中での電流注入：10.3 mV ± 1.3 mV, n = 6, P= 0.0313, 図 5A,B,D）。この結果から、TTX は後脱分極の振幅を低下させると考えられた。

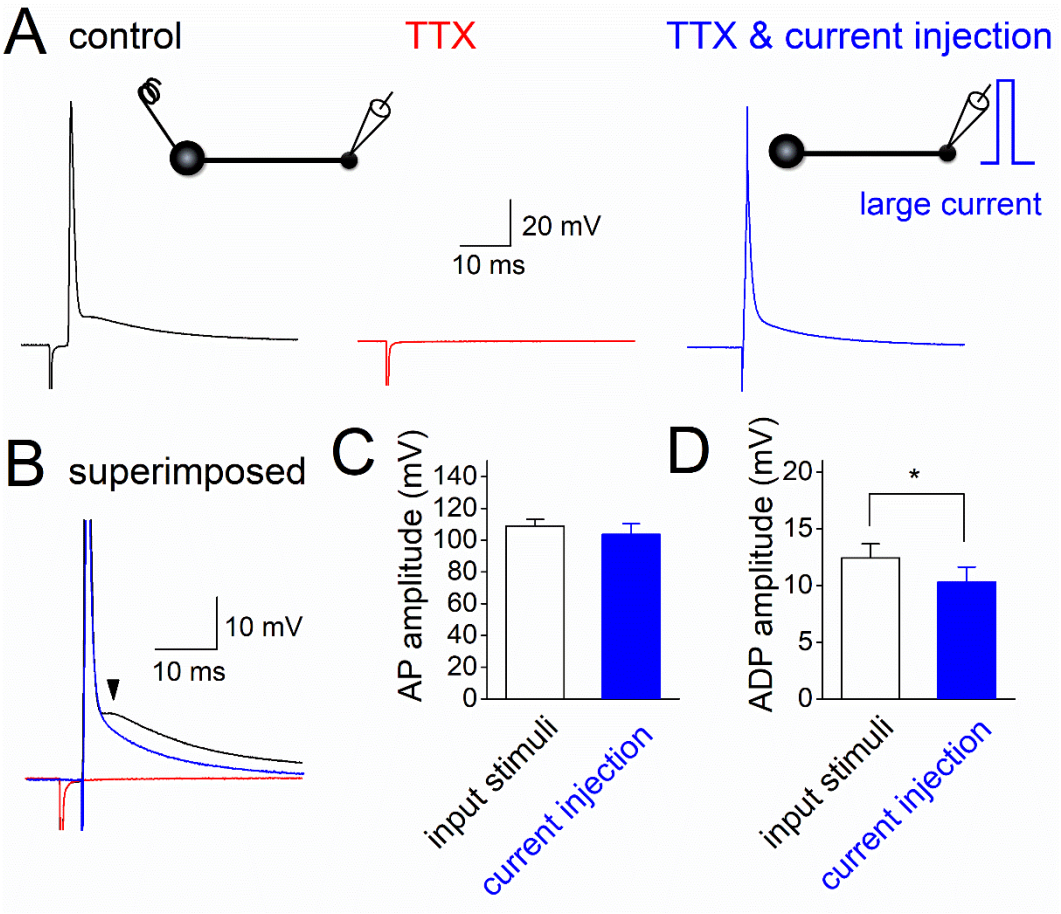


図 5. 後脱分極に対する TTX の効果

A. 入力刺激によって誘発した活動電位において（左）、0.5 μM の TTX を 10 分間投与したときの波形（中央）。TTX を投与した状態で、記録部位に 2000-4300 pA、1 ms の矩形電流パルスを注入した際の膜電位応答（右）。挿入図は実験の模式図。

B. A の波形の重ね書き。

C, D. 入力刺激による活動電位と後脱分極、および TTX 存在下での強い電流注入による活動電位の振幅（C）と後脱分極の振幅（D）。n = 6、* $P < 0.05$。

次に、異なる種類の Na^+チャネル阻害薬を用いて後脱分極に対する作用について検討を行った。電位依存性 Na^+チャネルは機能的に、不活性化が速く、活動電位形成に関与する transient 型と、活性化状態が持続する persistent 型、膜電位の再分極に応じて再び活性化する resurgent 型に分類される。リドカインの誘導体である QX-314 は、transient 型の Na^+チャネルに比べ、persistent 型及び resurgent 型に対してより選択的な抑制作用を示すことが報告されている（Kim et al., 2010）。0.2 mM の QX-314 を電極内液に加えて、苔状線維終末から活動電位の記録を行った。ホールセル記録開始直後に比べて、QX-314 が細胞内に十分灌流されたと考えられる

10 分後には、入力刺激による活動電位の振幅に減弱を認めた（コントロール：111.6 ± 2.9 mV, QX-314：98.1 ± 4.7 mV, n = 7, P = 0.0180, 図 6A,B）。加えて、後脱分極の振幅も減弱した（コントロール：14.6 ± 0.9 mV, QX-314：12.0 ± 0.6 mV, n = 7, P = 0.0280, 図 6A,C）。この結果から、QX-314 は後脱分極の振幅を減弱させると考えられた。一方で、後脱分極の減弱は、活動電位の振幅の減少に伴って減弱した可能性も考えられるので、QX-314 が後脱分極の振幅を直接低下させるかどうか判定できなかった。

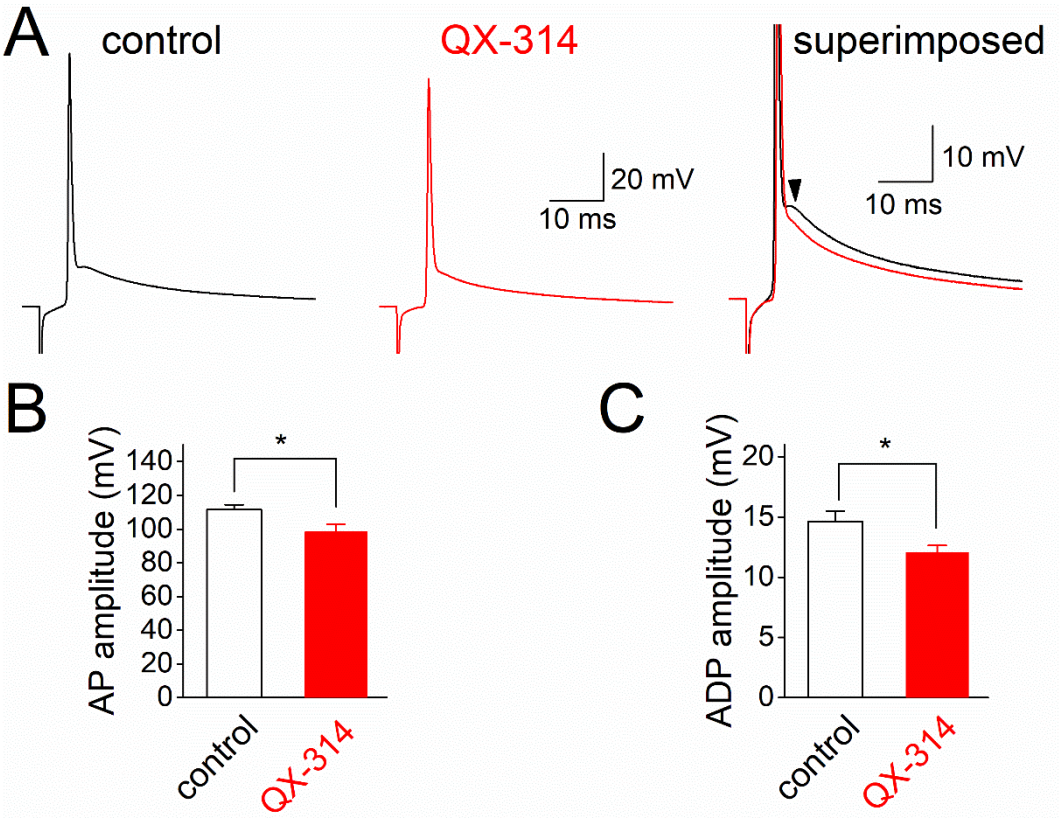


図 6. 後脱分極に対する QX-314 の効果

A. ホールセル記録開始直後に入力刺激で誘発した活動電位（左）と、10 分後の活動電位（中央）の重ね書き（右）。

B, C. 活動電位の振幅（C）と後脱分極の振幅（D）に対する QX-314 の効果。n = 7、* P < 0.05。

次に、電位依存性 Na^+チャネルの不活性化を抑制することで活性化薬として作用するベラトリジン（Ulbricht, 1998）の後脱分極に対する作用について検討を行った。ヘルド萼状シナプスの軸索終末では、ベラトリジンの投与により後脱分極の振幅が増加し、持続時間を延長することが報告されている（Kim et al., 2010）。本実験では、ベラトリジンにより後脱分極の持続時間が延長する可能性を考え、30 秒に

1 回入力刺激を加えた。1 μM のベラトリジンを 10 分間記録部位周辺に投与したところ、活動電位の振幅（コントロール：107.6 ± 6.0 mV, ベラトリジン：106.0 ± 7.4 mV, n = 6, P = 0.563, 図 7C）及び、半値幅（コントロール：1.02 ± 0.03 ms, ベラトリジン：1.07 ± 0.06 ms, n = 6, P = 0.688, 図 7D）には有意な変化を認めなかった。一方で、後脱分極の振幅には有意な増加を認めた（コントロール：10.8 ± 1.5 mV, ベラトリジン：13.5 ± 1.9 mV, n = 6, P = 0.0313, 図 7E）。6 例のうち 3 例では後脱分極振幅の増加のみを認めた（図 7A）。他の 3 例では後脱分極上に多数の活動電位の発生を認めた（図 7B）。ベラトリジンによる後脱分極の増強の程度が記録した苔状線維終末によって異なることは、軸索終末ごとに持続的に活性化する電位依存性 Na^+チャネルの分布が異なる可能性を示唆する。後脱分極上に多数の活動電位発生を認める苔状線維終末では、電位依存性 Na^+チャネルの量が多く、ベラトリジンの投与によって後脱分極の振幅がより大きくなり、多数の活動電位が生じるようになると推定される（Bean, 2007）。

これらの結果から後脱分極の発生には持続的に活性化する電位依存性 Na^+チャネルが関与することが推定された。先行研究において、persistent 型（Yue et al., 2005; D'Ascenzo et al., 2009; Paradiso and Wu, 2009; Kole, 2011; Ghitani et al., 2016）や resurgent 型の Na^+チャネル（Raman and Bean, 1997; Kim et al., 2010）が後脱分極の発生に関与すると報告されている。ヘルド萼状シナプスの軸索終末において、後脱分極は resurgent 型 Na^+チャネルによって制御され、ベラトリジンは resurgent 型 Na^+チャネルを活性化することで後脱分極の振幅を増加させる（Kim et al., 2010）。苔状線維の起始細胞である顆粒細胞においては、persistent 型（Epsztein et al., 2010）および resurgent 型の Na^+チャネルが発現し（Castelli et al., 2007）後脱分極が記録される（Geiger and Jonas, 2000）。そこで、ベラトリジンによる resurgent 型 Na^+チャネルの活性化が、顆粒細胞の後脱分極の振幅を増加させる可能性について検討した。歯状回顆粒細胞においてホールセル記録を行い、500-1000 pA、1 ms の矩形波電流を記録部位に注入することで活動電位を誘発すると、活動電位と引き続く後脱分極が記録された（図 8A）。活動電位の振幅は 129.6 ± 5.2 mV（n = 7, 図 8A）、後脱分極の振幅は 19.6 ± 2.4 mV（n = 7, 図 8A）と算出された。1 μM のベラトリジンを 10 分間記録領域に局所的に投与したところ、活動電位の振幅は軽度低下し（120.9 ± 4.6 mV, n = 7, P = 0.0313, 図 8A,B）、後脱分極の振幅に有意な増加を認めた（32.5 ± 1.8 mV, n = 7, P = 0.0156, 図 8A,C）。この結果は、ベラトリジンが resurgent 型 Na^+チャネルを発現する顆粒細胞の後脱分極の振幅を増加させることを示す。一方で、苔状線維終末においては、persistent 型 Na^+チャネルの発現は報告されているが（Alle et al., 2009）、resurgent 型に関しては報告が無い。Resurgent 型 Na^+チャネルが苔状線維終末の

後脱分極を制御するかは、今後苔状線維終末から Na^+電流の直接記録を行って検証が必要である。

一方で、図 5B から TTX 投与時に後脱分極に残存を認めたことから、電位依存性 Na^+チャネル活性化以外のメカニズムも後脱分極の発生に関与する可能性が考えられた。

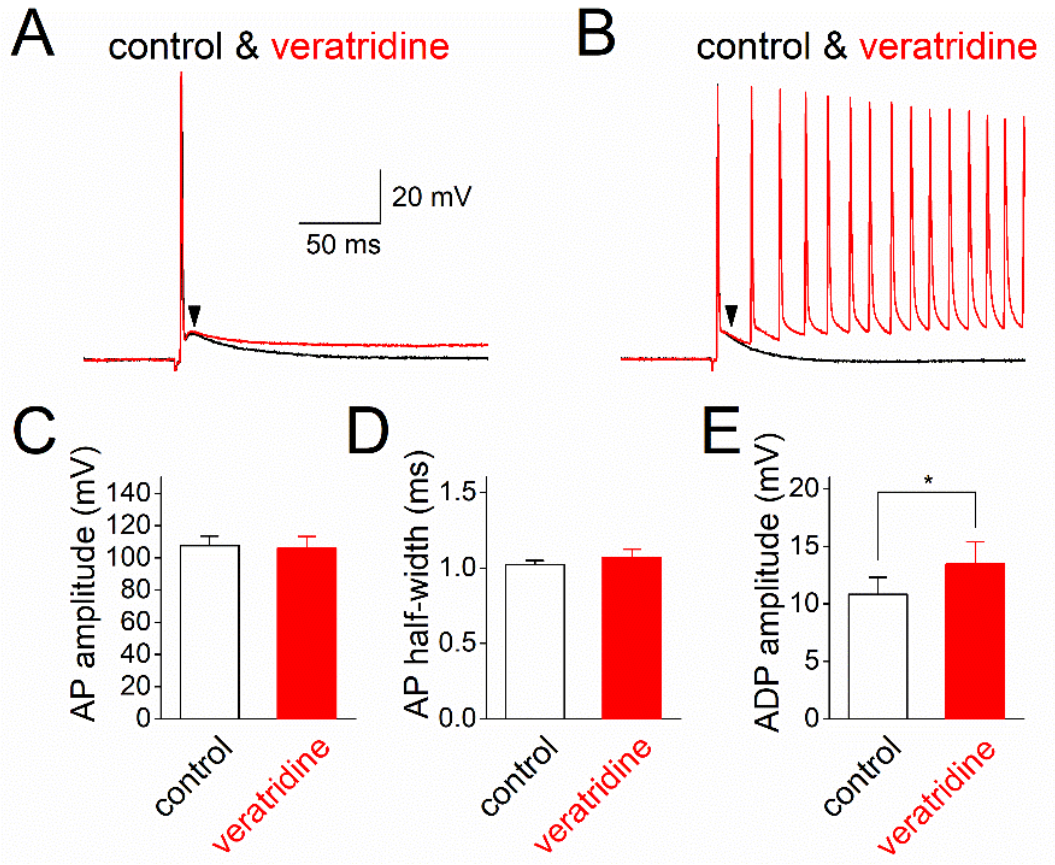


図 7. 後脱分極に対するベラトリジンの影響

A, B. 入力刺激によって誘発した活動電位波形（黒）と 1 μM のベラトリジン投与後の波形（赤）を重ね書きしたもの。後脱分極の振幅が増加する例と（A）、さらに多数の活動電位を生じた例がみられた（B）。なお図 7A, B では加算平均をしていない 1 試行分の波形を示す。

