

平成30年6月18日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K17362

研究課題名(和文) エピソード記憶の符号化が早い海馬CA1シナプス可塑性を引き起こす

研究課題名(英文) Encoding of episodic memory triggers rapid synaptic plasticity in the hippocampal CA1

研究代表者

崎本 裕也 (SAKIMOTO, Yuya)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40634390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本プロジェクトではエピソード事象直後から1時間以内の期間に焦点をあて、エピソード記憶の符号化が早い海馬CA1シナプス可塑性を生じさせるか検討した。スライスパッチクランプ法を用いた研究において、エピソード事象提示5分以内にmEPSCとmIPSCが増加することが示された。また、paired pulse ratioの結果はエピソード提示5分以内にグルタミン酸放出確率の増加を示し、加えて、ウェスタンブロッティング法はエピソード提示から5分以内にGABAA受容体数の増加を示すものであった。以上、エピソード提示による記憶構築過程においてこれらの興奮と抑制の強化のバランスが重要であると提案する。

研究成果の概要(英文)：In this project, we focused on rats' hippocampal synaptic plasticity within 1 hour time period after a presentation of episodic events in inhibitory avoidance task. In the slice patch clamp methods, mEPSC and mIPSC amplitude increased at the 5 min after learning. Also, the results of paired pulse ratio showed an increase of probability of glutamate release. In addition, in westernblotting methods, it increased the number of GABAA receptors on the hippocampal synapses. Thus, we suggest that it plays critical role for formation of episodic memory in the balance of excitatory and inhibitory input from synapses.

研究分野：神経生理学

キーワード：海馬CA1 エピソード記憶 patch clamp

1. 研究開始当初の背景

海馬は一日の出来事, エピソードの記憶形成に中心的に関わる(Scoville ら, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 1957)。近年, 申請者は *in vivo* 海馬脳波(海馬 波)を記録し, 記憶課題中のエピソード提示後の海馬 波のパワーの動向を観察し(Sakimoto ら, Behav. Brain Res. 2013, Exp. Brain Res. 2013), 課題獲得に伴う海馬 波のパワーの変化を明らかにした(PLoS One 2013; 図1)。初めて記憶課題を訓練した時点を獲得初期, 記憶課題を何度も繰り返しほぼ完全に習得した時点を獲得後期, 初期と後期の間を獲得中期とし, 獲得初期でエピソード提示後に海馬 波のパワーが顕著に増加した(Sakimoto ら, PLoS One 2013)。獲得初期で海馬 波のパワーの増加が見られたことは, 海馬 CA1 領域がエピソード記憶の符号化に重要な役割を担っていることを示す。先行研究において海馬 波が長期増強などシナプス可塑性を促進することが知られているが(Larson ら, Science 1986, Hyman ら, J. Neurosci. 2003),

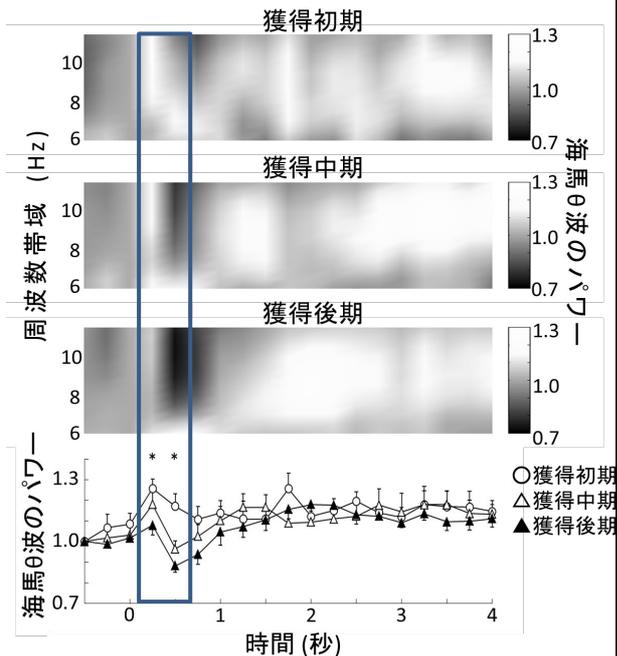


図1. 課題獲得に伴う海馬 θ 波のパワーの変化。枠内の区間で有意差が見られた(*: $p < 0.05$)。Sakimoto ら, PLoS ONE 2013 より一部抜粋。

