

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07276

研究課題名（和文）記憶形成におけるGABAA受容体  $\beta$ 3・Ser408-409リン酸化の機能的意義

研究課題名（英文）Contextual learning requires phosphorylation at Ser408-409 of GABAA receptor beta3 subunit

研究代表者

崎本 裕也（Sakimoto, Yuya）

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：40634390

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：文脈学習は、CA1錐体細胞におけるAMPA受容体のシナプス移行だけでなく、GABAA受容体を介する抑制性シナプスも急速的に強化し、シナプス入力を多様化する。私は、GABAA受容体の  $\beta$ 3サブユニットのintracellular loopに存在する408と409番目のSerineが課題訓練後1分以内にリン酸化を阻害し、GABAA受容体シナプス移行の阻止、学習との因果関係を証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私は、実際の学習でGABAA受容体  $\beta$ 3 Ser408-409のリン酸化を捉え、そのTemporal dynamicsも明らかにした（Sakimotoら, 2019）。本計画では更に  $\beta$ 3 Ser408-409のリン酸化を阻止することで、はじめて学習直後のGABAA受容体リン酸化とシナプス移行が記憶・学習に必要であることを証明した。ヒト臨床研究においてアルツハイマー型認知症患者の死後脳でGABAA受容体、特に  $\beta$ 3の発現量が健常者よりも少ないことが知られており、記憶と海馬の関係を包括的に理解する上で、興奮性シナプス可塑性と同様、抑制性シナプス可塑性にも注目する必要がある。

研究成果の概要（英文）：Contextual learning rapidly enhances not only synaptic transfer of AMPA receptors in CA1 pyramidal cells, but also GABAA receptor-mediated inhibitory synapses, diversifying synaptic inputs. The applicant demonstrated that the Ser408-409 in the intracellular loop of the  $\beta$ 3 subunit of the GABAA receptor inhibit phosphorylation within 1 min after IA task training, preventing GABAA receptor synaptic migration and proving a causal link to learning.

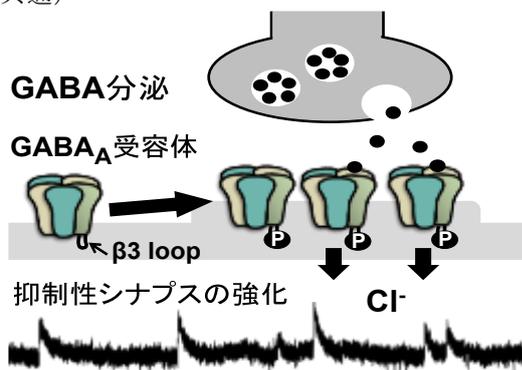
研究分野：生理心理学

キーワード：海馬 文脈学習 抑制性シナプス リン酸化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

抑制性シナプスはGABA<sub>A</sub>受容体のシナプス移行によって強化される。GABA<sub>A</sub>受容体はαとβサブユニットを含む五量体であり、GABA依存的なCl<sup>-</sup>チャネルである。GABAニューロンは発火活動を同期化してθ波を形成し、他グループの光遺伝学的解析でも学習成立に必要な事が判った(Lovett-Barronら *Science* 2014)。CA1ニューロンのGABA<sub>A</sub>受容体は、β<sub>3</sub>サブユニットを主な構成要素として持ち、細胞体付近に豊富に存在する(Megiasら *Neuroscience* 2001)。テトロドトキシン存在下でパッチクランプ解析を行うと、単一シナプス小胞GABAによるCl<sup>-</sup>電流、微小シナプス後電流(mIPSC)が記録できる(Mitsushimaら, *Nat Neurosci* 2013)。私はラット文脈学習後、学習依存的なシナプス可塑性の時間変動を初めて解明した。①課題直後1分以内にGABA<sub>A</sub>受容体のβ<sub>3</sub>サブユニットのcytoplasmic loopの408と409番目の



興奮性入力(AMPA受容体)と共に、CA1シナプスを多様化する事で文脈学習が成立

図1 学習後1分以内のβ<sub>3</sub>subunit Ser<sup>408-409</sup>リン酸化(P)がGABA<sub>A</sub>受容体のシナプス移行を促進、抑制性微小シナプス後電流(mIPSC)を強化する。

