

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590286

研究課題名(和文) 学習成立メカニズムの性的二型性とその分子基盤の解明

研究課題名(英文) Sex differences in learning and its mechanism

研究代表者

船橋 利也 (Funabashi, Toshiya)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：70229102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：動物の学習には性的二型性があると言われている。ヒトにおいても、例えば、数学は男性が、女性は言語機能に優れていると言われている。そこで、実験動物のラットを用いて、学習の成立過程、そのメカニズムに性差があると仮説をたてた。学習機能は海馬が中心となっているので、行動学的、電気生理学的、そして、生化学的に、海馬機能の学習過程における性差を解析した。その結果、海馬機能、すなわち、学習の成立過程に性差があること、女性ホルモンの代表であるエストロゲンが、AMPA受容体GluR1の発現に影響を与えている事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：It has been shown that there is a sex difference in learning process in animals. Even in human, men are superior in mathematic ability and women are better in words communication process. The present study was undertaken to proof the concept that there is a sex difference in the learning process in rats. Since the hippocampus plays a central role in this process, we analyzed the changes in hippocampal functions by behavioral, electrophysiological and biochemical methods. As the results, we revealed that estrogen plays a role for learning process by changes AMPA receptor subunit GluR1 function, which is critical for hippocampal learning ability.

研究分野：生理学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学

キーワード：性的二型性 海馬 学習 LTP Y迷路 Morris Water 迷路 エストロゲン

1. 研究開始当初の背景

脳には形態的・機能的な性的二型性が存在する。ホルモン環境の性差や、遺伝的・内分泌学的な影響を受けてホルモン感受性が変化する。例えばエストロジェンのネガティブフィードバック作用に性的二型性はなく、雌雄ともにエストロジェンは、性腺刺激ホルモン放出ホルモンニューロンの活動を抑制する。しかし、エストロジェンのポジティブフィードバック作用は雌性のみに存在する。その機序の一つに AMPA 受容体が関与している事を申請者は最近明らかにした。このように性的二型性は、様々な脳機能の性差として表現され、例えばヒトでは、摂食障害やうつ病、そして自閉症など発症の性差、すなわち疾患の脆弱性として現れているのではないかと申請者は考えるようになった。一方、興奮性神経伝達物質グルタミン酸の受容体、AMPA 受容体が、学習依存性にシナプスに挿入され、その数が増加することより電流応答が大きくなる(シナプスの伝達効率が上昇する)ということが学習成立の分子基盤と言われている。AMPA 受容体は GluR1~GluR4 のサブユニットから構成される 4 量体であり、通常は GluR2 を含んでいる。しかし、GluR2 を欠いているために、受容体 1 分子当たりの電流応答が大きいという特性を持つ GluR2-lacking AMPA 受容体が存在することが報告されている。この GluR2-lacking の存在は、シナプスの伝達効率が AMPA 受容体の数だけではなく、AMPA 受容体を構成するサブユニットの違いによっても決定される可能性を示唆している(図 1)。

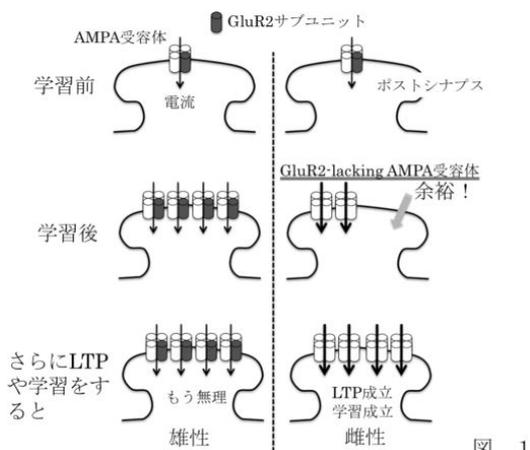


図 1

2. 研究の目的

本研究の目的は、AMPA 受容体のサブユニット構成に性的二型性があり、生理機能を変える事を明らかにする。すなわち、学習成立のメカニズムに性的二型性が存在し、それは AMPA 受容体のサブユニット構成の違いによるもので、その結果、新たな学習成立が影響される、という仮説を検証するのが本研究の目的で、そのために、海馬をターゲットに以下のことを明らかにする。

