

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700412

研究課題名（和文）

一酸化窒素合成酵素発現ニューロンによる大脳皮質視覚野のシナプス可塑性制御機構

研究課題名（英文）

The role of neuronal nitric oxide synthase-expressing neurons in the regulation of synaptic plasticity in the visual cortex

研究代表者

遠藤 利朗 (TOSHIAKI ENDO)

名古屋大学・環境医学研究所・准教授

研究者番号：30353436

研究成果の概要（和文）：本研究では大脳皮質視覚野のシナプス可塑性の制御に重要な役割を果たすと考えられる神経型一酸化窒素合成酵素（nNOS）発現神経細胞の性質について調べた。研究の結果、サブスタンス P が、nNOS 細胞を活性化させ、また、nNOS 細胞内のカルシウム濃度上昇を誘発することが明らかになった。以上の成果は、nNOS 細胞のシナプス可塑性制御における役割を検討する基礎となる。

研究成果の概要（英文）：The properties of neuronal nitric oxide synthase (nNOS)-positive neurons in the mouse visual cortex were examined. In vitro electrophysiological experiments revealed that substance P activate nNOS neurons and induce a rise in intracellular  $Ca^{2+}$ . This study provide important fundamental basis to understand the regulation of the synaptic plasticity in the visual cortex.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経・筋肉生理学

キーワード：視覚野、一酸化窒素合成酵素、大脳皮質

## 1. 研究開始当初の背景

(1) シナプス伝達の可塑的变化は、記憶・学習や神経回路形成における重要な素過程である。シナプスの可塑的变化の方向や起きやすさは、同じ刺激に対しても常に同じであるのではなく、発達段階、昼夜リズム、覚醒レベル、曝されている環境等、その時々動物の状態や経験に伴って変動する。大脳皮質視覚野においても、シナプス伝達の長期増強（LTP）や長期抑圧（LTD）といった可塑性が、視覚環境に適応するための神経回路の調節・精緻化、あるいは視覚情報の学習や保持といった過程の基盤となっており、それ

がダイナミックに制御されていることについても多くの報告がある。

シナプス可塑性の制御の機構について、一酸化窒素（NO）が重要な役割を果たしている可能性が考えられる。NOが様々な形でニューロン活動、神経回路の機能の制御、またシナプス可塑性に関わっていることに関しては多くの報告がある。大脳皮質視覚野に関するものでは、NO合成酵素（NOS）の抑制剤が視覚野ニューロンの視覚応答やAMPA、NMDA、アセチルコリンに対する応答を変化させるという報告や、

NO受容体のグアニル酸シクラーゼ欠損マウスではLTPが阻害されるという報告、NOがホメオスタシス可塑性に寄与しているという報告等がある。また、申請者の共同研究者らはNOが視覚野の錐体ニューロンへの抑制性入力の可塑的变化を制御していることを示唆する具体的な結果を得ている。これらのことから、視覚野においてNOが何らかの形でシナプス可塑性の制御に関わっていることは確実であるが、詳細は不明である。

(2) 大脳皮質の神経回路は約八割を占めるグルタミン酸作動性の興奮性細胞と、残りのGABA作動性の抑制性細胞によって構成されている。これらの細胞はその形態、位置、電気生理学的特性、マーカー分子の発現などによってさらに細かく分類されている。GABA作動性細胞の中に、神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS)を特に強く発現しているグループ(nNOS細胞)がある。これらは大脳皮質における一酸化窒素(NO)の主要な産生源の一つであると考えられる。nNOS細胞は大脳皮質のGABA作動性細胞のサブグループの中でも最も数の少ない部類に入るが、NOの神経回路内を拡散する信号伝達分子としての重要性を考えれば、nNOS細胞に注目して詳細に研究することで、神経回路機能の制御について理解する上で重要な多くの知見を得られると期待できる。

(3) nNOS細胞の性質や機能について研究開始以前に分かっていたことは多くはない。最近の報告によれば、大脳皮質のnNOS細胞は、睡眠中にslow-wave activity(SWA)の発現に伴って強く活動することから、睡眠中の大脳皮質SWAの生成、あるいは神経回路がSWAの状態にあるときにNOの放出などを通じて回路機能の調節に関与している可能性が考えられる。例えば、視覚野細胞に見られる眼優位可塑性(どちらの眼からの入力によく反応するか、の可塑的变化)が睡眠によって増強されることが知られており、これにnNOS細胞の活動が関係している可能性は大いに考えられる。

