

平成22年3月25日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19770134

研究課題名（和文） マウス学習記憶過程における一酸化窒素（NO）の生理学的役割の解明

研究課題名（英文） Physiological role of nitric oxide in learning and memory in mice

研究代表者

北村美一郎（KITAMURA YOSHIICHIRO）

徳島文理大学・香川薬学部・講師

研究者番号：70348829

研究成果の概要：マウスの小脳依存性学習における一酸化窒素（NO）の役割を、複数の学習パラダイム（ロータロッド試験、瞬目反射条件づけ）を用いて調べた。特にロータロッド試験の実験結果から、記憶が成立するためには脳内 NO 濃度が一定範囲に保たれる必要があることが示唆された。また、野生型マウスの聴力（聴性脳幹反応）の加齢的变化を長期（～90 週令）に渡って調べた。老化促進マウス（SAM）の聴性脳幹反応についても調べた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：脳・神経系の情報処理

1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素（NO）は様々な動物種で情報伝達分子として働く。近年では学習記憶の素過程と考えられる小脳長期抑圧や海馬長期抑圧に関与する可能性も示唆され、学習記憶行動における NO の役割が特に注目されている。実際にこれまで多くの動物種において、学習記憶行動が NO 合成酵素阻害剤により抑制され、逆に NO 放出剤により増強されることが知られている。さらに老齢ラットにおいては、大脳皮質および線条体における NOS 含有細胞数の減少や、小脳における NOS 活性の低下が報告されている。

しかしながら、NO は脳高次機能や老化による記憶障害のメカニズムに深く関わることが示唆されているものの、存在寿命が短い上に産生濃度も少ないこともあり、確実な NO 濃度測定法が確立されていないという根本的な問題がある。そのため生体内での詳しい NO 動態については未だ不明なところが多く、その生理学的役割については解明されていない。近年の学習記憶行動における NO の役割を調べた論文間に矛盾した報告が多々見られるのも、主に NO 動態の知見不足によるところが大きいと考えられる（実際に脊椎動物の *in vivo* 脳での

NO 測定例は国内外を通じてほとんど報告されていない。これらの問題解決のためには生体内 NO 測定法の確立および NO の生理学的役割を解明するのに相応しいモデル学習系が強く求められる。

2. 研究の目的

マウスの記憶学習行動における NO の生理学的役割を調べるため、主に以下の3つの実験を行った。

(1) 小脳依存性学習（ロータロッド試験、瞬目反射条件づけ）における NO 関連試薬の影響

(2) 野生型マウスおよび老化促進マウス (SAM) における聴性脳幹反応の測定

(3) NO センサー法による脳内 NO 濃度測定

3. 研究の方法

(1) 小脳依存性学習（ロータロッド試験、瞬目反射条件づけ）における NO 関連試薬の影響

オスの野生型マウス（12、40、100 週令）にロータロッド試験を行った。次に 12 週令のマウスに、NO 合成酵素阻害剤 L-NAME または NO ドナー NOR4 を腹腔投与してロータロッド試験を行った。また、40 週令のマウスに NOR4 を腹腔投与して、同様の試験を行った。

オスの野生型マウス（10 週令）に、神経型 NO 合成酵素阻害剤 7-NI を投与して瞬目反射条件づけを行った。7-NI は条件付け 1～7 日目の開始前に皮下注射により投与した。

(2) 野生型マウスおよび老化促進マウス (SAM) における聴性脳幹反応の測定

野生型マウスや老化促進マウス SAM を用いて老化や神経変性疾患における瞬目反射条件づけ学習障害を調べる際、この学習パラダイムでは条件刺激として音刺激を用いる。そのため学習実験に用いる動物種の聴力低下の有無を調べることは重要である。そこで野生型マウスの老化に伴う聴力変化を調べるため、聴性脳幹反応 (ABR) の経時的変化を長期 (~90 週令) にわたって調べた。また、老化促進マウス SAM (SAMP8) についても、同様に聴性脳幹反応を測定した。

(3) NO センサー法による脳内 NO 濃度測定

野生型マウスの脳ホモジナイズ液を作製し、NO 濃度の測定を行った。

4. 研究成果

(1) 小脳依存性学習（ロータロッド試験、瞬目反射条件づけ）における NO 関連試薬の影響

12 週令の若いマウス、40 週令の中年マウス、100 週令の老齢マウスにロータロッド試験を課したところ、12、40、100 週令共

に試験回数が増えるに伴って、ロッド上に滞在できる時間が長くなっていった (図 1)。試験 5 日目の滞在時間を比較してみると、週令と滞在時間には反比例していた。これは加齢による運動能力の低下によるものと思われる。また、100 週令のマウスは試験後、非常に消耗しており、NO 関連試薬の投与は大きな負担となると考えて行わないことにした。

