

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19500317
 研究課題名（和文）：海馬 CA3 シナプスにプレコンディショニングで誘導する LTP 抑制現象の研究
 研究課題名（英文）：LTP suppression induced by preconditioning inputs to hippocampal CA3 synapses

研究代表者
 藤井 聡 (FUJII SATOSHI)
 山形大学・医学部・教授
 研究者番号：80173384

研究成果の概要：

海馬CA3 ニューロンでのプレコンディショニングによる長期増強(long-term potentiation:LTP)誘導抑制を検討した。その結果、(1) 1-2Hz でのプレコンディショニングがシナプス後細胞膜上の代謝型グルタミン酸受容体を介してIP3 受容体を活性化し、(2)細胞内情報伝達系を賦活して代謝型グルタミン酸受容体機能を修飾して、(3)テタヌス刺激を与えてもシナプス後細胞のAMPA型グルタミン酸が自己リン酸化しないように修飾して、(4) LTP誘導を抑制する、というメカニズムが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：海馬ニューロン、長期増強、低周波刺激、シナプス可塑性、代謝型グルタミン酸受容体、細胞内リン酸化反応、CA3、誘導抑制

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで、モルモット海馬CA1 領域で低頻度プレコンディショニングによる

LTP 誘導抑制現象の性質を検討してきた。その結果、次のような性質が明らかになった (Fujii S et al. (, 1996)Exp.Brain Res.

111:305 ; Neurosci. Lett.

(2000) 279:12)。

- (1) プレコンディショニング刺激には周波数特異性があり、1-2 Hzでは誘導されるが、5 HzではLTP誘導は抑制されない。
- (2) プレコンディショニングとテタヌス刺激との間隔が20分ないし100分であるとLTPは抑制されない。即ち、プレコンディショニングがLTP誘導抑制効果を及ぼすためのtime-windowがある。
- (3) プレコンディショニング時にNMDA型グルタミン酸受容体を阻害すると、LTP誘導抑制が阻害される。
- (4) LTP誘導抑制効果はIP3受容体の活性化に依存して起こる。
- (5) プレコンディショニング時にadenyln cyclaseを抑制しておくと、LTP誘導が抑制されない。

以上から、プレコンディショニングによるLTP抑制現象のメカニズムとして、CA1シナプスでは「低頻度プレコンディショニングが、NMDA型受容体からのCa²⁺流入とIP₃受容体を介した細胞内ストアからのCa²⁺放出を引き起こし、シナプス後細胞内Ca²⁺濃度を上昇させる。その結果、A-kinase ないしC-kinase が作動しNMDA型受容体が阻害されてLTPが抑制される」という可能性が示唆された (Fujii S et al. Learning & Memory (2000)7:312-320) , Skeberdis VA et al. Neuropharmacol. (2001) 40:856)。

一方で、CA3ニューロンにおけるLTP誘導抑制現象に関する報告は、文献を渉猟した限りでは見当たらず、その詳細は依然として不明であった。

2 . 研究の目的

Mossy fiber-CA3ニューロンシナプスでも、CA3 - CA1ニューロン間のシナプスと同様に、プレコンディショニングとして1 Hz前後の低頻度刺激がLTPの誘導抑制に有効である (Fujii et al. unpublished data)。そのメカニズムも、CA1ニューロンと同様に、「プレコンディショニングにより特定の細胞内リン酸化反応が賦活され、テタヌス刺激による細胞内Ca²⁺濃度の増大を抑制する事でLTP誘導が抑制される」ことが想定された。

Mossy fiber-CA3ニューロン間のシナプスでは、グルタミン酸受容体の分布様態がCA1シナプスと異なる。NMDA受容体および代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)はCA1シナプスに存在するが、Mossy fiber-CA3ニューロン間のシナプスでは存在しない。一方、group mGluRは両シナプスに存在するものの、group mGluRはMossy fiber終末のみに分布する。従って、LTP誘導抑制メカニズムもCA1シナプスと異なる可能性がある。

これら相違点を考慮し、本研究では以下(1)および(2)を検証し、Mossy fiber-CA3ニューロンシナプスにおけるLTP誘導抑制の性質およびメカニズムを追求した。

