

主論文の要旨

**Tonotopic variation of the T-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in avian  
auditory coincidence detector neurons**

鳥類聴覚同時検出器ニューロンにおける  
周波数領域依存的な T 型カルシウムチャネルの発現と役割

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻

細胞科学講座 細胞生理学分野

(指導：久場 博司 教授)

深谷 亮太

## 【緒言】

私たちが音の方向を特定（音源定位）する際の手がかりとして、左右の耳に届く音の時間差（両耳間時差：ITD）が知られている。ITDは、脳幹の聴覚神経回路で活動するニューロンの位置としてコードされ、これはニューロンが左右の耳からの興奮性入力のを同時に正確に検出することにより実現される。したがって、ITD 検出の仕組みを理解するためには、このニューロンで EPSP の大きさや時間経過、さらに活動電位の発生がどのように制御されているのかを明らかにすることが重要である。

鳥類、特にニワトリは、ヒトが ITD を利用する周波数帯域（<3 kHz）と近い可聴周波数帯域（0.2-4 kHz）をもつため、ITD 検出機構を調べるモデル系として広く使われている。鳥類における ITD の検出は、層状核（NL）と呼ばれる哺乳類の内側上オリブ核と相同の神経核で行われる。一方、NL には周波数局在構造があり、個々の NL ニューロンは特定の音周波数（特徴周波数、CF）に強く応答する性質をもつ。さらに、NL ニューロンは CF に応じて細胞の構造的な特徴や電位依存性チャンネルの発現が異なる。たとえば、低い（low）CF（<1 kHz）のニューロンは、より高い（high/middle）CF（>1 kHz）のニューロンと比べて、樹状突起が長く、また活動電位の発生場である軸索起始部（AIS）は細胞体の近くに分布する。こうした違いは、NL が様々な周波数の音に対して精度の高い ITD 検出を行う上で重要だと考えられている。

T 型  $\text{Ca}^{2+}$ （CaT）チャンネルは静止膜電位付近で一過性に活性化する電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルで、様々な神経細胞の樹状突起や AIS に発現する。CaT チャンネルは、NL ニューロンにも発現している。しかしながら、その細胞内局在、CF に応じた違い、さらにその生理学的な意義については明らかでない。そこで本研究では、NL における CaT チャンネルの発現とその EPSP や活動電位発生に及ぼす効果を電気生理学的に調べることで、ITD 検出における CaT チャンネルの役割を検討した。

## 【対象及び方法】

ふ化後ニワトリの脳幹から急性スライス標本を作製し、ホールセルパッチクランプ記録と 2 光子励起顕微鏡を用いた  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを、NL ニューロンから行った。

## 【結果】

### (1) NL における CF に応じた CaT チャンネルの発現

電流固定下に各 CF の NL ニューロンへ過分極通電を行ったところ、通電直後に一過性の脱分極応答（リバウンド電位）が見られた（図 1A）。リバウンド電位は high/middle-CF ニューロンと比べて、low-CF ニューロンで顕著であった（図 1A、矢印）。このリバウンド電位は電位依存性  $\text{Na}^+$  チャンネル、HCN チャンネルを阻害してもみられ、さらに、CaT チャンネルの特異的な阻害剤（TTA-P2）により大きく減弱した（図 1B）。このようなリバウンド電位を示す細胞は、low-CF ニューロンに特徴的な長い樹状突起をもっていたことから（図 1C）、CaT チャンネルは low-CF ニューロンに多く存在することが示唆された。

次に、電位固定下で  $\text{Ca}^{2+}$  電流を測定したところ、特に low-CF ニューロンにおいて、

低い電位 (-65 mV 付近) で活性化する一過性の CaT 電流が大きく (図 1D)、このことは電流固定下での所見と一致する。CaT 電流は数 ms で活性化したのち、10-20 ms かけて不活性化した。また、CaT 電流は-60 mV より過分極で不活性化から回復したことから (図 1E)、low-CF ニューロンの CaT チャネルは静止膜電位付近で活性化し得ると考えられた。

