

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460314

研究課題名(和文) ストレス回避学習の分子メカニズム：アセチルコリンが強化する海馬シナプスの可塑性

研究課題名(英文) Cholinergic trigger drives synaptic plasticity for stress avoidance task

研究代表者

美津島 大 (MITSUSHIMA, Dai)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70264603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：急性ストレスは、海馬内に強いエピソード記憶を形成し、個体は回避行動に役立っている。ラットを用いてストレス回避学習を行うと、海馬CA1ニューロンに対する興奮性シナプスのみならず、抑制性シナプスの可塑性も高まる結果、多様な入力特性が保持されることを発見した。また、このシナプス多様性は学習の成立に必要であり、シナプス多様性の形成を薬物で阻止すると学習が成立しないことが判明した。回避学習の5分後にはシナプスの多様化が成立し、左右両側で見られた。さらに、この多様性をエントロピー解析すると、シナプスが持つ情報量(自己エントロピー)は、全CA1領域で大 $5.6 \times 1000000$  bitに及ぶことも判明した。

研究成果の概要(英文)：Acute stress forms strong episodic memory, being useful to avoid similar stress in future. Learning of stressful context by the inhibitory avoidance task strengthens not only AMPA receptor-mediated excitatory synapses, but also GABAA receptor-mediated inhibitory synapses, showing wide-diversity of synaptic input after the contextual learning in rats. Learning requires the diversity of synapses, since blocking to forms diversity successfully impaired the learning. CA1 neurons showed rapid synaptic diversity within 5 min after the episode, and we observed the diversity both sides of hippocampus, in right and left hemisphere. Moreover, self-entropy analysis of the diversity revealed the amount of information at the synapses. The total self-entropy at synapses in 400000 CA1 neurons was estimated  $5.6 \times 1000000$  bit after the learning.

研究分野：生理学、神経科学

キーワード：ストレス 学習・記憶 AMPA受容体 GABAA受容体 シナプス可塑性 パッチクランプ法

### 1. 研究開始当初の背景

アセチルコリン(ACh)ニューロンは前脳基底部に存在し、海馬を含む大脳皮質全体に投射して意識レベルの調節に関わる。急性ストレスや海馬学習は海馬内ACh分泌を急性的に上昇させ(Mitsushimaら, Endocrinology 2008)、エピソード記憶の形成に必要不可欠である。特定の場所での電気ショックを回避する、inhibitory avoidance (IA) taskは海馬依存性のエピソード学習であり、海馬CA1でLong-term potentiation (LTP)を発生させることが報告された(Whitlockら Science 2006)。分子メカニズムは不明であったが、我々は、IAによる回避学習が海馬CA1ニューロンのAMPA受容体を興奮性シナプスへ移行させる事実をはじめ確認した。また、移行を阻止する変異体の両側海馬CA1での発現が学習を阻害することから、「AMPA受容体のシナプス移行が学習成立に必要」であることも証明した(Mitsushimaら, PNAS 2011)。

### 2. 研究の目的

急性ストレスへの曝露は、強いエピソード記憶を形成し、後のストレス回避に役立つ。ラットにストレス回避学習を行うと、興奮性シナプスと抑制性シナプスの可塑性が高まり、海馬ニューロンが多様な入力特性を保持することを突き止めた。さらに、アセチルコリンの受容体阻害薬を海馬内に投与すると、この多様性が失われ、回避学習は阻止された。本研究では興奮性シナプスと抑制性シナプスに刻まれた回避学習の記憶痕跡を解析し、シナプス・分子レベルで学習の全体像を明らかにする。

### 3. 研究の方法

**動物** SD系雄性ラットを実験に用いる。室温約24℃、5時～19時までを明期とする人工環境下で飼育し、固形餌と水は自由摂取とした。**ストレス回避学習実験** Light-Dark Boxを備えたショックケージを使用して、受動的回避学習実験であるIA taskを行う。まず、Light

Boxにラットを入れ、Dark Boxへの扉を開く。Dark Boxへのラット移行後、扉を閉め電気ショック(1.6mA, 2s)を負荷する。Home Cageにラットを戻し、30分後に再度Light Boxにラットを入れ、Dark Boxに移動するまでの時間を測定し、学習レベルを評価した。