- (1) プレコンディショニング刺激の周波数特性についての解析：異なる周波数のプレコンディショニング刺激をMossy fiberに入力して、LTP誘導抑制が起こるかどうかを検討した。
- (2) プレコンディショニングで賦活される2次情報伝達系およびリン酸化反応に関して薬理的解析を行った。

3. 研究の方法

以下のように海馬スライス標本を作製してシナプス電位を記録した(図1)。

- (1) Hartley 種、体重250-300g の雄モルモットから海馬を取り出し厚さ500 μm のスライス標本を作製した。
- (2) 実体顕微鏡下に実験槽にスライスを固定し、標準人工脳脊髄液で灌流した(A)。実体顕微鏡でスライスを観察しながら、刺激用のタングステン製双極電極をCA3ニューロンの興奮性入力線維束に置き、20秒毎にテスト刺激して、記録用にCA3樹上突起層にガラス微小電極を刺入し集合EPSPを導出した。集合EPSPで初期の傾き(S-EPSP)を計測し、その変化をシナプス伝達効率の変化とした(B)。

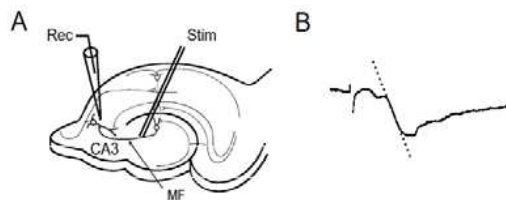


図1.(A) 実験方法。海馬 CA3 ニューロンへの興奮性入力線維束 mossy fiber を30秒に1回電気刺激し(Stim)、CA3 放線層に置いた記録用ガラス電極(Rec)より集合EPSPを導出した。
(B) 計測パラメータ。field EPSPの初期の傾き、S-EPSPを計測した。

4. 研究成果

- (1) プレコンディショニング刺激の周波数特性

Mossy fiber-CA3 ニューロン間のシナプスで、LTP誘導抑制に有効な低頻度プレコンディショニング刺激には周波数特異性があるものと考えられる。

プレコンディショニングに用いる低頻度刺激(LFS)の発数を1000発として、その周波数を1, 2 および5 Hz として与え、60分後にテタヌス刺激(100Hz, 100発)を10秒ごと

に3回入力(T)してLTP誘導抑制の可否を検討した(図2)。LFSが1 Hzである場合は、LFS入力後にシナプス伝達が弱く抑圧され、その後テタヌス刺激を与えてもLTPが誘導されなかった。LFSが5 Hzである場合は、LFS後にシナプス伝達は弱く増強され、その後テタヌス刺激を与えるとLTPが誘導された。LFSが2 Hzである場合、その後に長期抑圧および増強が誘導されず、かつ、LTP誘導が抑制されたことから、以後の検討では、LFSは2 Hz、1000発を用いるものとした。

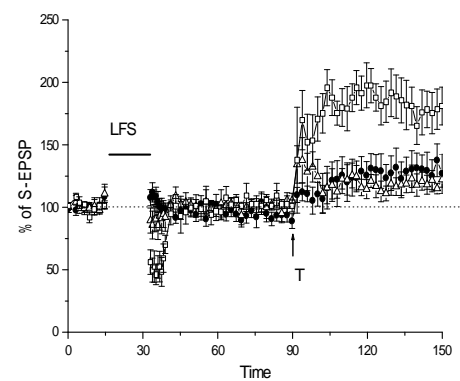


図2. プレコンディショニングに用いた低頻度シナプス入力(LFS)の周波数を1 Hz()、2 Hz()および5 Hz()とした場合のLTP誘導抑制効果。LFS終了60分後にテタヌス刺激(T, 100Hz, 100 pulses, 10秒おきに3回)を与えた。

- (2) プレコンディショニングによるシナプス後細胞内 store からの Ca^{2+} 放出

Mossy fiber-CA3 ニューロン間のシナプスでは、group mGluR が分布している。プレコンディショニング時に group mGluR 受容体の競合阻害薬である 4-cyclophenylglycine (4CPG)を細胞外に灌流させた場合のLTP誘導抑制の成否について検討した(図3)。

