

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：63905

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2011～2015

課題番号：23110004

研究課題名(和文)ペリニューロナル・ネットによる視覚野可塑性の制御

研究課題名(英文)Regulation of visual cortical plasticity by perineuronal nets

研究代表者

小松 由紀夫(KOMATSU, Yukio)

生理学研究所・基盤神経科学研究領域・特別協力研究員

研究者番号：90135343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 75,200,000円

研究成果の概要(和文)：ペリニューロナル・ネットを構成するコンドロイチン硫酸(CS)とケラタン硫酸(KS)プロテオグリカンによる発達期視覚野可塑性の制御を解析した。CSの6位の硫酸化を担う酵素を過剰発現させたマウスを用いた解析により、CSの硫酸化の6位優位から4位優位への変化が感受性期の終了の制御に関与することが分かった。この調節はパルブアルブミン陽性の抑制性細胞の成熟とT型Ca²⁺チャネル依存性長期増強の制御を介していた。また、低硫酸化のKSがその長期増強と片眼遮蔽による非遮蔽眼反応の増強を制御することが分かった。以上の結果は、特定の硫酸化パターンを持つ糖鎖により視覚野の可塑性が制御されることを示している。

研究成果の概要(英文)：We investigated the regulation of critical period plasticity by chondroitin sulfate (CS) and keratan sulfate (KS) proteoglycans included in perineuronal nets in the visual cortex. The analysis using transgenic mice, in which the enzyme responsible for the sulfation of CS at the 6 position was overexpressed, demonstrated that the transition of CS from 6S dominant to 4S dominant forms was involved in the regulation of terminating the critical period. This regulation was mediated by the modulation of the maturation of parvalbumin neurons and T-type Ca²⁺ channel-dependent long-term potentiation (T-LTP). In addition, we found that low-sulfated KS was involved in the regulation of T-LTP and the potentiation of nondeprived eye responses following monocular deprivation. These results suggest that these sugar chains with specific sulfation patterns regulate the critical period plasticity.

研究分野：神経生理学

キーワード：可塑性 シナプス伝達 経験依存的発達 長期増強 視覚野

1. 研究開始当初の背景

(1) 大脳皮質では、生後の感受性期と呼ばれる一時期の体験により神経回路が精緻化され、生まれ育った環境に適した機能が獲得される。感受性期には4-5日間片方の眼からの視覚入力を遮蔽するだけで、視覚野細胞の遮蔽眼刺激に対する反応は減弱し、非遮蔽眼刺激に対する反応は増強する。この変化はその後両眼を開け続けても持続する。この眼優位可塑性は経験依存的脳機能発達モデルとして盛んに研究されてきた。神経回路の精緻化は、視覚野細胞の活動パターンに応じて、あるシナプスには長期増強(LTP)が、他のシナプスには長期抑圧(LTD)が生じることにより引き起こされると考えられている。感受性期を過ぎると可塑性は低下し、視覚経験により生じる視覚反応の可塑的变化は減弱する。視覚野の神経細胞の約80%を占める興奮性細胞(錐体細胞)の興奮性シナプスと抑制性シナプスに複数の種類のLTPとLTDが生じることが見出されている。研究代表者は、興奮性シナプスのT型Ca²⁺チャネル依存性LTP(T-LTP)が感受性期に限局して生じ、暗室飼育すると成熟期にも起こることや(Komatsu et al., 1988; Ohmura et al., 2003)、抑制性シナプスのLTPが感受性期に限局して起こることを示してきた(Komatsu, 1994)。どのシナプス可塑性が眼優位可塑性に寄与するかが重要な研究テーマとなり、研究代表者は、感受性期の片眼遮蔽による非遮蔽眼反応の増強にT-LTPが寄与することを報告した(Yoshimura et al., 2008)。

