

## 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25年 5月 1日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890216

研究課題名（和文） 大脳皮質味覚野の局所回路におけるシナプス伝達に対する一酸化窒素の作用機序

研究課題名（英文） Presynaptic cell-type-dependent regulation of GABAergic synaptic transmission by nitric oxide in rat insular cortex

研究代表者

山本 清文 (YAMAMOTO KIYOFUMI)

日本大学・歯学部・専修研究員

研究者番号：30609764

研究成果の概要（和文）：

ラットの島皮質内抑制性シナプス伝達におよぼす一酸化窒素の影響を検討した。ホールセル・パッチクランプ法を用いて複数のニューロンを同時に刺激および記録した。シナプス前終末が GABA 作動性高頻度発火型ニューロンによって形成されるシナプスにおいて、脱分極性刺激パルスによって誘発されるシナプス伝達応答は、一酸化窒素ドナーである SNAP によって減弱または増加応答を示した。解析の結果、SNAP 存在下で認められたこれらの応答は、終末からの伝達物質放出を修飾機構あるいはシナプス後ニューロンの受容体の感受性の調節機構に起因し、かつその調節は終末がターゲットするニューロンの種類に依存していると推察された。

研究成果の概要（英文）：

Nitric oxide (NO) is a key retrograde messenger that regulates synaptic transmission in the cerebral cortex. We performed multiple whole-cell patch clamp recordings from Layer V neurons in rat insular cortex. SNAP, an NO donor, suppressed uIPSC amplitudes in approximately 40% of the connections, whereas 35% of the connections showed uIPSC facilitation in inhibitory synapses composed of presynaptic fast-spiking (FS) neurons. In contrast, synaptic connections composed of presynaptic non-FS neuron types showed a constant suppression of uIPSCs by SNAP. These results suggest that NO regulation of inhibitory synaptic transmission is dependent on presynaptic cell subtypes and that its effects are partially mediated by presynaptic mechanisms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：機能系基礎歯科学

キーワード：島皮質・シナプス伝達・短期可塑性・NO

## 1. 研究開始当初の背景

さまざまな感覚受容器から届く情報の分

析・統合によって、中枢神経系は外界の「状況」を知覚する。この原則は、味覚・内臓感

覚などの身体の内環境の知覚にもあてはまる。口腔内に存在する味蕾で受容した味覚情報は脳幹孤束核から視床後内側核を介して高次中枢である島皮質に入力する。入力した情報は、同皮質内に存在するニューロンによって構成されるネットワークによって統合・処理され、さらなる高次中枢へと出力される。さらに島皮質は扁桃核と相互の神経連絡があることから島皮質はストレスや情動行動にも重要な働きをされるとされる(Yamamoto et al., 1994)。味覚情報の処理を行う島皮質内神経ネットワークは、興奮性錐体細胞ならびに、発火特性の差異によって区別される種々の抑制性介在ニューロンから構成される。これらのニューロンによって形成されるシナプスのシナプス伝達が、脳内情報処理機構の根幹を成すと考えられる。過去の研究により、島皮質内抑制性シナプスでムスカリン受容体を介した伝達物質放出の修飾が、発火特性などの膜応答特性などによって分類されるシナプス後ニューロンの種類に依存することを示した。したがって、シナプス前終末はシナプス後ニューロンの種類を識別し、そのニューロンの特性あるいは種類に応じて放出を調節すると推察された。シナプス後側ニューロンによって産生され放出される様々なレトロ・グレードメッセンジャーがこれらの識別機構に寄与し、種々のメッセンジャーが短期的あるいは長期的にシナプス伝達特性を修飾しうると予想された。

## 2. 研究の目的

神経終末がシナプス後側ニューロンを識別する機構として、シナプス後ニューロンか

ら放出され、終末での伝達物質放出を修飾する一酸化窒素やエンドカンナビノイドなどのレトロ・グレードメッセンジャーを介した逆行性シグナル伝達機構が挙げられる。視野ならびに内側前頭野の皮質、海馬、腹側被蓋野においてシナプス伝達の長期増強や長期抑制を誘発するとされる一酸化窒素に注目し、島皮質内に存在する種々の抑制性介在ニューロンならびに興奮性錐体ニューロンから構成される抑制性シナプスにおけるシナプス伝達におよぼす一酸化窒素の影響を検討した。