4 CPG (10 μM) を灌流した場合、60分後に与えたテタヌス刺激によりLTPが誘導されている。即ち、group mGluR 受容体の競合阻害薬によりLTP誘導抑制が解除されている。従って、LTP誘導抑制にはプレコンディショニング時の group I mGluR 活性化が関与していると結論した。

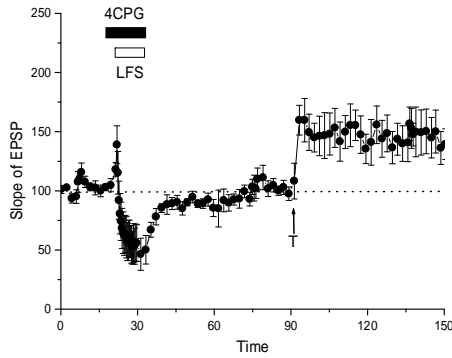


図3. LTP誘導抑制への代謝型グルタミン酸受容体の関与。プレコンディショニング時に4CPG(10 μ M)を灌流させるとLTP誘導抑制が解除された。LFSは2Hz。

Group I mGluRを阻害するとLTP誘導抑制が解除されたことから、group I mGluR活性化によりトリガーされるカスケード、即ち、IP₃ないしはprotein C-kinase (PKC)がLTP誘導抑制に関与している可能性がある。これを薬理的に検討するために、IP₃受容体の阻害薬である2APB(10 μ M)およびPKC inhibitorであるchelerythrine chloride(10 μ M)をプレコンディショニング時に灌流してLTP誘導抑制を検討した(図4)。

IP₃受容体阻害薬である2APB(10 μ M)を灌流させてプレコンディショニングし、60分後にテタヌ刺激を与えるとLTPが誘導された(図4上)。一方、プレコンディショニング時にPKC阻害薬であるchelerythrine(10 μ M)を灌流させた場合は、テタヌ刺激を与えてもLTP誘導がなされなかった(図4下)。

従って、LTP誘導抑制にはプレコンディショニング時にIP₃受容体の活性化が関与していることが示唆された。mossy fiber-CA3ニューロン間シナプスでは、低頻度プレコンディショニング入力group I mGluRを活性化し、IP₃受容体を活性化させてシナプス後細胞内のCa²⁺増大を引き起こし、LTP誘導抑制をトリガーすると結論した。

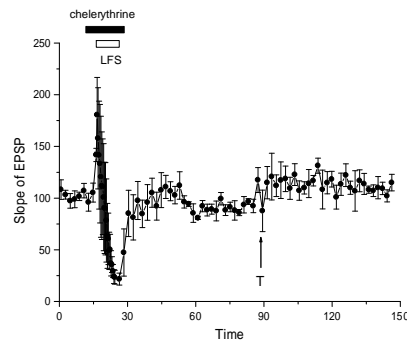
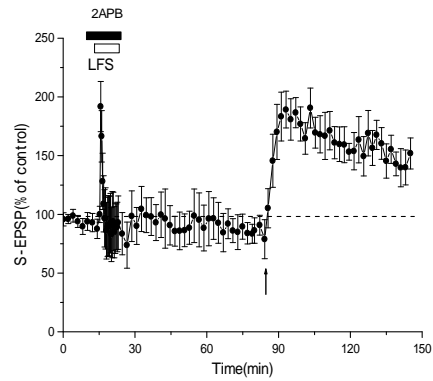


図4 LTP誘導抑制への代謝型グルタミン酸受容体活性化のカスケードの関与。

(上)プレコンディショニング時にIP₃受容体阻害薬2APB(10 μ M)を灌流させるとLTP誘導抑制が解除された。

(下)プレコンディショニング時にPKC阻害薬chelerythrine(10 μ M)を灌流させた。

(3) LTP誘導抑制に関与する2次情報伝達系の検討

プレコンディショニング後にFK506(10 μ M)を灌流してcalcineurinによる細胞内脱リン酸化反応を阻害すると、LTP誘導抑制は解除された(図5上)。これは、プレコンディショニング後の脱リン酸化反応を介してLTP誘導抑制が惹起されていることを示唆する。さらに、IP₃受容体阻害薬2APB(10 μ M)を灌流させてプレコンディショニングを加えると、LTP誘導は解除される。その後、テタヌ刺激時にgroup I mGluR作動薬3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG, 1 μ M)を与えるとLTP誘導抑制の解除が打ち消された(図5下)。