(2) 感受性期は固定されたものではなく、その時期は視覚体験の影響を受ける。近年の研究により、抑制性シナプス伝達の発達が感受性期の制御に関与し、parvalbumin (PV)陽性のGABA作動性細胞がその中心的役割を果たすことが分かってきた。開眼後PV細胞の周りにプロテオグリカン(PG)等の糖鎖から構成されるペリニューロナル・ネット(PNN)が形成され始める頃に感受性期が始まり、感受性期の終了時にはPNNは強固なものとなる。成熟ラットのPNNをコンドロイチン硫酸(CS)分解酵素で処理すると、眼優位可塑性が復活することが報告されてから(Pizzorusso et al., 2002)、PNNによる可塑性の制御が注目され始めた。CS鎖は硫酸化のパターンの相違から、CS-A、CS-C、CS-D、CS-Eの4種類に分けられるが、発達に伴い視覚野のCSPGの硫酸化が6位(CS-C)優位から4位(CS-A)優位に変化することが見出されていた。これらの知見から、感受性期はPV細胞のPNNを構成するCSPGやケラタン硫酸(KS)PGに内在する糖鎖機能ドメインにより制御されている可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

(1) 本研究計画では、CSやKSの酵素処理や糖鎖を変異させた遺伝子改変動物を用い

て糖鎖機能ドメインによる眼優位可塑性とその感受性期の制御機構の解析を試みた。

(2) T-LTPは眼優位可塑性と同様に感受性期に限局して起こるので、眼優位可塑性の基盤となる重要な神経機構と考えられる。CSやKSによるT-LTPの制御機構を解析し、発達期視覚野における経験依存的機能発達の神経機構の糖鎖機能ドメインによる調節の仕組みの解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) CSPGとKSPGに含まれる糖鎖機能ドメインが眼優位可塑性に及ぼす影響を解析するために、CSやKSを酵素処理した動物あるいは6位の硫酸化(6S)を担う硫酸転移酵素を過剰発現させたC6ST-1 TGマウス等の糖鎖変異マウスから視覚誘発電位を記録した。

(2) 糖鎖によるPV細胞の成熟の調節を解析するために、野生型及び糖鎖変異マウスのPV細胞からホール・セル記録を行った。

(3) CSPGとKSPGに含まれる糖鎖機能ドメインによるT-LTPの制御機構を解析するために、CSやKSを酵素処理した動物あるいは糖鎖変異マウスから作製した視覚野スライス標本で電気生理学実験を行った。

4. 研究成果

(1) CS鎖の硫酸化パターンの変化が眼優位可塑性の感受性期の制御に関与する可能性を検討した。C6ST-1 TGマウスを用いた研究により、6S優位から4S優位への硫酸化パターンの変化が感受性期の終了を制御することが分かった(発表論文)。C6ST-1 TGマウスでは感受性期が延長し、成長しても感受性期型の眼優位可塑性が見られると共に、PNNの構造の異常とホメオプロテインOtx2のPV細胞への取り込みの低下が見られた。また、野生型マウスに比して、PV細胞の静止膜電位はより脱分極しており、活動電位の幅は広く、PV細胞の電気生理学的特性の一部に発達の遅れが見られた。このPV細胞の特性の変化により視覚野内の信号伝達に生じる変化を視覚刺激に対する視覚野細胞の反応により解析した。視覚反応選択性は野生型と差が無いが、視覚刺激提示終了より長く反応が持続することから、全体としては抑制がやや低下していると推定した。この抑制の低下が感受性期を延長する一因と考えられる(発表論文)。

(2) 眼優位可塑性の基盤と考えられるシナプス可塑性のC6ST-1 TGと野生型マウスの間の相違を調べた。野生型マウスの視覚野スライス標本において、4層の電気刺激により2/3層に誘発される細胞外電位を解析した結果、2Hz刺激を15分間与えると、ラットと異なり、感受性期だけでなく成熟期にもLTPが

起こることが分かった(発表論文)。野生型マウスにおける感受性期のLTPは、ラットの場合と同様にNi²⁺あるいはML218で誘発が阻害され、T型Ca²⁺チャンネル依存性であることが分かった。また、成熟期に見られる長期増強の誘発にはT型Ca²⁺チャンネルではなく、L型Ca²⁺チャンネルが必要であることも判明した。野生型マウスとは異なり、C6ST-1 TGマウスでは、感受性期、成熟期の両時期においてT-LTPが同様に起こった。Ca²⁺電流を2/3層錐体細胞からホール・セル記録法により計測した結果、Ni²⁺感受性T型Ca²⁺電流は、野生型では感受性期では大きく、成長に伴い減少した。C6ST-1 TGマウスでは成長しても感受性期のレベルの電流が持続した。この結果は、CS鎖の硫酸化が6S優位から4S優位に変化するとNi²⁺感受性T型Ca²⁺チャンネル電流が減少してT-LTPが起こらなくなることを示している。C6ST-1 TGでは、T-LTPが成長しても減弱しないことが、成熟期でも感受性期と同様な眼優位可塑性が見られる理由の一つと考えられる。

