

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500384

研究課題名(和文) 神経変調因子の脳局所ダイナミクスとGPCR相互作用を介した学習効率の制御

研究課題名(英文) Influence of ambient neuromodulators on learning through hetero-GPCR interplay

研究代表者

田端 俊英 (Tabata, Toshihide)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・准教授

研究者番号：80303270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス小脳へのB型ガンマ・アミノ酪酸受容体アゴニスト注入は小脳長期抑圧(LTD)依存的な視機能性動眼反射(OKR)順応を促進した。一方、in-vitro実験により、1型アデノシン受容体がLTDのトリガー分子である1型代謝型グルタミン酸受容体と複合体化し、プルキンエ細胞におけるLTDの素過程を阻害することが分かった。Gタンパク質共役性受容体の相互作用がシナプス可塑性と学習に影響することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In cerebellar Purkinje cells, B-type gamma-aminobutyric acid receptor (GABA_BR) and type-1 adenosine receptor (A₁R) are suggested to modulate type-1 metabotropic glutamate receptor (mGluR1) whose intracellular signaling triggers induction of cerebellar long-term depression (LTD). Using a machine vision-based optokinetic reflex (OKR) measuring system, we found that in mice, cerebellar injection of a GABA_BR agonist facilitated OKR adaptation, a cerebellar LTD-dependent learning. Moreover, using in-vitro preparations, we found that A₁R interacted with mGluR1 via its C-terminus and that A₁R activation suppressed the LTD of Purkinje cell's glutamate-responsiveness by lowering mGluR1's ligand-sensitivity in a G protein-independent manner. The hetero-G protein-coupled receptor interplay may influence central synaptic plasticity and learning.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：Gタンパク質 シナプス可塑性 ニューロン 受容体 学習 小脳 生理学 神経科学

1. 研究開始当初の背景

我々は先行研究において、小脳プルキンエ細胞の表面ではGタンパク質共役型受容体(GPCR)の一種、1型代謝型グルタミン酸受容体(mGluR1)に対して別種のGPCRであるB型ガンマ・アミノ酪酸受容体(GABA_BR)や1型アデニン受容体(A1R)が近接発現しており、脳髄液レベルのGABAやアデノシンを投与すると、mGluR1のシグナリングが増強/減弱することを示した。mGluR1のシグナリングは、小脳関連学習を支えるシナプス可塑性(小脳長期抑圧)の素過程であるプルキンエ細胞のグルタミン酸応答性の長期抑圧(glu-LTD)のトリガーである。したがって、神経活動依存的なGABAやアデノシンの脳髄液濃度の増減は、小脳長期抑圧の誘導を促進/阻害し、学習成績に影響を与える可能性が考えられた。一般に、学習成績には個体差があり、同じ個体においても脳全体の活動等の影響を受けて変化する。GABAやアデノシンによるシナプス可塑性の促進/阻害は学習効率を調整する分子機序として働いている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

(1) 上記の可能性を検討するため、マウス個体において小脳長期抑圧が関与する視機性動眼反射(OKR、注視している動く物体の網膜上でのぶれを減らすための眼球の自動的補償運動)の順応(動く物体の長時間呈示によって、物体に対する眼球の追尾性が向上する学習現象)を測定し、GABA_BRの活性化が学習成績にどのような影響をもたらすかを調べた。

(2) 脳髄液に含まれているGABAの濃度を測定しつつ、OKR順応を測定し、生理的条件下におけるGABAの小脳関連学習に対する影響の解析を目指した。そのために高感度の脳髄液アミノ酸濃度検出システムを構築した。

(3) 異種GPCRの相互作用がシナプス可塑性・学習の効率を変化させる分子機序をA1R-mGluR1相互作用をモデルとして*in vitro*において解析した。

3. 研究の方法

(1) マシンビジョン技術によりマウスの瞳孔の位置を計測し、眼球運動を測定するシステムを開発した。水平往復回転する縦縞もしくは市松模様のスクリーンをマウスに1日当たり1時間、計2日間にわたり呈示し、OKR順応を測定した。OKR順応の学習成績はスクリーンの回転角度振幅に対する眼球の回転角度振幅の相対値(OKRゲイン)により評価した。1日目の呈示の直前に、テスト群およびコントロール群のマウスの小脳片葉にGABA_BRアゴニスト baclofen 含有/不含の生理食塩水を注入した。

(2) 予めマイクロダイアリシス半透膜プローブを小脳片葉に埋設したマウスを対象と

して上記の要領で OKR 順応を測定しながら、連続的に脳髄液物質を回収した。10 分間ごとにまとめたサンプルについて、アミノ酸の o-フタル酸(OPA)修飾を行い、高速液体クロマトグラフィーで分離し、さらにアミノ酸に付加された OPA の酸化・還元電流を電気化学的に検出することにより、脳髄液中の GABA の濃度を推定した。J