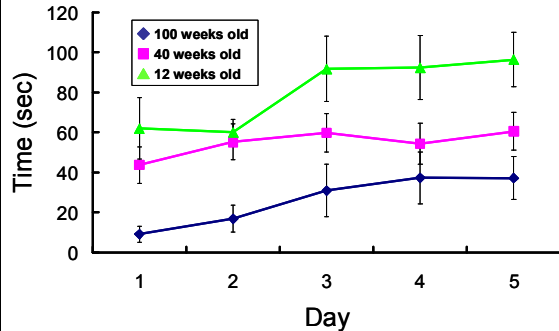


図 1. 各週令におけるロータロッド試験

12 週令のマウスに各日の試験開始前に NO 合成酵素阻害剤 L-NAME を投与すると、コントロール群に対してロッド滞在時間が短かった (学習が障害されていた、図 2)。

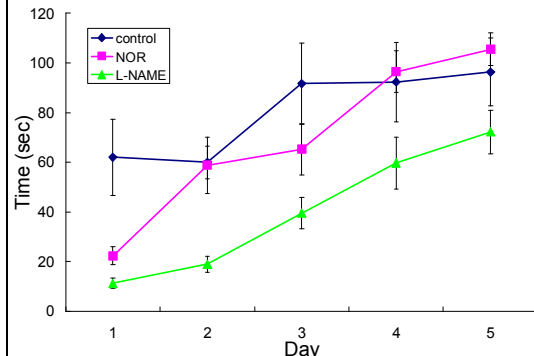


図 2. ロータロッド試験における NO 関連試薬の影響 (12 週令)

NO ドナーを投与した群では、興味深いことに学習初期 (1~3 日) にはわずかではあるが学習が障害されていた。NO ドナーを投与した場合、脳内の NO 濃度は上昇しているはずであるが、L-NAME を投与して脳内 NO 濃度が減少している場合と同様に学習が妨げられた。これらの結果は一見矛盾しているが、ロータロッド学習が成立するためには脳内 NO 濃度が一定範囲に収まっている必要があると考えたと説明がつく。さらに興味深いことに、40 週令のマウスに NOR4 を投与して学習を行うと、コントロールに比べて、学習が大きく傷害された (図 3)。12 週令のマウスの結果とあわせて考えると、過去の報告にあるようにマウス脳内の NO 濃度環境は週令を経るごとに変化

(おそらく減少)しており、それに伴って NO 標的細胞の感度も変化 (逆に増加) している可能性が示唆される。

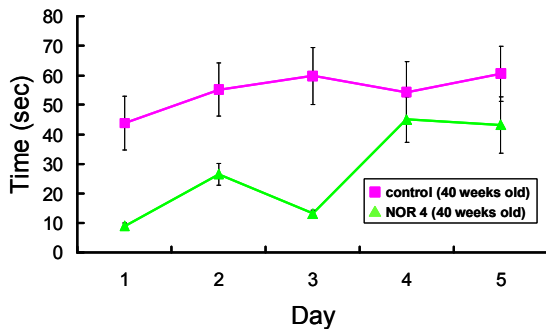


図 3. ロータロッド試験における NO 関連試薬の影響 (40 週令)

瞬目反射条件付け直前に野生型マウスに 7-NI を皮下投与して学習を施したところ、非投与群との間には大きな差は見られなかった。

(2) 野生型マウスおよび老化促進マウス (SAM) における聴性脳幹反応の測定

野生型マウスにおいて、低周波数の音刺激 (1 kHz のトーン音刺激、瞬目反射条件づけの条件刺激として用いる音刺激と同じ条件) を用いた場合には、9~60 週令でほとんど閾値 (=聴力) に差はなかった (約 50 dB、図 4)。