#### 海馬CA1におけるin vivo発火活動解析

学習依存的にシナプス可塑性が高まる結果、海馬CA1ニューロンの発火活動がどう変化するかを自由行動状態で解析した。記録電極を植え込み、Spike 2を取得システムとして、ストレス学習前後の海馬CA1ニューロンの発火活動を多チャンネル記録した。電気ショックストレスを用いたIA taskでは、Head ampが破壊される事が判明し、動物の四肢をガーゼで10分間固定する拘束ストレスをエピソードとして実験に用いた。本実験から、ストレスを伴うエピソード学習が、どの様に海馬発火活動に影響するか、発火パターン、頻度、スパイクタイミングへの個体での作用を検討した。

#### 脳スライスのパッチクランプ解析

ストレス回避学習や拘束ストレスの後、ラットに深麻酔を施し、速やかに脳を取り出した。厚さ350 μmの海馬急性スライスはVibratome (Leica VT1200)により作成した。95%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>ガスで飽和させた人工脳脊髄液中で急性スライスを維持し、蛍光顕微鏡下でのパッチクランプによりCA1錐体細胞の電気生理学的特性を解析した。

人工脳脊髄液中に0.5 μMのTTXを入れ、1シナプス小胞のグルタミン酸による、AMPA受容体を介する興奮性シナプス後細胞反応(mEPSC)と、1シナプス小胞のGABAによる、GABA<sub>A</sub>受容体を介する抑制性シナプス後細胞反応(mIPSC)を同一ニューロンで捉えた。

さらにPaired-pulse法により、興奮性線維を刺激した際のevoked EPSCや抑制性線維を刺激した際のevoked IPSCを解析し、学習によるシナプス可塑性がシナプス前後のどち

ら側に見られるかを確認した。

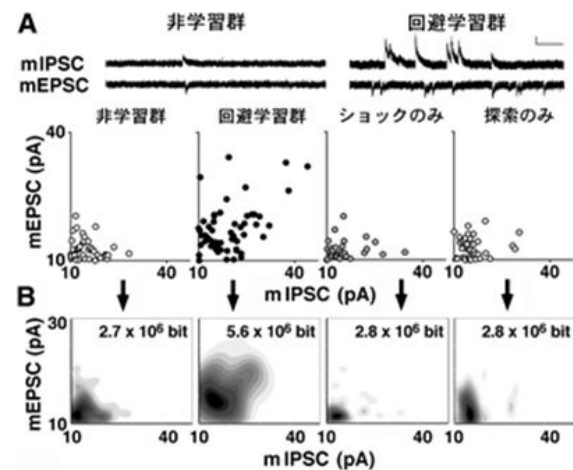
### 受容体蛋白の定量とリン酸化解析

CA1領域を特異的に切り出し、AMPA受容体 GluA1 subunitのSer<sup>831</sup>リン酸化とGABA<sub>A</sub>受容体 β<sub>3</sub> subunitのSer<sup>408</sup>-Ser<sup>409</sup>リン酸化を捉えた。AMPA受容体は4量体でNa<sup>+</sup>チャンネルを形成し、GluA1 subunitのSer<sup>831</sup>はPKCとCaMKIIによるリン酸化修飾を受け、活動依存的なAMPA受容体の興奮性シナプスへの移行に強く関わる。一方、GABA<sub>A</sub>受容体は5量体でCl<sup>-</sup>チャンネルを形成する。β<sub>3</sub> subunitのcytoplasmic loopに存在するSer<sup>408</sup>とSer<sup>409</sup>がPKC、PKA、CaMKIIによるリン酸化修飾を受け、活動依存的なGABA<sub>A</sub>受容体の抑制性シナプスへの移行に強く関わる。GluA1 subunitのリン酸化検出には anti-tublin, anti-GluA1, anti-GluA1 pSer<sup>831</sup>の抗体セットを、GABA<sub>A</sub> β<sub>3</sub> subunitのリン酸化検出にはanti-tublin, anti-GABA<sub>A</sub> β<sub>3</sub> subunit pSer<sup>408</sup>-Ser<sup>409</sup>の抗体セットを使用し、Chemiluminescence法で各蛋白の発現を解析した。検出されたバンドの濃さを相対評価し、蛋白発現量とリン酸化蛋白を定量的に評価した。