C, D, E. 活動電位の振幅（C）、半値幅（D）、後脱分極の振幅（E）に対するベラトリジンの効果。n = 6、* $P < 0.05$。

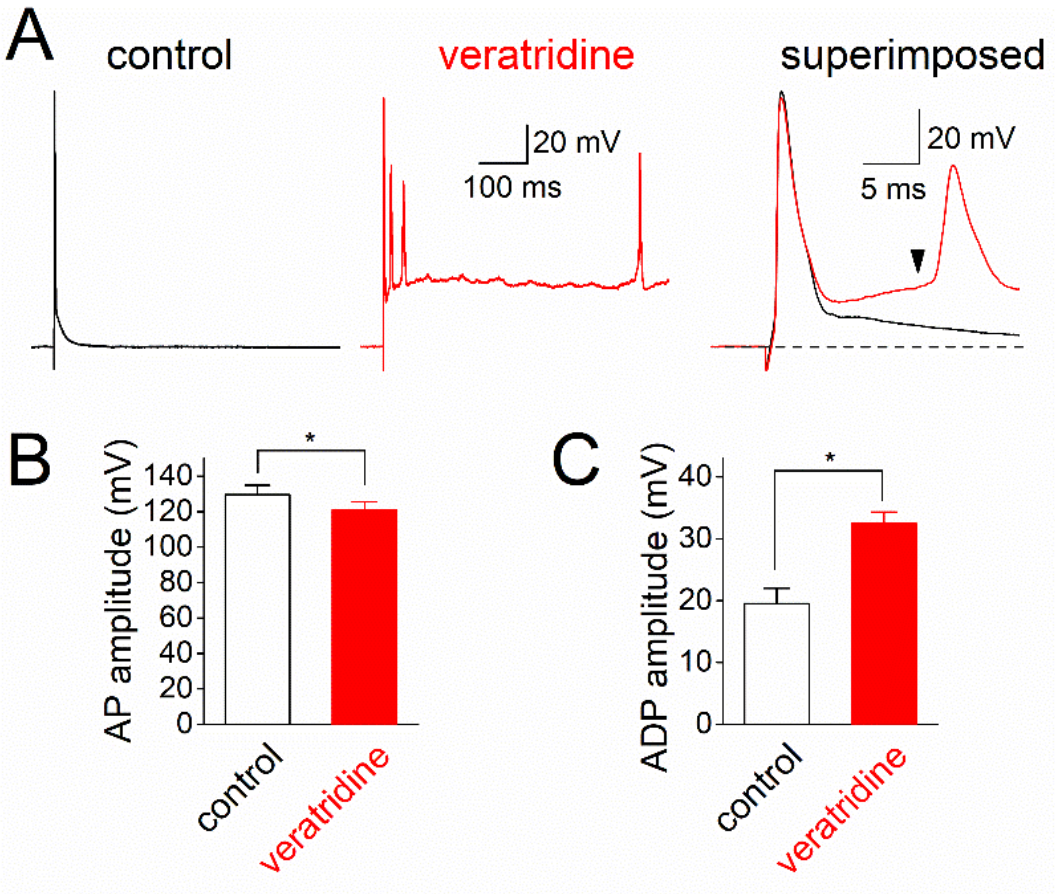


図 8. 歯状回顆粒細胞の後脱分極に対するベラトリジンの影響

A. 顆粒細胞への電流注入によって誘発した活動電位波形（左）と 1 μM のベラトリジン投与後の波形（中央）と重ね書き（右）。矢頭（▼）の時点で後脱分極を測定した。図 8A では加算平均をしていない 1 試行分の波形を示す。

B, C. 活動電位の振幅（B）と後脱分極の振幅（C）に対するベラトリジンの効果。n = 7、* $P < 0.05$。

5. 軸索膜の容量性放電による成分の後脱分極への関与

前項の結果から、後脱分極への電位依存性 Na^+チャネルの寄与が示された。これに対し、図 5 の結果から電位依存性 Na^+チャネル以外の成分も後脱分極に関与する可能性が考えられた。そこで、先行研究で指摘されている軸索の容量性放電による成分の寄与（Barrett and Barrett, 1982; Borst et al., 1995; David et al., 1995）について検討した。

まず、容量性成分を単離するために、電位依存性チャネルによる成分を全て消失させる必要があると考えた。苔状線維終末の活動電位には、電位依存性 Na^+チャネルに加え、再分極相を規定する電位依存性 K^+チャネルが関与する（Geiger and Jonas, 2000）。図 5 と同様に TTX 存在下で苔状線維終末に電流注入し、電位依存

性 K^+チャネル阻害薬の 4-AP（Alle et al., 2011）の効果を調べた。後脱分極の振幅は膜電位応答のピークから 5 ms 後に測定した。0.5 μM の TTX に加えて 2 mM 4-AP を 10 分間投与すると後脱分極応答は増加した（TTX：11.6 ± 0.9 mV, TTX + 4-AP：26.0 ± 4.0 mV, n = 8, P= 0.00781, 図 9A,B）。このとき、後脱分極の減衰の時定数は増加した（TTX：30.9 ± 4.8 ms, TTX + 4-AP：37.6 ± 6.1 ms, n = 8, P= 0.00781, 図 9A,C）。これらの結果から、電位依存性 K^+チャネルが後脱分極の振幅および持続時間を抑制的に制御していると考えられた。TTX と 4-AP の存在下で記録された応答が受動的な容量性成分であれば、持続的な電流注入により膜電位を変化させた際にも振幅や時間経過が不変であることが予想される。静止状態であるおよそ-80 mV（-78.0 ± 1.2 mV）とおよそ-70 mV の脱分極状態（-69.3 ± 1.5 mV）に保持した状態で後脱分極の応答を比較した。振幅（-80 mV：26.0 ± 4.0 mV, -70 mV：25.3 ± 3.9 mV, n = 8, P= 0.945, 図 9D）および減衰の時定数（-80 mV：37.6 ± 6.1 ms, -70 mV：35.8 ± 6.1 ms, n = 8, P= 0.813, 図 9D）には有意な変化を認めなかった。これは、TTX と 4-AP の投与時に生じる膜応答が膜電位非依存的な受動的膜特性による応答であることを示している。次に、軸索膜の時定数の測定を行った。-10 pA、300 ms の矩形波電流を注入した際の膜電位応答の時定数（37.7 ± 6.7 ms, n = 8, 図 9E）と、TTX と 4-AP 存在下でみられた応答の減衰の時定数（37.6 ± 6.1 ms, n = 8, 図 9D）の間には有意な差を認めなかった（P= 0.547, 図 9F）。これらの結果から、TTX と 4-AP 存在下で見られる緩徐な脱分極応答は、細胞膜の容量性放電を反映していると考えられた。

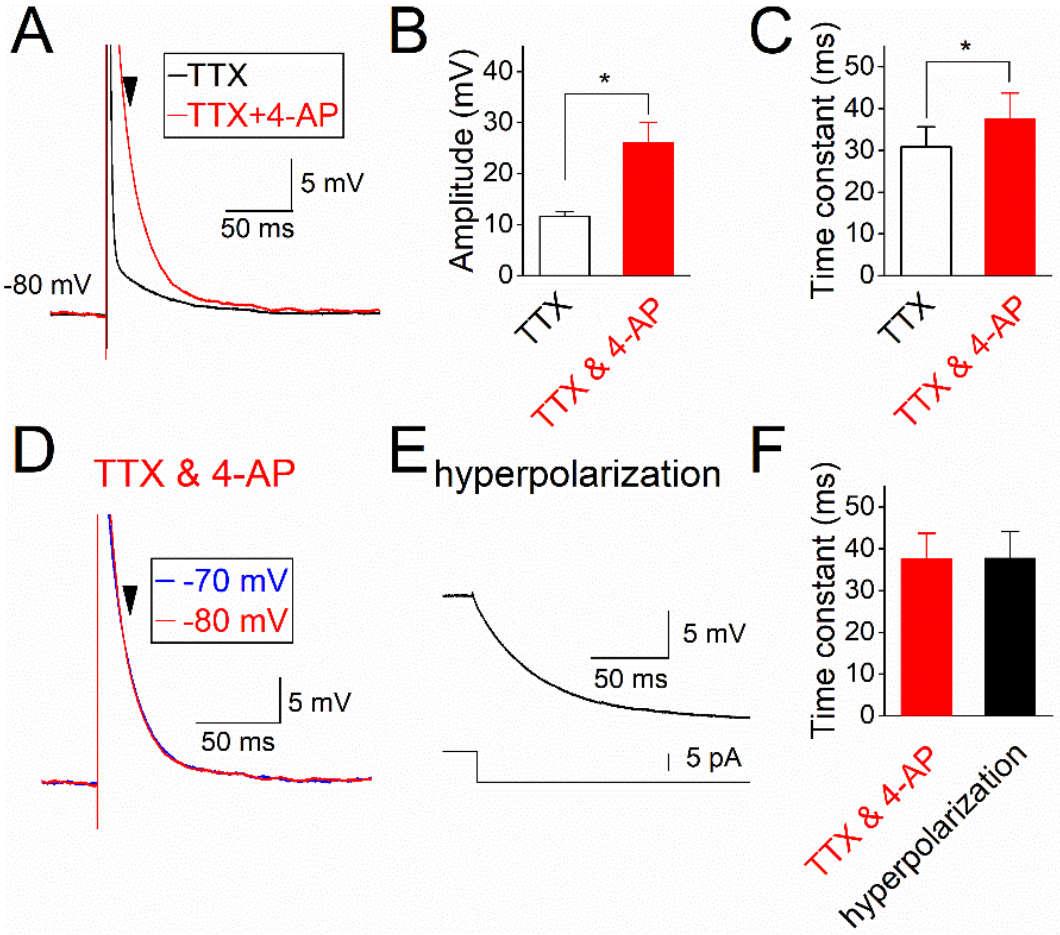


図 9. 軸索細胞膜の容量性放電による成分の後脱分極への関与

A. 0.5 μM の TTX 投与後に苔状線維終末に短時間の強い電流を注入して得られた膜電位応答（黒）と、さらに 2 mM の 4-AP を投与した際の膜電位応答（赤）の重ね書き。

B, C. A の膜電位応答の振幅（B）と減衰の時定数（C）。振幅は矢印（▼）の時点で測定した。n = 8、* $P < 0.05$。

D. TTX、4-AP を投与した状態で、-80 mV（赤）と-70 mV（青）に保持した際の応答の重ね書き。

E. -10 pA、300 pA の矩形波電流を注入した際の膜電位応答。

F. D と E における減衰の時定数。n = 8。

これまでの実験結果をより定量的に検証するために、シミュレーションを用いた解析を行った。先行研究において用いられた海馬苔状線維モデル（Engel and Jonas, 2005）を使用して、後脱分極についてシミュレーションを行った。-5 pA の過分極電流を注入して膜電位応答を記録し、膜の時定数を算出したところ 17.0 ms であった（図 10A 左）。次に、TTX と 4-AP を投与した実験条件を再現するために、Na^+コンダクタンスと K^+コンダクタンスを 0 にした状態で、苔状線維終末に電

流を注入し後脱分極の減衰の時定数を算出したところ、15.0 ms であった（図 10A 右）。この値は、膜の時定数である 17.0 ms と概ね近い値を示したことから、TTX と 4-AP 存在下に記録された緩徐な脱分極が軸索膜の容量性放電を反映するとの実験で得られた結論が支持された。

次に、このモデルにおけるシミュレーションを用いて、後脱分極の容量性成分を評価した。軸索で生じた活動電位は電位依存性 Na^+チャネルと K^+チャネルの連動により能動的な連続伝導の過程で軸索の遠位に向けて伝播するとともに、軸索膜のケーブル特性に従い受動的に伝播することも想定される。後者の機構を実験的に検証するためには、同一軸索上の複数の部位から膜電位記録を行う必要があり、実験は極めて困難である。そこで、シミュレーションで後者の成分、すなわちケーブル特性に従う受動的な伝播による応答を求めた。苔状線維終末を 100 μm 間隔で 10 個配置した海馬苔状線維モデルを使用し（Engel and Jonas, 2005）、7 番目の苔状線維終末より遠位の軸索本幹と苔状線維終末の Na^+コンダクタンスと K^+コンダクタンスを 0 にした（図 10B）。細胞体に電流を注入して活動電位を誘発し、7 番目の苔状線維終末と 8 番目の苔状線維終末での膜電位応答の振幅について検討した。7 番目の苔状線維終末での活動電位振幅は 108.2 mV であったのに対し、100 μm 離れた 8 番目の苔状線維終末の膜電位応答の振幅は 17.3 mV であった（図 10B）。この膜電位応答は 7 番目の苔状線維終末で生じた活動電位が軸索膜のケーブル特性に従って受動的に伝播した応答と考えられる。受動的な応答が 1/e（37%）になる距離は 53.6 μm であり、小脳のプルキンエ細胞の軸索で二点同時記録により実験的に求められた値と概ね相同であった（Zorrilla de San Martin et al., 2017）。これらの結果は、活動電位は受動的な膜の特性に従って減衰して伝播し、後脱分極の容量性放電による成分の形成に関与する可能性を示唆している。

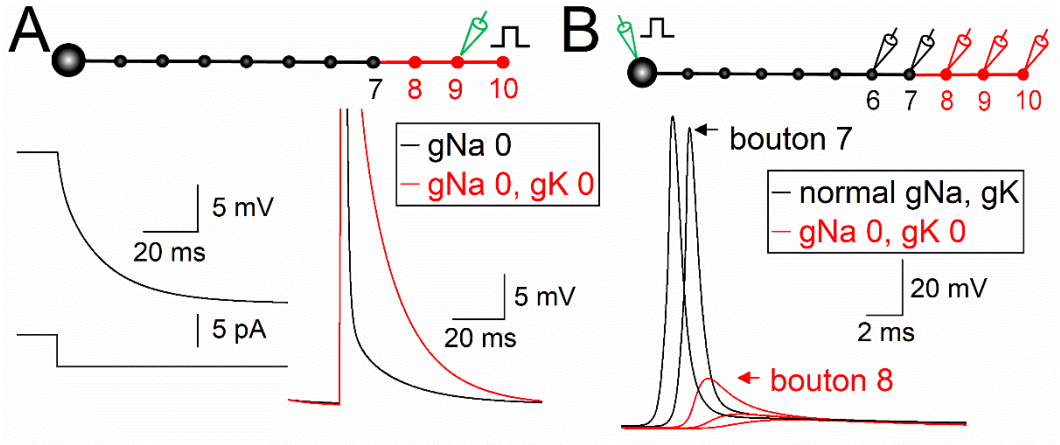


図 10. シミュレーションを用いた後脱分極の容量性放電の成分についての検討
A. シミュレーションに用いた苔状線維モデルの概略図（上）と 9 番目の苔状線維終末に電流注入した時の膜電位応答（下）。7 番目の苔状線維終末より遠位の赤い部分は、Na^+コンダクタンス（gNa）、K^+コンダクタンス（gK）ともに 0 とした。左は-5 pA の矩形波電流を注入した時の膜電位応答を表す。右は gNa を 0 にして 9 番目の苔状線維終末に強い電流を注入して得られた膜電位応答（黒）と、これに加え gK を 0 にした時の膜電位応答（赤）の重ね書き。
B. シミュレーションに用いた苔状線維モデルの概略図（上）。細胞体に電流を注入して活動電位を誘発し、6 番目から 10 番目の苔状線維終末で記録される膜電位応答（下）。

考察

本研究では、海馬苔状線維終末から軸索活動電位を記録し、後脱分極の発生機構を検討した。その結果、後脱分極は軸索細胞膜の容量性放電によって形成され、電位依存性 Na^+チャネルは後脱分極の振幅を増大し、電位依存性 K^+チャネルは後脱分極の振幅を減少させると考えられた。

1. 軸索終末からの活動電位の直接記録

中枢神経系の軸索径は電気生理学的記録に用いる電極の先端径に比べて細いため、活動電位の直接記録は困難とされてきた。近年、哺乳類聴覚中継核に存在するヘルド萼状シナプスの軸索終末をはじめ（Forsythe, 1994）、海馬苔状線維終末（Geiger and Jonas, 2000; Bischofberger et al., 2006）など例外的に大型の軸索終末を有する構造からの活動電位記録が行われてきた。また、脳スライスを作成する過程で軸索の断端が切断され形成された軸索切断端からの記録（Shu et al., 2006）

や、染色した培養細胞の軸索本幹からの直接記録も行われている（Sasaki et al., 2011; Zorrilla de San Martin et al., 2017）。今回の実験では、海馬苔状線維の軸索終末から記録を行った。苔状線維終末からの記録は軸索切断端や培養細胞を用いた場合に比べ、障害のない軸索終末を無染色に同定することができ、より生理的な条件で軸索活動電位の記録が可能である。

2. 後脱分極の記録

後脱分極は活動電位の発生の後に数十ミリから数百ミリ秒持続する緩徐な脱分極応答であり、細胞体の活動電位で記録されていた（Schwartzkroin, 1975; Storm, 1987）。加えて、神経軸索においても後脱分極が報告されており、これまでにトカゲの運動神経（Barrett and Barrett, 1982）、哺乳類聴覚系のヘルド萼状シナプスの軸索終末（Borst et al., 1995）、海馬苔状線維終末（Geiger and Jonas, 2000）、小脳バスケット細胞の軸索終末（Begum et al., 2016）で観察されていた。後脱分極は活動電位発生の確実性の亢進（Borst et al., 1995; Kim et al., 2010）や、活動電位発火パターンに影響を与えることが報告されている（Metz et al., 2005; Bean, 2007; Sierksma and Borst, 2017）。本研究では、詳細に解明されていなかった後脱分極の発生機構の定量的な理解を目指した。