(3)KS鎖の伸長に必要な酵素の一つであるGlcNAc6ST1を欠くマウス(KS欠損マウス)を解析したところ、感受性期の眼優位可塑性に異常があることが分かった(発表論文)。野生型マウスの視覚野細胞では、片眼遮蔽後に遮蔽眼刺激に対する視覚応答の減弱と非遮蔽眼刺激に対する視覚応答の増強が見られるが、KS欠損マウスでは前者の減弱は生じたが、後者の増強は見られなかった。この結果は、KS欠損マウスではT-LTPが障害されている可能性を示唆する。KS欠損マウスから作製した視覚野スライス標本で調べた結果、T-LTPは起きないことが分かった。また、野生型マウスから作製したスライスを、ケラタナーゼを含む人工脳脊髄液で灌流すると、KS欠損マウスと同様にT-LTPは障害された。感受性期の開始時期以降の視覚野に発現しているKSは低硫酸化のものであり、免疫組織学的検索から、フォスファカン上に存在することが分かった。抗フォスファカン抗体6B4存在下ではT-LTPは起こらず、KS欠損マウスにおいて灌流液にTNFを加えるとT-LTPは復活した。KS欠損マウスにおけるT-LTPの障害は、TNF欠損マウスに見られたもの

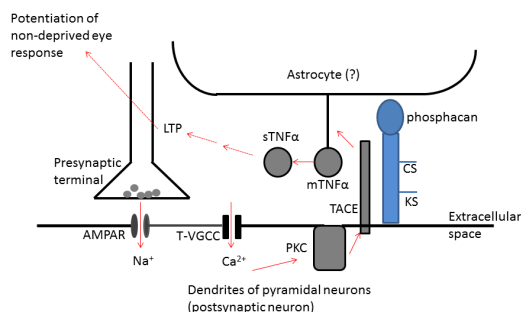


図1. フォスファカンに存在するケラタン硫酸鎖(KS)はTNFαシグナリングの調節を介してT-LTPと片眼遮蔽による非遮蔽眼反応の増強を制御する

と同様であったが(発表論文)。KS欠損マウスの視覚野におけるTNF発現量は野生型と差がないので、膜結合型TNFを可溶性TNFに変換する酵素TNF converting enzyme (TACE)あるいはその上流の信号伝達分子の機能の制御にKS-フォスファカンが関与すると考えられる(図1)。これらの結果は、KSがT-LTPを介して非遮蔽眼反応の増強を制御することを示唆する

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 10件)

Taketoshi Sugimura, Mariko Yamamoto, Kazumasa Yamada, Yukio Komatsu, and Yumiko Yoshimura (2017) Visual experience regulates the development of long-term synaptic modifications induced by low-frequency stimulation in mouse visual cortex. *Neurosci. Res.*, 査読有, in press. DOI: 10.1016/j.neures.2015.02.005

Hisakazu Izumida, Hiroshi Takagi, Haruki Fujisawa, Naoko Iwata, Kohtaro Nakashima, Seiji Takeuchi, Shintaro Iwama, Takashi Namba, Yukio Komatsu, Kozo Kaibuchi, Yutaka Oiso Hiroshi Arima, Yoshihisa Sugimura (2017) NMDA receptor antagonist prevents cell death in the hippocampal dentate gyrus induced by hyponatremia accompanying adrenal insufficiency in rats. *Exp. Neurol.*, 査読有, 287: 65-74, 2017. DOI: 10.1016/j.expneurol.2016.08.007

Haruki Fujisawa, Yoshihisa Sugimura, Hiroshi Takagi, Hisakazu Izumida, Naoko Iwata, Kotaro Nakashima, Hiroshi Ochiai, Seiji Takeuchi, Atsushi Kiyota, Kazuya Fukumoto, Shintaro Iwama, Hidetaka Suga, Motomitsu Goto, Ryoichi Banno, Hiroyuki Mizoguchi, Hideyuki Takeuchi, Yoshiko Takagishi, Hiroshi Arima, Yoshitaka Hayashi, Yukio Komatsu, Yoshiharu Murata and Yutaka Oiso (2016) Chronic hyponatremia causes gait disturbance, anxiety, and cognitive impairment. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 査読有, 27, 766-780. DOI: 10.1681/ASN.2014121196

