

主論文の要旨

Ni²⁺-sensitive T-type Ca²⁺ channel currents are regulated in parallel with synaptic and visual response plasticity in visual cortex

（ 視覚野において Ni²⁺感受性 T 型 Ca²⁺チャネル電流は
シナプスと視覚反応の可塑性と並行して制御される ）

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻
高次神経統御学講座 視覚神経科学分野

（指導：小松 由紀夫 教授）

堀部 尚子

【はじめに】

大脳皮質視覚野細胞は視覚刺激の特徴に対して選択的に反応する。反応選択性は感受性期と呼ばれる生後発達の一時期の視覚体験により精緻化される。シナプス伝達の活動依存的長期可塑性は、この経験依存的皮質機能の精緻化の初期過程と想定されてきた。感受性期に片眼を遮蔽すると、遮蔽眼と非遮蔽眼の刺激により視覚野ニューロンに誘発される反応にそれぞれ抑圧と増強が生じる。したがって、眼優位可塑性はこの仮説の検証に有用である。最近の研究により興奮性シナプス伝達の長期増強と長期抑圧が眼優位可塑性に寄与することが示唆されている。一連の研究により NMDA 受容体依存性の長期抑圧が遮蔽眼反応の減弱を担うことが支持されている。一方、我々の薬理学的研究は低頻度刺激により誘発される長期増強が非遮蔽眼反応の増強を担うことを示唆している。この長期増強の誘発にはシナプス後細胞の T 型 Ca^{2+} チャンネルの活性化が必要である。片眼遮蔽による眼優位性の変化と同様に、2/3 層錐体細胞の T 型 Ca^{2+} チャンネル依存性長期増強は動物を正常に飼育すると感受性期に局限して生じ、暗室飼育すると成熟期になっても起こる。この長期増強の誘発は低濃度の Ni^{2+} だけでなく有機化合物の T 型 Ca^{2+} チャンネル阻害薬によっても抑えられる。T 型 Ca^{2+} チャンネルには $\text{Ca}_v3.1$ 、 $\text{Ca}_v3.2$ 、 $\text{Ca}_v3.3$ の 3 種類のサブタイプがあるが、 $\text{Ca}_v3.2$ だけが高い Ni^{2+} 感受性を示すので、 $\text{Ca}_v3.2$ がこの長期増強の誘発に必要と考えられる。本研究では、2/3 層錐体細胞の $\text{Ca}_v3.2$ 電流の生後発達を調べた。

【対象と方法】

正常飼育した生後 8-12、20-30、60-90 日齢と生下時より暗室飼育した 60-90 日齢の Long-Evans ラットより作製した、厚さ 300 μm の一次視覚野スライス標本を人工脳脊髄液で灌流し、室温で電気生理学的実験を行った。膜電位固定がより適切に行えるように 2/3 層上部の小型の錐体細胞からホール・セル記録を行い、 Ca^{2+} チャンネル電流を測定した。パッチ電極内液には、主な陽イオンが Cs^+ で、 K^+ チャンネル・ブロッカーのテトラエチルアンモニウム (TEA) を含むものを用いた。灌流液には Na^+ チャンネル・ブロッカーのテトロドトキシンとリドカイン、及び TEA を加えて、 Na^+ チャンネルと K^+ チャンネルを阻害した。1 価の陽イオン電流を更に減少させるために、 Na^+ と K^+ をコリンと Cs^+ に置換した。膜電流は、膜容量補償と 60-80% のシリーズ抵抗補償下で記録し、P4 プロトコールによりリーク電流を差し引いた。

【結果】

感受性期 (生後 20-30 日齢) のラットの 2/3 層錐体細胞から Ca^{2+} チャンネル電流を記録し、その特徴を調べた。-100 mV の保持電位から -80 mV と +20 mV の間のテスト電位にステップ状に脱分極させることにより引き起こされる Ca^{2+} チャンネル電流を測定した。P/Q、N、L 型の高閾値 Ca^{2+} チャンネル・ブロッカーを投与すると、-30 mV よりプラス側への脱分極による電流は大きく減少したが、-40 mV とそれよりマイナス側への脱分極による電流は影響を受けなかった (図 1A)。したがって、-40 mV までの脱分極によつ