3. 後脱分極における容量性放電による成分の関与

先行研究において、軸索細胞膜の容量性成分が後脱分極の発生に関与しているという報告がされている（Barrett and Barrett, 1982; Borst et al., 1995; David et al., 1995）。そこで、苔状線維終末の後脱分極への成分の寄与について検討した。TTX と 4-AP 存在下で見られる緩徐な脱分極応答の減衰の時定数が軸索膜の時定数と対応する点や、膜電位依存性を認めない点から、容量性放電による成分が後脱分極に関与していると推定された。

実験的な検証に加え、NEURON シミュレーターを用いたシミュレーションによる検討も行った。Na^+コンダクタンスと K^+コンダクタンスを 0 にした状態で、軸索終末に電流を注入して得られた後脱分極の減衰の時定数は、負の矩形波電流の注入で生じた過分極応答から求められた時定数と概ね一致することが示された。実験とシミュレーションの結果から、細胞膜の容量性放電による成分が後脱分極の発生に主要な役割を担うことが示された。

シミュレーションにより、この容量性成分は近位の苔状線維の軸索膜の受動的な性質に従って伝わった減衰した活動電位によって生じたものと考えられた。この実験的な検証には、電位依存性 Na^+チャネル及び K^+チャネルの軸索終末レベルでの局所的な阻害が必要である。これに対し、今回使用した局所投与法では実験的検証に

必要な局所的なイオンチャネルの操作は困難である。今後、軸索終末レベルの空間解像度で Na^+チャネルや K^+チャネルの阻害が可能な新規のケージド化合物の開発や、同一軸索からの二点同時記録法によって、容量性成分の伝播様式を検証することが必要と考えられる。

今回のシミュレーションから算出された、活動電位の振幅が受動的に 1/e（37 %）にまで減衰する距離は 53.6 μm と算出された。これは、先行研究において小脳のプルキンエ細胞の軸索において二点記録を行って算出された値（47 ± 15 μm）と概ね相同な値である（Zorrilla de San Martin et al., 2017）。受動的な性質に従って膜電位変化が伝播する場合、ケーブル特性に従い、伝播する距離は軸索の直径に反比例する（Rall, 1969）。そのため、同一の軸索径では、この長さ定数は相同になると考えられる。一方で、海馬苔状線維において、シナプス応答の振幅が 37%にまで減衰する距離は 400 μm ほどと大きな値が報告されている（Alle and Geiger, 2006）。同一の苔状線維においてこの値が大きく異なるのは、Alle らの見ているシナプス応答の減衰に比べ、活動電位は膜電位変化が速い過渡的な応答であることが理由の一つと考えられる。活動電位のような持続時間の短い応答は軸索を伝播する過程でフィルター効果により、振幅の減弱がより強く生じると考えられる。そのため、シナプス応答のような遅い電位変化に比べ、活動電位の受動的な減衰の距離は、短く算出されると考えられる。

4. 後脱分極に対する電位依存性成分の関与

苔状線維終末の保持電位を静止状態から脱分極状態に変化させた際に、後脱分極の振幅が減弱した。このことから、細胞膜の容量性放電による成分に加え、電位依存性チャネルの活性化を伴う機構が後脱分極に関与すると考えられた。TTX、ベラトリジンを用いた実験から、電位依存性 Na^+チャネルが苔状線維終末における後脱分極発生に関与していることが示された。電位依存性 Na^+チャネルは活動電位発生に寄与する transient 型に加え、persistent 型や resurgent 型に分類される。先行研究において、resurgent 型 Na^+チャネルはヘルド萼状シナプスの後脱分極を形成していると報告されている（Kim et al., 2010）。一方で苔状線維終末における resurgent 型 Na^+チャネルの発現は現在まで報告されていない。今後、苔状線維終末から Na^+電流を直接記録することで、後脱分極発生に関与する Na^+チャネルの種類を同定することが必要である。

これに加え、4-AP 感受性を示す電位依存性 K^+チャネルが後脱分極を制御する可能性を想定した。先行研究において、苔状線維終末に発現している Kv1 と Kv3 チャネルは活動電位の再分極相を形成していることが報告されている（Geiger and Jonas, 2000; Alle et al., 2011）。電位依存性 K^+チャネル阻害薬の 4-AP を使用して

（Alle et al., 2011）、後脱分極成分について検討を行ったところ、後脱分極の減衰の時定数の延長をきたすことが示されたことから、電位依存性 K^+チャネルは後脱分極の初期相を抑制的に制御している可能性が考えられた。ヘルド萼状シナプスにおいて、Kv1.2 チャネルは後脱分極上での活動電位の発生を抑えるとされる（Dodson et al., 2003）。
これに加え、Kv7 チャネルが錐体細胞の後脱分極を制御していることが報告されている（Yue and Yaari, 2004; Gu et al., 2005; Brown and Randall, 2009）。また苔状線維終末において Kv7 チャネルの存在が報告されている（Martinello et al., 2015）。今後、どのサブタイプの電位依存性 K^+チャネルによって後脱分極が制御されているか検討する必要がある。

結論

本研究において、これまで詳細が不明であった苔状線維終末での後脱分極の発生機構の一端が明らかとなった。後脱分極の発生機構には軸索細胞膜の容量性放電による成分と電位依存性 Na^+チャネル、K^+チャネルが関与すると考えられた。また容量性成分は、上流の活動電位が軸索のケーブル特性に従い受動的に減衰して伝播したものを反映していると推定した。

第二章　軸索活動電位の活動依存的な制御における後脱分極の役割

緒言

これまで、神経軸索は全か無かの法則に従って活動電位を伝播させるデジタルケーブルと考えられてきた（Adrian, 1914）。一方で、中枢神経系において、軸索機能の理解に修正を加えるアナログな活動電位制御について報告がなされている（Debanne et al., 2011）。その一つに、反復刺激による活動電位の延長がある（Jackson et al., 1991; Geiger and Jonas, 2000）。これは反復刺激によって軸索終末部に存在する電位依存性 K^+チャネルが不活性化するため、活動電位が延長する。この反復刺激による活動電位の延長は、シナプス伝達の強度を変化させると考えられる。

一方で、軸索終末部の電位依存性 Na^+チャネルが反復刺激時の活動電位に与える影響は十分解明されていない。電位依存性 Na^+チャネルの不活性化の蓄積によって、細胞体での活動電位振幅が減弱することが知られている（Brody and Yue, 2000; He et al., 2002）。一方で、電位依存性 Na^+チャネルの密度は細胞体に比べ軸索において高いことや、活性化および不活性化の時間経過は軸索の方が細胞体のものに比べて速いなど、電位依存性 Na^+チャネルの分布や特性が部位によって異なることが報告されている（Engel and Jonas, 2005; Kole et al., 2008; Schmidt-Hieber et al., 2008）。そのため、細胞体で見られるような電位依存性 Na^+チャネルによる活動電位の減弱が軸索において生じるかは不明であった。

本研究では、苔状線維終末からルースパッチクランプ法を用いて、軸索活動電位（以下、軸索スパイクと記す）を記録した。反復刺激によって、軸索スパイクの振幅が軽度減弱することを見出し、この機構への後脱分極の関与について検討した。

材料と方法

実験で用いた動物、器具、解析法は第一章に記載したものと同様である。異なる部分のみ記載する。第二章の実験では基本的に以下に記すルースパッチクランプ法による記録を行い、図 11D および図 14 では第一章で用いたホールセルクランプ法を用いた。

1. ルースパッチクランプ法による軸索スパイクの記録

実験は 14～43 日齢の C57BL/6J マウスを用いて行った。記録電極は、電極内液を充填した状態で 3-6 MΩ になるように電極作成装置で作成した。電極内に Ca^{2+}濃度が 0 mM の細胞外液を充填した。記録電極を苔状線維終末の表面に当てた後、電極ホルダーにつなげた注射筒を用いて電極先端に軽度陰圧をかけ、電極抵抗が 15-30 MΩ 程度になるように保持した。軸索スパイクは顆粒細胞層に刺入した刺激電極を用いて誘発した。すべての刺激に応じて活動電位を誘発するために、刺激強度を閾刺激の 1.2 倍に設定した。

結果

1. 海馬苔状線維終末からのルースパッチクランプ法を用いた活動電位記録

本研究では、ルースパッチクランプ法を用いて、苔状線維終末からの活動電位記録を行った（図 11A）。これは、非侵襲的な細胞外記録であり、長時間の安定した活動電位記録が可能である。記録した活動電位（軸索スパイク）は全か無かの応答性を示した（図 11B）。また、0.5 μM の TTX を 10 分間投与すると、軸索スパイクは減弱した（コントロール：101.8 ± 1.4 %, TTX：18.5 ± 1.8 %, n = 9, P= 0.00391, 図 11C）。細胞外記録法を用いて記録した波形は、膜電位の一次微分波形を反映していると考えられる（Meeks et al., 2005）。ホールセル法で記録した活動電位（図 11D 左）を一次微分した波形（図 11D 中央）は、ルースパッチクランプ法で記録された波形と相同になることが示された（図 11D 右）。

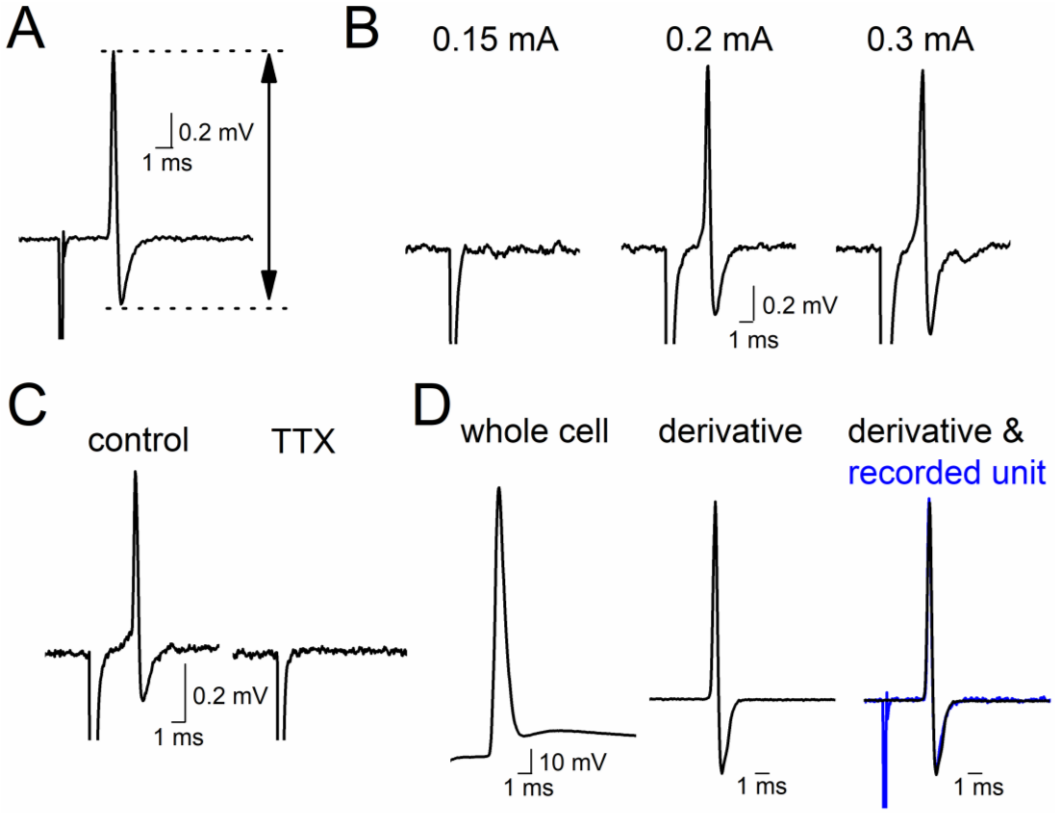


図 11. ルースパッチクランプ法を用いた苔状線維終末からの軸索スパイク記録
A. ルースパッチクランプ法によって記録される軸索スパイク。矢印は軸索スパイクの振幅を表す。
B. 細胞外刺激強度の上昇に伴い、全か無かの応答性に従う活動電位。数字は細胞外刺激に用いた刺激強度を示す。この例では 0.2 mA が閾刺激となる（中央）。
C. TTX を投与した時の軸索スパイク（右）。
D. ホールセル法によって記録された軸索活動電位（左）を一次微分した波形（中央）と、A の波形との重ね書き（右）。

2. 軸索スパイクの二発刺激抑圧

50 ms の刺激間隔で二発刺激を加えた所、二発目の軸索スパイクの振幅の軽度減弱が観察された（89.3 ± 0.9 % of control, n = 29, P = 0.0000027, 図 12A）。この現象を軸索スパイクの二発刺激抑圧（paired-pulse depression、以下 PPD と記す）と定義した。細胞外記録による軸索スパイクは理論的に膜電位の一次微分波形を反映すると考えられる（Meeks et al., 2005）。軸索スパイクを積分することで細胞内記録による活動電位の時間経過を計算的に算出し、一発目と二発目の振幅を比較した。算出された活動電位の振幅は二発目において軽度減弱することが示された（94.4 ± 3.4 % of control, n = 20, P = 0.0153, 図 12B）。

次に刺激間隔を 10 ms から 500 ms まで変化させて、軸索スパイク PPD の持続時間を検討した。その結果、PPD は刺激間隔が 200 ms まで持続し（10 ms, 91.4 ± 1.1 %, P= 0.00769; 20 ms, 90.3 ± 2.0 %, P= 0.00769; 50 ms, 89.8 ± 1.5 %, P= 0.00769; 100 ms, 92.6 ± 1.8 %, P= 0.00468; 200 ms, 97.1 ± 0.9 % of control, n = 9, P= 0.0284, 図 12C,E）、500 ms では抑圧が消失した（500 ms, 102.1 ± 1.1 %, n = 9, P= 0.0663, 図 12C,E）。これらの結果から、PPD は刺激間隔が少なくとも 200 ms まで持続することが示された。

本実験は室温（25 ± 1℃）で記録を行った。生理的な条件よりも低い温度で記録を行った場合、チャネルの開閉が遅くなることが報告されており（Collins and Rojas, 1982）、PPD に影響が生じている可能性が考えられた。PPD が生理的な温度条件に近い 33 ± 1℃において再現されるか検討を行った。その結果、PPD は刺激間隔が 200 ms まで持続し（10 ms, 87.5 ± 2.0 % of control, P= 0.01562; 20 ms, 84.4 ± 1.2 %, P= 0.01562; 50 ms, 87.7 ± 1.7 %, P= 0.01562; 100 ms, 93.2 ± 1.5 %, P= 0.01562; 200 ms, 98.2 ± 1.6 %, P= 0.0219）、500 ms では抑圧が消失した（500 ms, 100.4 ± 1.6 %, P= 0.297, n = 7, 図 12D,E）。これらの結果から、PPD は室温だけでなく生理的な条件に近い温度でも生じることが示された。以下、記録は室温（25 ± 1℃）で行った。

これに加え、50 ms の二発刺激条件において、軸索スパイクが発生するまでの潜時について検討した。潜時は、電気刺激から軸索スパイクの頂点までの時間を測定した。その結果、一発目に比べ、二発目の軸索スパイクで潜時が有意に短くなることが示された（95.2 ± 1.1 % of control, n = 20, P= 0.000558, 図 12F）。