(3) 培養したマウス小脳プルキンエ細胞および A1R や mGluR1 を強制発現させた Neuro2a 細胞を対象として、パッチクランプ測定、免疫共沈、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)イメージングなどを用いて GPCR 間の相互作用機序を解析した。

4. 研究成果

(1) 開発した眼球運動計測システムを用いて測定したところ、1時間連続呈示の期間中に時間をおいてOKRゲインが増加することを確認できた(図1A,B)。また lidocaine の脳内注入による小脳片葉の活動抑制がOKR順応を阻害することも検出できた。これらの結果から、開発した計測システムが神経変調による小脳関連学習の変化を評価するために十分な測定感度・精度を備えていることが分かった。

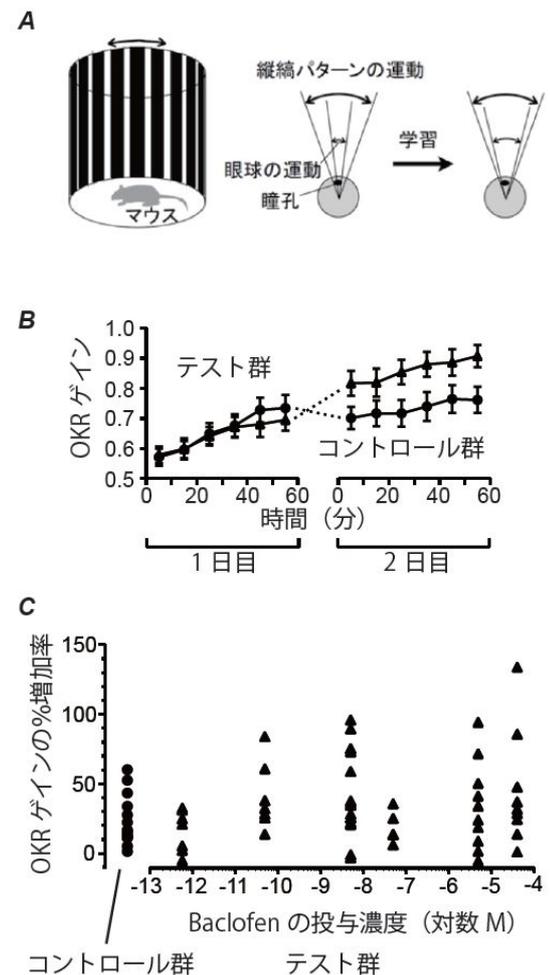


図1 Baclofen小脳内注入のOKR順応に対する効果(図の説明は次ページに続く)

A: OKR順応により、スクリーンに対する眼球の追尾性が向上する。本研究ではスクリーンの回転角度振幅を18度とした(往復運動の周期は0.2 Hz)。OKRゲインは眼球の回転角度振幅をスクリーンの回転角度振幅に対する相対値で示した。例えば、眼球の回転角度振幅が9度の場合、OKRゲインは0.5となる。

B: 1日当たり1時間、計2日間に渡りOKRゲインの時間的変化をプロットしたグラフ。このグラフのテスト群では5 nMのbaclofenを注入している。一つ一つのシンボルは、1時間の呈示期間を10分間ごとのピリオドに分け、それぞれのピリオドごとに全試行のOKRゲインを平均した値を示している。

C: OKR順応の長期記憶のbaclofen濃度依存性。縦軸は、各個体について1日目の最初のピリオドを基準として、2日目の最初のピリオドまでのOKRゲインの増加率を%で表している。一つ一つのシンボルは各個体のデータを表している。コントロール群には見られない大きな増加率を示す個体がnMオーダー以上のbaclofenを投与したテスト群に見られる。

(2) 第1日目の1時間にわたる刺激呈示中のOKRゲインの増加についてはテスト群とコントロール群に差が見られなかった(図1B)。しかし、テスト群では第2日目の呈示開始時に前日に達成した成績が維持されていたが、コントロール群ではこのような維持が顕著ではなかった(図1B)。この結果は、GABA_BRの活性化がOKR順応における長期記憶の形成・維持を促進することを示唆している。この促進作用はnMオーダーのbaclofenでも観察され(図1C)、効果濃度領域の共通性から先行研究で報告したGABA_BRを介したmGluR1シグナリングの増強が関与している可能性が考えられた(Tabata et al., *PNAS*, 2004)。

(3) OPA化アミノ酸の酸化・還元電流を約1Vに保持したカーボン電極により検出することで、マウス小脳片葉近傍の脳髄液から数nMのGABAを検出することができた。また検出はOKR順応学習中のマウスから採取したサンプルでも成功した。現在、脳髄液GABA濃度とOKR順応の学習成績の相関等を解析している。

