

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16370

研究課題名（和文）忌避学習・嫌悪記憶や認知記憶の形成におけるアセチルコリン-PAKシグナルの解明

研究課題名（英文）The clarification of acetylcholine-PAK signaling in aversive learning and cognitive memory formation

研究代表者

山橋 幸恵 (Yamahashi, Yukie)

藤田医科大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：00793481

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：脳内のアセチルコリンは学習・記憶に重要な神経伝達物質であり、認知症治療薬の標的となっている。本研究の目的は、学習・記憶を制御するアセチルコリンの神経細胞内での作用機序を解明することである。研究成果は以下の3点にまとめられる。1、側坐核内のD2R-MSNにおけるPAKキナーゼの活性化がシナプス可塑性を促進し、忌避学習を亢進する。2、ドネペジルにより、D2R-MSN内のPAKが活性化し、忌避学習が亢進する。3、認知記憶を担う海馬内のCA1領域においてもPAKはドネペジルにより活性化する。以上の結果より、アセチルコリン-PAK経路がシナプス可塑性を介して忌避学習や認知記憶を制御することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、学習・記憶を制御するアセチルコリンの神経細胞内におけるシグナル伝達機構を明らかにし、認知症治療薬ドネペジルの細胞内における作用機序の解明にも繋げることができた。更に、アセチルコリンがシナプス形態可塑性の制御にも関わるという新たな機能を示唆した。忌避学習や認知記憶が、アルツハイマー型認知症治療薬のスクリーニングの評価に使われている。このことから、本研究で同定したアセチルコリンのシグナル伝達経路の構成分子が治療標的に繋がることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Acetylcholine (ACh) is a neuromodulator critical for learning and memory and has been one of the targets for treating Alzheimer's disease. The aim of this study is to clarify the intracellular ACh signaling that regulates learning and memory. We have found the followings: 1) PAK facilitates structural synaptic plasticity in accumbal D2-type medium spiny neurons (D2R-MSNs), which resulted in enhanced aversive learning, 2) donepezil enhances aversive learning by activating PAK in D2R-MSNs, and 3) donepezil activates PAK in CA1 region of hippocampus, the region responsible for cognitive memory. The findings suggest that ACh-PAK pathway regulates aversive learning and cognitive memory through structural synaptic plasticity.

研究分野：神経薬理学、神経化学、生化学、分子生物学

キーワード：アセチルコリン PAKキナーゼ ドネペジル 忌避学習 認知機能 シナプス 側坐核 海馬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳内のアセチルコリンは忌避学習・嫌悪記憶や認知機能に重要な役割を果たしており、アルツハイマー型認知症と密接に関わることから、治療薬開発の標的となっている。しかし、神経細胞内におけるアセチルコリンの作用機序は今もよく理解されていない。研究代表者は既に、アセチルコリンが PKC キナーゼを介して PAK キナーゼを活性化することを見出している。更に、アセチルコリン-Rac-PAK シグナルがシナプスの形態可塑性を制御することを示唆する結果も得ている。

2. 研究の目的

本研究では、PAK 基質の包括的探索を行うことで、アセチルコリンの作用機序を解明すると共に、忌避学習・嫌悪記憶や認知記憶の形成におけるアセチルコリン-Rac-PAK シグナルの役割を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

神経細胞内におけるアセチルコリンの作用機序の解明

(ア)アセチルコリン-PKC 経路の下流における PAK 基質の包括的探索：

リン酸化プロテオミクス法により、PAK 基質候補を包括的に探索した。具体的には、1) 線条体・側坐核スライスを PKC 活性化剤 PEP-005 で刺激し、2) リン酸化蛋白と特異的に結合する 14-3-3 蛋白質を用いて、線条体・側坐核スライスの溶解物中のリン酸化蛋白を濃縮し、3) 質量分析により PAK 基質候補を同定した。

(イ)アセチルコリン-PAK シグナル伝達の解析：

側坐核内の D2R-MSN 神経細胞が忌避学習・嫌悪記憶を担い、海馬内の CA1 領域が認知記憶を担うことが知られている。そこで、コリンエステラーゼ阻害剤ドネペジルのマウスへの投与により、これらの領域において PAK が活性化するかを検証した。ここでは、組織免疫染色法により PAK の自己リン酸化を指標として PAK の活性化をモニターした。

忌避学習・嫌悪記憶や認知記憶におけるアセチルコリン-Rac-PAK シグナルの役割の解明

(ア) 個体内における樹状突起スパインの形態解析：

PAK 変異体(不活性型及び活性型)を Cre 依存的に発現する Flex-AAV を、D2R-MSN 特異的に Cre を発現する A2A-Cre マウスの側坐核に導入した。3週間後、PAK 変異体の発現によるスパインの形態変化を観察した。

