

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：33303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670129

研究課題名(和文) アセチルコリンによる細胞内受容体を介した新たなシナプス可塑性調節機構の解明

研究課題名(英文) Novel regulation of synaptic plasticity by intracellular acetylcholine receptors

研究代表者

工藤 麻希子 (KUDO, Makiko)

金沢医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50722253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：海馬や大脳皮質の神経細胞においてムスカリン性アセチルコリン受容体M1 (M1-mAChRs) は細胞小器官内に機能的に発現しており、その活性化は海馬CA1シナプスのシナプス伝達長期増強(LTP)を促進することを明らかにしてきた。本研究では、細胞内M1-mAChRsが内因性アゴニストであるアセチルコリンにより活性化して、海馬におけるLTPの促進に關与しているか明らかにする研究を行った。

研究成果の概要(英文)：We have reported that muscarinic acetylcholine receptors M1 (M1-mAChRs) are functionally expressed in the intracellular membranes of cortical and hippocampal neurons, and facilitate long-term potentiation (LTP) in hippocampal CA1 synapses. In this study, we clarified whether endogenous agonist acetylcholine activates the intracellular M1-mAChRs and regulates hippocampal synaptic plasticity.

研究分野：薬理学

キーワード：海馬 アセチルコリン 細胞内受容体

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系においてアセチルコリンはシナプス伝達やその調節を行う重要な神経伝達物質であり、学習・記憶などの高次機能の制御に必要不可欠である。アセチルコリン受容体には様々な種類が存在するが、Gq タンパク質共役型のムスカリン性アセチルコリン受容体 M1 は、記憶・学習に重要な大脳皮質や海馬など特定の脳領域で強く発現している。神経細胞において M1 受容体は、C 末端にトリプトファン含有モチーフを有することにより構成的インターナリゼーションを起こすことから、その他のムスカリン受容体サブタイプとは異なり細胞膜上だけではなく常にゴルジ体や小胞体などの細胞内小器官にも発現していることが明らかになってきた (Uwada et al, J Cell Sci, 127:3131-3140, 2014)。さらに、細胞内に発現している M1 受容体は、アゴニストと結合することによりセカンドメッセンジャーである細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) を活性化する機能的受容体として存在している。これまでに我々は、学習・記憶の神経基盤と考えられているシナプス伝達長期増強が細胞内 M1 受容体により調節されているか海馬スライス標本を用いて検討してきた。その結果、細胞内 M1 受容体は遅発相の LTP の増強に関与していることが明らかにすることができた (Anisuzzaman et al, J Neurochem 126(3):361-371, 2013)。しかしながら、内因性リガンドであるアセチルコリンにより細胞内 M1 受容体が活性化し、シナプス可塑性調節に関与しているかについては明らかでない。

2. 研究の目的

脳内のアセチルコリンは、コリン作動性神経系より遊離されて受容体に結合することにより作用を発揮する。一方で、遊離されたアセチルコリンは、細胞外に分布するコリンエステラーゼにより速やかに分解され不活化される。細胞内 M1 受容体が活性化するためには、細胞外のアセチルコリン濃度が上昇することにより細胞内へのアセチルコリンが取込まれることが必要であると考えられる。そこで、我々は細胞外にアセチルコリン

を加えるもしくはアセチルコリン分解を抑制するコリンエステラーゼ阻害薬を加えることにより細胞外アセチルコリン濃度を上昇させて、細胞内 M1 受容体の活性化にともなう LTP 促進が引き起こされるか否か明らかにする研究を行った。

3. 研究の方法

イソフルラン麻酔下で 6-8 週齢の Wistar ラットから海馬を摘出して急性スライス標本を作製した。GABA_A 受容体遮断薬ピクロトキシン存在下、双極タングステン電極でシャーファー側枝を刺激して、striatum radiatum からシャーファー側枝 - CA1 錐体細胞シナプスの興奮性シナプス後電位 (fEPSP) をフィールド記録法により測定した。LTP はシャーファー側枝を 100 Hz, 1s で高頻度刺激して誘導した。

4. 研究成果

はじめに海馬スライス標本においてムスカリン受容体作動薬のカルバコール (50 nM) を加えることにより細胞内に発現する M1 受容体を活性化すると、シナプス伝達長期増強 (LTP) の遅発相が促進されることを確認した。

次に、スライスを 10^{-7} - 10^{-5} M アセチルコリンを含んだ人工脳脊髄液 (ACSF) で 20 分間インキュベーションしたスライスで LTP を測定した。その結果、LTP の促進は観察されたが、安定した促進効果を得ることはできなかった。

そこで、アセチルコリンの分解を触媒するコリンエステラーゼを不可逆的に阻害した条件下でアセチルコリンによる LTP の促進効果が得られるか検討した。本実験では非可逆的コリンエステラーゼ阻害薬として diisopropyl fluorophosphates (DFP) を用いた。DFP は、 10^{-4} M 以上でほぼ完全にコリンエステラーゼ活性を抑制し、細胞内へのアセチルコリン取り込みを引き起こした。 10^{-4} M の DFP を前処置したスライス標本で LTP を測定すると、無処置群と比較して LTP が有意に増強した。DFP による LTP 増強は、選択的 M1 受容体拮抗薬ピレンゼピンで遮断されたことから、M1 受容体刺激によるもので

