

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300116

研究課題名(和文) 視覚野可塑性のnNOS細胞による制御

研究課題名(英文) Regulation of visual cortical plasticity by nNOS neurons

研究代表者

小松 由紀夫 (Komatsu, Yukio)

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号：90135343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,500,000円、(間接経費) 4,650,000円

研究成果の概要(和文)：大脳皮質視覚野において神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS)はGABA作動性抑制性細胞の一部の細胞群にのみ発現している。この細胞が放出する一酸化窒素(NO)によるシナプス可塑性と視覚反応の経験依存的発達の制御を解析した。その結果、NOは2/3層錐体細胞の興奮性シナプスに見られるT型Caチャンネル依存性長期増強の誘発を抑制し、抑制性シナプスの長期増強を促進することが分かった。両作用ともguanylyl cyclaseの活性化とそれに伴うcGMPの上昇を介していた。視覚反応の解析によりNOがシナプス可塑性の制御を通して視覚反応の経験依存的発達に影響を及ぼすことを示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：In visual cortex, neuronal nitric oxide synthase (nNOS) is expressed only in a sub group of GABAergic interneurons. I investigated the regulation of synaptic plasticity and experience-dependent development by nitric oxide (NO) released from nNOS neurons. We found that released NO suppressed the induction of T-type calcium channel-dependent long-term potentiation (LTP) at excitatory synapses in rat layer 2/3 pyramidal cells, whereas it facilitated the induction of LTP at the inhibitory synapses in these cells. Both effects were mediated by the activation of guanylyl cyclase and a resultant increase in cGMP. Our in vivo studies suggest that NO regulates the development of visual responsiveness of visual cortical cells through the modulation of synaptic plasticity.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：シナプス可塑性 経験依存的発達 一酸化窒素 視覚野

## 1. 研究開始当初の背景

視覚野細胞の視覚刺激に対する反応選択性は感受性期の視覚体験に基づいて活動依存的に成熟する。シナプス前細胞と後細胞の活動の相関に依存して生じる長期増強と長期抑圧は、活動依存的な視覚反応選択性向上の基盤として注目されてきた。視覚野スライス標本を用いて、この領域の神経細胞の約 80%を占める錐体細胞においてシナプス可塑性が検討され、興奮性シナプスと抑制性シナプスの両者に複数の種類の長期増強と長期抑圧が生じることが示された。申請者は、抑制性シナプスの長期増強と  $\text{Ni}^{2+}$ 感受性の T 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの活性化を必要とする興奮性シナプスの長期増強 (TCa-LTP) は感受性期に限局して起こることを見出した (Komatsu, 1994; Komatsu et al., 1988; Ohmura et al., 2003)。この年齢依存性は、これらのシナプス可塑性が経験依存的機能発達に寄与する可能性が強いことを示唆する。

マウスラットの視覚野から記録した視覚誘発電位 (VEP) の解析により、感受性期に 4-5 日間片眼遮蔽すると、遮蔽眼 VEP が減少し、非遮蔽眼 VEP が増大することが示された (Frenkel and Bear, 2004)。この結果から、遮蔽眼からの信号を伝える興奮性シナプスに長期抑圧 (あるいは抑制性シナプスに長期増強) が生じ、非遮蔽眼からの信号を伝える興奮性シナプスに長期増強 (あるいは抑制性シナプスに長期抑圧) が生じるものと考えられている。Bear のグループの一連の研究により、興奮性シナプスの NMDA 受容体依存性長期抑圧が遮蔽眼反応の減弱を担うことが提唱されている。しかし、抑制性シナプスの長期増強が遮蔽眼反応の減弱を担う可能性も指摘されている (Maffei et al., 2006)。我々は、片眼遮蔽の間ラット視覚野に T 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル阻害薬 mibefradil を持続注入すると、非遮蔽眼 VEP の増大が選択的に阻害されることを見出し、TCa-LTP が非遮蔽眼反応の増大を担うことを提唱している (Yoshimura et al., 2008)。3 種類の T 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの中で唯一高い  $\text{Ni}^{2+}$ 感受性を示す  $\text{Ca}_v3.2$  のノックアウト・マウスにおいても同様な結果を得ている。この動物の視覚野細胞の視覚刺激に対する反応の強さは野生型と変わらないが、選択的反応性に低下が見られる。これらの結果は、TCa-LTP は、反応選択性の経験依存的な向上に不可欠であることを示唆している。