(イ) マウスの情動学習の解析：

D2R-MSN 内での PAK の活性化が忌避学習を亢進するのかが検証するために、活性型 PAK 変異体を Cre 依存的に発現する Flex-AAV を A2A-Cre マウスの側坐核に導入した。3週間後、受動回避試験を行なった。ここでは、マウスの好む暗室で嫌悪刺激(電気ショック)を与えた翌日、マウスを明室に入れて明室に留まる時間を測定した。この系を用いて、ドネペジルが D2R-MSN 内の PAK を介して忌避学習を亢進するのかも検証した。

(ウ) マウスの認知記憶の解析：

認知記憶におけるアセチルコリン-PAK シグナルの役割を検証するために、ドネペジルまたは PAK 阻害剤を野生型マウスに投与し、新奇物体認識試験を行った。この試験では、2つの物体を装置内に置き、マウスに探索させて物体の位置を認識させる。その後、片方の物体を新しい物に置き換えた時の馴染物体と新奇物体との探索時間の差を測定した。

4. 研究成果

神経細胞内におけるアセチルコリンの作用機序の解明

(ア)アセチルコリン下流における PAK 基質の包括的探索：

リン酸化プロテオミクス法により、200種類以上の PAK 基質候補を同定した。更に、得られた PAK 基質候補をパスウェイ解析することにより、アセチルコリン-PAK シグナルが Rho ファミリー関連シグナル、シナプス長期増強(LTP)関連シグナル、Ras-MAPK 関連シグナルなどのシナプス可塑性を代表するシグナル伝達経路と関連していることを明らかにした。PAK 基質候補の中、側坐核で最も強く発現している Rac 不活性化因子 BCR に注目し、アセチルコリン-PKC-PAK 経路との関連性を調べた。そのために、線条体スライスをアセチルコリン作動薬で刺激し、14-3-3 プルダウンアッセイを

行なった。その結果、BCR の 14-3-3 との結合量は増加し、PKC 及び PAK 阻害剤の前処理では抑えられた。このことから、アセチルコリン-PKC 経路の下流で PAK が BCR をリン酸化することが示唆された。また、BCR はもともとスパイン形成及び成熟に関与する (Oh *et al.*, J Neurosci, 2010) ことが知られていることから、アセチルコリン-PKC-PAK 経路とスパインの形成及び成熟との関連性も視された。

(イ) アセチルコリン-PAK シグナル伝達解析：

ドネペジルが D2R-MSN 神経細胞においてムスカリン受容体 M1R を介して PAK を活性化することを組織免疫染色により明らかにした。また、担う海馬内の CA1 領域においても PAK を活性化することを組織免疫染色により明らかにした。

忌避学習・嫌悪記憶や認知記憶におけるアセチルコリン-Rac-PAK シグナルの役割の解明

(ア) 個体内における樹状突起スパインの形態解析：

PAK 変異体(不活性型及び活性型)を Cre 依存的に発現する Flex-AAV を、D2R-MSN 特異的に Cre を発現する A2A-Cre マウスの側坐核に導入した。3 週間後、PAK 変異体の発現によるスパインの形態変化を観察し、個体内の D2R-MSN 神経細胞における PAK の活性化がスパインの形成及び成熟を促進することを明らかにした。

(イ) マウスの情動学習の解析：

A2A-Cre マウスを用いて活性型 PAK 変異体を D2R-MSN 特異的に発現させて、D2R-MSN 内の PAK のみを活性化し、受動回避試験を行った。その結果、D2R-MSN 内での活性型 PAK 変異体の発現によりマウスの明室での滞在時間が延長した。このことにより、D2R-MSN 内の PAK が忌避学習を亢進することが明らかになった。また、ドネペジルを用いた受動回避試験により、ドネペジルが D2R-MSN 内の PAK を介して忌避学習を亢進することも分かった。

(ウ) マウスの認知記憶の解析：

野生型マウスに PAK 阻害剤を投与し、新奇物体認識試験を行った。その結果、新奇物体の探索時間が減少したことにより、認知記憶が PAK に依存することが分かった。しかし、ドネペジルを投与した場合、新奇物体の探索時間に影響がなかった。この原因として、ドネペジルによるアセチルコリン量の増加が認知記憶に重要なムスカリン受容体 M1R のみならず、他の全てのアセチルコリン受容体にも作用するため、ドネペジルの M1R への作用が弱かったことが考えられる。実際、野生型ラットへの M1R 特異的作動薬の投与が認知記憶を亢進するという報告 (Brown *et al.*, Cell, 2021) が上記の結果を支持する。