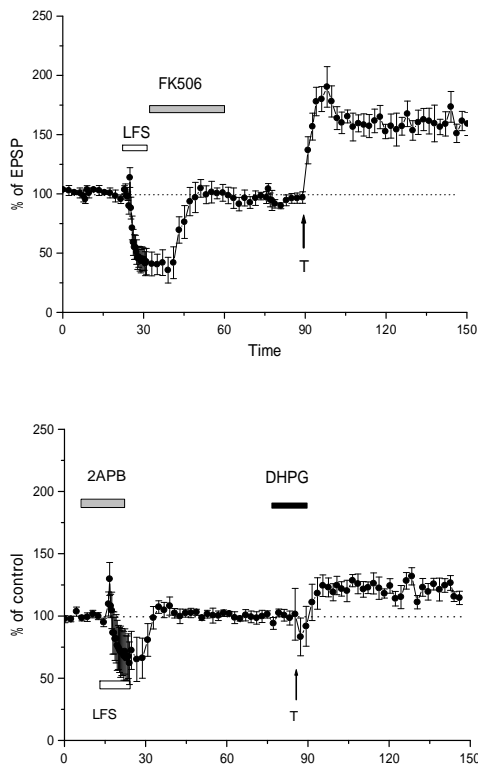


図5 .

LTP 誘導抑制への細胞内情報系関与の検討。プレコンディショニング後に FK506(10 μ M)を30分間投与するとLTP誘導抑制が解除される(上)

IP3受容体阻害薬2APB(10 μ M)を灌流させてプレコンディショニングを加え、さらにテタヌス刺激時に group I mGluR 作動薬 DHPG (1 μ M)を与えるとLTP誘導抑制が誘導された(下)

これらの結果から、プレコンディショニングでIP3受容体が活性化して放出された細胞内Ca²⁺は、Ca²⁺/カルモデュリン活性化を介してcalcineurinによる細胞内脱リン酸化反応を亢進させている可能性があるといえる。その結果、テタヌス刺激時にgroup I mGluR活性化が阻害されてLTP誘導が抑制された可能性がある、と結論した。

討論 (Discussion)

(1) 海馬CA3ニューロンにおけるLTP誘導抑制のメカニズム

報告者は海馬CA3ニューロンで、プレコンディショニングによるLTP誘導抑制現象を検討した。その結果、(1)LTP誘導抑制がプレコンディショニング刺激の周波数に依存する、(2)プレコンディショニング

時シナプス後細胞の代謝型グルタミン酸受容体の活性化と Inositol triphosphate (IP3) 受容体を介した細胞内Ca²⁺ storeからのCa²⁺放出の両者がメカニズムに關与する、(3)プレコンディショニングにより賦活された細胞内脱リン酸化反応が關与する可能性がある、(4)脱リン酸化反応の基質として代謝型グルタミン酸受容体が挙げられる、(5)テタヌス刺激時に代謝型グルタミン酸受容体の活性化が阻害されてLTP誘導が抑制される、ということが明らかにされた。従ってLTP誘導抑制のメカニズムは、(1)1-2Hzでのプレコンディショニングがシナプス後細胞膜上のgroup I代謝型グルタミン酸受容体活性化(mGluR)を介してIP3受容体を活性化させ、(2)脱リン酸化反応を含む細胞内情報伝達系を賦活してmGluRの機能を修飾し、(3)その後テタヌス刺激を与えてもシナプス後細胞のAMPA型グルタミン酸の自己リン酸化が生じないように誘導して、(4)LTP誘導を抑制する、ことが示唆された。

プレコンディショニング後60分間はLTP誘導抑制効果を発現していることから、プレコンディショニング後にLTP誘導抑制効果を発現するまでに数次の情報伝達系が關与している可能性がある。しかしながら、本研究では、細胞内情報伝達系の同定までは至らなかった。