長期増強を誘発するためには、ある一定以上の強さの神経活動が必要である。この閾値が固定されたものであると、視覚情報が効率的に処理できるように神経回路が精緻化されるとは限らない。強い視覚入力により視覚野細胞が盛んに活動すると多くの興奮性シナプスに増強が起き、弱い視覚入力を受けると興奮性シナプスが全般的に減弱し、適切な視覚反応性は形成されないであろう。このような状況は、長期増強誘発の閾値を平均的活動レベルに応じて変化させれば回避できる。

神経活動レベルが高い場合には、長期増強誘発の閾値を高くし、そのレベルが低い場合には、閾値を下げればよい。視覚野では経験依存的機能発達の仕組みが詳しく調べられており、GABA 作動性細胞 (非錐体細胞) がシナプス可塑性並びに視覚反応性発達の調節に重要な役割を果たすことが分かってきた (Hensch, 2004)。GABA 細胞には分子マーカーや発火特性、形態に基づいて複数のグループがあることが分かっている。通電により活動電位を引き起こすと時間と共に発火頻度が低下する、adapting cell と一定の頻度で発火を続ける non-adapting cell (fast spiking cell) の 2 群に分けられる。後者は parvalbumin (PV) を発現しており錐体細胞の細胞体とその周辺に強い抑制をかけるのに対して、前者は錐体細胞の樹状突起に抑制をかけ、somatostatin, neuropeptide Y, nNOS 等の分子を発現するサブグループからなる。この GABA 細胞のサブグループの中に、視覚入力の強さを検出してシナプス可塑性の閾値を調節するものがあるかもしれない。

## 2. 研究の目的

視覚野細胞の選択的視覚反応性は感受性期の視覚体験に基づいて経験依存的に成熟する。シナプス可塑性は、この発達に重要な役割を果たすと考えられている。興奮性シナプスの TCa-LTP と抑制性シナプスの長期増強は感受性期に限局して起こるので、経験依存的機能発達の基盤をなす過程である可能性が強い。一酸化窒素 ( $\text{NO}$ ) が、前者の誘発を抑制し、後者の誘発を促進することを示唆する結果を予備的実験により得た。視覚野においては、一部の GABA 作動性抑制細胞だけが神経型  $\text{NO}$  合成酵素 (nNOS) を発現するので、本研究では、nNOS 陽性 GABA 細胞によるシナプス可塑性と経験依存的機能発達の制御機構の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

nNOS 細胞による視覚野可塑性の制御機構を明らかにする目的で、スライス標本によるシナプス伝達レベルと麻酔下での視覚反応レベルの解析を行う。片眼遮蔽による非遮蔽眼反応増大に寄与する可能性のある TCa-LTP と遮蔽眼反応減弱に寄与する可能性のある抑制性シナプスの長期増強の  $\text{NO}$  による制御機構を、スライス標本を用いて解析する。 $\text{NO}$  による可塑性制御の機能的役割を解明するために nNOS 細胞の  $\text{NO}$  産生の特性を解析する。これらのスライス実験の結果を踏まえて、nNOS 細胞による視覚反応性発達の制御機構を視覚野細胞の視覚反応記録により調べる。

## 4. 研究成果

(1) ラット視覚野スライス標本を用いて  $\text{NO}$  による TCa-LTP 誘発の抑制機構を解析した。4 層の刺激により誘発される細胞外電位を 2/3 層から記録し、2Hz 刺激を 15 分間与えて

TCa-LTP を誘発した。灌流液に NO 発生剤のアルギニン (0.2 mM 以上) あるいは NOR3 を加えると TCa-LTP の誘発は完全に抑えられた。この抑制作用は、NO 合成阻害薬 L-NAME あるいは nNOS 選択的 NO 合成阻害薬 N-propyl-L-arginine のどちらによっても抑えられた。また、アルギニンによる TCa-LTP の抑制は、NO スカベンジャーの PTIO、あるいは、NO 感受性 guanylyl cyclase 抑制剤により抑えられた。cGMP アナログの pCPT-cGMP はアルギニンと同様に TCa-LTP の誘発を阻止した。nNOS が一部の GABA 作動性細胞にのみ発現していることを考慮すると、以上の結果は、nNOS 細胞由来の NO が guanylyl cyclase と cGMP を介して TCa-LTP 誘発を抑制すると結論できる。