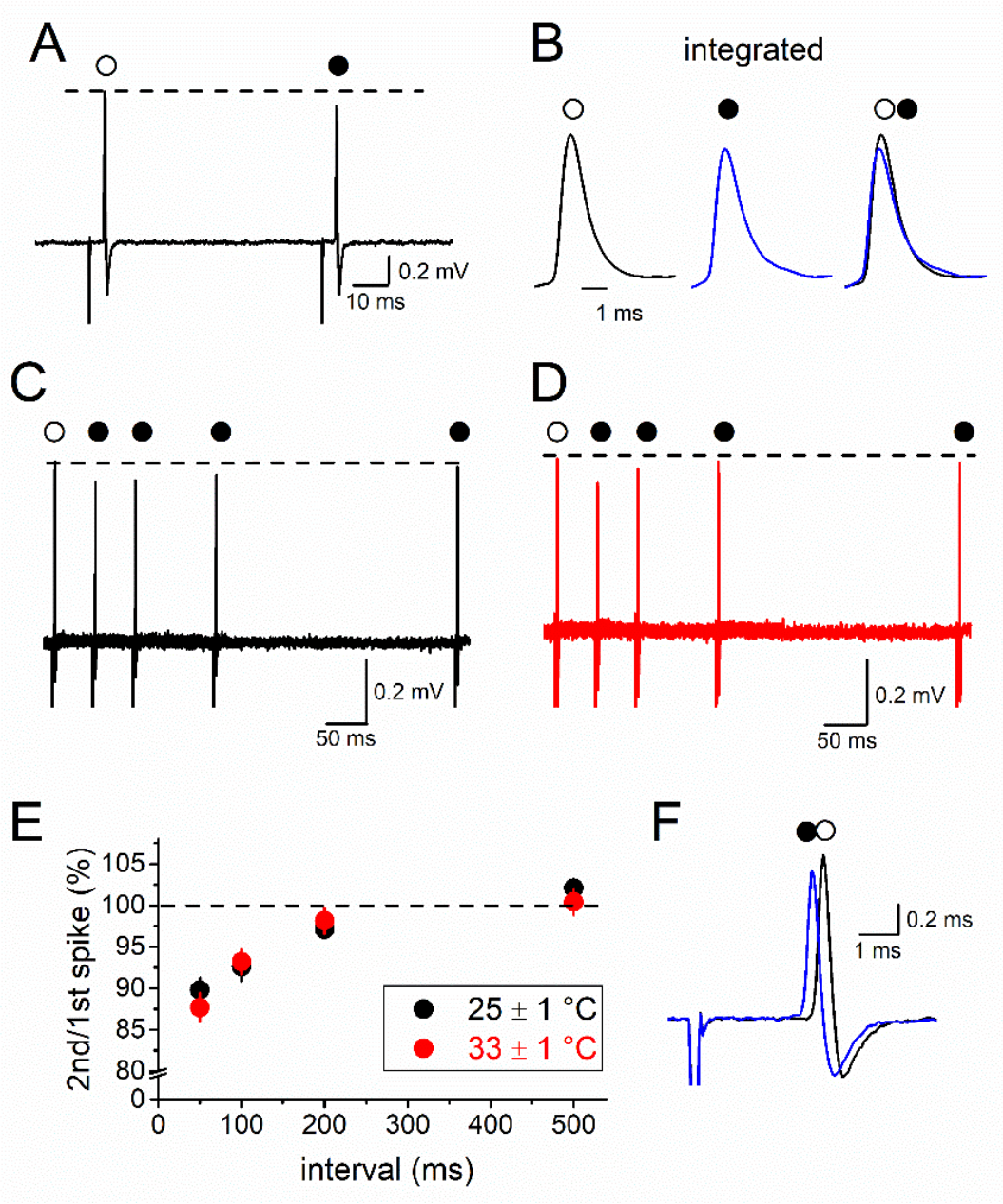


図 12. 軸索スパイクの二発刺激抑圧

A. 50 ms の刺激間隔で二発刺激を加えた時の、一発目（○）と二発目の軸索スパイク（●）。

B. A の軸索スパイクを積分した一発目（○）と二発目（●）の波形の重ね書き（右）。

C, D. 25 ± 1℃（C）ないし 33 ± 1℃（D）の 50, 100, 200, 500 ms の刺激間隔で二発刺激した波形の重ね書き。

E. 25 ± 1℃（黒）ないし 33 ± 1℃（赤）の一発目に対する二発目の軸索スパイクの振幅。n = 9（25 ± 1℃）または n = 7（33 ± 1℃）。

F. A について一発目と二発目の軸索スパイクの重ね書き。

本実験では、周辺の細胞からのシナプス入力を抑制し、神経細胞の内在的な膜電位応答の検出を行うために、Ca^{2+}を除いた細胞外液（$CaCl_2$ 0 mM, $MgSO_4$ 3.7 mM）を用いた。Ca^{2+}が PPD に与える影響を検討するために、刺激間隔が 50 ms の二発刺激条件で、細胞外液を Ca^{2+}を含まない溶液から Ca^{2+}を含む溶液に置換したところ、一発目、二発目の軸索スパイクの振幅ともに変化を認めなかった（1 発目：102.3 ± 2.5 % of control, n = 8, P = 0.742, 2 発目：104.7 ± 2.8 % of control, n = 8, P = 0.461, 図 13A,B,C,E）。Ca^{2+}を含まない溶液と含む溶液では PPD の程度に有意な差を認めなかった（無 Ca^{2+}液：84.7 ± 1.2 % of control, 標準 Ca^{2+}液：86.9 ± 1.0 % of control, n = 8, P = 0.109, 図 13A,D）。これらの結果から、Ca^{2+}の除去は、PPD に影響を与えないと考えられた。以下の実験は特に記載のない場合、Ca^{2+}濃度が 0 mM の細胞外液を使用した。

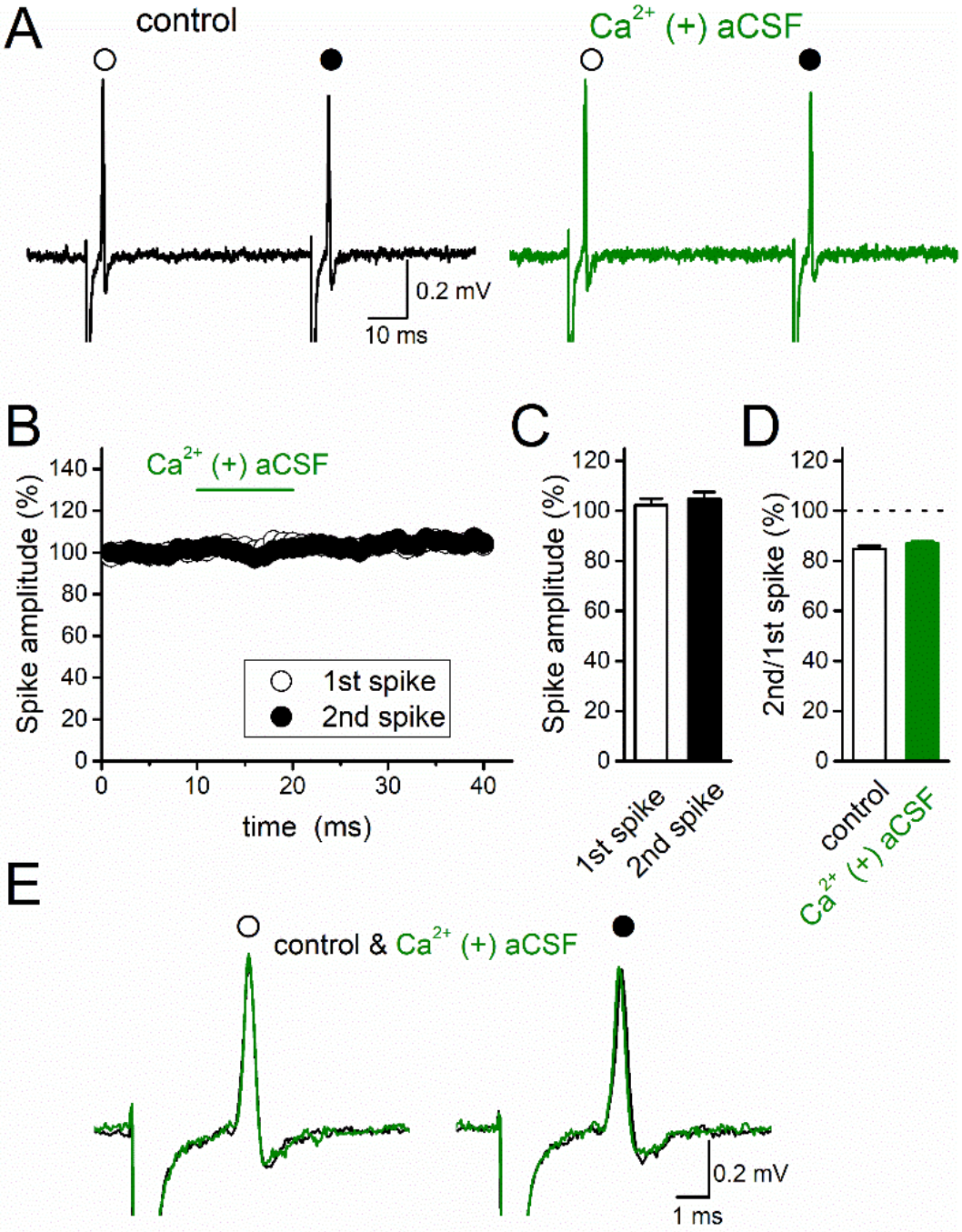


図 13. PPD に対する Ca^{2+}の効果

A. 無 Ca^{2+}細胞外液（左）と、標準 Ca^{2+}細胞外液投与時（右）の二発刺激による軸索スパイク。

B. 軸索スパイクの振幅の時間経過。

C. 一発目と二発目の軸索スパイクの振幅に対する標準 Ca^{2+}細胞外液の効果。

D. PPD に対する標準 Ca^{2+}細胞外液投与時の効果。

E. 無 Ca^{2+}細胞外液（黒）と標準 Ca^{2+}細胞外液投与後（緑）の一発目（○）と二発目の軸索スパイク（●）の重ね書き。n = 8。

3. 後脱分極が PPD に与える影響

これまでの結果から、PPD は少なくとも 200 ms 持続することが示された。活動電位の発生に関与する transient 型 Na^+チャネルの不活性化は細胞体での活動電位の PPD を生じる（Brody and Yue, 2000; He et al., 2002）。しかしながら、苔状線維終末における電位依存性 Na^+チャネルは不活性化からの回復が 20 ms 以内に完了する（Engel and Jonas, 2005）が、PPD はそれ以上持続することから、先行する活動電位による電位依存性 Na^+チャネルの不活性化の持続とは異なるメカニズムが関与すると考えられた。後脱分極は、数十から数百ミリ秒ほど持続すること報告されており（Geiger and Jonas, 2000; Kamiya et al., 2002）、およそ PPD の持続時間に相当する。そこで、後脱分極が軸索スパイクの PPD に関与する可能性について検討を行った。まず、脱分極が活動電位発生に及ぼす影響について検討するために、ホールセル法で軸索活動電位を記録し、膜電位を軽度脱分極させた際に、軸索活動電位に与える影響について検討を行った。静止電位付近（-75.6 ± 0.9 mV）に保持したものと軽度に脱分極させた（-62.2 ± 1.2 mV）もので比較したところ、活動電位のピーク値（97.7 ± 2.9 % of control, n = 14, P = 0.542）と半値幅（97.8 ± 2.3 % of control, n = 14, P = 0.3269）に有意な差を認めなった（図 14A,B）。一方で、刺激から活動電位が誘発されるまでの潜時は短縮した（85.9 ± 5.7 % of control, n = 14, P = 0.00842, 図 14A,B）（活動電位のピーク値、潜時、半値幅は補足図 1a,b,d を参照）。この結果は、図 12F で見られた、二発目の活動電位発生の潜時が短くなる傾向と一致する。これは、後脱分極により膜電位が軽度脱分極することによって、transient 型 Na^+チャネルの活性化までの時間が短縮したことにより（Carter et al., 2012）、活動電位発生までの潜時が短縮したと考えられた。ヘルド萼状シナプスの後脱分極においても、後脱分極による活動電位発生の潜時の短縮が報告されている（Kim et al., 2010）。

次に、軸索スパイクの PPD がホールセル法で記録される活動電位において見られるか検討した。振幅の減弱は少なくとも 50 ms まで有意に見られ（10 ms, 86.8 ± 2.3 % of control, n = 8, P = 0.00195; 20 ms, 91.0 ± 1.4 %, P = 0.000479, 50 m：97.2 ± 0.6 %, P = 0.00352）、100 ms では振幅の減弱は認めなかった（100 ms：99.5 ± 0.5 % of control, n = 8, P = 0.288, 図 14C,D）。この傾向は、後脱分極が少なくとも 50 ms 以上持続しているため（図 2D）、二発目の活動電位振幅が後脱分極振幅の分だけ減弱していることを反映すると考えられた。

次に、ルースパッチクランプ法で記録した軸索スパイクの PPD と比較するために、ホールセル法で記録された波形を一次微分した波形の振幅について検討した。一発目の波形に比べ二発目の波形の振幅は少なくとも 100 ms までの刺激間隔において有意に減弱した（10 ms, 88.4 ± 4.1 % of control, n = 8, P = 0.00781; 20 ms, 92.6 ±

1.5 %, P= 0.00781; 50 ms, 96.4 ± 0.9 %, P= 0.00781; 100 ms, 97.8 ± 0.5 %, P= 0.00781, 図 14E,F）。後脱分極は電位依存性 Na^+チャネルの定常的な不活性化をきたし、活動電位の立ち上がりを減衰することで軸索スパイクの PPD を生じたと推定した。

これらの結果から、後脱分極による軽度脱分極応答は軸索スパイクの PPD を生じさせると考えられた。また、後脱分極は活動電位発生までの潜時を短くさせると考えられた。

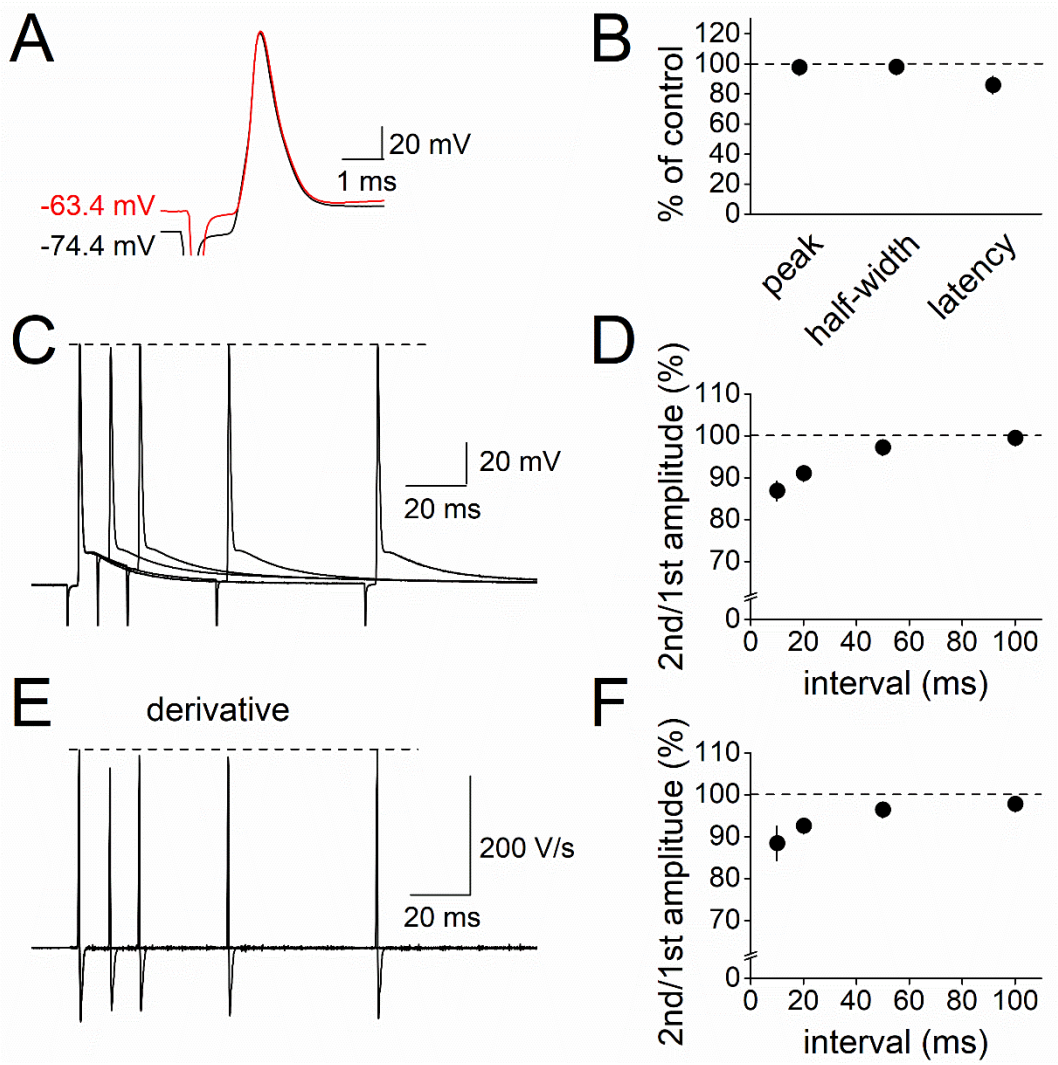


図 14. 後脱分極が PPD に与える影響

A. 入力刺激によって誘発した活動電位（黒）と膜電位を軽度脱分極させた活動電位（赤）の重ね書き。

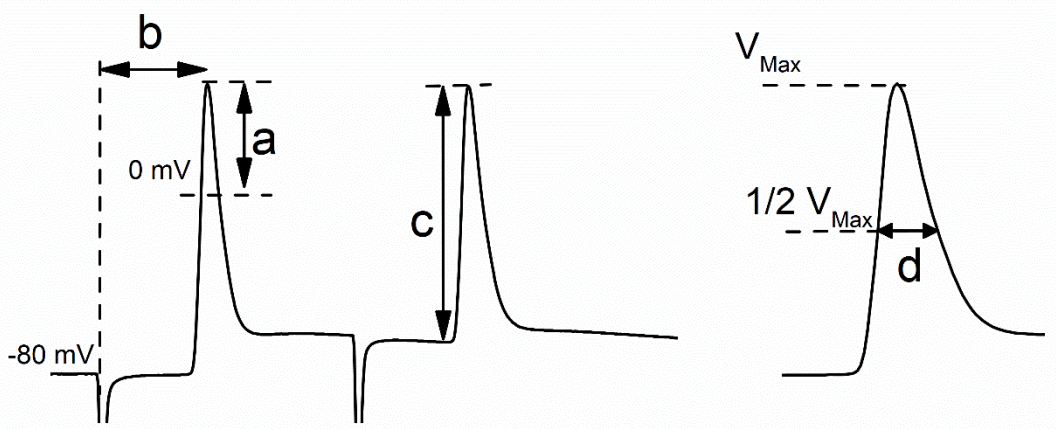
B. A の静止状態に対する脱分極状態で膜電位を保持した時の活動電位のピーク（補足図 1a）、半値幅（補足図 1d）、活動電位発生の潜時（補足図 1b）。n = 14。