(1) 受動的回避学習は、本来暗室を好み明

るい部屋を嫌う習性がラットにあるが、電気ショックを避けるために明るい部屋にとどまるようになる、という海馬依存性の学習課題である。受動的回避学習獲得後の AMPA 受容体のサブユニット構成に性的二型性が存在し、雌性では GluR2-lacking AMPA 受容体優位に変化することを明らかにする。(2) 受動的回避学習課題において、シナプス伝達効率が優れている GluR2-lacking AMPA 受容体が優位の雌性ではシナプスへ挿入される受容体の数が減少しており、シナプスに余裕が生じるとされる。その結果、動的回避学習課題後には、新たな long-term potentiation (LTP、長期増強) の誘導は起らないが(LTP の飽和) 雌性の場合、新たな LTP が誘導可能であることを明らかにする。LTP は学習の分子基盤と言われている。(3) 同じように、シナプスに余裕があるならば、新たな学習も成立するであろう。雄性の場合、受動的回避学習後に他の海馬依存性学習である Y 迷路学習成立は抑制され、雌性の場合、シナプスに余裕があるので Y 迷路学習成立は抑制されないことを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 行動解析

受動的回避学習

受動的回避学習装置は、ドアで隔たれた明るい部屋と暗い部屋の 2 連部屋からなり、動物を明るい部屋におくと速やかに暗い部屋に移動する。暗い部屋に移動した時にドアを閉めて床のグリッドから電気ショック(0.8-1.6 mA、2 秒)を与える。その後再び明るい部屋に入ると受動的回避学習が成立しているため、明るい部屋に行かない。行動しないこと(明るい部屋に行かない)により電気ショックを回避する学習海馬依存性である事がわかっている。

恐怖条件付け

目印をした部屋に移して(文脈刺激)床のグリッドから電気ショック(0.8-1.6 mA、2 秒)を与え、動物はすくみ行動(freezing)をとる。再びその部屋に移すとその部屋を覚えていて、すくみ行動をとる。10 分間観察し、動物の行動をテレビカメラでパソコン上にデータを取り込み、すくみ行動をとっていた時間を計測する。海馬依存性である事がわかっている。また、同じ条件付けで、電気ショックとベルの音を連合させると、扁桃体依存性の学習となる。

Y 迷路学習

動物を Y 迷路の一つの選択肢に置き、5 分間の自発的交替行動(spontaneous alternation)を算出する。自発的交替行動は探索行動で、自発的に異なる選択肢に入る性質を利用し、既に入った選択肢を記憶していることにより可能となる行動で、迷路の上にテレビカメラを置き、接続したパソコン上にデータを取り込み、自動解析する。

(2) 電気生理学的解析

イソフルラン麻酔をしてから脳を摘出し、スライス切片をリニア-振動型ピプラトームで作成する。我々が改良した2段階インキュベーション法を用いる。記録は、パッチクランプ膜電位固定法を用いる。また、電気刺激は、シェーファー線維を刺激することにより行う。

AMPA/NMDA 比の解析

ビククリン存在下に、-60 mV に膜電位を固定した時の電気刺激により電流応答

(excitatory post synaptic current, EPSC) を記録し、また、+40 mV の EPSC を記録する。-60 mV の EPSC (AMPA 受容体成分) を電気刺激 150 msec 後の+40 mV の EPSC (NMDA 受容体成分) で除した値を計算する。

シナプス入力 of 解析

TTX 存在下に-60 mV に膜電位を固定し、ビククリン存在下では miniature EPSC (mEPSC)、CNQX 存在下では miniature inhibitory post synaptic current (mIPSC) を記録し、mini analysis を用いて、mEPSC と mIPSC の起こる頻度と振幅を検討する。

AMPA 受容体のサブユニット構成

ビククリンおよび APV 存在下(NMDA 受容体成分を切る)に電気刺激し、膜電位-60 mV にした時の EPSC を+40 mV の EPSC で割った値を rectification index (RI) と定義する。通常は 1.5~1.6 であるが、GluR2-lacking 受容体があると、約 2.0 になる。つまり、RI があがると GluR2-lacking 受容体があるという、機能的な解析となる。