また、nNOS細胞に関する免疫組織化学的研究では、大脳皮質のnNOS細胞は、サブスタンスP(SP)の受容体であるNK1受容体の特異的に強く発現していることが報告されている。このことから、サブスタンスPが、nNOS細胞の活動制御に重要な役割を果たしている可能性が考えられるが、これまでnNOS細胞に対するサブスタンスPの作用については全く分かっていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、nNOS細胞がシナプス可塑性制御にどのように関わっているか検討するための基礎的情報を得るために、大脳皮質視覚野のnNOS細胞の性質と、その活動がどのように制御されているのかについて詳細に調べることを目的とした。具格的には、nNOS細胞の基本的な電気生理学的特性と、サブスタンスPによるnNOS細胞の活動制御の機構に焦点をあてて研究を行った。

## 3. 研究の方法

GABA作動性神経細胞に特異的に緑色蛍光タンパクGFPを発現する遺伝子改変マウス(GAD67-GFPノックインマウス)を用いた。生後20から30日齢のマウスから大脳皮質の急性スライス標本を作製し、視覚野のGFP発現神経細胞からホールセルパッチクランプ記録を行った。また、カルシウム感受性蛍光色素を用いて、細胞内カルシウム濃度変化の計測を行った。記録した細胞の電気生理学的特性や薬剤投与の効果を調べた後、標本を固定し、抗nNOS抗体を用いた免疫組織化学的染色を行った。

## 4. 研究成果

(1) サブスタンスPによるnNOS細胞活動の制御について検討した。先行研究によってnNOS細胞が特異的に抗NK1抗体によって強く染色されることが知られていたが、その機能については全く分かっていなかった。そこで、まずはNK1のリガンドであるサブスタンスP(SP)のnNOS細胞への作用を調べることから研究を開始した。GAD67-GFPノックインマウスから作製した大脳皮質視覚野のスライス標本上のGFP陽性の細胞を選んでホールセル記録を行った。SP(250nM)を還流液中に加えたところ、一部の大型のGFP陽性細胞で脱分極が生じ、活動電位が生成された(図1)。SPに対する脱分極性電流応答は、NK1の阻害剤であるRP67580の存在下では抑制されたことから、NK1受容体の活性化によるものであることが確認された。SPに対して応答を示した細胞がnNOS細胞であるか確認するために記録終了後に免疫組織化学的染色を行った。その結果、SP応答を示した細胞のほとんど(n=28/33)が抗nNOS抗体で染色されることが確認された。一方、SP応答を示さなかった細胞(n=18)は一つも抗nNOS抗体で染色されなかった。この結果は、SPのnNOS細胞に対する作用を初めて示したものであり、また先行研究の組織学的研究結果を機能的に確認するものである。

SPで誘発される脱分極性電流の反転電位を計測した結果から、SPはnNOS細胞において陽イオンチャネルを活性化させると考え

られた。SP 電流は、ナトリウムイオンチャネルの阻害薬である TTX では阻害されず、細胞外のカルシウムイオンを取り除いても阻害されず、またカリウムイオンチャネル阻害剤 TEA の存在下でも記録できたが、TRPC チャネルの阻害剤である 2-APB によって抑制された。