セリン(Ser<sup>408-409</sup>)がリン酸化される事、続いて②CA1ニューロンのmIPSCが強化され数時間以上維持される事を発見した(Sakimotoら *FASEB J* 2019)。さらに Non-stationary fluctuation analysisにより、③GABA<sub>A</sub>受容体のopen channel数を増加させることを分子レベルで明らかにした(Sakimotoら *Cerebral Cortex* 2019)。そこで今回、文脈学習課題が急性的にGABA<sub>A</sub>受容体β<sub>3</sub>Ser<sup>408-409</sup>のリン酸化を誘起し、シナプス下膜のGABA<sub>A</sub>受容体チャネル数を増加、抑制性シナプス入力強化が学習を成立するという、新たな学習仮説を提案した(図1)。

### 2. 研究の目的

本計画では細胞透過性GABA<sub>A</sub>受容体β<sub>3</sub>Ser<sup>408-409</sup>リン酸化阻害ペプチドを開発する。HIVウイルス由来のTatペプチドにGABA<sub>A</sub>受容体β<sub>3</sub>intracellular loop Ser<sup>408-409</sup>リン酸化ペプチド配列の一部を模し、β<sub>3</sub>Ser<sup>408-409</sup>をmimicしてリン酸化阻害を行った。このリン酸化阻害と抑制性シナプス強化や学習成立との因果関係を示した。

### 3. 研究の方法

**学習行動** CPPは膜透過性が高いHIV-Tat蛋白質由来の塩基性キャリアペプチドを用いた。Tat pep β3 (YGRKKRRQRRR-KTHLRRRSSQLK; Smithら, *J Neurosci* 2011)はキャリアペプチドにβ<sub>3</sub>Ser<sup>408/409</sup>を含むアミノ酸配列のtagを付与したもので、β<sub>3</sub>Ser<sup>408/409</sup>リン酸化を阻害した。また、統制条件としてコントロールペプチド(YGRKKRRQRRR-KTHLRRRAAQLK)を用いた。28日齢のSDラット両側海馬CA1にカニューレを埋め込み手術を行い(N=56)、その後一週間の回復期間を置く。回避学習課題1時間前に片側海馬CA1にTat pep β3を1μL投与し(0.5μL/min; 40ng/μL)、もう片方の側にはコントロールペプチドを1μL投与する(0.5μL/min; 40ng/μL)。ペプチド投与1時間後明暗ボックスを用いてIA課題訓練を行った(図2)。

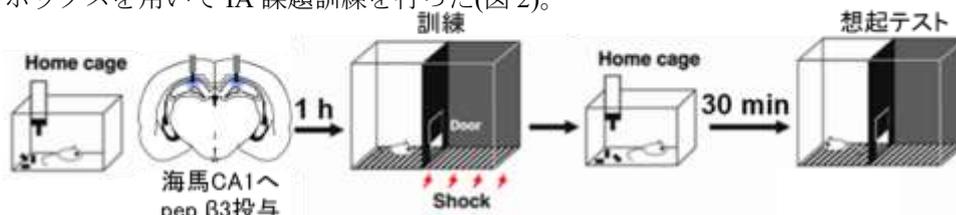


図2 IA課題訓練60分前に背側海馬領域にpep β3-SSをin vivo microinjection行った。IA訓練は明暗ボックスを用い、ラットが明室から暗室に移動すればfoot shock(1.6 mA, 2 sec)与えた。その後、ホームケージに戻し、30分後に想起テストを行った。IA訓練と想起テストにおいて暗室に入るまでの時間(latency)を学習成績の指標とした。

**Patch clamp 法** スライスパッチクランプ法を用いて海馬CA1ニューロンからmIPSC振幅・頻度を測定する。先行研究でペプチド処置なし群を用い、回避学習課題5分後に最もmIPSC振幅が増加し、10分時点でピークとなりその後徐々に減衰した(Sakimotoら *FASEB* 2019)。このことから、回避課題後5分時点で焦点をあて、ラット海馬CA1を採取し、mIPSCを観察した。また、シナプス前終末からのGABA放出確立に変化がないことを確認するため、Paired pulse ratioを測定した。