LTP の検討

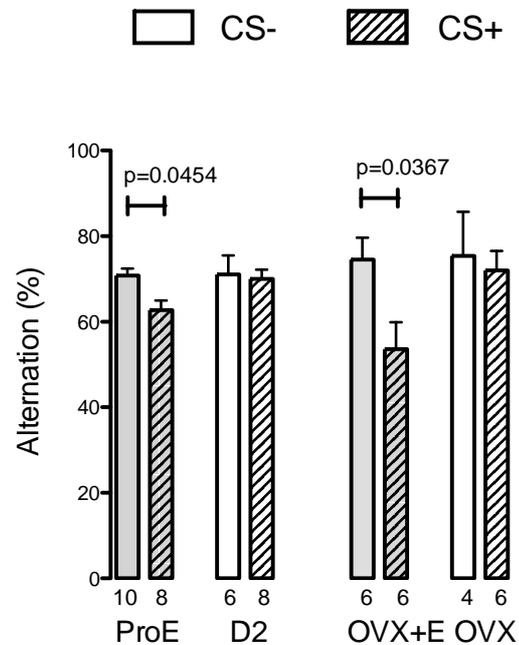
膜電位を-60 mV に固定する。テタヌス刺激は paired 刺激で、0 mV の脱分極刺激と、3-10 Hz 90 秒間の電気刺激を同時に行う。テタヌス刺激前に、10 秒間に 1 回電気刺激し、その 30 回(すなわち 5 分間)の平均を 100%として、その後 1 時間、10 秒間に 1 回電気刺激をして、経過を観察する。

(3) 生化学的解析

ウエスタンブロット

動物をイソフルラン麻酔して脳を摘出し、実態顕微鏡下で目的の領域を切り出し、液体窒素で凍結する。サンプルから定型的に蛋白質を抽出する。シナプトソーム分画の場合は、組織サンプルを、シナプトソーム分画用バッファにてホモジナイズを行い、フィルターを通して採集する。遠心後、上清を捨て、ペレットを再度シナプトソーム分画用バッファにて溶解する。それら蛋白サンプルは、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法を用いて、泳動を行い、メンブレン(PVDF膜)に転写する。PVDF膜に転写する。転写後、ブロッキング剤を用いてブロッキング処理を行い、目的の蛋白質の1次抗体を反応させる。反応後、膜を洗浄し、2次抗体(HRP標識抗体)にて反応させ、化学発光法にて検出する。

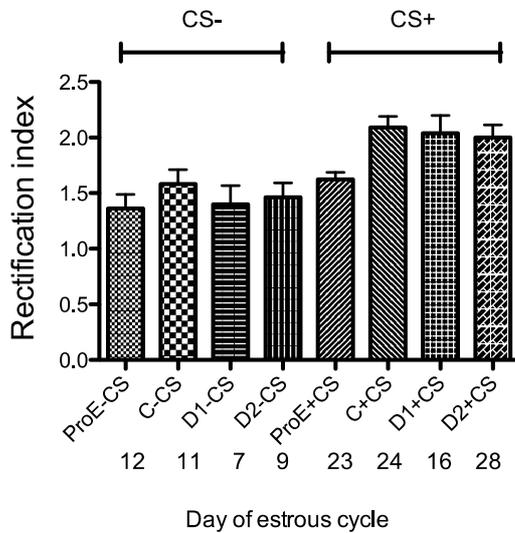
4. 研究成果



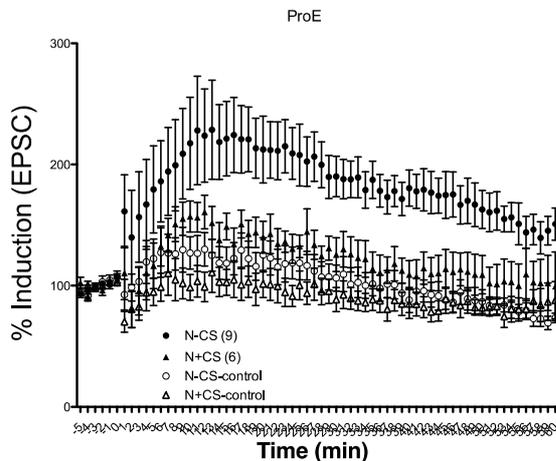
3年間は、正常な性周期を回復するラットを中心に、変化の要因がエストロゲンにある事を明らかにするために、卵巣摘除ラットにエストロゲンを処置したものを中心に解析した。また、本研究の大きな柱は、海馬依存性の受動的回避学習を行ってから、海馬機能を解析する方法を用いた。それは、海馬シナプス機能の飽和の解析に主眼を置いたからである。

