

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06476

研究課題名(和文) マウス一次視覚野における可塑的变化の多様性を生み出す遺伝子群の同定

研究課題名(英文) Identification of the gene that defines a variety of the strength of plasticity in mouse primary visual cortex

研究代表者

林 健二 (Hayashi, Kenji)

生理学研究所・基盤神経科学研究領域・助教

研究者番号：50512349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：一酸化窒素(NO)は、シナプス伝達効率を修飾する拡散性メディエーターとして知られる。NOは隣接する細胞に作用することで長期的な可塑性に関係すると考えられるが、in vivoの大脳皮質での機能は不明であった。我々は、NOS1-IRES-Creマウスにて一酸化窒素合成酵素1(NOS1)陽性の抑制細胞を活性化するTet-systemベースのAAV-DREADDを開発した。その結果、一次視覚野にてNO依存的に片眼遮蔽に伴った眼優位性シフトが消失することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の研究によりin vivo大脳皮質でNOは可塑性に対して抑制的に働くことが分かってきた。眼優位可塑性の中でも制動の分子メカニズムはほぼ未解明であり、本研究の進展は眼優位可塑性の全体像の理解のための重要な知見となると考えている。

研究成果の概要(英文)：Nitric oxide (NO) is known to be a diffuse mediator for modifying the efficacy of synaptic transmission. In the cortex, NO relates to long-term plasticity by affecting neighboring cells, but the in vivo cortical function is elusive. Here we show that cortical NO inhibits ocular dominance plasticity. We developed an AAV-DREADD based on Tet-system to specifically and sufficiently activate nitric oxide synthase 1 (NOS1) positive inhibitory cells in NOS1-IRES-Cre mice. We found that the chronic activation of NOS1+ cells eliminates the ocular dominance shift in monocularly deprived animals with NO-dependent manner. Diffusive NO can act synchronously on the plasticity of the surrounding cell population. Together, NO might play a crucial role as a pacemaker in orchestrate the development of the cell ensemble in visual cortex through reducing the instability.

研究分野：神経科学

キーワード：一酸化窒素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経回路は外界からの入力などに伴い可塑的な変化を起こす。感覚野では発達期における一次視覚野の眼優位可塑性がよく知られる。通常、マウス一次視覚野の両眼視領域では両眼からの視覚入力に対する応答が特定のバランスで均衡するが、臨界期に片眼遮蔽すると大部分の細胞は開眼側の視覚入力に対して反応するように選択性が大きくシフトする。一方で個々の細胞に着目すると変化の程度は一様ではなく、可塑的な変化の強度は細胞ごとに非常にばらつく。現在までの研究により可塑性の分子メカニズムの詳細が分かりつつあるものの、従来の解析ではあくまで細胞の平均的な挙動を解析の対象としていた。可塑的な変化の強度の違いがその後の細胞ごとの多様な運命を決定する可能性があるが、そのような観点からの研究は進んでいない。

臨界期に片眼遮蔽を行うと眼優位性の可塑的な変化が誘導される。大部分の細胞は開眼側の眼に強く応答するようになるが、一部の細胞はほとんど性質を変化させない。しかしながら、このような刺激に対する柔軟性がどのように規定されるのかは未解明である。可塑的な変化の強度は転写因子の発現量など、可塑性以前に内因性に決定されている可能性があり、遺伝子発現の解析を行うことで、そのメカニズムを突き止めたい。

2. 研究の目的

可塑性における細胞ごとの多様性がどのようにして生み出されるのかを解明するために、本研究は一次視覚野の眼優位可塑性に着目し、可塑的な変化の強度がどういった遺伝子の発現により規定されるのかを明らかにすることを当初の目的としていた。本研究の中で、一酸化窒素が眼優位可塑性に関与することが明らかとなった。一酸化窒素 (NO) は拡散性のメディエーターであり、神経細胞の機能修飾に関与することが明らかになりつつある。そこで一酸化窒素合成酵素 1 (NOS1) 陽性細胞からの距離により可塑性の多様性が生まれる可能性を検証しようと考えた。

3. 研究の方法

眼優位可塑性の細胞レベルでの多様性を評価するために、二光子励起顕微鏡を用いて in vivo カルシウムイメージングを行った。NOS1 発現細胞で Cre を発現するトランスジェニックマウス (NOS1-IRES-Cre マウス) を用いて NOS1 細胞の機能の評価を行った。また、NOS1 の生理的な機能を見るために、DREADD-Gq を用いた活動操作を行った。

4. 研究成果

(1) これまでに、NOS1 の細胞サブタイプ間での発現パターンが当初想定していたよりも複雑に制御されていることが分かってきた。先行研究では、NOS1 は Type I, Type II など複数の抑制性細胞種に発現することは知られていたものの、興奮性細胞での発現や、より詳細な抑制性細胞サブタイプの種類に関する見解は一致しておらず、議論の余地が残されていた。今回、NOS1-IRES-Cre マウスと AAV-CAG-FLEX-tdTomato による高い感度で発現細胞を検出することができる実験系を用いて NOS1 の発現を解析したところ、NOS1 は抑制性細胞だけではなく、興奮性細胞にも発現することを確認した。また、Dlx プロモーターベースの AAV-Dlx-FLEX-tdTomato を用いることにより、NOS1 陽性細胞のうち、抑制性細胞特異的に発現調節できることが分かった。また AbScale を用いた NOS1 陽性細胞の細胞サブタイプの

同定により、NOS1 陽性の抑制性細胞は PV+, SOM+, VIP+, および Reelin+ なニューログリアフォーム細胞などから構成されることや、それらの細胞サブタイプの大脳皮質での存在比率を明らかにした。