C. 10, 20, 50, 100 ms の刺激間隔で二発刺激した波形の重ね書き。

D. 一発目に対する二発目の活動電位の振幅（補足図 1c）。n = 8。

E. 一次微分した C の波形の重ね書き。

F. 一発目に対する二発目の振幅。n = 8。



補足図 1. 図 14 において測定した成分

（a）活動電位のピーク値、（b）潜時、（c）活動電位の振幅、（d）半値幅（活動電位振幅の最大値 V_{Max} の 1/2 の膜電位における活動電位の持続時間）

4. ベラトリジンによる PPD の促進

後脱分極と PPD の関係について検討するために、後脱分極の振幅を変化させることで PPD に影響がみられるか検討を行った。第一章で、電位依存性 Na^+チャネルの活性化薬として作用するベラトリジンは後脱分極の振幅を増加することを示した。そこで、1 μM のベラトリジンを投与すると、一発目の軸索スパイクにはほとんど影響を与えず（97.6 ± 1.8 % of control）二発目の振幅が有意に減少した（78.1 ± 1.8 % of control, n = 20, P= 0.00000191, 図 15A,B,C,E）。ベラトリジンは PPD を亢進することが示された（コントロール：89.0 ± 1.1 % of control, ベラトリジン：71.9 ± 1.5 % of control, n = 20, P= 0.00000191, 図 15D）。後脱分極が電位依存性 Na^+チャネルの定常的な不活性化をきたすことで PPD が生じると推定した。

次に、二発刺激の刺激間隔を変更して、ベラトリジンを投与した際の軸索スパイクの PPD の持続時間を検討した。1 μM のベラトリジンを投与すると、PPD は 2000 ms までの刺激間隔で持続し（500 ms, 71.3 ± 4.8, P= 0.00781; 1000 ms, 74.4 ± 5.6 %, P= 0.00781; 2000 ms, 80.8 ± 2.7 % of control, n = 8, P= 0.00781）、5000 ms では PPD が消失した（99.8 ± 1.3 % of control, n = 8. P= 0.711, 図 15F,G）。この実験結果から、ベラトリジンは PPD の持続時間を少なくとも 2000 ms まで延長することが示された。

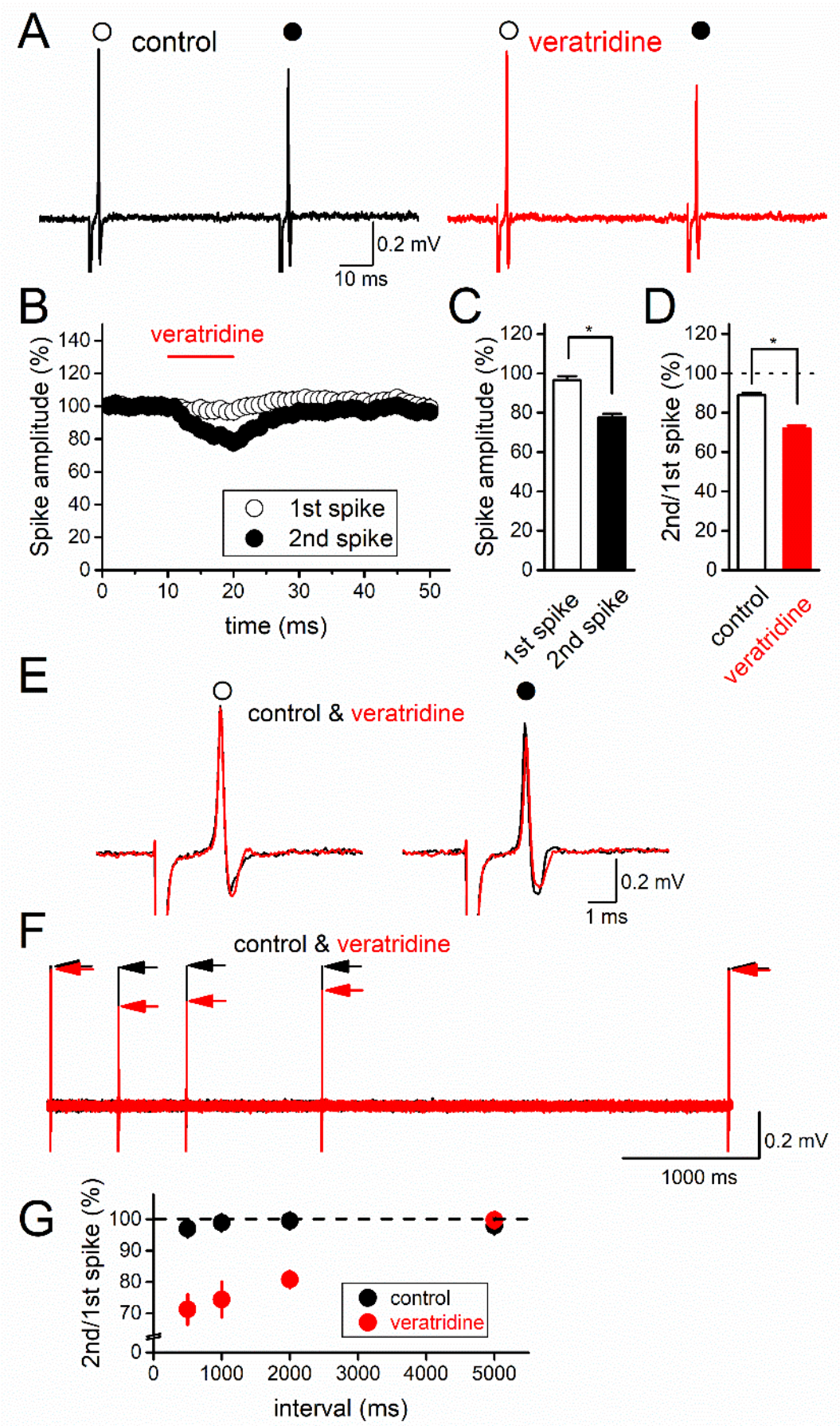

A
control
veratridine
0.2 mV
10 ms
B
veratridine
Spike amplitude (%)
1st spike
2nd spike
time (ms)
C
Spike amplitude (%)
1st spike
2nd spike
D
2nd/1st spike (%)
control
veratridine
E
control & veratridine
0.2 mV
1 ms
F
control & veratridine
0.2 mV
1000 ms
G
2nd/1st spike (%)
control
veratridine
interval (ms)

図 15. PPD に対するベラトリジンの効果
A. コントロール（左）と 1 μM のベラトリジン投与時（右）の二発刺激での軸索スパイク。
B. 軸索スパイクの振幅の時間経過。
C. 一発目と二発目の軸索スパイクの振幅に対するベラトリジンの効果。
D. PPD に対するベラトリジンの効果。n = 20、*P< 0.05。
E. コントロール（黒）とベラトリジン投与後（赤）の一発目（○）と二発目の軸索スパイク（●）の重ね書き。
F. 刺激間隔を 500, 1000, 2000, 5000 ms に設定した時のコントロール（黒）とベラトリジン投与後（赤）の軸索スパイクの重ね書き。
G. コントロール（黒）とベラトリジン投与時（赤）の PPD。n = 8。

5. 反復刺激による軸索スパイクの抑圧とベラトリジンの効果

次に、反復刺激に対する軸索スパイクの応答を調べた。20 Hz、10 発の反復刺激を 30 秒ごとに与えた。反復刺激に対して軸索スパイクは減弱し、10 発目の応答は一発目の 89.7 ± 2.8 %（n = 13）であった。1 μM のベラトリジンを 10 分間投与すると、一発目の応答にはほとんど効果がなかった（98.8 ± 3.2 %）が、反復刺激による抑圧が顕著になり 10 発目は強く抑制された（61.8 ± 3.1 %, n = 13, P= 0.000244, 図 16A,C）。次に、100 Hz、100 発の刺激を与えると、同様の活動依存的な抑圧がより顕著に生じた。100 発目の応答は一発目の 73.2 ± 3.4%（n = 14）であった。ベラトリジンを 10 分間投与すると一発目の応答にほとんど効果がなかった（111.6 ± 4.8 %）が、100 発目はより強く抑制された（50.2 ± 8.2 %, n = 14, P= 0.000366, 図 16B,D）。

次に、刺激から軸索スパイクの頂点までの潜時について解析した。20 Hz、10 発の刺激では 10 発目の潜時が軽度に延長した（102.6 ± 1.1 %, n = 13, P= 0.000244, 図 16F）。さらに、100 Hz、100 発の刺激でも同様に、100 発目の潜時の延長が見られた（128.2 ± 4.5 % of control, n = 14, P= 0.000109, 図 16E,F）。ベラトリジンは 20 Hz 刺激に対する潜時の延長を促進したことから（114.1 ± 1.1 %, n = 13, P= 0.000244, 図 16F）、後脱分極は軸索スパイク発生までの潜時を延長すると考えられた。なお、100 Hz の刺激に対する応答はベラトリジンにより強く抑制され、正確な潜時の測定はできなかった（図 16E,F）。ここでみられた反復刺激による軸索スパイクの潜時の延長は、二発刺激を用いた図 12F での潜時の短縮とは逆の効果であった。

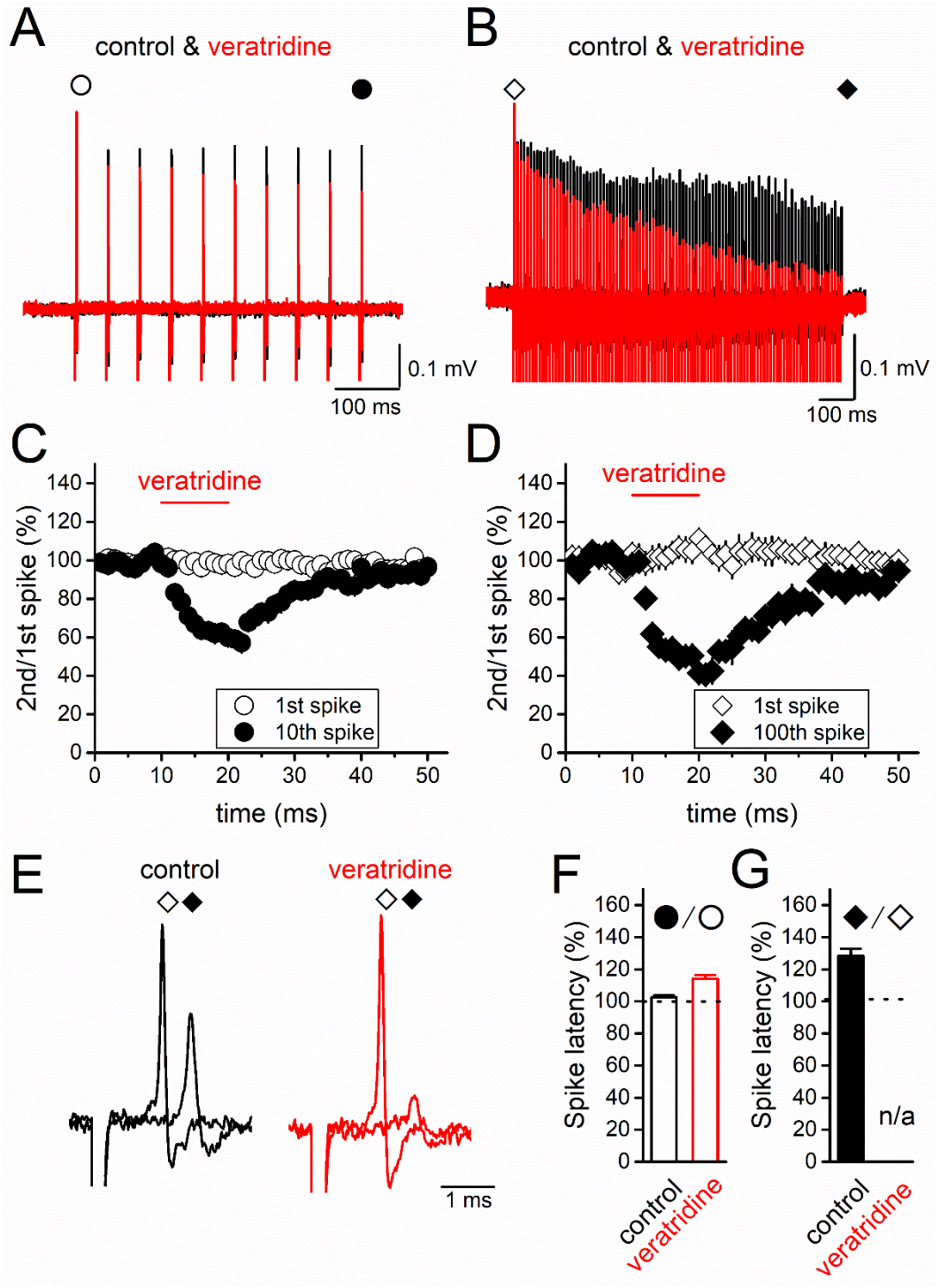


図 16. 反復刺激による軸索スパイクの抑圧とベラトリジンの効果

A, B. 20 Hz（A）、100 Hz（B）の反復刺激に対する軸索スパイクと 1 μM のベラトリジン投与後の波形の重ね書き。

C, D. 20 Hz（C）ないし 100 Hz（D）の軸索スパイクの振幅の時間経過。n = 13（20 Hz）または n = 14（100 Hz）。

E. コントロール（黒）とベラトリジン投与後（赤）の一発目（◇）と 100 発目の軸索スパイク（◆）の重ね書き。

F, G. コントロールとベラトリジン投与後における 20 Hz（F）、100 Hz（G）刺激時の軸索スパイクの潜時の変化。

6. PPD に対する低濃度 TTX の影響

これまでの結果から、ベラトリジンによって後脱分極の振幅が増加すると軸索スパイクの減弱が亢進することが示された。後脱分極と PPD の関係について更に検討するために、先行研究でヘルド萼状シナプスの軸索終末での後脱分極を消失することが報告されている低濃度の TTX の効果を調べた（Kim et al., 2010）。20 nM の TTX の投与は二発刺激に対する応答を軽度に抑制した（1 発目：90.8 ± 1.7%, P= 0.0156, 2 発目：92.8 ± 1.9 %, n = 7, P= 0.0156, 図 17A,C,D）。また、50 nM の TTX ではさらに強い抑制がみられた（1 発目：66.4 ± 3.6%, P= 0.00391, 2 発目：70.1 ± 2.4 %, n = 9, P= 0.00391, 図 17B,C,D）。20 nM の TTX は PPD を変化させなかった（コントロール：84.4 ± 3.6%, TTX：85.3 ± 3.6%, n = 7, P= 0.813, 図 17A,E）が、50 nM では PPD が減弱した（コントロール：82.3 ± 2.5%, TTX：88.6 ± 2.5%, n = 9, P= 0.0391, 図 17B,E）。これらの結果から、50 nM の TTX を用いることで後脱分極の振幅が減少し、PPD からの軽度回復をきたすと考えられた。

