

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 24 日現在

機関番号：32690

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430025

研究課題名(和文) 一次聴覚野におけるニコチン性制御による感覚情報選択性の機序

研究課題名(英文) Nicotinic regulation of sensory information processing in primary auditory cortex

研究代表者

川井 秀樹 (Kawai, Hideki)

創価大学・理工学部・准教授

研究者番号：90546243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：一次聴覚皮質においてある音周波数に感受性が高い部位では、ニコチン投与がその周波数応答を増強させ、他の周波数応答を減少させる。本研究ではこのニコチン性フィルタリングの仕組みについて、分子、細胞、生体レベルで検証した。ニコチンによるプロテインキナーゼA (PKA) 活性が細胞外シグナリングキナーゼ(ERK)を活性化して、この制御をしていることがわかった。皮質内の興奮性シナプスでのニコチン性活性が、PKAを介して、主要な神経伝達物質グルタミン酸依存性イオンチャネルをリン酸化し、シナプス電流を増強していることが示唆された。また一方で、抑制性シナプスでも応答を減少させていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Systemic nicotine exposure enhances sound evoked responses of specific auditory information while it suppresses those of non-specific information via nicotinic acetylcholine receptors in primary auditory cortex (A1). We investigated mechanisms underlying this nicotinic filtering of sensory information at molecular, cellular, and system levels. Nicotine exposure activated protein kinase A (PKA), which in turn activated extracellular signaling-regulated kinases (ERK) to confer the nicotinic filtering. Nicotine increased the amplitude of spontaneous excitatory synaptic activities via PKA by phosphorylating the subunit of main neurotransmitter glutamate-activated ion channels at or near the synapses. It was also found that nicotine suppressed the responses of inhibitory synaptic activities. These data suggest that nicotinic filtering recruits PKA to regulate both excitatory and inhibitory synapses in A1.

研究分野：神経科学

キーワード：ニコチン性受容体 アセチルコリン 大脳新皮質 聴覚皮質 認知症 知覚 認識

## 1. 研究開始当初の背景

「感覚情報フィルタリング」とは、必要な情報を選択し、必要でない感覚情報を抑制する、大脳皮質の神経回路が担う神経情報処理機構である。この機構は、例えばヒトが感覚情報に注意・集中する際に生じると考えられており、音情報を処理する聴覚大脳皮質でも生じると考えられる。この機構の一部を担っているとされているのが神経伝達物質アセチルコリンで、脳内にあるニコチン性およびマスカリン性受容体に作用して感覚情報を制御すると考えられている。

マウスの一次聴覚皮質でのこれまでの研究から、薬物ニコチンの生体への投与によっても同様の情報処理がみられ、具体的には、視床から聴覚皮質入力層(第3・4層)へ、音周波数特異的に入力する応答が、ニコチン性活性により増強し、さらにその上層(第2・3層)でも応答も増強することが観察された(Kawai et al., 2007, *Nature Neurosci*, 10, 1168-75)。こうした音周波数依存的なコラム内での増強と、特徴周波数から2オクターブ離れた周波数に感受性が高いコラムからの入力応答による、第2~4層内での水平的な神経伝達の流れは、ニコチン性活性により抑制されることが観察された(Kawai et al., 2011, *J Neurosci*, 31, 14367-77)。これらの”ニコチン性フィルタリング”と呼ばれる制御は、ニコチン投与後、約5~10分でピークを迎え、少なくとも30分持続した。また、これらの応答は雌雄で思春期から成体までみられ、特に思春期で雌マウスの方が雄マウスより早い時期に強い制御が観察された。

このニコチン性制御による聴覚情報フィルタリングのメカニズムは、これまで ERK と呼ばれるキナーゼ酵素を介していることが報告された(Intzkirveli and Metherate, 2012, *J Neurophysiol*, 107, 2782-93)。更に、ニコチン性活性と音刺激により、ERK のリン酸化が増加することが示唆された(Kawai et al., 2013, *Synapse*, 67, 455-68)。

## 2. 研究の目的

上記の背景をもとに、本研究では、一次聴覚皮質におけるニコチン性制御のメカニズムを、分子、細胞、システム(神経回路)レベルで解明することを目的とする。

特に、以下の課題を検証する。

(1) 生体マウスにおける音刺激応答のニコチン性制

(2) 第3・4層神経細胞での興奮性および抑制性シナプス伝達のニコチン性制御機序の解明

(3) 御興奮性シナプスにおけるニコチン性制御の生化学的機序の解明

## 3. 研究の方法

マウス(FVB系統、生後26~30日)を全身麻酔下で以下の実験を行なった。

### (1) 生体を用いた電気生理学実験

開頭手術後、防音チャンパーにマウスを設置し、音刺激を片耳方向で与え、対側の一次聴覚皮質から局所電場電位(LFP)を記録した。音刺激は、様々な音強度と周波数(1-40kHz)のピュアトーン、もしくはホワイトノイズで、音長100ms(5ms rise/fall)、0.5Hzで25回繰返したものを1セットとし、それらを平均した応答を得た。ニコチン(もしくは生理食塩水)は服用量0.7-2 mg/kgで腹腔に投与した。阻害剤は、微小な先端(<50 μm)に加工したガラス管を用いて直接一次聴覚皮質内に注入した。