あることが明らかになった。また、細胞膜を通過しないペプチド性 M1 受容体拮抗薬である MT7 は、DFP による初期のシナプス伝達増強の亢進は抑制したが、遅発相の増強には影響がなかった。逆に、アセチルコリンの取り込みを抑える低濃度の tetraethylammonium によって DFP による遅発相の増強が抑制された。

以上の結果より、コリンエステラーゼ阻害下では内因性アセチルコリンが神経細胞内に取り込まれることにより細胞内 M1 受容体が活性化して、シナプス伝達長期増強が促進的に調節されていることが示唆された。

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 5 件)

Masuoka T, Kudo M, Yoshida J, Ishibashi T, Muramatsu I, Kato N, Imaizumi N, Nishio M. Long-Term Activation of Group I Metabotropic Glutamate Receptors Increases Functional TRPV1-Expressing Neurons in Mouse Dorsal Root Ganglia. *Front Cell Neurosci.* 2016 10:79. doi:10.3389/fncel.2016.00079. (査読有り)

Masuoka T, Nakamura T, Kudo M, Yoshida J, Takaoka Y, Kato N, Ishibashi T, Imaizumi N, Nishio M. Biphasic modulation by mGlu5 receptors of TRPV1-mediated intracellular calcium elevation in sensory neurons contributes to heat sensitivity. *Br J Pharmacol.* 2015 172(4):1020-33. doi:10.1111/bph.12962. (査読有り)

Masuoka T, Ishibashi T. and Nishio M. Biphasic modulation of noxious heat sensitivity in sensory neurons by peripheral metabotropic glutamate receptors. *Inflamm Cell Signal*, 2015; 2: e602. doi: 10.14800/ics.602 (査読有り)

Yoshiki H, Uwada J, Anisuzzaman AS, Umada H, Hayashi R, Kainoh M,

Masuoka T, Nishio M, Muramatsu I. Pharmacologically distinct phenotypes of $\alpha 1B$ -adrenoceptors: variation in binding and functional affinities for antagonists. *Br J Pharmacol.* 2014 171(21):4890-4901.

doi:10.1111/bph.12813. (査読有り)

Uwada J, Yoshiki H, Masuoka T, Nishio M, Muramatsu I. Intracellular localization of the M1 muscarinic acetylcholine receptor through clathrin-dependent constitutive internalization is mediated by a C-terminal tryptophan-based motif. *J Cell Sci.* 2014 127(Pt 14):3131-3140. doi:10.1242/jcs.148478. (査読有り)

[学会発表](計 6 件)

Kudo M, Masuoka T, Muramatsu I, Nishio M. Contribution of intracellular acetylcholine receptor to hippocampal long-term potentiation reinforced by an irreversible cholinesterase inhibitor 第 89 回日本薬理学会年会、2016 年 3 月 10 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
Masuoka T, Kudo M, Ishibashi T, Nishio M. Electrophysiological characteristics of TRPV1-mediated responses in TRPA1-positive neurons in dorsal root ganglion 第 89 回日本薬理学会年会、2016 年 3 月 10 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

益岡尚由、工藤麻希子、吉田純子、石橋隆治、今泉範子、西尾眞友。短時間および長時間のグルタミン酸受容体活性化による後根神経節細胞の capsaicin に対する応答性の変化、第 66 回日本薬理学会北部会、2015 年 9 月 18 日、富山国際会議場(富山県・富山市)

Masuoka T, Gallar J, Belmonte C. Effects of sodium channel blocker amitriptyline on the spontaneous and stimulus-evoked activity of corneal cold-sensitive nerve terminals in intact and tear-deficit guinea-pig eye. The association for Research in vision and Ophthalmology 2015、2015 年 5 月 3 日~7 日、Denver (米国)

Imaizumi N, Yoshida J, Ishibashi T,

Masuoka T, Nishio M. Resveratrol Downregulated Caveolin-1 in A431 Cells、第 88 回日本薬理学会年会 2015 年 3 月 18 日～20 日、名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）

Gallar J, Masuoka T, Belmonte C. Effects of amitriptyline on the spontaneous and stimulus-evoked activity of corneal cold-sensitive nerve terminals. Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics 2015, 2015 年 2 月 26 日～3 月 1 日, Charleston (米国)

〔図書〕(計 1 件)

Muramatsu I, Yoshiki H, Sada K, Uwada J, Taniguchi T, Masuoka T, Nishio M. Binding Method for Detection of Muscarinic Acetylcholine Receptors in Receptor's Natural Environment, Muscarinic Receptor: From Structure to Animal Models, Volume 107 of the series Neuromethods, Springer, pp 69-81, 2016

6. 研究組織

(1)研究代表者

工藤 麻希子 (KUDO, Makiko)
金沢医科大学・医学部・研究員
研究者番号：50722253

(2)研究分担者

益岡 尚由 (MASUOKA, Takayoshi)
金沢医科大学・医学部・講師
研究者番号：80509307