(2) nNOS-ChR2/GFP マウスから作製した視覚野スライス標本において、青色光照射により nNOS 細胞に活動電位が発生することが判明した。このスライス標本に、2Hz 刺激の間、青色光照射して nNOS 細胞を活性化すると、TCa-LTP の誘発が抑えられることが分かった。この結果は、nNOS 細胞の活動レベルにより TCa-LTP の起こりやすさが制御されていることを示す。

(3) 灌流液に substance P (SP, 250 nM) を加えると nNOS 細胞に選択的に持続的な活動電位が発生することが分かった。SP 投与が TCa-LTP の誘発を抑制するかを検討した結果、SP は TCa-LTP の誘発を抑制することが判明した。

(4) NO による TCa-LTP 誘発の抑制が、T 型 Ca チャネル電流の抑制によるか検討した。TCa-LTP 誘発を促進する NOS 阻害薬の L-NAME を投与しても T 型 Ca チャネル電流にほとんど変化が見られなかったため、その可能性は低いと考えられる。

(5) 錐体細胞の抑制性シナプスの長期増強 (I-LTP) に対する NO の作用を錐体細胞からのホール・セル記録により解析した。I-LTP 誘発は、アルギニン投与により NO 産生を増加させると促進され、NO 合成阻害剤 L-NAME 投与により抑制された。薬理的解析により、nNOS 細胞由来の NO による錐体細胞内の guanylyl cyclase の活性化と cGMP 生成促進により I-LTP 誘発が促進されることが分かった。

(6) nNOS 細胞の活動に伴う NO 産生特性を NO 蛍光インディケータの DAF-FM や DAF-2 を用いて調べたが、この方法は NO の細胞外への広がりを検出するのに必要な感度が無いことが分かった。更に高い NO 検出感度を持つ、一酸化窒素測定システム inNO-T を導入して検討したが、測定は困難であった。

(7) nNOS 細胞の活動が視覚反応の可塑性の制御に関与するかを解析した。片眼遮蔽の間、持続的にアルギニンを視覚野に注入すると非遮蔽眼刺激により視覚野に誘発される細胞外電位 (VEP) の増大が抑制され、TCa-LTP が非遮蔽眼反応の増大に寄与することを支持する

結果が得られた。しかし、遮蔽眼刺激により誘発される VEP の減弱にも抑制される傾向が見られ、TCa-LTP 以外のシナプス可塑性にも NO による制御が行われている可能性があることが分かった。また、片眼遮蔽なしで視覚野にアルギニンを投与すると、その濃度に依存して VEP の大きさが影響を受けることも分かった。従って、実験結果の解釈は慎重に行う必要があると考えている。

nNOS-ChR2/GFP マウスの視覚野の上に青色発光ダイオードを装着し、片眼遮蔽の間 nNOS 細胞に活動電位を発生させる実験を試みた。しかし、5 - 6 日間の間持続的に光照射することが技術的に困難で、その光刺激が視覚入力となる問題もあり、実験を成功させるためには、さらなる工夫が必要であることが分かった。

(8) 片眼遮蔽により nNOS 細胞の活動が変化するかを、活動依存的に発現する c-Fos を用いて調べた。暗室に一晩おいた後、1 - 2 時間両眼視あるいは片眼視させた後、灌流固定して、nNOS と c-Fos に対する 2 重免疫組織化学染色を行った。nNOS 細胞の c-Fos 発現は、両眼刺激の場合の方が、片眼刺激の場合より強い傾向が見られた。

(9) 以上の結果は、nNOS 細胞の活動が視覚反応の可塑的变化を制御することを支持する。しかし、その制御の詳細な機構を解明するためにはさらなる解析が必要である。

## 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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

Komatsu Y., Postsynaptic determination of the polarity of long-term modifications at inhibitory synapses in neocortical pyramidal cells. 第 71 回日本生理学会大会, 2014 年 3 月 17 日, 鹿児島。

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

遠藤利朗、柳川右千夫、小松由紀夫、サブスタンス P はマウス大脳皮質視覚野の nNOS 細胞の陽イオンチャネルを活性化して脱分極させる。第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 18 日

[図書](計 1 件)

Komatsu Y., Yoshimura Y (2011) Long-term modification at inhibitory synapses in developing visual cortex. "Inhibitory Synaptic Plasticity" Woodin MA, Maffei A

(eds.) pp. 17-27 Springer

〔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)

研究者番号：90135343

(2)研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ( )

研究者番号：