### (2) 脳スライスを用いた電気生理学実験

一次聴覚皮質を含む脳切片を作成し、ホールセルパッチクランプ法を用いて一つの細胞に電極を刺し、神経細胞の内在的および誘発的な、電気的膜特性を測定した。特に静止膜電位、膜抵抗および時定数、方形波電流の入力による活動電位の閾値、ピーク値、スパイク幅、そして脱分極および再分極の傾斜、後再分極値、スパイク間の時間間隔などを測定し、機能的に細胞種を同定した。シナプスでのニコチン性制御を調査するため、電位固定を行い、自発的、もしくは誘発的なシナプス電流を記録した。記録後、応答開始時間、応答上昇期の傾き(スロープ)、応答の大きさ(振幅)、応答頻度などを計測した。また、神経細胞の形態的解析を行うため、蛍光色素で標識されたアビジンを用いて、記録用細胞内溶液に含まれていたビオチンを認識させ、落射蛍光顕微鏡で撮影した。

### (3) 生化学的実験

マウスを防音チャンパーにスピーカーから約15cm離して設置し、ニコチン(または生理食塩水)を腹腔内に注入し、音刺激の有無の条件で10分間刺激した。音は、ホワイトノイズ(70dB SPL, 100 ms, 0.5 Hz)を用いた。刺激後に、脳を摘出し、氷冷下で聴覚皮質上層を切り取り、シナプスを含む膜試料(シナプトニューロゾーム)を単離した。その後、Western Blot法を用いてタンパク質の定量解析を行った。簡単に説明すると、SDS入りの緩衝溶液で膜試料を溶解し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動でタンパク質を分離し、メンブレンに転写してプロットを作成した。次に、目的タンパク質に特異的に結合する免疫抗体(一次抗体)で認識させ、その一次抗体をHorse Radish Peroxidase (HRP) 酵素で標識した二次抗体で認識させて、化学発光(Enhanced Chemiluminescence)をする基質を加え、発光を装置で検出し、得られたプロットを定量した。

細胞表面に存在するタンパク質を標識するため、上記のように脳を摘出し、脳切片を切り出し、1時間半回復させたのち、ビオチン化を行なった。その後、シナプトニューロゾ

ームを作製し、アビジンビーズによって、ビオチン化タンパク質を単離し、Western Bot 法を用いて定量解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 生体マウスにおける音刺激応答のニコチン性制御

これまで一次聴覚野(A1)におけるホワイトノイズによる応答に対するニコチン制御について知られていなかったため、まず 1-20kHz の音周波数を持つホワイトノイズで刺激し、局所電場電位(LFP)を A1 の第3・4層で記録した。特徴周波数(CF)ピュアトーンによる刺激応答の場合と、応答開始時間は変わらなかったが、応答持続時間はより長かった。安定した応答を計測したのち、ニコチンを腹腔に投与したところ、応答の大きさが増加した。ピュアトーンと同様に、応答開始時間も早くなった。

次にプロテインキナーゼ A (PKA) 阻害剤を一次聴覚皮質に注入し、ニコチン性活性によるホワイトノイズ応答の増加が PKA を介しているかどうかを検討した。その結果、PKA 阻害剤の存在下で、ニコチン性活性による応答の増加は見られなかった。このことから、生体でもニコチン性活性が PKA を介して音刺激応答を増加させていることが示唆された。

次に、一次聴覚野の表面から皮質下白質までの応答を、100  $\mu$ m 間隔で直線上に配置されたマルチ微小電極を用いて記録した。神経回路の時間依存的活性を検証するため、特徴周波数(CF)、およびその周波数から2オクターブ離れた周波数(nonCF)のピュアトーンに対する LFP 応答を記録した。その後、電流源密度解析(Current Source Density analysis)を行ない、音刺激中の電流源密度変化に対するニコチン性活性の変化を検討した。

これまでの研究結果と同様に、ニコチン投与により、第3・4層での応答開始時間が早まり、興奮性のシナプス入力を意味する電流シンク量が応答開始から0-20msで増加した。一方、30-80msでの応答は平均的に有意な変化は見られなかった。