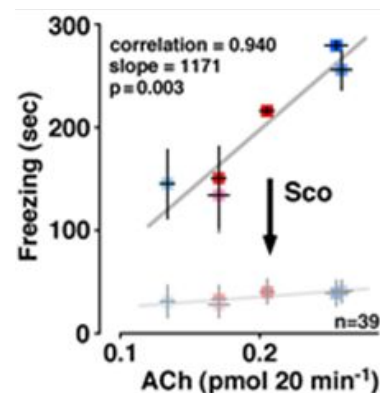
In vivo microdialysis 脳定位固定装置を用いて背側海馬にガイドカニューラを植え込み、頭蓋骨に固定する。術後のラットは、アクリル製円筒形ケージ(直径35cm、高さ45cm)で飼育し、4日間回復させる。実験前日に、ダミープローブを抜き、先端が半透膜からなるmicrodialysis用プローブ(Eicom Co.)を、ガイドカニューラを介してCA1領域に刺入する。プローブは自由行動用シーベルを備えた流路につなぎ、マイクロポンプ(CMA)を用いて、人工脳脊髄液で環流する。自由行動状態を維持しつつ、翌日 *in vivo* microdialysis実験を行い、脳内環流液の採取を続けながらtaskを行う。実験終了後は10%ホルマリン溶液による環流固定を行う。凍結切片を作成し、プローブ刺入部位を確認した。

### 4. 研究成果

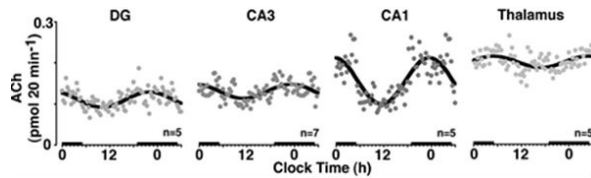
CA1ニューロン毎の興奮性シナプス入力と抑制性シナプス入力は回避学習によって多様化した(図1A)。興奮性シナプスの多様化はAChのM1受容体阻害薬のCA1局所投与で、抑制性シナプスの多様化はAChのα7受容体阻害薬のCA1局所投与で阻止された。シナプス多様性を両側海馬で阻止すると、学習が成立しないため、学習がもたらす多様なシナプス入力は記憶痕跡であると考えられた(Mitsushima et al, *Nature Communications*, 2013)。



**図1** A: 1シナプス小胞あたりの、グルタミン酸による興奮性シナプス反応(mEPSC)とGABAによる抑制性シナプス反応(mIPSC)。CA1ニューロン毎に興奮性シナプスの入力状況(縦軸)と抑制性シナプスの入力状況(横軸)がわかる。回避学習により興奮性シナプスと抑制性シナプスが多様に強化された。B: 二次元カーネル密度解析により、mEPSCとmIPSCの分布密度を求め、シナプス入力多様性をエントロピー解析した。取得データはCA1ニューロン400,000個の代表と考え、CA1全体の自己エントロピー(情報量)を求めた。



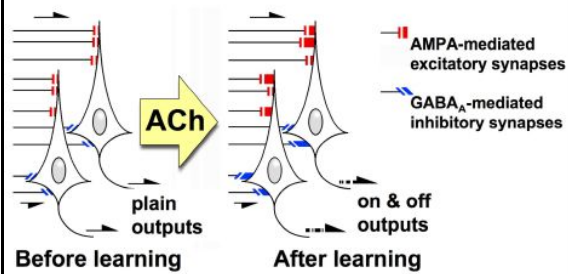
**図2** *In vivo* microdialysis法により、学習成績(y)と海馬ACh分泌量(x)の関係を明らかにした[ $y = 1171x + 36$ ]。ACh阻害薬 Scopolamine (2mg/kg)の皮下投与により関係は消失した(Takase & Mitsushima, 2014)。



**図3** *In vivo* microdialysis法を用い、24時間のACh分泌量をDG, CA3, CA1と背側視床で解析し、CA1内に時間依存性変動の焦点を確認した。本研究からCA1内における24時間のACh分泌量(y)と時間(x)の関係を明らかにした。[ $y = 0.057 \cos(x + 7.755) + 0.156$ ]、xは角度時で正午12時=180°、深夜0時=0°とする。(Mitsushimaら, 2015)

本研究で、自由行動状態の海馬CA1における多ニューロン発火活動と波を同時記録し、エピソード学習をさせると、波の頂点位相( $\approx 180^\circ$ )に同期した、短いパースト状同期発火(リップル波)が見られた。さらに、リップル波の構成ニューロン数、周波数(Frequency)、長さ(Duration)が多様化する事実も掴んだ。エピソードの30分後にも多様なリップル波の挿入が維持され、個々のCA1ニューロンへのシナプス入力をスライスパッチクランプ法で解析すると、興奮性シナプスと抑制性シナプスが多様に強化されていた。興奮と抑制で描き出されるシナプス可塑性のパターンを二次元カーネル密度解析し、異なる文脈のエピソードでは密度分布領域が異なることも判明した。さらに、興奮と抑制のシナプスによって紡ぎ出される、シナプス多様性を数理解析し、CA1全体に展開すると、情報拡大は最大 $5.6 \times 10^6$  bitに及んだ。