その分子メカニズムについては明らかにされていなかった。当研究室では記憶の形成と海馬 CA1 領域のシナプス可塑性の關係に着眼しており, 記憶課題でのエピソード提示後に海馬 CA1 シナプスで AMPA 受容体と GABA_A 受容体のシナプス移行が見られ, その結果, シナプス間の伝達効率が高まることを近年明らかにした(Mitsushima ら Nat Comm 2013, PNAS 2011)。しかし, Mitsushima らの研究では記憶課題でのエピソード提示 1 時間後の AMPA 受容体と GABA_A 受容体のシナプス移行は確認しているが, エピソード提示直後から 1 時間以内の変化は明らかではない。

2. 研究の目的

そこで本プロジェクトでは回避学習課題を用い, エピソード提示から 1 時間以内の海馬シナプス可塑性 (AMPA 受容体や GABA_A 受容体由来のシナプス電位活動の変化や, AMPA 受容体や GABA_A 受容体のシナプス移行), また海馬 波の活動の増加を明らかにし, エピソード記憶の符号化を成立させる海馬の神経メカニズムを解明する。異なる記憶課題を用いた申請者の研究においてエピソード提示直後に海馬 パワーが増加したことから (Sakimoto ら, PLoS One 2013), 『エピソード提示直後から記憶の符号化に伴い早い海馬シナプス可塑性が生じる』との仮説を立てた。

3. 研究の方法

本実験では回避学習課題を用い, エピソード提示(電気ショック)直後(0分), 5分, 10分, 20分, 30分時点のラット海馬シナプス電位を測定し, エピソード提示後の時間経過に伴うシナプス電位の動的変化を明らかにする。申請者はエピソード提示後 5 分時点から, 微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC: miniature excitatory postsynaptic current), 微小抑制性シナプス後電流 (mIPSC: miniature inhibitory postsynaptic

current)がエピソード非提示群に比べて増加することを明らかにする。

パッチクランプ法と同様にエピソード提示後の時間経過(課題後0分, 5分, 10分, 20分, 30分)に伴い, CA1錐体細胞のspine上に点在するAMPA受容体やGABA_A受容体の量や分布の違いを明らかにする。CA1錐体細胞を可視化するため, エレクトロポレーション法を用い, 予めCA1にGFP(図2)を発現させた動物に回避学習を訓練する。興奮性シナプスに関しては postsynapticなAMPA受容体のシナプス移行とGluA1陽性spine増加を見る。N端側の抗GluA1抗体を反応させ, シナプスに挿入されたAMPA受容体と結合させる。固定した後, Alexa594でラベルした二次抗体を用いてspineを標識する。一方, 抑制性シナプスに関しては, GABA_A受容体のシナプス移行を見る。抗GABA_A受容体

2/3 subunit抗体を脳スライスに反応させ, 固定の後, Alexa594でラベルした二次抗体を用いて標識する。作製した切片は共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察する。Ikegayaらは興奮性のシナプス電位の増加に興奮性シナプスの先端樹状突起上のspine群(クラスター)が関係することを示した(Science 2012)。学習依存的な変化は全く不明だが, 海馬CA1興奮性シナプスの先端樹状突起上のクラスターにAMPA受容体が多く発現することが予想できる。抑制に関する知見は得られていないが, 抑制性シナプスが多い細胞体付近のクラスターにGABA_A受容体が多く発現する可能性も考えられる。