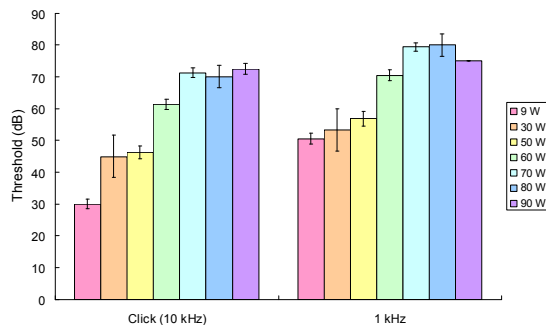


図 4. マウス聴性脳幹反応の加齢による変化

それ以上の週令では聴力は徐々に低下していた (60 週令…約 70 dB、70~90 週令…約 80 dB)。また、比較的高周波数の音刺激の場合 (10 kHz のクリック音刺激)、加齢に伴って徐々に聴力が低下していた (9 週令…約 30 dB、30~50 週令…約 45 dB、60 週令…約 60 dB、90 週令で約 70 dB)。これまで老化マウス (85~90 週令) では、瞬目反射条件づけ (音刺激として 85 dB の音刺激を使用) において重度の学習障害が見られることがわかっている。

SAMP8 (10 週令) の ABR 応答を調べたところ、野生型マウス (9 週令) との間には有意な差は見られなかった (図 5)。過去の報告では、10 週令の SAMP8 は瞬目反射学習ができないが、この障害は

聴力低下によるものではなく、老化に伴う脳機能の障害に依存するものであることが確認できた。

以上の結果より、野生型老化マウスや SAMP8 が 80~85 dB の音刺激に反応していたことから、従来報告されている野生型老化マウスや SAM の学習障害は聴力自体の低下によるものではなく、記憶に関わる脳機能の障害によるものであることがわかった。

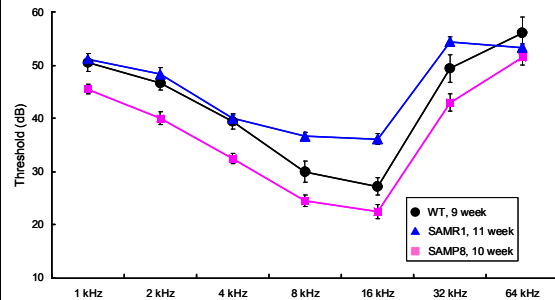


図 5. 老化促進マウス SAM の聴性脳幹反応

(3) NO センサー法による脳内 NO 濃度測定

NO センサーを生理食塩水中で安定させておき、野生型マウスの脳ホモジナイズ液を添加したところ、NO 濃度が上昇した (ピーク濃度…0.3~1.0 μM)。この結果から、NO センサー法がマウス脳内 NO 濃度測定に有用であることが示された。

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 1 件)

- ①Hitoshi Aonuma, Yoshiichiro Kitamura, Koichi Niwa, Hiroto Ogawa, Kotaro Oka, Nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate signaling in the local circuit of the cricket abdominal nervous system, *Neuroscience*, Vol. 157 (4), pp. 749-761, 2008 (査読有)。

[学会発表] (計 6 件)

- ①北村美一郎、桐野 豊、マウス瞬目反射学習における NO の役割、第 1 回 日本生物物理学会 四国支部大会、平成 19 年 6 月 16 日、香川。
- ②北村美一郎、桐野 豊、加齢によるマウス聴性脳幹反応の変化、第 45 回 日本生物物理学会年会、平成 19 年 12 月 21-23 日、横浜。
- ③北村美一郎、桐野 豊、マウス聴性脳幹反応の加齢による変化、第 128 年会 日本薬学会、平成 20 年 3 月 26-28 日、横浜。
- ④北村美一郎、桐野 豊、野生型マウスの加齢による聴性脳幹反応の変化、第 1 回 日本生物物理学会 中国四国支部大会、平成 20 年 6 月 16 日、高知。

- ⑤ 北村美一郎、桐野 豊、野生型マウス C57BL/6J における聴性脳幹反応の加齢に伴う変化、第 46 回 日本生物物理学学会年会、平成 20 年 12 月 3-5 日、福岡。
- ⑥ 北村美一郎、中山順子、桐野 豊、マウス瞬目反射条件づけにおける一酸化窒素 (NO) の役割、第 46 回 日本生物物理学学会年会、平成 21 年 10 月 30-11 月 1 日、徳島。

[図書] (計 1 件)

- ①伊藤悦朗、岡浩太郎、金澤昭良、北村美一郎、小林一也、小林 卓、定本久世、松尾亮太、松本 緑、箕田康一、身近な動物を使った実験シリーズ〈2〉プラナリア・モノアラガイ・ナメクジ・ミミズ、三共出版、2009。

[その他]

徳島文理大学 香川薬学部 生物物理学講座
ホームページ：

<http://kp.bunri-u.ac.jp/kph16/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村美一郎 (KITAMURA YOSHIICHIRO)
徳島文理大学・香川薬学部・講師
研究者番号：70348829