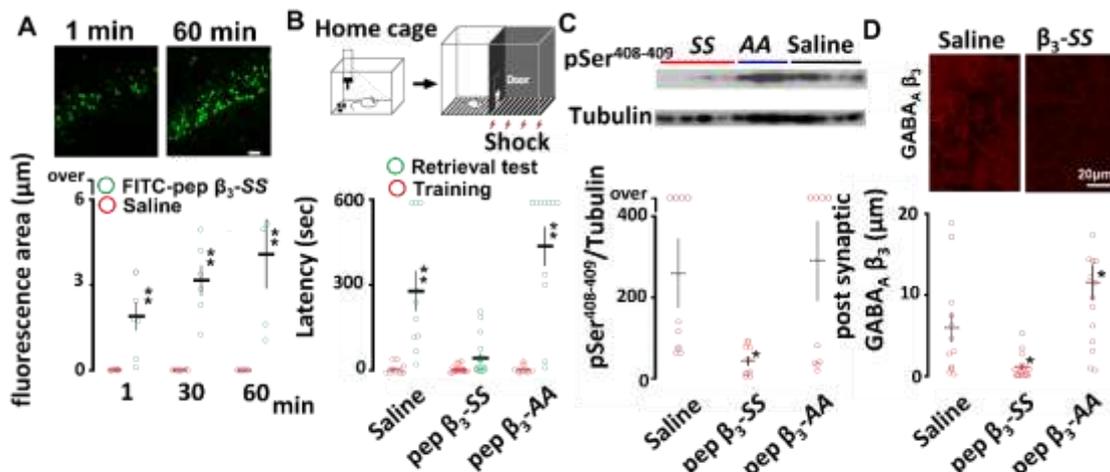
**Western blotting 法** 先行研究(Sakimotoら *FASEB* 2019)から、回避学習課題直後(1分以内)のラット海馬CA1を採取し、ウェスタンブロッティング法を用いて各時点でのβ<sub>3</sub>Ser<sup>408/409</sup>リン酸化を明らかにした。CPP投与していない統制群のデータは既に取得・公表しており(Sakimotoら, *FASEB* 2019)、回避学習課題直後にβ<sub>3</sub>Ser<sup>408/409</sup>のリン酸化が増加した。Tat pep β3投与し、学習依存的なβ<sub>3</sub>Ser<sup>408/409</sup>リン酸化を抑制できることを証明した(図3)。

**蛍光免疫染色.** GABA<sub>A</sub> 受容体  $\beta_3$  のシナプス移行が filopodia の形成に関わる (Vithlani ら, *Physiol Rev* 2011)。上記  $\beta_3$  subunit の Ser<sup>408/409</sup> リン酸化阻止が filopodia スパインの減少を引き起こすか検討した。パッチクランプ法では回避学習 5 分後にシナプス多様化が最大となり、徐々に減衰しながら多様性が維持されることを確認した。回避学習 5 分後にゴルジ銀染色で形態変化を確認すると、GABA<sub>A</sub> 受容体を介する抑制性シナプスが約 94% を占める細胞体付近の領域で、filopodia type スパインの増加が確認された(未発表データ)。GABA<sub>A</sub> 受容体が filopodia に集まりクラスター化する (Zhang and Berg, *Mol Cell Neurosci* 2007)。Pep  $\beta_3$ -SS が訓練 5 分時点でのシナプス部の GABA<sub>A</sub> 受容体発現量を比較した。抗 GABA<sub>A</sub> 受容体  $\beta_3$  subunit 抗体、Alexa647 二次抗体を用いた。抑制性シナプスマーカーとして抗ゲフリン抗体、Alexa594 二次抗体を用いて共発現量を定量化した。既存の共焦点レーザー顕微鏡で観察し、Image J を用いて画像解析を行った。