以上, 本実験によりAMPA受容体やGABA_A受容体のシナプス移行に対する組織学的証拠が得られ,

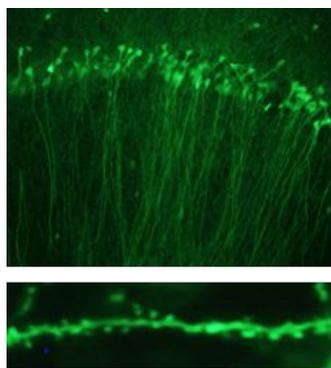


図2.海馬CA1でのGFP発現(上)とCA1ニューロンのスパイン(下)。

また, どのCA1ニューロンのどの部分のspineに符号情報が構築されているか解明できる。

申請者はオペラント条件づけを用いた記憶課題の獲得初期でエピソード提示直後に海馬波のパワーが増加し, 課題の獲得に伴ってこの増加は消失することを示した(PLoS One 2013)。このことから, 回避学習課題においても同様に課題の獲得初期でエピソード提示直後に海馬波のパワーが増加し, 獲得に伴って海馬波のパワーが消失すると考えられる。本実験では回避学習群, 統制群として新規環境のexploringのみの群の2群を設ける。課題前に海馬CA1領域に記録電極を埋め込み, 課題前後や課題中の海馬波の活動を記録する。同時にFreezing行動や回避行動等もビデオモニターし, これらの行動と海馬波の関係を明らかにする。獲得初期・後期の試行終了後, 海馬波のパワーの増加がどの程度持続されるのか, その中でも特にパワーが増加する期間があるのか明らかにし, 海馬のシナプス可塑性が生じる期間, 特にシナプス可塑性が顕著に生じる期間を同定する。

4. 研究成果

本実験では回避学習課題を用い, エピソード提示(電気ショック)直後(0分), 5分, 10分, 20分, 30分時点のラット海馬シナプス電位を測定し, エピソード提示後の時間経過に伴うシナプス電位の動的变化を明らかにした。エピソード提示後5分時点からmEPSC振幅が有意に増加し, 60分時点まで増加は維持された。同様に, mIPSC振幅もエピソード提示後5分時点から有意に増加し, 60分時点まで維持された。AMPA受容体の阻害薬(CNQX)によってmEPSC活動が消失し, GABA_A受容体の阻害薬によってmIPSC活動が消失しことから, mEPSCはAMPA受容体由来でmIPSCはGABA_A受容体由来であると考えられる。このことから, 回避学習課題5分後, AMPA受容体を介する興奮性

のシナプス入力が増強され、同時に GABA_A 受容体を介する抑制のシナプス入力が増強されたことを明らかにした (図 3)。

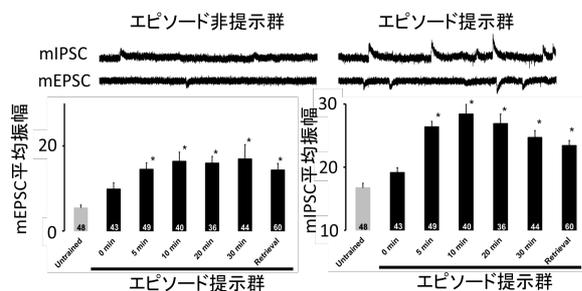


図 3. 微小興奮性シナプス後電位(mEPSC: 左)と微小抑制性シナプス後電位(mIPSC: 右)はエピソード非提示群(untrained; n=48)と比べてエピソード提示群ではエピソード提示後 5 分から有意に増加した。

加えて、mE(I)PSC の頻度も 5 分後から増加していた。mE(I)PSC の頻度はシナプス前の神経伝達物質の放出確率を反映しており、このことから回避学習課題によってシナプス前可塑性が生じた可能性が考えられる。そこで、paired pulse ratio を測定し、シナプス前の興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸、抑制性神経伝達物質である GABA の放出確率を検討した。結果、課題 5 分後にグルタミン酸の放出確率が増加することを明らかにした (図 4)。このことから、回避学習課題のエピソードの記憶形成には興奮性の神経伝達物質であるグルタミン酸放出確率の増加、その受容体である AMPA 受容体の強化、同時に抑制性である GABA_A 受容体の強化が起こり、これらの興奮と抑制の強化のバランスが記憶形成に重要であると提案する。次に western blotting を用いて、課題後の AMPA 受容体、GABA_A 受容体の定量化を行った。結果、課題直後にリン酸化された GABA_A 受容体数が増加していた。このことから、課題直後に起きた GABA_A 受容体を介する mIPSC 振幅の増加はシナプス上の GABA_A 受容体の数が増加したことに起因する。このことから、本研究では回避学習課題によって興奮性の入力だけでなく GABA_A 受容体を介する抑制性の入力にも劇的に強化が起こる