(4) In vitro の実験により、A1R が主としてC末領域を介してmGluR1と相互作用し、複合体を形成することが明らかになった。またアデノシン等によりA1Rを活性化すると、glu-LTDの誘導が阻害されることが分かった。この阻害効果の主原因は、mGluR1の細胞内シグナリングの減弱ではなく、mGluR1のグルタミン酸感受性の低下であることが示唆された。さらにA1Rは共役するGタンパク質を介さずmGluR1のグルタミン酸感受性を変調していることが分かった。

(5) 以上の結果から、脳髄液中のGABAやアデノシンがGタンパク質に依存しない異種

GPCR相互作用により小脳のシナプス可塑性の誘導を促進/阻害し、個体レベルの学習に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

Y. Ohtani, M. Miyata, K. Hashimoto, T. Tabata, Y. Kishimoto, M. Fukaya, D. Kase, H. Kassai, K. Nakao, T. Hirata, M. Watanabe, M. Kano, A. Aiba. The synaptic targeting of mGluR1 by its carboxyl-terminal domain is crucial for cerebellar function. *Journal of Neuroscience* 査読有 34(7):2702-2712, 2014.

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3542-13.2014

Y. Shirai, T. Sasajima, S. Uchiyama, M. Takegoshi, E. Tsushima, T. Tabata. Activation of cerebellar B-type gamma-aminobutyric acid receptor modulates optokinetic reflex adaptation. *Yakugaku Zasshi* 査読有 134(3):439-445, 2014.

DOI: 10.1248/yakushi.13-00233

Y. Kamikubo, T. Shimomura, Y. Fujita, T. Tabata, T. Kashiya, T. Sakurai, K. Fukurotani, M. Kano. Functional cooperation of metabotropic adenosine and glutamate receptors regulates postsynaptic plasticity in the cerebellum. *Journal of Neuroscience* 査読有 33(47):18661-18671, 2013.

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5567-12.2013

Y. Shirai, K. Asano, Y. Takegoshi, S. Uchiyama, Y. Nonobe, T. Tabata. A simple machine vision-driven system for measuring optokinetic reflex in small animals. *Journal of Physiological Sciences* 査読有63(5):395-399, 2013.

DOI: 10.1007/s12576-013-0276-5

A. Fujita, T. Fukushima, T. Tabata. Optokinetic reflex measurement system for mice - a biomedical application of machine vision and PIC microcontroller. *Proceedings of Biometrics Workshop* 査読無 BioX2013-P5:9-11, 2013.

上窪裕二, 田端俊英, GPCRヘテロ複合体形成による神経伝達の制御, *Clinical Neuroscience*, 査読無, 32(1)2:8-9, 2013.

上窪裕二, 田端俊英, GPCR複合体形成, *Clinical Neuroscience*, 査読無, 31(12):1354-1355, 2013.

田端俊英, 野々部裕樹, 中枢神経におけるGPCRとイオンチャネルの連関, *Clinical Neuroscience*, 査読無, 31(6):638-639, 2013.

[学会発表](計6件)

藤田陽, 福嶋才貴, 田端俊英, マウス視

機性動眼反射測定システム-マシンビジョンとPICマイコンの医・生物学的応用、電子情報通信学会バイオメトリクス研究会、2013年5月24日、富山県立大学(射水市)

田端俊英、浅野健太、視機性動眼反射を用いた小動物における認知・学習機能の定量化システム、Bio Japan 2011、2011年10月5~7日、パシフィコ横浜(横浜市)

田端俊英、浅野健太、小動物用視機性動眼反射測定装置の実用化・製品化、富山大学コラボフェスタ、2011年9月28日、富山大学(富山市)

田端俊英、白井義啓、内山周、篠島俊史、竹腰昌広、立川公博、袋谷賢吉、マウスにおけるGABA_B受容体活性化による視機性動眼反射順応の促進：マシン・ビジョンを応用した測定システムによる解析、日本神経科学大会、2011年9月15日、パシフィコ横浜(横浜市)

上窪裕二、藤田洋介、下村岳司、宮島隆彰、藤野真弘、田端俊英、袋谷賢吉、狩野方伸、アデノシン A1 受容体と代謝型グルタミン酸受容体の相互作用による小脳 LTD の調整、日本神経科学大会、2011年9月15日、パシフィコ横浜(横浜市)

田端俊英、マシン・ビジョンを用いた小動物の視機性動眼反射測定システム、国際バイオ EXPO 2011、2011年6月29~7月1日、東京ビッグサイト(東京)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計1件)

名称：保定装置

発明者：白井義啓、田端俊英

権利者：国立大学法人富山大学

種類：A61D 3/100

番号：特開 2011-130906

取得年月日：査定受理

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

http://niteut.eng.u-toyama.ac.jp/Lab_NIT/Intro_ai_za.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田端 俊英 (TABATA, Toshihide)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・

准教授

研究者番号：80303270

(2) 連携研究者

上窪 裕二 (KAMIKUBO, Yuji)

順天堂大学・医学部・助教