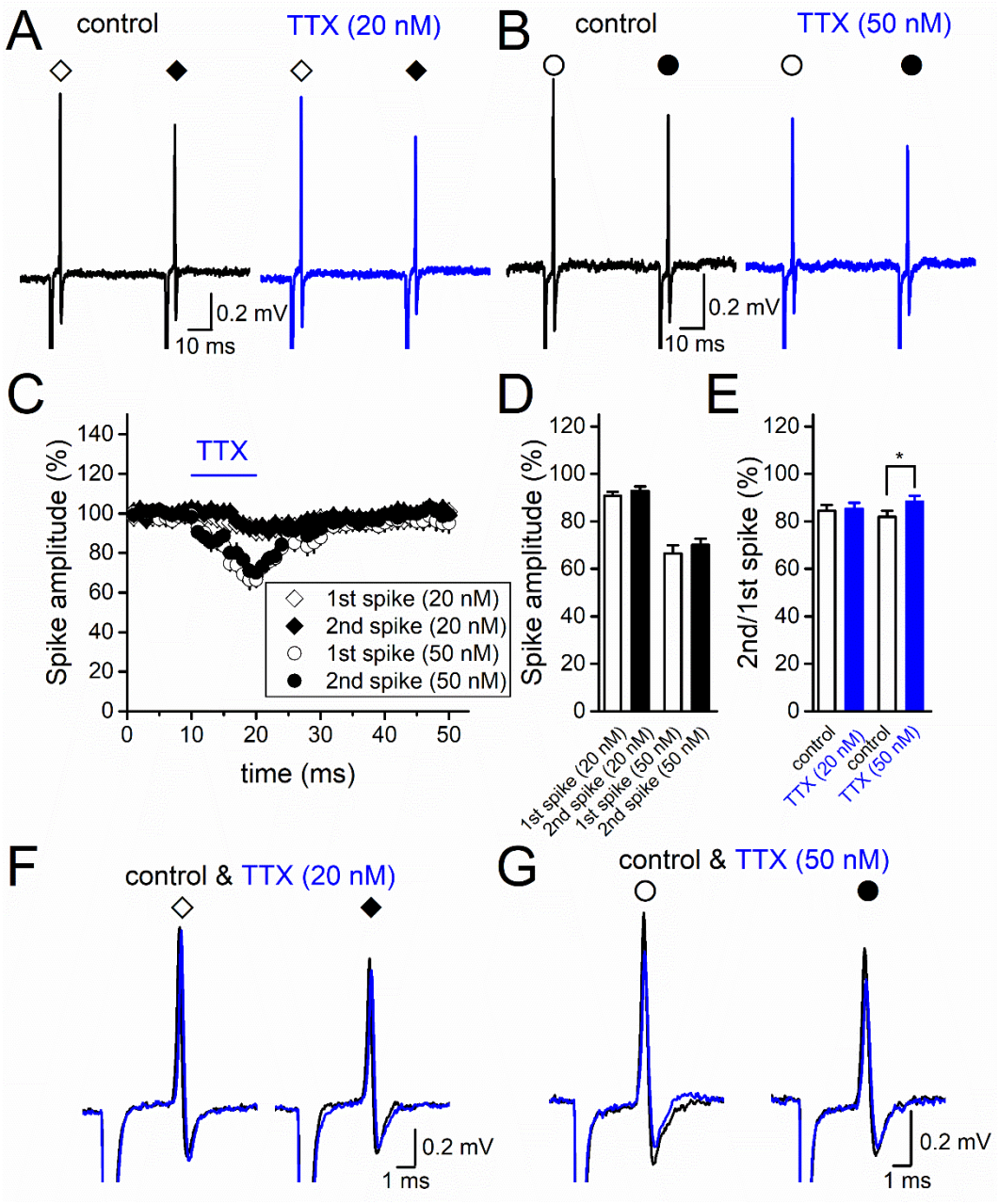


図 17. PPD に対する低濃度 TTX の効果

A, B. 20 nM（A）および 50 nM の TTX（B）の二発刺激応答に対する効果。

C. 軸索スパイクの振幅の時間経過。n = 7（20 nM）、n = 9（50 nM）。

D. 一発目と二発目の軸索スパイクに対する 20 ないし 50 nM の TTX の作用。

E. PPD に対する 20 ないし 50 nM の TTX の作用。*P< 0.05。

F, G. 20 nM（F）および 50 nM の TTX（G）を投与した際の一発目と二発目の軸索スパイクの重ね書き。

7. PPD に対する 4-AP の影響

電位依存性 K^+チャネルは活動電位の再分極相に関与しており、反復刺激による K^+チャネルの不活性化により活動電位幅の増加をきたす（Geiger and Jonas, 2000）。そこで、電位依存性 K^+チャネルを阻害することで、PPD が変調する可能性について検討した。電位依存性 K^+チャネルの阻害薬であり、苔状線維終末の活動電位の半値幅を増加させる 10 μM の 4-AP（Carta et al., 2014）を 10 分間、記録部位に投与した。一発目の軸索スパイクの振幅（86.1 ± 2.0 %, n = 9, P= 0.00781, 図 18A-C）および、二発目の軸索スパイクの振幅は有意に抑制された（65.3 ± 5.2 %, n = 9, P= 0.00391, 図 18A-C）。また、4-AP は PPD を亢進した（コントロール：80.3 ± 1.8%, 4-AP：61.6 ± 4.6%, n = 9, P= 0.00391, 図 18A,D）。これに加え、4-AP は軸索スパイクの半値幅を増加する作用が見られたことから（1 発目：112.6 ± 3.5 %, n = 9, P= 0.0117, 2 発目：138.9 ± 9.8 %, n = 9, P= 0.0117, 図 18E,F）、ベラトリジンとは異なる機構で PPD を亢進したと考えられた。

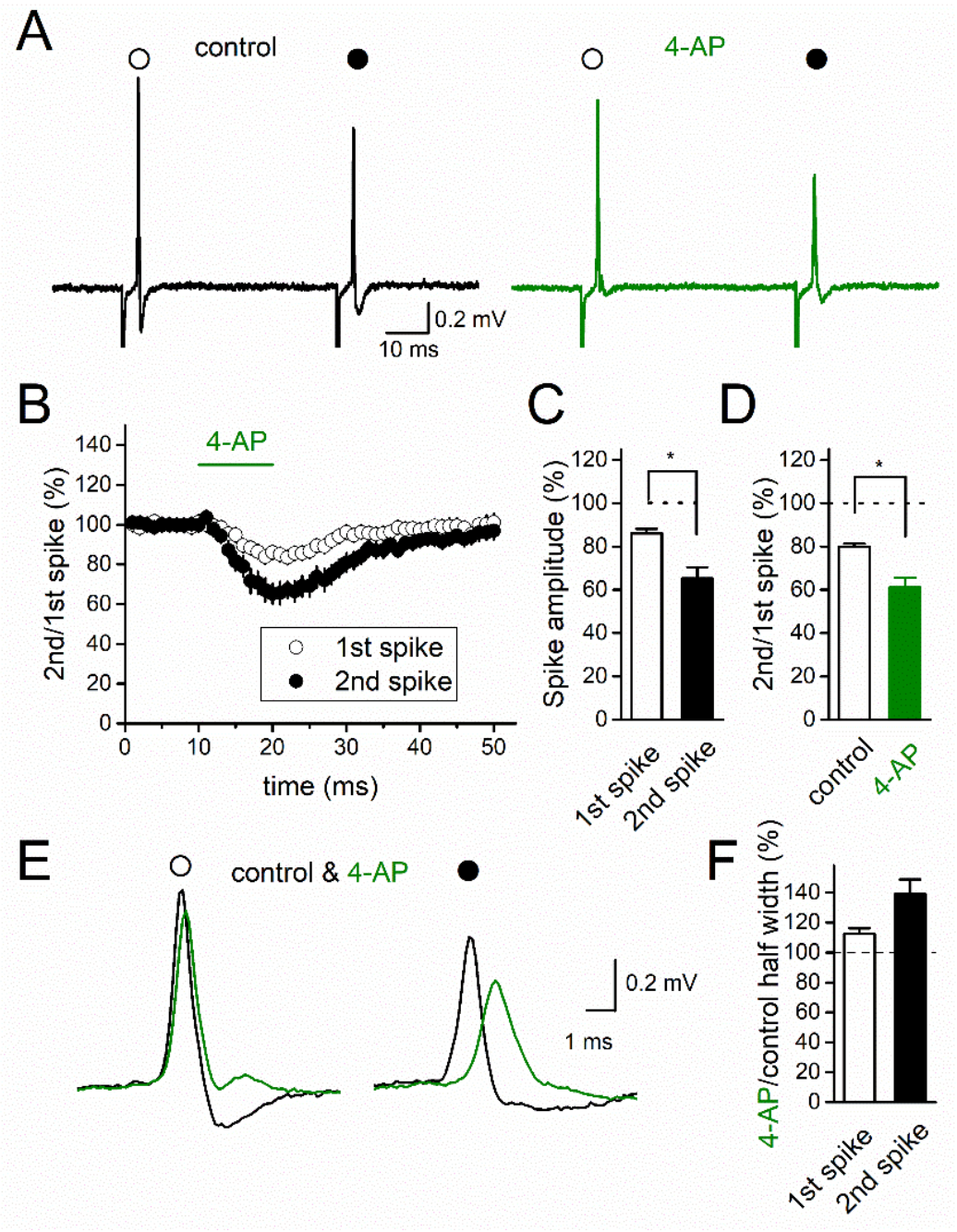


図 18. PPD に対する 4-AP の効果

A. コントロール（左）と 10 μM の 4-AP 投与時（右）の二発刺激による軸索スパイク。

B. 軸索スパイクの振幅の時間経過。

C. 一発目と二発目の軸索スパイクの振幅に対する 4-AP の効果。

D. PPD に対する 4-AP の効果。n = 9、*P < 0.05。

E. コントロール（黒）と 4-AP 投与時（緑）の一発目と二発目の軸索スパイクの重ね書き。

F. 4-AP 投与時の軸索スパイクの半値幅の変化。

考察

本研究では、活動依存的な軸索スパイクの抑圧現象を発見した。この軸索スパイクの抑圧の持続時間は、後脱分極の時間経過に相当した。また、後脱分極の振幅を薬理学的に操作することで、軸索スパイクの抑圧の程度が変化した。これらの結果から、軸索スパイクの抑圧は後脱分極によって制御されていると考えられた。

1. PPD における電位依存性 Na^+チャネルの不活性化の役割

本研究において、二発刺激によって軸索スパイクの振幅が軽度減弱する二発刺激抑圧（PPD）と呼ばれる現象を発見した。PPD は少なくとも 200 ms ほど持続することが示された。先行研究において、活動電位発生に主要な役割を果たす transient 型 Na^+チャネルが先行する活動電位により不活性化し、二発目の活動電位が減弱し PPD を生じることが培養海馬ニューロンの細胞体の活動電位について示されている（Brody and Yue et al., 2000; He et al., 2002）。しかしながら、苔状線維終末の電位依存性 Na^+チャネルの不活性化は 20 ms 以内に回復する（Engel and Jonas, 2005）。PPD の持続時間は 200 ms とこれよりも長いため、異なるメカニズムの関与が想定された。本研究では後脱分極の関与を想定して検討を行った。後脱分極の振幅を増加させるベラトリジンを投与すると、二発目の軸索スパイクの減弱が亢進することが示された。反復刺激時にはベラトリジンによる軸索スパイクの減弱効果は強くなることが示された。

一方で、低濃度の TTX が、PPD を軽度に回復させることを確認した。20 nM の TTX を投与するとヘルド萼状シナプスにおける後脱分極がほぼ消失する（Kim et al., 2010）。今回の実験では 20 nM の TTX では無効だが、50 nM の TTX は PPD を軽度に回復させることが確認された。これらの結果から、軸索スパイクの活動依存的な減弱現象には、後脱分極による電位依存性 Na^+チャネルの定常的な不活性化が関与することが考えられた。

また、後脱分極は軸索スパイク発生までの潜時を制御すると考えられた。二発刺激では、二発目の軸索スパイクの潜時は短縮した。軽度脱分極は transient 型 Na^+チャネルの活性化までの時間を短縮するため（Carter et al., 2012）、後脱分極に引き続く軸索スパイクの潜時を短縮したと考えられる。一方で、反復刺激により、軸索スパイクの潜時が延長した。反復刺激により transient 型 Na^+チャネルの不活性化の蓄積が強く生じるため（Klyachko et al., 2001, Leão and von Gersdorff, 2002）、軸索スパイクの潜時が延長したと考えられた。

2. PPD における電位依存性 K^+チャネルの役割

先行研究において反復刺激により活動電位幅の延長がおこることが報告されている（Geiger and Jonas, 2000）。これは反復刺激によって活動電位の再分極相をいたす電位依存性 K^+チャネルの不活性化が蓄積することによって生じるとされている。軸索スパイクの PPD に電位依存性 K^+チャネルの不活性化が与える影響について検討を行った。4-AP 感受性の K^+チャネルを阻害することで苔状線維の活動電位が延長することが報告されおり（Carta et al., 2014）、本研究においても 4-AP による軸索スパイクの延長が認められた。これに加え、4-AP は一発目と二発目の軸索スパイクの振幅を減弱させ、PPD を亢進することが示された。4-AP の投与によって生じる PPD の亢進は、活動電位の延長によって transient 型の Na^+チャネルの不活性化が強く起こることにより生じたと推定される。一方で第一章の結果 5 において、高濃度の 4-AP を投与した場合に、活動電位発生後の脱分極応答の持続時間の延長が確認された（図 9A）。4-AP 感受性の K^+チャネルの抑制が後脱分極の振幅を増加させた結果、PPD を亢進させたと考えられる。

結論

本研究において、活動依存的な軸索スパイクの抑圧現象を発見し、この機構に後脱分極による電位依存性 Na^+チャネルの定常的な不活性化が関与すると考えられた。

第三章　海馬苔状線維終末への Ca^{2+}流入に対する後脱分極の役割

緒言

本研究の第二章では、後脱分極が活動依存的な活動電位制御に与える影響について示した。一方で、後脱分極がシナプス伝達に与える影響についてはこれまで詳細が不明であった。

そこで本研究では、シナプス伝達効率に影響を与える軸索終末への Ca^{2+}の流入量に後脱分極が与える影響を検討するために、苔状線維終末からホールセル法を用いて、軸索終末部での Ca^{2+}電流を測定した。

実験方法

実験で用いた動物、器具、解析法は第一章に記載したものと同様である。異なる部分のみ記載する。

1. 苔状線維終末からのホールセル電位固定法による Ca^{2+}電流の測定

記録電極は電極内液を充填した状態で 8-14 MΩ になるように電極作成装置で作成した。記録電極は CsCl 145, $MgCl_2$ 2, Na_2ATP 2, NaGTP 0.3, Na_2-phosphocreatinine 5, HEPES 10, EGTA 10（CsOH で pH を 7.2 に調整した。単位は mM）からなる細胞内液で満たした。細胞外液には標準 aCSF を使用した。ホールセル形成直後に TTX 1 μM、tetraethylammonium chloride (TEA) 20 mM、4-AP 5 mM を記録領域周辺に投与した。上記の薬剤は、浸透圧を調整するために Na^+濃度を 20 mM を下げた aCSF に希釈して使用した。P/4 法を用いてリーク電流を差し引いた。膜電位の制御を正確に行うために、アクセス抵抗（57.2 ± 3.3 MΩ）を 50-70 %補正した後に記録を開始した。いくつかの記録ではテール電流の戻りの遅いものが存在した。これは膜電位の制御が不十分なために、近接した軸索や軸索終末において発生したスパイクを反映した応答が記録されたと考えられた（Geiger and Jonas, 2000; Bischofberger et al., 2002）。テール電流の減衰の時定数が 400 μs より長いものはこの可能性を考えて解析から除外した（Metz et al., 2005）。

実験結果

1. 二発刺激条件での活動電位半値幅の変化

第二章までの結果から、後脱分極が軸索スパイクの振幅を活動依存的に減弱させることが明らかになった。本章では、後脱分極が神経伝達に与える影響について検討するために、後脱分極が軸索終末への Ca^{2+}の流入量に与える影響について検討した。まず、二発刺激条件における活動電位波形の半値幅の変化について検討した。ホールセル法で記録された活動電位は、50 ms の刺激間隔までで二発目の半値幅の増加が確認された（10 ms, 113 ± 5 %, P = 0.00781; 20 ms, 110 ± 2 %, P = 0.00781; 50 ms, 104 ± 1 %, n = 8, P = 0.00781）が、100 ms では半値幅の増加は認められなかった（100 ms, 102 ± 1 %, P = 0.148, 図 19A,B）。先行研究では、反復刺激による半値幅の増加が報告されている（Geiger and Jonas, 2000）。今回の結果は、二発刺激条件のように少ない刺激回数でも半値幅が増加することを示している。