海馬CA3ニューロンでは、シナプスへの高頻度入力に際してシナプス前終末におけるadenylyl cyclaseなどが活性化され、Ca²⁺依存性リン酸化酵素を賦活して細胞内リン酸化反応が惹起される。その結果、シナプス前終末からのグルタミン酸放出量が増大してLTPが誘導されると考えられている(11,12)。

一方で、LTP誘導抑制はgroup I mGluRおよびIP3受容体活性化を要しており、LTP誘導に關与するメカニズムとは異なるものであろうと推測される。即ち、1-2Hzのシナプス入力がシナプス後細胞のgroup I mGluR活性化を出発点として、複数の細胞内情報伝達系賦活を経て、group I mGluRの活性化を抑制するという、ネガティブフィードバックをか

けている点である。このネガティブフィードバックがかかると、テタヌス刺激による AMPA 型グルタミン酸受容体のリン酸化が阻害されて、LTP 誘導が抑制されるのであろう。

(2) 海馬 CA3 領域における LTP 誘導抑制の意義

LTP 誘導抑制は、海馬シナプス回路でのシナプス伝達効率の飽和の防止と、海馬機能の維持に關与する可能性がある。高頻度入力が高馬歯状回より入ると、perforant pathway-顆粒細胞(Dentate granule cell)間、Mossy fiber-CA3 ニューロン間および CA3-CA1 間の各シナプスで LTP が誘導されて伝達効率が增強する。

ここで、もし、LTP 誘導抑制が無ければ、頻回の高頻度入力で海馬回路の伝達効率は飽和する(図 7A)。しかし、LTP 誘導抑制が存在し、低頻度入力が行先すれば、Mossy fiber-CA3 ニューロン間および CA1 シナプスの各シナプスで LTP の誘導が抑制されるので、伝達効率が飽和しない(図 7B)。

Mossy fiber-CA3 シナプスでの LTP 誘導抑制は、海馬シナプス回路の伝達効率のレベル調節に寄与する可能性がある。即ち、一定時間において回路内の LTP の加算を防ぎ、シナプス伝達の增強を一定レベルに固定する可能性がある。例えば、先行して dentate granule cell や中隔からの入力により CA3 ニューロンが低頻度で興奮する場合、その後に顆粒細胞が高頻度に興奮しても CA3 および CA1 ニューロンでは LTP の誘導が抑制されるため、海馬から出力される伝達効率が增強しない(図 7B)。

CA3 シナプスでの LTP 誘導抑制に關して分子メカニズムには未だ不明な点が多いが、LTP 誘導抑制とは「特定周波数の低頻度入力で伝達効率增強の飽和を防ぎ、シナプス可塑性を維持するメカニズム」であるといえる。これらの現象が実際の脳でどのような意味を持つかは、更なる検証が必要である。

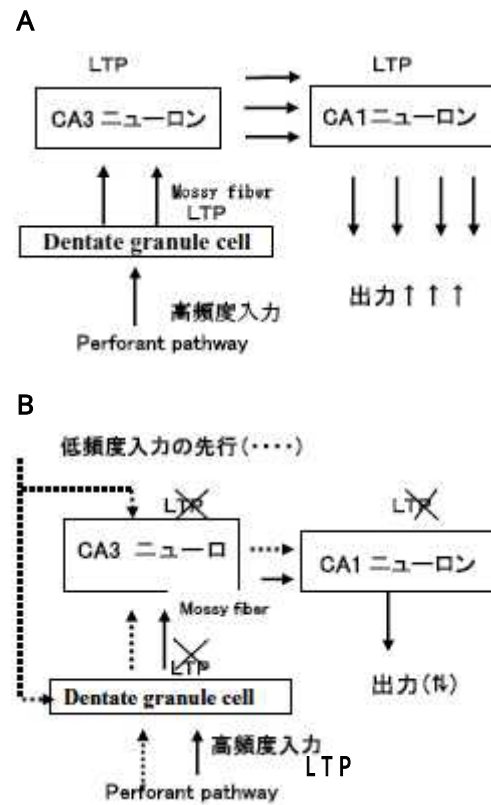


図 7 海馬 CA3 ニューロンにおける LTP 誘導抑制の役割。

(A) CA3 ニューロンに先行して低頻度入力がない場合。LTP 誘導が抑制されないため、高頻度刺激が perforant pathway に入力されると、CA3 および CA1 ニューロンからの出力が容易に增強する。