て誘発される電流は、T型あるいはR型Ca²⁺チャネルの活性化によるものと考えられる。この推測は、約-80 mVと静止膜電位より少し過分極側の電位からこの電流に不活性化が起こることからも支持された(図1B)。

-100 mVから-40 mVへの脱分極ステップにより引き起こされる電流は50 μMのNi²⁺の投与により約半減し、細胞外液からCa²⁺を除くと消失した(図1B-C)。この電流は、R型Ca²⁺チャネルを含む高閾値Ca²⁺チャネルを阻害するが、T型Ca²⁺チャネルには影響を与えない低濃度のCd²⁺(10 μM)の影響は受けなかった(図1D)。しかし、T型Ca²⁺チャネルの全てのサブタイプに対して阻害効果を示すML218(3 μM)の投与により完全に消失した(図1E)。したがって、-100 mVから-40 mVへの脱分極ステップにより引き起こされる電流はT型Ca²⁺チャネルの活性化によるもので、Ni²⁺により消失した電流はCa_v3.2 T型Ca²⁺チャネルの活性化によるものと考えられる。

上記の結果を踏まえて、-100 mVから-40 mVへの脱分極ステップにより引き起こされる電流の測定により、T型Ca²⁺チャネルの発達に伴う変化を調べた。この電流のNi²⁺感受性は、開眼前の時期(8-12日)では低く、感受性期で最も高くなり、成熟すると(60-90日)再び低くなった(図2A-C)。暗室飼育すると、成熟してもNi²⁺感受性は高いままであった(図2D)。細胞の大きさが発達とともに大きくなるので、単位膜面積当たりの電流を、電流を細胞容量で割った電流密度で評価した。総T型Ca²⁺チャネル電流は開眼前から感受性期までの間に増大したが、その電流密度には発達に伴う変化は見られなかった(図3A-B)。Ni²⁺投与により消失した電流でCa_v3.2電流を評価すると、その電流と電流密度は共に開眼前では小さいが、感受性期には非常に大きく、成熟すると再び小さな値に戻った(図3C-D)。暗室飼育すると、成熟しても大きな電流と電流密度が維持された(図3C-D)。シリーズ抵抗及び入力抵抗には実験群間に有意な差は認められなかった(図3E-F)。したがって、Ca_v3.2電流の年齢と経験に依存する変化はT型Ca²⁺チャネル依存性長期増強及び眼優位可塑性のものと同様であった。

【考察】

本研究では、-100 mVから-40 mVへの脱分極ステップにより引き起こされるT型Ca²⁺チャネル電流を測定し、50 μMのNi²⁺の投与により消失した電流量によりCa_v3.2 T型Ca²⁺チャネル電流の大きさを評価した。Ni²⁺による阻害のIC₅₀はCa_v3.2では約10 μMであるのに対してCa_v3.1とCa_v3.3ではその約20倍であることが知られているので、50 μMのNi²⁺はCa_v3.2の大部分を抑えるが、他の2つのサブタイプに対してはほとんど抑制効果がないと考えられる。従って、Ca_v3.2電流の大きさの評価は適切と考えられる。本研究で得られた結果は、T型Ca²⁺チャネルの中でCa_v3.2だけがT型Ca²⁺チャネル依存性長期増強の誘発に関与し、Ca_v3.2が視覚反応の経験依存的発達に重要な役割を果たすことを示唆している。Ca_v3.2電流の大きさは、細胞膜に存在するチャネル数とその特性に依存するので、チャネルの転写、翻訳、細胞膜への輸送の過程での調節と、リン酸化、レドックス制御等によるチャネル特性レベルでの調節を受ける可能性が考えられる。Ca_v3.2電流の発達に伴う変化を制御する機構の解明は、感受性期の

制御機構を理解するために重要な今後の課題である。

【結語】

本研究結果は、T型 Ca^{2+} チャネル依存性長期増強の発達に伴う変化が $\text{Ca}_v3.2$ T型 Ca^{2+} チャネル電流の調節を介して起きることを示唆する。