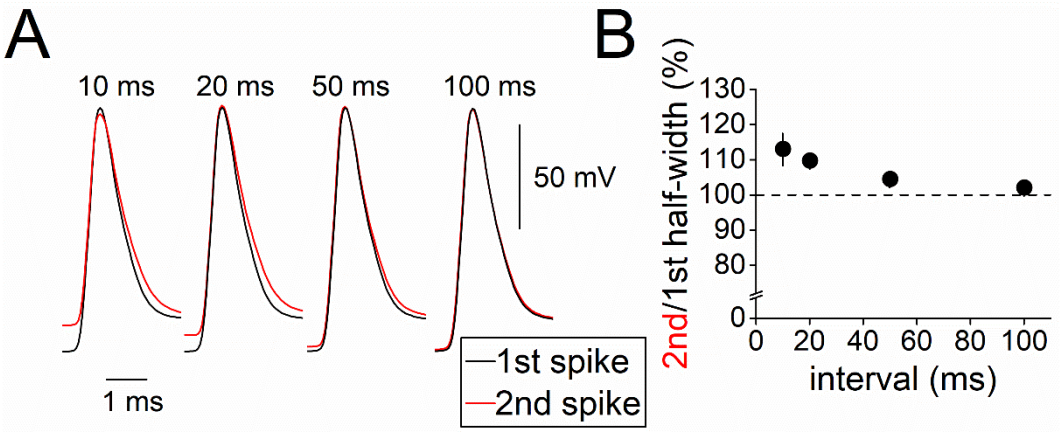


図 19. 二発刺激条件における活動電位半値幅の変化

A. 刺激間隔が 10, 20, 50, 100 ms の二発刺激による活動電位をホールセル法を用いて記録し、一発目と二発目の波形を重ね書きした。

B. 一発目に対する二発目の活動電位幅の比率。n = 8。

2. 軸索終末への Ca^{2+}の流入量に対する後脱分極の効果

最後に、後脱分極が軸索終末への Ca^{2+}の流入量に与える影響について検討を行った。苔状線維終末からの Ca^{2+}電流を記録するために、ホールセル形成後に-80 mV で膜電位固定を行い、記録領域に電位依存性 Na^{+}チャネル阻害薬の TTX（1 μM）と電位依存性 K^{+}チャネル阻害薬の TEA（20 mM）および 4-AP（5 mM）を 5 分間投与し Ca^{2+}電流を分離した。

まず、保持電位-80 mV から、10 mV 刻みの電位パルスを-70 mV から 50 mV まで 20 ms 間与えることで Ca^{2+}電流の電流電圧関係を調べた。約-40 mV から Ca^{2+}電流が活性化し、保持電位が 10 mV において最大値（134 ± 15 pA, n = 7, 図 20A,B）をとることが示された。これに加え、テール電流の電流電圧関係を測定した。この電流電圧関係はボルツマン関数でフィットすることが可能であり、傾き係数（slope factor）は 10.4 mV となることが示された。これは先行研究で報告されている苔状線維終末の Ca^{2+}電流の特徴と一致するものであった（Bischofberger et al., 2002; Li et al., 2007）。

次に、二発刺激時に Ca^{2+}の流入量がどのように変化するか検討した。図 19 において刺激間隔が 10 , 20 , 50 , 100 ms の二発刺激時に得られた活動電位波形を膜電位コマンドとして苔状線維終末に注入し、Ca^{2+}電流を誘発した。Ca^{2+}の流入量は Ca^{2+}電流波形の曲線下面積から計算した。刺激間隔が 10 ms の二発刺激の膜電位コマンドに応答して、二発目の Ca^{2+}の流入量は一発目のものに比べ軽度増加した（115.2 ± 8.5 %, n = 7, P= 0.0156, 図 20E）。また、Ca^{2+}電流の半値幅も増加した（117.8 ± 7.8 %, n = 7, P= 0.0156, 図 20F）。この二発目の Ca^{2+}の流入量の増加は刺激間隔が 50 ms まで認められ（20 ms, 119.4 ± 6.0 %, P= 0.0156; 50 ms, 110.3 ± 2.5 %, P = 0.0156）、100 ms では生じなかった（103.0 ± 2.7 %, P= 0.4688）。先行研究において、活動電位の半値幅の増加は Ca^{2+}の流入量を増加させると報告されている（Geiger and Jonas, 2000）。本研究においても、50 ms の刺激間隔までで活動電位の半値幅は軽度に増加した（図 19A,B）。そこで、この活動依存的な Ca^{2+}の流入量の増加が、活動電位の半値幅の増加によるのか、後脱分極によるのかについて検討した。活動電位の半値幅は図 19 において記録されたものと相同だが後脱分極のない波形を作成し、これを膜電位コマンドとして軸索終末部に注入した。その結果、10 ms から 100 ms のいずれの刺激間隔においても一発目に比べ二発目の Ca^{2+}の流入量に増加を認めず、50 ms の刺激間隔まででは逆に減少傾向を認めた（10 ms, 91.1 ± 3.3 %, n = 7, P= 0.0156; 20 ms, 97.9 ± 2.7 %, P= 0.0313; 50 ms, 99.8 ± 3.0 %, P= 0.0313; 100 ms, 104.6 ± 2.6 %, P= 1）。後脱分極を伴う膜電位コマンドで誘発された Ca^{2+}の流入量は、後脱分極を除いた膜電位コマンドを与えた場合に比べ有意に大きいことが示され、この傾向は刺激間隔が 50 ms よりも短い場合にみられた（10 ms, 125.9 ± 6.9 %, P= 0.0156; 20 ms, 122.5 ± 6.7 %, P= 0.0313; 50 ms, 110.8 ± 2.9 %, P= 0.0156; 100 ms, 98.6 ± 2.6 %, P= 0.688, 図 20E）。また、後脱分極を伴う膜電位コマンドで誘発された Ca^{2+}電流の半値幅は、後脱分極を除いた膜電位コマンドを与えた場合に比べ、刺激間隔が 50 ms よりも短い場合に有意に大きかった（10 ms, 114.6 ± 4.8 %, P= 0.0313; 20 ms, 110.9 ± 4.6 %, P= 0.0469; 50 ms, 103.9 ± 1.4 %, P= 0.0469; 100 ms, 100.2 ± 2.0 %, P= 1, 図 20F）。これらの結果か

ら、二発刺激条件で生じる活動電位幅の増加では Ca^{2+}の流入量に増加を生じないが、後脱分極は増加させることが示された。

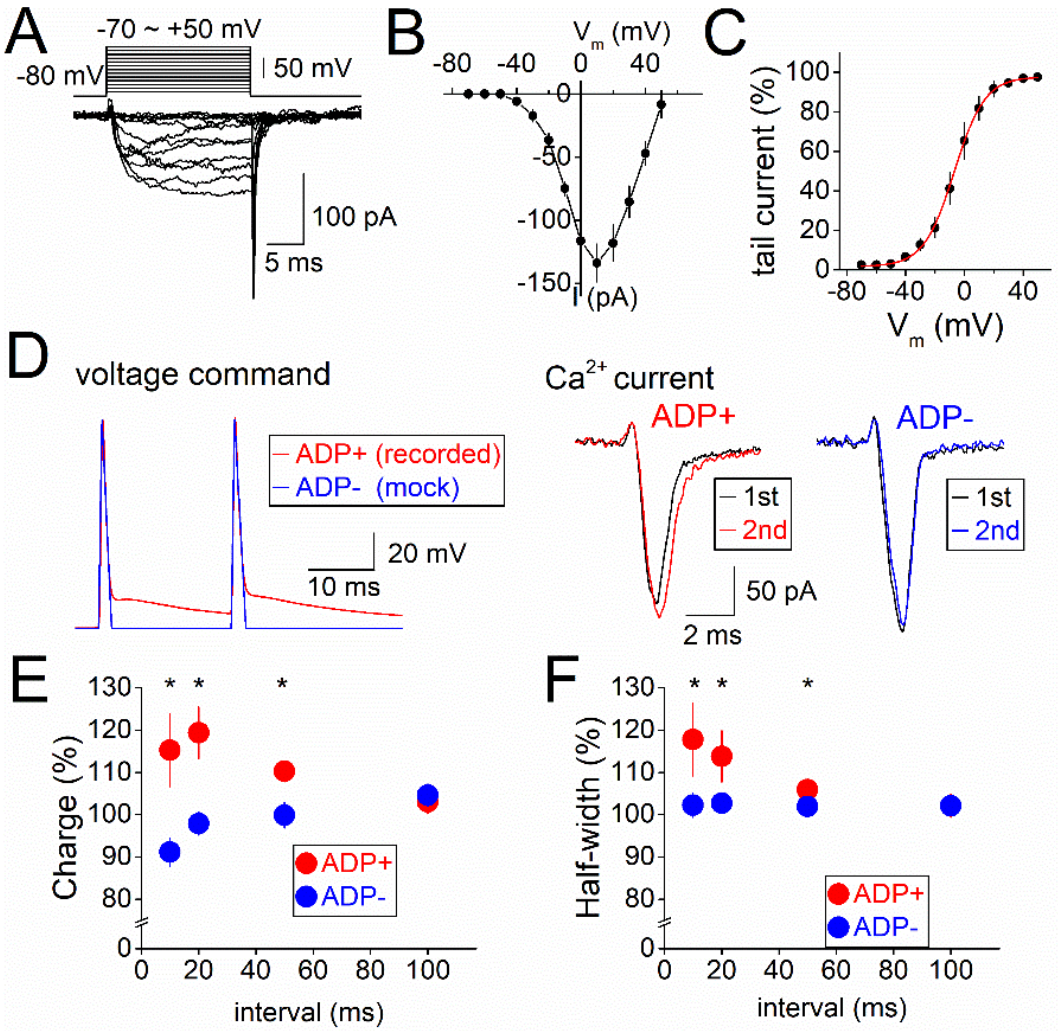


図 20. 軸索終末への Ca^{2+}の流入量に対する後脱分極が与える影響

A. 苔状線維終末における Ca^{2+}電流。Ca^{2+}電流は加算平均をしていない 1 試行分の波形を示す。

B. Ca^{2+}電流の電流電圧関係。

C. テール電流の電流電圧関係。

D. 苔状線維終末で記録した二発刺激応答（赤）と、後脱分極を抑止したコマンド電位（青）を与えた際の Ca^{2+}電流（右）。

E, F. Ca^{2+}の電荷流入量（E）および半値幅（F）。n = 7、* $P < 0.05$。

考察

後脱分極は短い間隔での二発刺激時において、軸索終末への Ca^{2+}の流入を有意に増加させることが示された。

1. 軸索終末への Ca^{2+}の流入量に対する後脱分極の効果

苔状線維終末の活動電位において、反復刺激による活動電位の半値幅の増加は Ca^{2+}の流入量を有意に増加させる（Geiger and Jonas, 2000; Bischofberger et al., 2002）。これに加え、本研究では後脱分極により Ca^{2+}の流入量を増加させる可能性が示された。この活動依存性の調整メカニズムは、小脳プルキンエ細胞の軸索においても報告されている（Zorrilla de San Martin et al., 2017）。Ca^{2+}の流入量の増加機構として、以下のメカニズムが推定される。海馬苔状線維終末においては、P/Q 型、N 型、R 型と呼ばれる電位依存性 Ca^{2+}チャネルが共発現し、軸索終末への Ca^{2+}の流入を引き起こすとされている（Li et al., 2007）。これらの Ca^{2+}チャネルは-30～-20 mV に活性化の閾値を持つ。後脱分極という閾値下の脱分極は、Ca^{2+}チャネルの開口確率を増加させると推定される（Christie et al., 2011, Zorrilla de San Martin et al., 2017）。そのため、後脱分極に引き続く二発目の活動電位は一発目の活動電位に比べ電位依存性 Ca^{2+}チャネルを開口しやすくし、Ca^{2+}の流入量に促通をきたす可能性が考えられた。

一方で、ヘルド萼状シナプスの軸索終末においては、後脱分極が Ca^{2+}の流入量に影響を与えないとする報告がなされている（Clarke et al., 2016）。後脱分極に対する Ca^{2+}の流入量の違いは、苔状線維終末とヘルド萼状シナプスの軸索終末間での後脱分極の振幅の違い（Sierksma and Borst, 2017）や苔状線維終末の電位依存性 Ca^{2+}チャネルの活性化の閾値がより脱分極側に存在すること（Borst and Sakmann, 1998; Li et al., 2007）が想定されるが、詳細は不明である。

2. 後脱分極がシナプス伝達強度の変調に与える影響

軸索終末への Ca^{2+}の流入量の増加は神経伝達物質の放出量を増加させ、シナプス強度を変化させる（Zucker and Regehr, 2002）。多くのシナプスにおいて、反復刺激によりシナプス強度が一時的に変化する短期シナプス可塑性と呼ばれる現象が確認されている（Salin et al., 1996; Zucker and Regehr, 2002）。今回の研究で観察された後脱分極による Ca^{2+}の流入量の増加は、短期シナプス可塑性を調節するメカニズムの一つである可能性が示唆された。

近年、軸索終末の膜電位の変化が Ca^{2+}の流入量を変化させ、シナプス強度を変調させると報告されている（Shu et al., 2006; Christie et al., 2011; Bialowas et al.,

2015）。一方で、軸索終末の Ca^{2+}の流入量非依存的に神経伝達に影響を与える報告もされている（Alle and Geiger, 2006; Scott et al., 2008）。後脱分極がシナプス強度に対して与える影響を検討するために、今後、軸索終末と後細胞からの同時記録法を用いた更なる検討が必要である（Vyleta and Jonas, 2014; Midorikawa and Sakaba, 2017）。

結論

後脱分極は、二発刺激条件時に軸索終末部への Ca^{2+}の流入量を増加させる作用をもつことが示された。

総括および結論

①本研究全体から得られた知見

1.　マウス海馬の苔状線維終末からホールセル法、ルースパッチクランプ法を用いて軸索活動電位の直接記録を確立した（図 21A）。

2.　ホールセル電流固定法にて後脱分極を記録した。後脱分極の発生には軸索膜の容量性放電による成分と電位依存性 Na^+チャネル、K^+チャネルが関与すると考えられた（図 21B）。

3.　軸索膜の容量性放電による成分は、近位軸索から受動的な性質に従って伝わってきた減衰した活動電位を反映すると推定した。

4.　ルースパッチクランプ法で記録された軸索スパイクの振幅は、反復刺激により減少することを示した（図 21C）。

5.　軸索スパイクの振幅の減少には、後脱分極による Na^+チャネルの定常的な不活性化が関与すると考えられた。

6.　後脱分極は引き続く活動電位による軸索終末部への Ca^{2+}の流入量を増加させることが示された（図 21D）。

②本研究の意義

・これまで解明されていなかった、海馬苔状線維終末での後脱分極の発生機構を明らかにした。

・後脱分極による活動電位の抑圧現象と軸索終末への Ca^{2+}流入の促進を明らかにした。

③今後の研究展開

・後脱分極発生に関与する電位依存性 Na^+チャネルのタイプについて検証する。

・軸索終末とシナプス後細胞との同時記録を行い、後脱分極がシナプス伝達強度に与える影響を検討する。

④今後の課題

・容量性成分の伝播機序を実験的に証明するために、局所的なチャネルの操作が可能な新規の薬剤や光操作法を確立する。

・単一軸索から軸索活動電位の二点同時記録を行うことによって、活動電位の受動的な伝播機構について実験的な解明を行う。

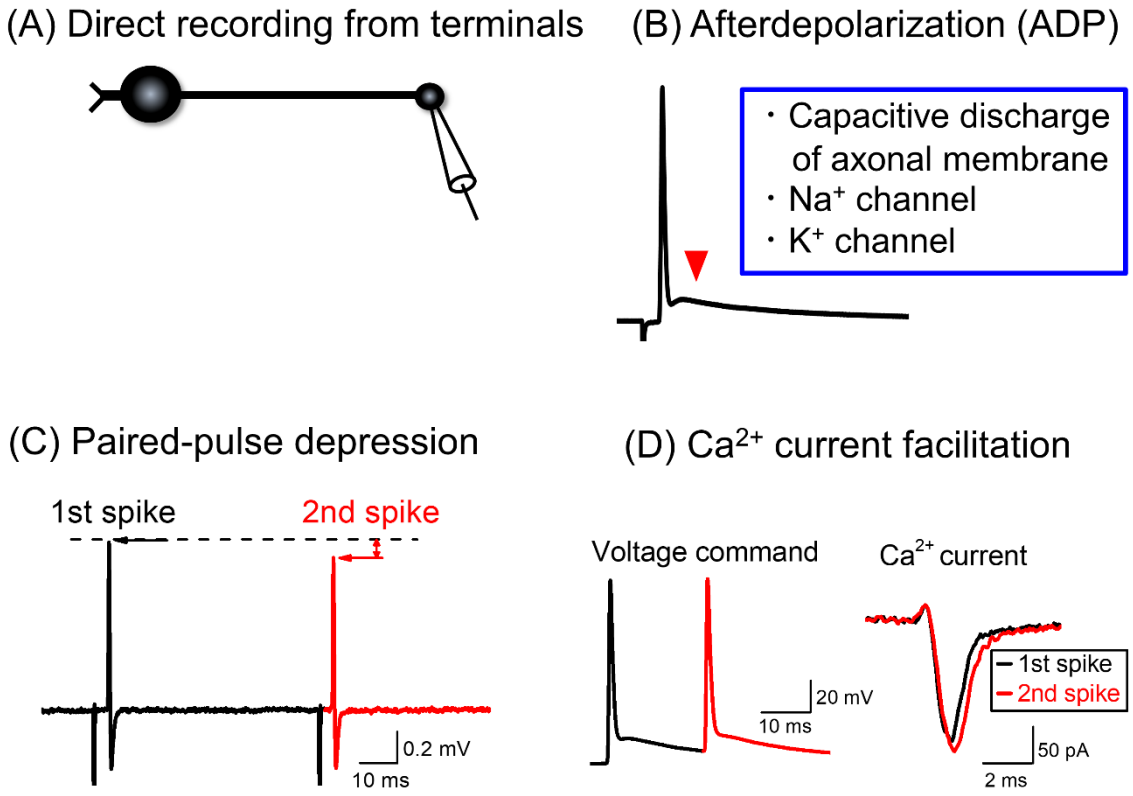

(A) Direct recording from terminals
(B) Afterdepolarization (ADP)
・Capacitive discharge of axonal membrane
・Na+ channel
・K+ channel
(C) Paired-pulse depression
1st spike
2nd spike
0.2 mV
10 ms
(D) Ca2+ current facilitation
Voltage command
Ca2+ current
20 mV
10 ms
1st spike
2nd spike
50 pA
2 ms

図 21. 本研究のまとめ

謝辞

博士学位論文を終えるに当たり、本研究の機会を与えてくださいますと共に、学部時代より終始ご指導賜り、研究手法のみならず研究に対する姿勢などたくさんのことをご指導くださいました北海道大学大学院医学研究院神経生物学教室 神谷温之教授に深く感謝いたします。

第三章の Ca^{2+}電流の測定は、京都大学産官学連携本部 川口真也准教授にご指導いただきました。感謝いたします。

研究及び様々な面で大変お世話になりました、北海道大学大学院医学研究院神経生物学教室の皆さまに厚く御礼申し上げます。

また、公益財団法人武田科学振興財団の医学部博士課程奨学助成を頂き、大学院の期間中、研究活動に集中することができました。感謝いたします。

最後に、長い学生生活および研究生活を支え続けてくれた両親、妻に感謝いたします。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Acsády, L., Kamondi, A., Sík, A., Freund, T., and Buzsáki, G. (1998). GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. J. Neurosci. 18, 3386-3403.