#### 4. 研究成果

GABA<sub>A</sub> 受容体  $\beta_3$  Ser<sup>408-409</sup> リン酸化ドメインを含む Tat-pep  $\beta_3$ -SS ペプチドを用いて、Ser<sup>408-409</sup> リン酸化と訓練依存的シナプス強化および文脈学習との因果関係を検討した。*In vivo* で Tat-pep  $\beta_3$ -SS を海馬背側に microinjection したところ、IA 課題訓練依存的な GABA<sub>A</sub> 受容体  $\beta_3$  サブユニットの Ser<sup>408-409</sup> リン酸化が 1 分以内に減少し、GABA<sub>A</sub> 受容体を介する抑制性シナプス電流が 5 分以内に減少し、文脈学習が阻害された。我々は、Tat-pep  $\beta_3$ -SS による Ser<sup>408-409</sup> リン酸化の遮断が、訓練依存的な抑制性シナプスの強化と文脈学習の形成に必要であると結論した。薬理学的研究により、ピククリンによる GABA<sub>A</sub> 受容体の不活性化は文脈学習を促進するが、低濃度のピククリンでは文脈学習が阻害されることが示唆された (Parsaei et al. 2011)。このように、従来の薬理学的研究では学習における GABA<sub>A</sub> 受容体の役割は不明である。最近の CA1 ニューロンの光遺伝学的操作により、回避刺激中の樹状突起標的 CA1 介在ニューロンの光不活性化が恐怖学習を妨げるのに十分であることから、GABA<sub>A</sub> 入力と学習との間に時期特異的な因果関係があることがさらに示された (Lovett-Barron et al. 2014) さらに、GABA<sub>A</sub> 受容体サブユニットの特異的な違いが報告されており、 $\alpha 5$  サブユニットが学習と因果関係があるとされている。GABA<sub>A</sub> 受容体  $\beta_3$  サブユニットと学習の関係を示唆した論文もあるが (Delorey et al. 1998)、GABA<sub>A</sub> 受容体  $\beta_3$  サブユニットと学習の直接的な因果関係はまだ証明されていない。我々は、IA 課題を用いた学習依存的な GABA<sub>A</sub> 受容体を介した抑制性シナプスの強化 (Mitsushima ら 2009, 2013; Sakimoto ら *FASEB* 2019) と、この抑制性シナプスの強化に先立ち、IA 訓練の 1 分以内に GABA<sub>A</sub> 受容体  $\beta_3$  サブユニットの Ser<sup>408-409</sup> リン酸化が起こることを明らかにしてきた。本研究は、GABA<sub>A</sub> 受容体  $\beta_3$  サブユニットの Ser<sup>408-409</sup> のリン酸化が、IA 訓練依存的な抑制性シナプス強化と文脈学習の形成を引き起こすという初めての証拠を提供するものである。以上、この急速なリン酸化が抑制性シナプスを強化し、文脈記憶を形成するという新しい記憶神経理論を提唱する。

学習は、脳の回路の可塑性、つまりニューロンがシナプス伝達の効率を持続的に変化させる能力に依存している。Hebb (1949 年) は、2 つのニューロンが同時に活動すると、その間のシナプスが強化されるという直観を得た。この仮説は多くの研究者を刺激し、それを裏付ける最初のメカニズムである長期増強 (LTP) が 1970 年代初頭に発見された (Bliss and Lomo, 1973)。長期増強には Hebb 則がよく用いられるが、Hebb は抑制性シナプスに関するルールを想定していない。Mongillo ら (2018) は、皮質回路のシナプスモデルにおいて、興奮性シナプス入力より抑制性シナプス入力の方が多様なニューロン活動パターンの創出に寄与すると提案された。彼らはこの多様なニューロン活動は記憶を表象すると論じており、本研究はこの non-Hebb 則の一面を実験的に証明したのかもしれない。



**図3** A: FITC-Tat-pep  $\beta_3$ -SS は slice 添加 1 分で神経細胞へ取り込まれ、1 時間維持された。B: Tat-pep  $\beta_3$ -SS の *in vivo* 海馬投与は回避学習を阻害した。Tat-pep  $\beta_3$ -SS は課題直後の GABA<sub>A</sub> 受容体  $\beta_3$  subunit Ser<sup>408-409</sup> のリン酸化 (C) と GABA<sub>A</sub> 受容体  $\beta_3$  subunit シナプス移行 (D) を阻止した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakimoto Yuya	4. 巻 12
2. 論文標題 A critical period for learning and plastic changes at hippocampal CA1 synapses.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-10453-z, 2022.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 H. Kida	4. 巻 601
2. 論文標題 Motor training promotes both synaptic and intrinsic plasticity of layer 5 pyramidal neurons in the primary motor cortex.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The journal of physiology	6. 最初と最後の頁 335-353
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1113/JP283755	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Sakimoto Yuya
2. 発表標題 文脈学習を成立には Ser408 - 409 of GABAA receptor 3 subunit リン酸化が必要
3. 学会等名 日本生理学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	美津島 大  (Mitsushima Dai)  (70264603)	山口大学・大学院医学系研究科・教授    (15501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	木田 裕之  (Kida Hiroyuki)  (70432739)	山口大学・大学院医学系研究科・講師     (15501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関