Toshiaki Endo, Yuchio Yanagawa and Yukio Komatsu (2016) Substance P activates Ca²⁺-permeable nonselective cation channels through a phosphatidylcholine-specific phospholipase C signaling pathway in nNOS-expressing GABAergic neurons in visual cortex. *Cereb. Cortex.*, 査読有, 26, 669-682. DOI: 10.1093/cercor/bhu233

Yoshiko Takeda-Uchimura, Kenji Uchimura, Taketoshi Sugimura, Yuchio Yanagawa, Toshisuke Kawasaki, Yukio Komatsu and Kenji Kadomatsu (2015) Requirement of keratan sulfate proteoglycan phosphacan with a specific sulfation pattern for critical period plasticity in the visual cortex. *Exp. Neurol.*, 査読有, 274, 145-155.

DOI: 10.1016/j.expneurol.2015.08.005

Taketoshi Sugimura, Yumiko Yoshimura and Yukio Komatsu (2015) TNF α is required for the production of T-type Ca²⁺ channel-dependent long-term potentiation in visual cortex. *Neurosci. Res.*, 査読有, 96, 37-44.

DOI: 10.1016/j.neures.2015.02.005

Shoko Horibe, Etsuko Tarusawa, Yukio Komatsu and Yumiko Yoshimura (2014) Ni²⁺-sensitive T-type Ca²⁺ channel currents are regulated in parallel with synaptic and visual response plasticity in visual cortex. *Neurosci. Res.*, 査読有, 87, 33-39.

DOI: 10.1016/j.neures.2014.07.001

Ayako Wendy Ishikawa, Yukio Komatsu and Yumiko Yoshimura (2014) Experience-dependent emergence of fine-scale networks in visual cortex. *J. Neurosci.*, 査読有, 34, 12576-12586.

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1346-14.2014

Rie Funahashi, Takuro Maruyama, Yumiko Yoshimura and Yukio Komatsu (2013) Silent synapses persist into adulthood in layer 2/3 pyramidal neurons of visual cortex in dark-reared mice. *J. Neurophysiol.*, 査読有, 109, 2064-2076.

DOI: 10.1152/jn.00912.2012

Shinji Miyata, Yukio Komatsu, Yumiko Yoshimura, Choji Taya and Hiroshi Kitagawa (2012) Persistent cortical plasticity by upregulation of chondroitin 6-sulfation. *Nature Neurosci.*, 査読有, 15, 414-422.

DOI: 10.1038/nn.3023

[学会発表](計 6件)

Komatsu Y., Regulation of visual cortical plasticity by keratan sulfate proteoglycan. The 3rd International Symposium on Glico-Neuroscience, 2016 Jan 15, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji, Hyogo

小松由紀夫, 大脳皮質視覚野における発達期可塑性の糖鎖による制御、新学術領域「プラズマ医療科学の創生」+「統合的神経機能の制御を標的とした糖鎖の作動原理解明」合同シンポジウム、2015年

8月5日、名古屋大学、名古屋、愛知

Komatsu Y., Uchimura Y, Uchimura K, Kadomatsu K, Regulation of visual cortical plasticity by keratan sulfate proteoglycans. Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research, Satellite Symposium II "Glycans in Neuroscience", 2014 Nov 16, Honolulu, USA

Komatsu Y., Regulation of visual cortical plasticity by chondroitin and keratan sulfate proteoglycans. International Symposium on Glyco-Neuroscience, 2014 Jan 10, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji, Hyogo

小松由紀夫, 新皮質錐体細胞の抑制性シナプスにおける長期可塑性の方向のシナプス後細胞による決定、第91回日本生理学会大会、2014年3月7日、鹿児島大学、鹿児島、鹿児島

Komatsu Y., Maruyama, T, Yoshimura Y, L-cysteine facilitates the induction of T-type Ca²⁺ channel-dependent long-term potentiation in visual cortex. 第34回日本神経科学大会、2012年9月15日、パシフィコ横浜、横浜、神奈川

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者

小松 由紀夫 (KOMATSU, Yukio)
生理学研究所・基盤神経科学研究領域・特
別協力研究員
研究者番号：90135343

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()