ニコチン投与前に、PKA 阻害剤を一次聴覚野に注入したところ、CF に対する応答開始時間にばらつきが見られたが、電流シンクの大きさには変化はなかった。その後、ニコチンを投与すると、応答開始時間は有意に減少したが、応答開始(0ms)から20msの電流シンクの大きさは増加しなかった。しかし、30-80msの応答では投与から少なくとも約30分ほど長期的な減少が見られた。これらのことから、CF音開始から20msの応答のニコチン性活性による増強は、PKA 依存的に生じていることが示唆され、その後少し遅れた30-80msの応答はPKA 阻害下で、ニコチン性活性がさらに音依存的に減少させることが明らかになった。したがって、ニコチン性制御には、少なくとも

も二相性の制御 - 応答初期の直接的な PKA 依存的増強と応答後期の間接的な PKA 依存的抑制 - が関与していることが明らかになった。

nonCF ピュアトーンに対する応答において、ニコチン投与は約10分間、応答開始から20msと30-80msの電流シンクを減少させた。一方、PKA 阻害剤下では、ニコチン性活性による応答開始時間の減少がみられ、0-20msでの応答は阻害され、30-80msの応答は減少したままで変化がなかった。これらのことから、A1でのnonCF入力場所からCF入力場所への水平な皮質間入力のニコチン性活性による減少は、PKA 依存的に生じており、応答開始後30-80msで生じる遅れた神経活性へのニコチン性制御はPKA 非依存的であることが示唆された。

##### (2) 第3・4層神経細胞での興奮性および抑制性シナプス伝達のニコチン性制御機序の解明

一次聴覚皮質の第3・4層の神経細胞において、興奮性シナプス入力を測定し、ニコチン性活性による影響を検討した。錐体細胞において、自発的な入力応答をニコチン性活性前後で比較すると、応答の大きさは平均的に増加したが、応答頻度には変化が見られなかった。このことから、シナプス前ではなく、シナプス後でのニコチン性シグナリングによる制御の可能性が示唆された。

視床細胞による直接的な興奮性入力を単離して、電気刺激による誘導応答に対するニコチン性活性の影響を調べたところ、応答の大きさや応答確率に変化はなかった。これらのことから、第3・4層の神経細胞における興奮性シナプスのニコチン性制御は、視床-皮質系シナプスではなく、皮質内神経細胞の興奮性シナプスで生じることが明らかとなった。

次に、この皮質内神経細胞の興奮性シナプスにおけるニコチン性制御の機序を、阻害剤を用いて検討した。背景で述べたように、これまでニコチンによる音刺激応答の増加がERKを介していることから、ERK 阻害剤を用いて、興奮性シナプスの自発的応答のニコチン性制御を調べたところ、応答の頻度には影響はなかったが、ニコチン性活性による応答の大きさの増加は阻害された。また ERK 阻害剤だけの影響はなかった。これは、シナプス後での ERK の関与を示唆している。一方、PKA 阻害剤(PKI)のみにより、その応答の大きさと頻度のわずかな増加がみられた。しかし、PKI 存在下でのニコチン性活性により、応答の大きさと頻度は有意に減少した。これらのことから、PKA はシナプス前後で重要な役割をしており、ニコチン性活性によるシグナリングは、PKA 阻害の状態では、抑制的に働くことが示唆された。

さらに、シナプス末端におけるニコチン性制御を検討するため、活動電位非依存的な自発的シナプス伝達への影響を調べた。電位依存性ナトリウムチャンネルをテトロドトキシン

で阻害して、活動電位発生を阻害したところ、自発的な興奮性シナプス応答の大きさと頻度が減少した。その状態で、ニコチン性活性を起こしたところ、応答の大きさと頻度がさらに減少した。これらのことから、シナプス前におけるニコチン性制御は、活動電位非依存的に、抑制的に働いていることが示唆された。

一方、第3・4層錐体細胞において、抑制性シナプスの自発的応答に対するニコチン性制御を検討した。以前の研究から、抑制性応答の大きさを低応答群(<50 pA)と高応答群(>50 pA)に分けて分析したところ、ニコチン性活性により、低応答群の応答や、高応答群の応答の頻度には影響がなかったが、その大きさがわずかに(約8%)増加した。

この増加が活動電位依存的に生じているかどうかを検証するため、テトロドトキシンを用いて、シナプス前末端でのニコチン性制御を検討した。自発的応答の大きさはテトロドトキシンで変わらなかったが、応答の頻度が約半分に減少した。その状態でニコチン性活性を起こしたところ、応答の大きさがさらに約13%減少し、応答頻度は約60%減少した。このことから、活動電位とは別に、ニコチン性活性は抑制性シナプス前で、強い抑制的影響を及ぼすことが示唆された。