(1) その結果、受動的回避学習を事前に行わなければ、性周期によるY迷路の学習機能に差は認められなかった(上図)。しかし、事前に受動的回避学習を行っておくと、発情前期のラットはY迷路の学習獲得が障害された。この事はエストロゲンの作用を推測させ、実際、受動的回避学習を事前に行わなければ、エストロゲンによりY迷路の学習機能に差は認められなかったが、事前に受動的回避学習を行っておくと、エストロゲンす処置を受けたラットのY迷路の学習獲得が障害された。

(2) その機序を明らかにするために、電気生理学的な解析を行った。その結果、受動的回避学習を事前に行わなければ、性周期によるAMPA受容体サブユニットの構成に差は認められなかった(=Rectification index、下図)。しかし、事前に受動的回避学習を行っておくと、発情前期のラットのRectification indexは下降した。逆に言えば、その他の性周期では、受動的回避学習を事前に行うと、Rectification indexは上昇した。この事はエストロゲンの作用によりAMPA受容体サブユニットの構成が変化すること、その結果が、行動に現れることが推測された。同時に、AMPA受容体サブユニットの構成変化は、海馬機能の余裕のあらわれであ



ると推測した。実際、エストロジェンの処置により、事前に受動的回避学習を行っていないと Rectification index は変わらないが、受動的回避学習を事前に行うと、Rectification index はエストロジェンにより上昇しなかった (data not shown)。この

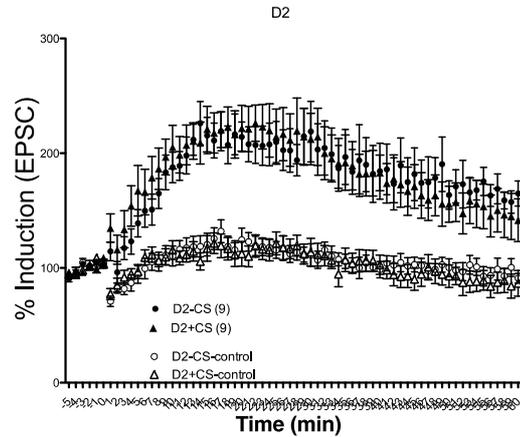


事はエストロジェンの作用により AMPA 受容体サブユニットの構成が変化すること、その結果が、行動に現れることが確かめられた。

この結果を、より確かめるために、LTP 実験を行った。事前に受動的回避学習を行っていないと発情前期のラットは、は変わらないが、受動的回避学習を事前に行うと、Rectification index はエストロジェンにより上昇しなかった (data not shown)。この事はエストロジェンの作用により AMPA 受容体サブユニットの構成が変化すること、その結果が、行動に現れることが確かめられた。

この結果を、より確かめるために、LTP 実験を行った。事前に受動的回避学習を行っていないと発情前期野ラットでも LTP は誘導されたが、事前に受動的回避学習を行うと、LTP は誘導されなかった、すなわち、LTP の飽和が観察された (下図)。その他の性周期、すなわち、エストロジェンが低い日では受動的回避学習を事前にやったかどうかの有無に関わらず、LTP が海馬において誘導されたこ

とから、飽和は起こっていないと考えられた



(上図)。そして、この機序の一つにエストロジェンがあることが明らかとなった (data not shown)。

現在、生化学的な解析と、性差を検討している。今のところ、雄性は、LTP の飽和は、非発情期の雌性と同じようにおきないことが示唆されている。

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6件)

①Tada H, Kuroki Y, Funabashi T, Kamiya Y, Goto T, Suyama K, Sano A, Mitsushima D, Etgen AM and Takahashi T, Phasic synaptic incorporation of GluR2-lacking AMPA receptors at gonadotropin-releasing hormone neurons is involved in the generation of the luteinizing hormone surge in female rats. *Neuroscience*, 査読有, 248, 2013, 664-669

②Nishitani S, Funabashi T, Shinohara K, Kimura F, Phosphorylation of cAMP response element-binding proteoin in the extended amygdala of male rats is induced by novel environment and attenuated by estrous female-bedding. *Neuroendocrinology Letters*, 査読有, 34, 2013, 118-123

③Hagiwara H, Funabashi T, Akema T, Kimura F, Sex-specific differences in pain response by dopamine in the bed nucleus of the stria terminalis in rats. *NeuroReport*, 査読有, 24, 2013, 181-185

④Fukushima A, Furuta M, Kimura F, Akema T, Funabashi T, Testosterone exposure during the critical period decreases corticotropin-releasing hormone-immunoreactive neurons in the bed nucleus of the stria terminalis of female rats. *Neuroscience Letters*, 査読有, 534, 2013, 64-68.