## 3. 研究の方法

実験には VGAT-Venus 蛍光タンパク遺伝子導入ラットを用いた。既報に基づき急性脳スライス標本を作製した。2-3 週齢の Venus 発現ラットを pentobarbital 麻酔下で断頭した(75 mg/kg, i.p.)。吻側大脳皮質を摘出し、マイクロサイザーを用いて島皮質を用いて厚さ 350  $\mu\text{m}$  の冠状断スライスを作製した。

人工脳脊髄液灌流下で、共焦点レーザー顕微鏡ならびに蛍光顕微鏡観察下で、Venus 陽性ニューロンと陰性ニューロンを GABA 作動性抑制性ニューロンと興奮性錐体ニューロンに弁別した。複数のニューロンに電極を同時に装着しホールセルパッチクランプ法により膜電位を記録した。脱分極性ならびに過分極性パルスによって惹起された発火パターンや膜特性から記録したニューロンの種類を同定した。分類したニューロンに対し、-60 mV で膜固定し、脱分極性刺激パルス(1200 pA, 2.5 ms)によってパッチ電極を設置するニューロン同士で形成されるシナプス

応答を記録した。シナプス伝達におよぼす一酸化窒素の影響を検討するために、一酸化窒素の donor である、

S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP) 投与中のシナプス後電流の振幅値の変化を解析した。

#### 4. 研究成果

GABA 作動性ニューロンのうち、シナプス前側 fast-spiking ニューロン (FS)とシナプス後側興奮性錐体ニューロン (Pyr)によって形成される FS-Pyr 間の抑制性シナプスにおいて、それぞれ約3割のシナプスが SNAP によって減弱ならびに増強応答を示した。さらにシナプス前 FS ニューロンと GABA 作動性ニューロンで形成される抑制性シナプス、FS-interneuron シナプスにおいても同様な結果が得られた。連続刺激により誘発される IPSC 振幅比である paired-pulse ratio 値ならびに放出失敗確率、振幅値の coefficient variance を解析し、SNAP 投与によってもたらされるシナプス伝達応答の変化は、シナプス前終末の放出機構を介している可能性が示された。しかし、一部のシナプスタイプにおいてシナプス後ニューロンの GABA 受容体の感受性の変化に起因する可能性が示唆された。シナプス前側ニューロンが FS ニューロン以外のニューロンタイプ、non-FS 介在ニューロンから構成される nonFS-Pyr シナプス nonFS-interneuron シナプスのシナプス伝達において、SNAP による減弱応答が認められた。FS-Pyr シナプスならびに FS-interneuron シナプスにおける振幅値は、1-300  $\mu$  M SNAP 投与によって濃度に依存した変化を示した。一酸

化窒素のスキャベンジャーである PTIO ならびにグアニル酸シクラーゼ阻害薬である ODQ 存在下で SNAP 誘発性の IPSC 振幅値の変化は認められなかった。これらの解析法により、この応答はシナプス前終末放出の修飾を介する可能性を見いだした。

一酸化窒素合成酵素である NOS-1 の局在が、島皮質内の錐体細胞の apical dendrite ならびに抑制性ニューロンの一部に認められた。

これらの結果から、ニューロンの興奮依存的に産生・放出された一酸化窒素がシナプス前終末に到達し、あるいは自ら産生細胞の GABA 受容体の感受性を変化させることによって、シナプスタイプに依存したシナプス伝達調節を示唆する。

#### 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2件)

- ① Ebihara K, Yamamoto K, Ueda K, Koshikawa N, Kobayashi M: Cholinergic interneurons suppress action potential initiation of medium spiny neurons in rat nucleus accumbens shell. *Neuroscience.*, 査読有, 236(16), 2013, pp. 332-344.
- ② Kobayashi M, Takei H, Yamamoto K, Hatanaka H, Koshikawa N: Kinetics of GABA<sub>B</sub> autoreceptor-mediated suppression of GABA release in rat insular cortex. *J. Neurophysiol.*, 査読有, 107 (5), 2012, pp. 1431-1442.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 山本 清文. 大脳皮質味覚野における興奮性・抑制性シナプス伝達に關与する電位依存性カルシウムチャンネルの同定. 第 35 回日本神経科学大会 名古屋 2012 年 9 月 21 日
- ② 山本 清文. ラット島皮質 GABA 抑制性シナプス伝達におけるシナプス後ニューロン依存的な一酸化窒素の修飾作用, 第 85 回日本薬理学会 京都 2012 年 3 月 15 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 清文 (YAMAMOTO KIYOFUMI)  
日本大学・歯学部・専修研究員  
研究者番号 : 30609764