## (2) Low-CF NL ニューロンにおける CaT チャネルの局在

Ca<sup>2+</sup>感受性の蛍光色素を電極内液に加えて、2光子励起顕微鏡下で Ca<sup>2+</sup>イメージングを行った。Low-CF ニューロンにおいて細胞体への通電により活動電位を誘発したところ、樹状突起と軸索の AIS に相当する部分に、活動電位に伴う一過性の Ca<sup>2+</sup>流入が生じた (図 1F)。これらの Ca<sup>2+</sup>流入は TTA-P2 によってほぼ半減したことから (図 1F)、CaT チャネルは low-CF ニューロンの樹状突起と AIS に分布すると考えられた。

## (3) Low-CF NL ニューロンにおける CaT 電流の EPSP・活動電位に対する影響

まず、CaT 電流が EPSP の振幅にどのように影響するかを、TTA-P2 を用いて薬理的に検討した。片側からの興奮性入力線維を刺激して、EPSP と興奮性シナプス電流 (EPSC) を記録した (図 2A-F)。単発の刺激を行ったときに TTA-P2 を加えたところ、EPSC の振幅はほとんど変わらなかったのに対し、EPSP は減弱した (図 2A)。この効果は 10 mV 以下の小さな EPSP でもみられた (図 2B、C)。このことは、low-CF ニューロンにおいて、CaT 電流が EPSP により活性化し、脱分極を増強することを示している。

NL ニューロンは音の位相に同期した興奮性入力を受ける。そこで、より生理的な条件として、連続する EPSP に対する CaT 電流の増強効果を調べた。閾値以下の刺激を与えたとき、通電開始直後の EPSP では増強が見られたものの、引き続く相の EPSP ではそれがみられなかった (図 2D)。この理由としては、シナプス抑圧により EPSC が徐々に減少することに加え、繰り返す脱分極により CaT 電流が不活性化する可能性が考えられた。実際に、各相での電流の大きさが一定になるような正弦波を通電した場合も、同じように開始直後でのみ CaT 電流による増強がみられた (図 2E)。

EPSP で活性化する CaT 電流は、活動電位の発生確率を高めた (図 2F)。このことから、樹状突起の CaT 電流が発火頻度の上昇に重要だと考えられた。一方、CaT 電流は、細胞体通電による単発の活動電位の発生にはほとんど影響しなかったのに対して (図 2G)、複数発の活動電位の発生 (バースト発火) を促進した (図 2H)。これは、AIS の CaT 電流が発火を増強するには、細胞体での大きな脱分極が必要であることを示している。

## 【考察】

CaT 電流による EPSP の増強は、low-CF ニューロンのもつ長い樹状突起での EPSP の減衰を和らげるため、小さな音入力に対する応答性を高めると考えられる。一方、大きい音入力時には、AIS の CaT 電流が効果的に活性化してバースト発火を促す。これら CaT 電流の効果は左右からの興奮性入力が同時のときに最も強くなるため、low-CF ニューロンの ITD 検出の感度を効率的に高めると考えられる。また、こうした働きは、

音入力の開始直後で強いことが予想される。

CaT チャンネルが、主に low-CF ニューロンに発現することは極めて合理的である。実際、低頻度の興奮性入力時には、脱分極レベルが ITD に応じて大きく変化するため、CaT 電流は入力が同時の場合に特に強く活性化し、発火頻度を増強することができる。一方、高頻度の興奮性入力時には ITD に応じた脱分極レベルの変化は小さくなるため、CaT 電流による発火頻度の増強効果に ITD による違いは生じない。

#### **【結語】**

ITD 検出の神経核である NL では、low-CF ニューロンの樹状突起と AIS に CaT チャンネルが多く発現していた。これらの CaT チャンネルは EPSP を増強するとともに、活動電位発生を促進することで、低音領域での ITD の検出感度を高めることが示唆された。