(2) AAV-hSyn1-jGCaMP7f を用いた in vivo カルシウムイメージングにより、NOS1 陽性の抑制性細胞も視覚刺激に応答することが初めて明らかとなった。次に NOS1 陽性の抑制性細胞の

機能を調べるために、DREADD-Gq を用いた活動操作を行った。発現の特異性と効率を同時に確保するために、Tet システムをベースにした AAV-DREADD と Dlx プロモータを組み合わせた発現系を構築した。その結果、NOS1 陽性の抑制性細胞特異的に十分な量の DREADD-Gq の発現を確認することができた。また、カルシウムイメージングで、DREADD アゴニストの投与により DREADD 発現細胞で顕著な細胞内カルシウム濃度と自発活動頻度の上昇、および最初期遺伝子の一種である c-fos の特異的な発現亢進を確認した。DREADD を用いた活性化は、NOS1 発現細胞の活性化のみならず、小胞体ストア由来のものであると考えられる非常に大きな細胞内カルシウム濃度の上昇を誘導することができた。このため、カルシウムにより NO の合成を亢進させることが知られる NOS1 タンパク質の直接的な活性化に適していた実験系であるといえる。

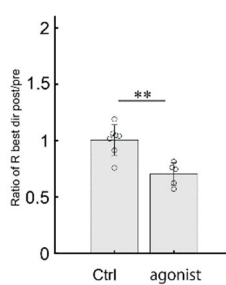


図 2. NOS1 陽性細胞の DREADD 活性化により、周囲の細胞の視覚応答が急性に減弱する様子が観察された。

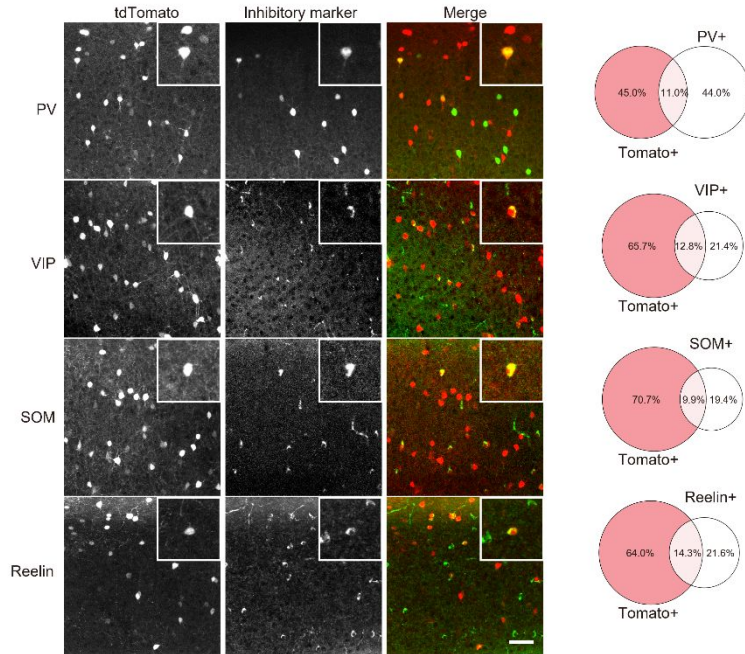


図 1. NOS1-IRES-Cre マウスに AAV-Dlx-FLEX-tdTomato を発現させた。各種抑制性細胞マーカーにて染色し、NOS1 陽性抑制性細胞のサブタイプの構成割合を解析した。

(3) 次に、NOS1 陽性の抑制性細胞の DREADD による活性化で誘導される急性の効果を確認した。NOS1 陽性細胞の活性化の 1-2 時間後から周囲の細胞の視覚応答性が有意に減少することを初めて明らかにした。この応答性の減少は対側眼、同側眼のどちらでも見られることから入力特異性は存在せず、眼優位性インデックス (ODI) に変化は見られなかった。また、この急性の効果と NOS1 陽性細胞の距離には明確な関係性が見られなかった。

(4) NOS1 陽性の抑制性細胞の臨界期における機能を評価するために、DREADD による慢性的な活性

化が眼優位可塑性に対してどのような影響を及ぼすかを解析した。臨界期のマウスは、対側眼の片眼遮蔽と同時に DREADD アゴニストを投与し、NOS1 陽性細胞を6日間活性化し続けた。遮蔽眼の開眼直後にイメージングした結果、NOS1 陽性細胞の活性化により、周囲の細胞の眼優位性のシフトが顕著に阻害されることを明らかにした。DREADD 活性化と同時に NOS の阻害薬を投与した動物では、このような眼優位性のシフトの阻害が観察されなかったことから、このことは NO が眼優位可塑性を阻害することを意味する。

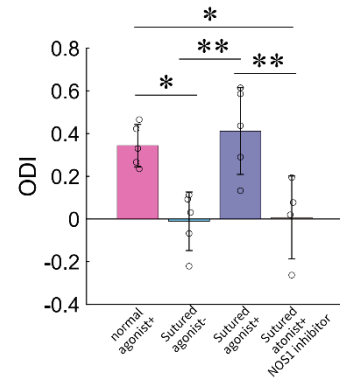


図 3.DREADD による慢性的な活性化により、片眼遮蔽による眼優位可塑性のシフトが阻害された。NOS の阻害薬を投与した動物では、このような眼優位性のシフトの阻害は観察されなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林健二
2. 発表標題 Gap junctions in postnatal excitatory neurons regulate spine density and response reliability
3. 学会等名 遺伝研研究会「哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム」（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------