以上の研究結果より、アセチルコリンによる PAK の活性化が D2R-MSN 神経細胞のシナプス可塑性を促進することで、忌避学習を亢進することが示唆された。また、アセチルコリンが海馬において PAK を活性化することによって認知記憶を制御することも示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Faruk Md. Omar, Tsuboi Daisuke, Yamahashi Yukie, Funahashi Yasuhiro, Lin You Hsin, Ahammad Rijwan Uddin, Hossen Emran, Amano Mutsuki, Nishioka Tomoki, Tzingounis Anastasios V, Yamada Kiyofumi, Nagai Taku, Kaibuchi Kozo	4. 巻 160
2. 論文標題 Muscarinic signaling regulates voltage gated potassium channel KCNQ2 phosphorylation in the nucleus accumbens via protein kinase C for aversive learning	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 325 ~ 341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15555	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ahammad Rijwan Uddin, Nishioka Tomoki, Yoshimoto Junichiro, Kannon Takayuki, Amano Mutsuki, Funahashi Yasuhiro, Tsuboi Daisuke, Faruk Md. Omar, Yamahashi Yukie, Yamada Kiyofumi, Nagai Taku, Kaibuchi Kozo	4. 巻 11
2. 論文標題 KANPHOS: A Database of Kinase-Associated Neural Protein Phosphorylation in the Brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 47 ~ 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11010047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Lin You-Hsin, Yamahashi Yukie, Kuroda Keisuke, Faruk Md. Omar, Zhang Xinjian, Yamada Kiyofumi, Yamanaka Akihiro, Nagai Taku, Kaibuchi Kozo	4. 巻 143
2. 論文標題 Accumbal D2R-medium spiny neurons regulate aversive behaviors through PKA-Rap1 pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 104935 ~ 104935
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2020.104935	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Amano Mutsuki, Nishioka Tomoki, Tsuboi Daisuke, Kuroda Keisuke, Funahashi Yasuhiro, Yamahashi Yukie, Kaibuchi Kozo	4. 巻 165
2. 論文標題 Comprehensive analysis of kinase-oriented phospho-signalling pathways	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 301 ~ 307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvy115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 山橋 幸恵、張 心健、永井 拓、坪井 大輔、貝淵 弘三
2. 発表標題 忌避学習に至るアセチルコリンシグナル伝達の解明
3. 学会等名 第53回藤田学園医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yukie Yamahashi, You-Hsin Lin, Sho Iwanaga, Kawashima, Yuya Tokumoto, Omar Faruk, Xijian Zhang, Taku Nagai, Daisuke Tsuboi, Kozo Kaibuchi
2. 発表標題 Acetylcholine signaling in D2R-MSN neurons and its stimulation of aversive learning
3. 学会等名 第64回日本神経化学会大会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山橋 幸恵
2. 発表標題 忌避学習に至るアセチルコリンシグナル伝達の解明
3. 学会等名 2021年度若手支援技術講習会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yukie Yamahashi, You-Hsin Lin, Sho Iwanaga, Kawashima, Yuya Tokumoto, Omar Faruk, Xijian Zhang, Taku Nagai, Daisuke Tsuboi, Kozo Kaibuchi
2. 発表標題 Acetylcholine signaling in D2R-MSN neurons and its stimulation of aversive learning
3. 学会等名 総合医科学研究所・研究成果発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山橋幸恵、岩永渉、徳元友哉、林祐新、張心健、永井拓、坪井大輔、貝淵弘三
2. 発表標題 忌避行動・学習に至る側坐核内のアセチルコリンの作用機序
3. 学会等名 Neuro2019 第42回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林祐新、永井拓、山橋幸恵、黒田啓介、貝淵弘三
2. 発表標題 嫌悪刺激によるドーパミン放出の抑制が側坐核D2R-中型有棘神経細胞内のPKA-Rap1経路を活性化する
3. 学会等名 Neuro2019 第42回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山橋幸恵、岩永渉、徳元友哉、林祐新、張心健、永井拓、坪井大輔、貝淵弘三
2. 発表標題 忌避行動・学習に至る側坐核内のアセチルコリンの作用機序
3. 学会等名 第34回 日本大脳基底核研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林祐新、永井拓、山橋幸恵、黒田啓介、貝淵弘三
2. 発表標題 側坐核D2R-中型有棘神経細胞内におけるアデノシン-A2AR-PKA-Rap1経路が忌避行動を制御する
3. 学会等名 第9回 名古屋大学医学系研究科・生理研究所合同シンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------