さらに、左右の背側CA1でGluA1 subunitのSer<sup>831</sup>リン酸化および、GABA<sub>A</sub>  $\beta_3$  subunitのSer<sup>408</sup>-Ser<sup>409</sup>リン酸化の両者を捉えた。



**図4** 海馬CA1における学習メカニズムの仮説。学習後のCA1ニューロンは、自発性高頻度発火活動(super burst)の発生後、興奮と抑制のフェーズを繰り返す特徴的な発火活動(リップル波)を形成する。学習依存的な興奮性シナプスの多様化にはAChのM1受容体が、抑制性シナプスの多様化にはAChの $\alpha 7$ 受容体の活性化が必要である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

Kida H, Tsuda Y, Ito N, Yamamoto Y, Owada Y, Kamiya Y, Mitsushima D. Motor training promotes both synaptic and intrinsic plasticity of layer II/III pyramidal neurons in the primary motor cortex. *Cerebral Cortex*, doi: 10.1093/cercor/bhw134, 2016, in press, 査読有.

Ebrahimi M, Yamamoto Y, Sharifi K, Kida H, Kagawa Y, Yasumoto Y, Islam A, Miyazaki H, Shimamoto C, Maekawa M, Mitsushima D, Yoshikawa T, Owada Y. Astrocyte-expressed FABP7 regulates dendritic morphology and excitatory synaptic function of cortical neurons. *Glia*, 64(1):48-62, 2016, 査読有.

Mitsushima D. Contextual learning requires functional diversity at excitatory and inhibitory synapses onto CA1 pyramidal neurons. *AIMS Neuroscience*, invited review 2(1):7-17, 2015, 査読有.

Hosokawa T, Mitsushima D, Kaneko R, Hayashi Y. Stoichiometry and phosphoisotypes of hippocampal AMPA-type glutamate receptor phosphorylation. *Neuron*, 85(1): 60-67, 2015, 査読有.

Takase K, Sakimoto Y, Kimura F, Mitsushima D. Developmental trajectory of contextual learning and 24-h acetylcholine release in the hippocampus. *Scientific Reports* 4, 3738 doi:10.1038/

srep03738, 2014, 査読有.

木田 裕之、美津島 大 スライスパッチクランプ法を用いた一次運動野ニューロンとシナプス機能の解析 山口医学 Vol.63 No.3, 189-193, 2014, 査読有.

Mitsushima D, Sano A, Takahashi T. A cholinergic trigger drives learning-induced plasticity at hippocampal synapses. Nature Communications, 4:2760 doi: 10.1038/ncomms3760, 2013, 査読有.

〔学会発表〕(計 3 件)

Ishikawa J, Mitsushima D. Real-time change of neuronal activity in the hippocampal CA1 before, during, and after the exposure to emotional episodes: spontaneous high frequent firing and following ripple diversity. 第 93 回日本生理学会大会 札幌市、札幌コンベンションセンター、2016.3.22~24.

Sakimoto Y, Mitsushima D. Rapid synaptic plasticity within 5 min: experienced episode increases diversity of excitatory and inhibitory synapses in the hippocampal CA1. 第 93 回日本生理学会大会 札幌市、札幌コンベンションセンター、2016.3.22~24.

Kida H, Mitsushima D. Motor training promotes both synaptic and intrinsic plasticity of layer II/III neurons in the primary motor cortex. 第 93 回日本生理学会大会 札幌市、札幌コンベンションセンター、2016.3.22~24.

〔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〕

教室ホームページ

<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~seiri2/>

Nature Asia より

<http://www.natureasia.com/ja-jp/ncomms/abstracts/50591>

山口大学ニュース

[http://www.yamaguchi-u.ac.jp/topics/2013/\\_3105.html](http://www.yamaguchi-u.ac.jp/topics/2013/_3105.html)

山口大学ニュース

[http://www.yamaguchi-u.ac.jp/weeklynews/2016/\\_5155.html](http://www.yamaguchi-u.ac.jp/weeklynews/2016/_5155.html)

日本生理学会サイエンストピックス  
<http://physiology.jp/science-topic/5961/>  
日本神経科学学会神経科学トピックス  
<http://www.jnss.org/131206-01/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

美津島 大 (MITSUSHIMA, Dai)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：7 0 2 6 4 6 0 3

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

木田 裕之 (KIDA, Hiroyuki)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：7 2 4 3 2 7 3 9

石川 淳子 (ISHIKAWA, Junko)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：3 0 5 7 0 8 0 8

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