Adrian, E.D. (1914). The all-or-none principle in nerve. J. Physiol. 47, 460-474.

Alessi, C., Raspanti, A., and Magistretti, J. (2016). Two distinct types of depolarizing afterpotentials are differentially expressed in stellate and pyramidal-like neurons of entorhinal-cortex layer II. Hippocampus 26, 380-404.

Alle, H., and Geiger, J.R. (2006). Combined analog and action potential coding in hippocampal mossy fibers. Science 311, 1290-1293.

Alle, H., and Geiger, J.R. (2007). GABAergic spill-over transmission onto hippocampal mossy fiber boutons. J. Neurosci. 27, 942-950.

Alle H, Ostroumov K, Geiger J & Storm JF (2009). M-current, persistent Na^+ current, and subthreshold resonance recorded in mossy fiber boutons (MFBs) in rat hippocampus. Society for Neuroscience, Program No. 42.2/D10.

Alle, H., Kubota, H., and Geiger, J.R. (2011). Sparse but highly efficient Kv3 outpace BK_{Ca} channels in action potential repolarization at hippocampal mossy fiber boutons. J. Neurosci. 31, 8001-8012.

Barrett, E.F., and Barrett, J.N. (1982). Intracellular recording from vertebrate myelinated axons: mechanism of the depolarizing afterpotential. J. Physiol. 323, 117-144.

Bean, B.P. (2007). The action potential in mammalian central neurons. Nat. Rev. Neurosci. 8, 451-465.

Begum, R., Bakiri, Y., Volynski, K.E., and Kullmann, D.M. (2016). Action potential broadening in a presynaptic channelopathy. Nat. Commun. 7, 12102.

Bialowas, A., Rama, S., Zbili, M., Marra, V., Fronzaroli-Molinieres, L., Ankri, N., Carlier, E., and Debanne, D. (2015). Analog modulation of spike-evoked transmission in CA3 circuits is determined by axonal Kv1.1 channels in a time-dependent manner. Eur. J. Neurosci. 41, 293-304.

Bischofberger, J., Engel, D., Li, L., Geiger, J.R., and Jonas, P. (2006). Patch-clamp recording from mossy fiber terminals in hippocampal slices. Nat. Protoc. 1, 2075-2081.

Bischofberger, J., Geiger, J.R., and Jonas, P. (2002). Timing and efficacy of Ca^{2+} channel activation in hippocampal mossy fiber boutons. J. Neurosci. 22, 10593-10602.

Borst, J.G., Helmchen, F., and Sakmann, B. (1995). Pre- and postsynaptic whole-cell recordings in the medial nucleus of the trapezoid body of the rat. J. Physiol. 489, 825-840.

Borst, J.G., and Sakmann, B. (1998). Calcium current during a single action potential in a large presynaptic terminal of the rat brainstem. J. Physiol. 506, 143-157.

Brody, D.L., and Yue, D.T. (2000). Release-independent short-term synaptic depression in cultured hippocampal neurons. J. Neurosci. 20, 2480-2494.

Brown, J.T., and Randall, A.D. (2009). Activity-dependent depression of the spike after-depolarization generates long-lasting intrinsic plasticity in hippocampal CA3 pyramidal neurons. J. Physiol. 587, 1265-1281.

Carta, M., Lanore, F., Rebola, N., Szabo, Z., Da Silva, S.V., Lourenço, J., Verraes, A., Nadler, A., Schultz, C., Blanchet, C., et al. (2014). Membrane lipids tune synaptic transmission by direct modulation of presynaptic potassium channels. Neuron 81, 787-799.

Carter, B.C., Giessel, A.J., Sabatini, B.L., and Bean, B.P. (2012). Transient sodium current at subthreshold voltages: activation by EPSP waveforms. Neuron 75, 1081-1093.

Castelli, L., Nigro, M.J., and Magistretti, J. (2007). Analysis of resurgent sodium-current expression in rat parahippocampal cortices and hippocampal formation. Brain Res. 1163, 44-55.

Christie, J.M., Chiu, D.N., and Jahr, C.E. (2011). Ca^{2+} dependent enhancement of release by subthreshold somatic depolarization. Nat. Neurosci. 14, 62-68.

Clarke, S.G., Scarnati, M.S., and Paradiso, K.G. (2016). Neurotransmitter release can be stabilized by a mechanism that prevents voltage changes near the end of action potentials from affecting calcium currents. J. Neurosci. 36, 11559-11572.

Cole, K.S. (1968). Membranes, ions, and impulses: A chapter of classical biophysics (Oakland, USA: Cambridge U.P.).

Collins, C.A., and Rojas, E. (1982). Temperature dependence of the sodium channel gating kinetics in the node of Ranvier. Q. J. Exp. Physiol. 67, 41-55.

D'Ascenzo, M., Podda, M.V., Fellin, T., Azzena, G.B., Haydon, P., and Grassi, C. (2009). Activation of mGluR5 induces spike afterdepolarization and enhanced excitability in medium spiny neurons of the nucleus accumbens by modulating persistent Na^{+} currents. J. Physiol. 587, 3233-3250.

David, G., Modney, B., Scappaticci, K.A., Barrett, J.N., and Barrett, E.F. (1995). Electrical and morphological factors influencing the depolarizing after-potential in rat and lizard myelinated axons. J. Physiol. 489, 141-157.

Debanne, D., Campanac, E., Bialowas, A., Carlier, E., and Alcaraz, G. (2011). Axon physiology. Physiol. Rev. 91, 555-602.

Dodson, P.D., Billups, B., Rusznák, Z., Szûcs, G., Barker, M.C., and Forsythe, I.D. (2003). Presynaptic rat Kv1.2 channels suppress synaptic terminal hyperexcitability following action potential invasion. J. Physiol. 550, 27-33.

Engel, D., and Jonas, P. (2005). Presynaptic action potential amplification by voltage-gated Na^+ channels in hippocampal mossy fiber boutons. Neuron 45, 405-417.

Epsztein, J., Sola, E., Represa, A., Ben-Ari, Y., and Crépel, V. (2010). A selective interplay between aberrant $EPSP_{KA}$ and I_{NaP} reduces spike timing precision in dentate granule cells of epileptic rats. Cereb. Cortex 20, 898-911.

Forsythe, I.D. (1994). Direct patch recording from identified presynaptic terminals mediating glutamatergic EPSCs in the rat CNS, in vitro. J. Physiol. 479, 381-387.

Gasparini, S., Kasyanov, A.M., Pietrobon, D., Voronin, L.L., and Cherubini, E. (2001). Presynaptic R-type calcium channels contribute to fast excitatory synaptic transmission in the rat hippocampus. J. Neurosci. 21, 8715-8721.

Geiger, J.R., Bischofberger, J., Vida, I., Fröbe, U., Pfitzinger, S., Weber, H.J., Haverkampf, K., and Jonas, P. (2002). Patch-clamp recording in brain slices with improved slicer technology. Pflügers Arch. 443, 491-501.

Geiger, J.R., and Jonas, P. (2000). Dynamic control of presynaptic Ca^{2+} inflow by fast-inactivating K^+ channels in hippocampal mossy fiber boutons. Neuron 28, 927-939.

Ghitani, N., Bayguinov, P.O., Basso, M.A., and Jackson, M.B. (2016). A sodium afterdepolarization in rat superior colliculus neurons and its contribution to population activity. J. Neurophysiol. 116, 191-200.

Gu, N., Vervaeke, K., Hu, H., and Storm, J.F. (2005). Kv7/KCNQ/M and HCN/h, but not $K_{Ca}2$/SK channels, contribute to the somatic medium after-

hyperpolarization and excitability control in CA1 hippocampal pyramidal cells. J. Physiol. 566, 689-715.

He, Y., Zorumski, C.F., and Mennerick, S. (2002). Contribution of presynaptic Na^+ channel inactivation to paired-pulse synaptic depression in cultured hippocampal neurons. J. Neurophysiol. 87, 925-936.

Hines, M.L., and Carnevale, N.T. (1997). The NEURON simulation environment. Neural Comput. 9, 1179-1209.

Hodgkin, A.L., and Huxley, A.F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. J. Physiol. 117, 500-544.

Jackson, M.B., Konnerth, A., and Augustine, G.J. (1991). Action potential broadening and frequency-dependent facilitation of calcium signals in pituitary nerve terminals. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 88, 380-384.

Kamiya, H. (2012). Photochemical inactivation analysis of temporal dynamics of postsynaptic native AMPA receptors in hippocampal slices. J. Neurosci. 32, 6517-6524.

Kamiya, H., Ozawa, S., and Manabe, T. (2002). Kainate receptor-dependent short-term plasticity of presynaptic Ca^{2+} influx at the hippocampal mossy fiber synapses. J. Neurosci. 22, 9237-9243.

Kim, J.H., Kushmerick, C., and von Gersdorff, H. (2010). Presynaptic resurgent Na^+ currents sculpt the action potential waveform and increase firing reliability at a CNS nerve terminal. J. Neurosci. 30, 15479-15490.

Klyachko, V.A., Ahern, G.P., and Jackson, M.B. (2001). cGMP-mediated facilitation in nerve terminals by enhancement of the spike afterhyperpolarization. Neuron 31, 1015-1025.

Kole, M.H. (2011). First node of Ranvier facilitates high-frequency burst encoding. Neuron 71, 671-682.

Kole, M.H., Ilschner, S.U., Kampa, B.M., Williams, S.R., Ruben, P.C., and Stuart, G.J. (2008). Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment. Nat. Neurosci. 11, 178-186.

Leão, R.M., and von Gersdorff, H. (2002). Noradrenaline increases high-frequency firing at the calyx of Held synapse during development by inhibiting glutamate release. J. Neurophysiol. 87, 2297-2306.

Li, L., Bischofberger, J., and Jonas, P. (2007). Differential gating and recruitment of P/Q-, N-, and R-type Ca^{2+} channels in hippocampal mossy fiber boutons. J. Neurosci. 27, 13420-13429.

Martinello, K., Huang, Z., Lujan, R., Tran, B., Watanabe, M., Cooper, E.C., Brown, D.A., and Shah, M.M. (2015). Cholinergic afferent stimulation induces axonal function plasticity in adult hippocampal granule cells. Neuron 85, 346-363.

Meeks, J.P., Jiang, X., and Mennerick, S. (2005). Action potential fidelity during normal and epileptiform activity in paired soma-axon recordings from rat hippocampus. J. Physiol. 566, 425-441.

Metz, A.E., Jarsky, T., Martina, M., and Spruston, N. (2005). R-type calcium channels contribute to afterdepolarization and bursting in hippocampal CA1 pyramidal neurons. J. Neurosci. 25, 5763-5773.

Midorikawa, M., and Sakaba, T. (2017). Kinetics of releasable synaptic vesicles and their plastic changes at hippocampal mossy fiber synapses. Neuron 96, 1033-1040.

Paradiso, K., and Wu, L.G. (2009). Small voltage changes at nerve terminals travel up axons to affect action potential initiation. Nat. Neurosci. 12, 541-543.

R Core Team. (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. (http://www.R-project.org/.)

Rall, W. (1969). Time constants and electrotonic length of membrane cylinders and neurons. Biophys. J. 9, 1483-1508.

Rama, S., Zbili, M., Bialowas, A., Fronzaroli-Molinieres, L., Ankri, N., Carlier, E., Marra, V., and Debanne, D. (2015). Presynaptic hyperpolarization induces a fast analogue modulation of spike-evoked transmission mediated by axonal sodium channels. Nat. Commun. 6, 10163.

Raman, I.M., and Bean, B.P. (1997). Resurgent sodium current and action potential formation in dissociated cerebellar Purkinje neurons. J. Neurosci. 17, 4517-4526.

Salin, P.A., Scanziani, M., Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. (1996). Distinct short-term plasticity at two excitatory synapses in the hippocampus. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 93, 13304-13309.

Sasaki, T., Matsuki, N., and Ikegaya, Y. (2011). Action-potential modulation during axonal conduction. Science 331, 599-601.

Schmidt-Hieber, C., Jonas, P., and Bischofberger, J. (2008). Action potential initiation and propagation in hippocampal mossy fibre axons. J. Physiol. 586, 1849-1857.

Schwartzkroin, P.A. (1975). Characteristics of CA1 neurons recorded intracellularly in the hippocampal in vitro slice preparation. Brain Res. 85, 423-436.

Scott, R., Ruiz, A., Henneberger, C., Kullmann, D.M., and Rusakov, D.A. (2008). Analog modulation of mossy fiber transmission is uncoupled from changes in presynaptic Ca^{2+}. J. Neurosci. 28, 7765-7773.

Shu, Y., Hasenstaub, A., Duque, A., Yu, Y., and McCormick, D.A. (2006). Modulation of intracortical synaptic potentials by presynaptic somatic membrane potential. Nature 441, 761-765.

Sierksma, M.C., and Borst, J.G.G. (2017). Resistance to action potential depression of a rat axon terminal in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 114, 4249-4254.

Storm, J.F. (1987). Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. J. Physiol. 385, 733-759.

Szabadics, J., and Soltesz, I. (2009). Functional specificity of mossy fiber innervation of GABAergic cells in the hippocampus. J. Neurosci. 29, 4239-4251.

Ting, J.T., Daigle, T.L., Chen, Q., and Feng, G. (2014). Acute brain slice methods for adult and aging animals: application of targeted patch clamp analysis and optogenetics. Methods Mol. Biol. 1183, 221-242.

Uchida, T., Fukuda, S., and Kamiya, H. (2012). Heterosynaptic enhancement of the excitability of hippocampal mossy fibers by long-range spill-over of glutamate. Hippocampus 22, 222-229.

Ulbricht, W. (1998). Effects of veratridine on sodium currents and fluxes. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 133, 1-54.

Vyleta, N.P., and Jonas, P. (2014). Loose coupling between Ca^{2+} channels and release sensors at a plastic hippocampal synapse. Science 343, 665-670.

Yue, C., Remy, S., Su, H., Beck, H., and Yaari, Y. (2005). Proximal persistent Na^{+} channels drive spike afterdepolarizations and associated bursting in adult CA1 pyramidal cells. J. Neurosci. 25, 9704-9720.

Yue, C., and Yaari, Y. (2004). KCNQ/M channels control spike afterdepolarization and burst generation in hippocampal neurons. J. Neurosci. 24, 4614-4624.

Zorrilla de San Martin, J., Trigo, F.F., and Kawaguchi, S.Y. (2017). Axonal $GABA_A$ receptors depolarize presynaptic terminals and facilitate transmitter release in cerebellar Purkinje cells. J. Physiol. 595, 7477-7493.

Zucker, R.S., and Regehr, W.G. (2002). Short-term synaptic plasticity. Annu. Rev. Physiol. 64, 355-405.