### (3) 興奮性シナプスにおけるニコチン性制御の生化学的機序の解明

ニコチン投与による音刺激応答の増強機序として、興奮性シナプスでのグルタミン酸作動性イオンチャネル(iGluR)のリン酸化が考えられる。iGluRサブユニットのGluA1アミノ酸配列のうち、845番目のセリン残基(Ser845)のPKAによるリン酸化が、シナプスへの挿入を増加させ、コンダクタンスを増加することが、他の脳部位(海馬)で知られている。そこで、生体でニコチン投与または音刺激を行い、シナプス試料であるシナプトニューロゾームをA1上層部位から単離して、GluA1およびERKの活性(リン酸化)を検証した。

ニコチン投与後、ホワイトノイズ刺激を10分間行なったところ、Ser845リン酸化の増加が検出された。音刺激だけではリン酸化の増加は見られなかったが、ニコチン投与後に音刺激を行わずとも、Ser845リン酸化の増加が見られた。このことから、ニコチン性受容体活性が、GluA1のSer845リン酸化を誘導していることが示唆された。

このリン酸化を行なっているキナーゼを同定するために、PKA阻害剤を一次聴覚皮質に注入したところ、ニコチン投与によるリン酸化が有意に減少したことから、PKAがSer845のリン酸化を介していることが明らかとなった。さらに、PKAによるERKの活性の可能性を調べたところ、PKA阻害により、ERKのリン酸化が阻害された。このことから、PKAがGluA1Ser845とともにERKをリン酸化していることが示唆された。

これまでのGluA1Ser845のリン酸化の結果は、シナプトニューロゾーム全てに存在するタンパク質を検出したため、細胞表面にある機能的なiGluRのリン酸化とは限らない。そこで、シナプス膜表面に存在するiGluRを、ビオチン化で認識させ、それらのSer845のリン酸化を調査したところ、明らかな増加が検出された。このことから、ニコチン性活性が、神経伝達に関わるiGluRのリン酸化を起こしていることが示唆された。

### (4) まとめ

これらの研究から、ニコチン性フィルタリングの機序が僅かながら明らかになってきた。ニコチン性活性によるPKAの活性がERKに作用し、音刺激による視床入力依存的な神経情報処理を増大し、同時に非特徴周波数による水平的な入力を減少させる。その時、皮質内錐体細胞の興奮性シナプスでは、iGluRのGluA1サブユニットがリン酸化され、ナトリウムイオンのコンダクタンスが増加し、脱分極を生じる電流の増加を起こしていると考えられる。錐体細胞の抑制性シナプスでは、(活動電位阻害の条件下において、シナプス前で抑制が生じているが、)通常、ニコチン性活性により抑制が増加する。これが水平的入力による錐体細胞の抑制の機序である可能性がある。しかし、これまでの結果から、どの層の興奮性シナプスと、どの種類の抑制性シナプスがニコチン性活性により制御を受けているかは明らかではない。アセチルコリンのニコチン性活性が、注意力を生み出して、感覚情報の知覚・認識を高めていることから、今後の研究が、認知症などの認識機能低下の理解と、治療法の開発へと繋がると考えられる。

### 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 1件)

[学会発表] (計 2件)

Kenichi YAMASAKI, Kiyonobu INAKUMA, Takahiro NAGAYAMA, and Hideki D. KAWAI (2015) Nicotinic enhancement of sound-evoked responses in auditory cortex involves phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases and GluA1 subunit of AMPA receptors. Association for Research in Otolaryngology, 38<sup>th</sup> Annual Mid-Winter Meeting. Program No. PS-98.

Takahiro NAGAYAMA, Kenichi YAMASAKI, Kiyonobu INAKUMA, and Hideki D. KAWAI (2016) Nicotinic activation of protein kinase A modulates excitatory synapses in pyramidal neurons to regulate sound-evoked responses in the thalamocortical input layers of mouse auditory cortex. Society for Neuroscience, Program No.

500.02.

本年度の第40回日本神経科学大会でも、最新の研究結果を発表する予定。

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 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 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

川井 秀樹 (KAWAI, Hideki)  
創価大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号：90546243

### (2) 研究分担者

根本 正史 (NEMOTO, Masahito)  
創価大学・公私立大学の部局等・その他  
研究者番号：80370980

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

山崎 賢一 (YAMASAKI, Kenichi)  
稲熊 清伸 (INAKUMA, Kiyonobu)  
永山 貴大 (NAGAYAMA, Takahiro)  
鈴木 杏奈 (SUZUKI, Anna)