ことを明らかにでき、この抑制性入力の重要性を今後明らかにしていきたい。

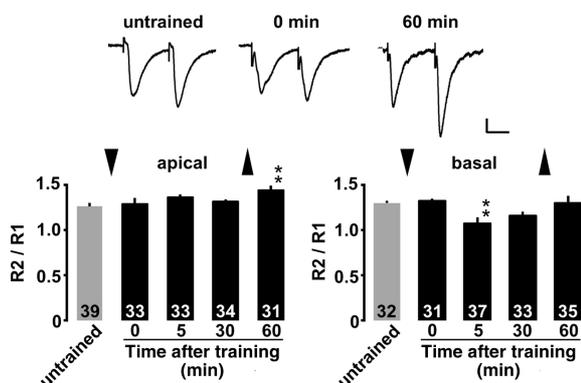


図 4. 5 分後に海馬の basal 側でグルタミン酸の放出確率が増加した。

本プロジェクトで得られた研究成果は平成 28 年の日本行動科学学会のシンポジウムで、平成 29 年の日本生理学会大会で発表を行った。本プロジェクトで得られた結果は査読付き国際誌である「Journal of Visualized Experiments,」と「Neurotransmitter」に掲載された。

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)

Kida, H., Sakimoto, Y., Mitsushima, D. (2017) Slice patch clamp technique for analyzing learning-induced plasticity.

Journal of Visualized Experiments, e55876. doi:10.3791/55876 査読有

Sakimoto Y., Mitsushima D. (2016)

Examination of configural association theory and conflict resolution model through hippocampal theta activity.

Neurotransmitter, 3, e1478.

doi:10.14800/nt.1478 査読有

[学会発表](計 7 件)

Yuya Sakimoto, Hiroyuki Kida, Dai

Mitsushima (2017). Disinhibition from GABA and rapid strengthening of hippocampal CA1 synapses after

contextual training. 第94回日本生理学会大会 2017年3月28-30日 浜松アクロシティコンgresセンター
Ako Matsumoto, Yuya Sakimoto, Hiroyuki Kida, Dai Mitsushima (2017).
Developmental changes in the learning-induced plasticity at hippocampal CA1 synapses. 第94回日本生理学会大会 2017年3月28-30日 浜松アクロシティコンgresセンター
Junzo Mizuno, Yuya Sakimoto, Hiroyuki Kida, Yumie Ono, Yoshinori Kamiya, Dai Mitsushima (2017). Contextual learning increases subfield-specific self-entropy at hippocampal CA1 synapses. 第94回日本生理学会大会 2017年3月28-30日 浜松アクロシティコンgresセンター
Paw Min Thein Oo, Yuya Sakimoto, Dai Mitsushima (2017). Contextual training enhances synaptic plasticity at both temporoammonic and Schaffer pathways onto CA1 neurons. 第94回日本生理学会大会 2017年3月28-30日 浜松アクロシティコンgresセンター
Nabiul Islam, Yuya Sakimoto, Gregory Wroblewski, Joe Nemoto, Amami Imagawa, Kosei Yonezawa, Akie Yanai, Ryutaro Fujinaga, Dai Mitsushima, Koh Shinoda (2016) Gonadal hormones affect androgen receptor expression and intrinsic plasticity in the CA1 hippocampal subfield of male rats. 日本解剖学会第71回中国・四国支部学術集会 2016年10月22-23日 岡山大学鹿田キャンパス
Nabiul Islam, Yuya Sakimoto, Dai Mitsushima, Koh Shinoda (2016) Androgen modulates the androgen receptor expression and intrinsic excitability of the hippocampal CA1 pyramidal neurons. 日本解剖学会第71回中国・四国支部学術集

会 2016年10月22-23日 岡山大学鹿田キャンパス

崎本裕也 (2016)海馬研究のフロンティア - 機能的多面性の動作原理に迫る - 日本行動科学学会 第 32 回大会 2016 年 3 月 13-15 日 新潟県妙高高原香風館

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究代表者

崎本 裕也 (SAKIMOTO, Yuya)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：4 0 6 3 4 3 9 0