⑤Fujioka H, Kakehashi C, Funabashi T, Akema T, Immunohistochemical evidence for the relationship between microglia and GnRH neurons in the preoptic area of ovariectomized rats with and without steroid replacement.

Endocrine Journal, 査読有, 60, 2013, 191-196
⑥Furuta M, Funabashi T, Akema, Maternal iron deficiency heightens fetal susceptibility to metabolic syndrome in adulthood. Endocrinology, 査読有, 153, 2012, 1003-1004

〔学会発表〕(計 15 件)

福島篤、舩橋利也、長谷都、藤岡仁美、小倉裕司、明間立雄：エストロゲンの細胞膜エストロゲン受容体 GPER を介した摂食調節機構に関する研究：第 9 回環境生理学プレコングレス (平成 26 年 3 月 15 日：鹿児島県)

黒坂光寿、小倉裕司、舩橋利也、明間立雄。筋サテライト細胞における温度依存性 TRP チャネルの発現と機能の検討：第 68 回日本体力医学会大会 (平成 25 年 9 月 21 日：東京都)

Kurosaka M., Ogura Y., Fujiya H., Kishiro S., Ito T., Funabashi T., Akema T. The role of JAK2/STAT3 signaling pathway in immobilization-induced muscle atrophy. 34th Annual Meeting International Gravitational Physiology (平成 25 年 6 月 24 日：愛知県)

福島篤、舩橋利也、明間立雄：摂食行動調節における TCPTP の役割：第 90 回日本生理学会 (平成 25 年 3 月 30 日：東京都)

古田都、福島篤、舩橋利也、明間立雄：妊娠、出産、子育ては海馬機能を向上させる：第 90 回日本生理学会 (平成 25 年 3 月 30 日：東京都)

藤岡仁美、舩橋利也、明間立雄：GnRH ニューロンの制御におけるミクログリアの関与：第 90 回日本生理学会 (平成 25 年 3 月 30 日：東京都)

黒坂光寿、小倉裕司、舩橋利也、明間立雄：筋損傷・再生過程における JAK2/STAT3 経路の役割：第 90 回日本生理学会大会 (平成 25 年 3 月 29 日：東京都)

藤原清悦、舩橋利也、明間立雄：学習課題遂行過程の海馬と前頭前野のニューロン活動の相関：第 244 回生理学東京談話会 (平成 25 年 3 月 26 日：東京都)

福島篤、舩橋利也、明間立雄：視床下部の TCPTP と摂食行動：第 244 回生理学東京談話会 (平成 25 年 3 月 26 日：東京都)

久保田隆文、福島篤、長谷都、舩橋利也、明間立雄：視床下部 TIDA ニューロンと摂食：第 244 回生理学東京談話会 (平成 25 年 3 月 26 日：東京都)

福島篤、由利和也、舩橋利也、明間立雄：視床下部の TCPTP 発現と摂食行動調節の役割：第 39 回日本神経内分泌学会 (平成 24 年 9 月 28 日：福岡県)

藤原清悦、伊崎義憲、舩橋利也、明間立雄：オペラント学習中にみられる報酬に関連した海馬リップル波：電気学会 電子・情報システム部門大会 (平成 24 年 9 月 3 日：青森県)

舩橋利也、古田都、福島篤、遠藤豊、田中富久子、明間立雄：性周期と食餌環境が海馬

空間認知機能に及ぼす影響：第 7 回環境生理学プレコングレス (平成 24 年 3 月 28 日：長野県)

古田都、舩橋利也、小倉裕司、藤原清悦、明間立雄：雌性ラットの離乳直後から粉餌で飼育すると海馬及び学習の機能が変化する：第 38 回日本神経内分泌学会 (平成 23 年 11 月 25 日：東京都)

舩橋利也、古田都、川平敦子、紙谷義孝、明間立雄：Feeding with powdered diet from weaning changed the performance in the task of Morris water maze and Y maze without affecting the elevated T maze in female rats：第 34 回日本神経科学学会 (平成 23 年 9 月 16 日：神奈川県)

〔図書〕(計 1 件)

舩橋利也、南江堂、生理学実習書、2013, 107-115

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.marianna-u.ac.jp/physiology/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

舩橋 利也 (Funabashi, Toshiya)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：70229102

(2) 研究分担者

長谷 都 (Nagatani, Miyako)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：20450611

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：