(B) CA3 ニューロンに先行して低頻度入力がある場合。LTP 誘導が抑制されるので、海馬 CA1 ニューロンからの出力は增強しない。

脳の高次機能のなかでも記憶や学習は、我々自信の日常生活においてなじみの深い現象で、その性質については自分の体験を思いだしてみるだけでよい面がある。しかしその脳内メカニズムとなると人の脳の複雑さから研究が困難で殆どわかっていないのが現状である。個体の発生に伴い形成された脳の神経回路網は機能的にも形態的にも可塑性を持つ。神経回路網の個々のニューロンにおける情報伝達において、シナプス前ニューロンの発火頻度と発火時間に依存して引き起こされるシナプス後細胞の発火パターンの変化、即ち、シナプス伝達の可塑性がその後の形態的变化を引き起こすうえで重要で、シナプスでの機能的な可塑性が細胞レベル

での記憶と学習の基礎過程として注目されている。LTP誘導抑制は、低頻度刺激で誘導されるシナプス伝達可塑性の一つである。海馬CA3ニューロンにおいては、低頻度入力が先行する場合に積極的にシナプス後細胞でLTP誘導を抑制し、CA3-CA1ニューロン間のシナプス伝達効率の飽和を防いで海馬ニューロン回路の可塑性を維持する役割を果たしていると思われる。

文献 (References)

- 1) Bliss, T.V.P and Lomo, T.: J. Physiol., 232: 331-356, 1973.
- 2) Schwartzkroin, P.A. and Wester, K.: Brain Research, 89:107-119, 1975.
- 3) Hesse, G.W. and Teyler, T.J.: Nature, 264: 562-564, 1976.
- 4) Barrieneuvo, G. et al.: Life Sci., 27: 2385-2391, 1980.
- 5) Staubli, U. and Lynch, G.: Brain Research, 513: 413-425, 1990.
- 6) Fujii, S., et al.: Brain Research, 555: 112-122, 1991.
- 7) Huang, Y.-Y., Colino, A., Malenka, R.C., Science, 255: 730-733, 1992.
- 8) Fujii, S., et al., Exp. Brain Res., 111: 305-317, 1996.
- 9) Fujii, S., Kuroda, Y., Ito, K.-I., Yoshioka, M., et al., Neurosci. Lett., 279 (2): 121-124, 2000.
- 10) Fujii et al., Learn. Mem., 7:312-320, 2000.
- 11) Bortolotto, A.Z. et al., NeuroToxicol., 26: 769-777, 2005.
- 12) Nicol, R.A. and Schmiz, D., Nature Neurosci., 6: 863-876, 2005.

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 3 件)

Fujii S., Yamazaki Y., Sugihara T. & Wakabayashi I (2008) Acute and chronic ethanol exposure differentially affect induction of hippocampal LTP. Brain Res, 1211 (2008) 13-21. (査読有)

Yamazaki Y., Hozumi Y., Kaneko K., Sugihara T., Fujii S., Goto K. & Kato H. Modulatory effects of oligodendrocytes on the conduction velocity of action potentials along axons in the alveus of the rat hippocampal CA1 region. Neuron Glia Biology, 3(2008)325-334. (査読有)

藤井聡, 山崎良彦, 佐々木寛, 黒田洋一郎. 記憶・忘却の生理学. Brain medical 19, 119-12, 2007. (査読無)

[学会発表](計 2 件)

藤井聡: 長期間のエタノール投与による海馬長期増強の促進効果について. 第43回日本アルコール・薬物医学会総会 2008年9月19日、横浜市

藤井聡: 長期間のアルコール投与による海馬長期増強の促進効果について. 第16回海馬と高次機能学会 2007年11月25日、奈良市

[図書](計 1 件)

藤井聡, 山崎良彦 著 コアカリ生理学

[その他]

ホームページ等

<http://www.id.yamagata-u.ac.jp/PhysiologyII/Physiol2-J.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤井 聡 (FUJII SATOSHI)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：80173384

(2)研究分担者

(3)連携研究者