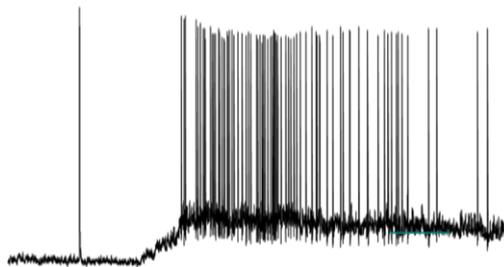


図1 SP によって誘発された脱分極と発火応答。スケールバーは 50 mV と 50 秒。

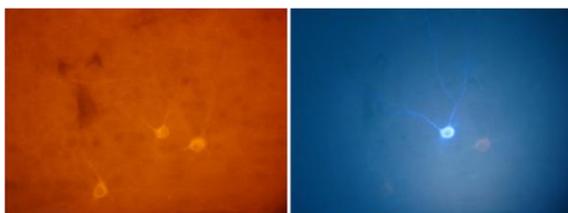


図2 図1の神経細胞の細胞内に注入したバイオサイチン(右)と、抗 nNOS 抗体(左)による二重染色。

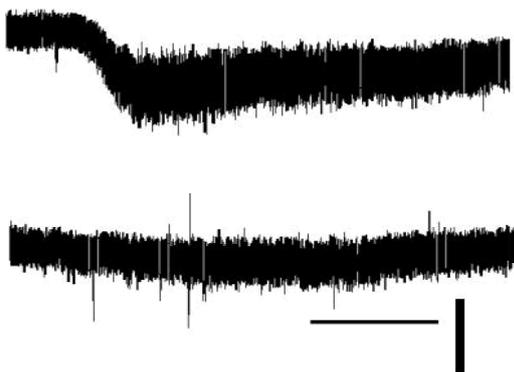


図3 SP 投与に対する電流応答。保持電位 -55 mV。コントロール(上)と、NK1 受容体の阻害薬 RP67580 存在下(下)での電流応答。スケールは 40 pA と 50 秒。

(2) SP刺激によってnNOS細胞における細胞内カルシウムイオン濃度に変化が見られるかどうかを、カルシウム感受性蛍光色素を用いたカルシウムイメージングによって検討した。

カルシウム感受性蛍光色素 (X-rhod 5F) は、パッチ電極から細胞内に導入した。電位固定し、TTXの存在下で行った計測の結果、SPによって活動電位非依存的に細胞内カルシウムイオン濃度上昇が引き起こされることが明らかになった(図4)。このカルシウムイオン濃度上昇については、nNOSニューロンの発火状態にかかわらずNO放出を引き起こす可能性があるという意味で、重要な知見を得られたと考えている。

以上の結果は、nNOS細胞の活動の制御にSPが重要な役割を果たしていることを示唆しており、この活動制御が、大脳皮質視覚野におけるシナプス可塑性制御に関係している可能性も考えられる。

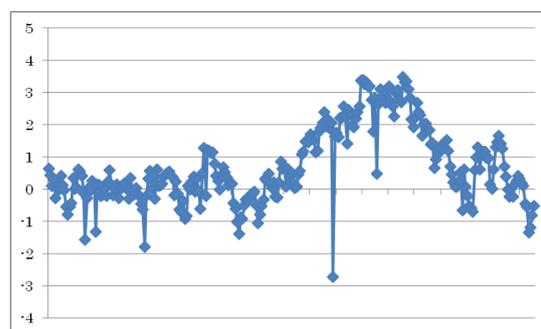


図4 SPによるカルシウム濃度上昇。縦軸はカルシウム感受性色素から発せられる蛍光の強度変化(%)。

(3) nNOS細胞の発火特性について検討した。大脳皮質のGABA作動性細胞は、タイプによって特徴的な発火特性を示すことが知られている。nNOS細胞についてもその発火特性を知ることが重要である。nNOS細胞に脱分極通電すると、低頻度で且つ徐々に発火頻度を減少させる、またしばしば活動電位の生成が持続しない、という発火パターンを示した。また大部分において、比較的過分極した状態から脱分極通電した場合に活動電位の生成がやや遅れるが、静止電位付近から通電した場合には遅れは見られない、という発火特性を示した。持続的な高頻度発火や一過性のバースト発火は示さなかった。

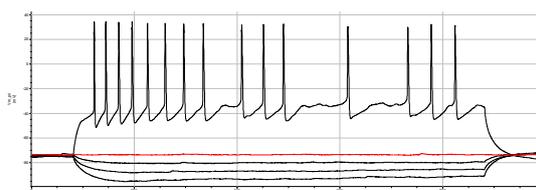


図5 nNOS 細胞の発火特性。

以上の成果は、nNOS 細胞のシナプス可塑性制御における役割を検討する基礎となる重要な成果である。

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 利朗 (TOSHIAKI ENDO )

名古屋大学・環境医学研究所・准教授

研究者番号 : 30353436

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし