

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500284

研究課題名（和文） Gタンパク共役型受容体クロストークによるシナプス可塑性と学習の制御

研究課題名（英文） Regulation of synaptic plasticity and learning by cross-talk of G protein-coupled receptors

研究代表者

田端 俊英 (TABATA TOSHIHIDE)

富山大学・大学院理工学研究部（工学）・准教授

研究者番号：80303270

研究成果の概要（和文）：培養マウス小脳プルキンエ細胞を用いた電気生理学的解析により、リガンドを受容したアデノシン1型受容体 A1R は  $G_{i/o}$  タンパク質非依存的に1型代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 のグルタミン酸感受性を低下させ、mGluR1 が誘導する小脳長期抑圧を阻害することが示唆された。マウス個体を用いた行動学的解析においては、B型γアミノ酪酸受容体 GABA<sub>B</sub>R を活性化させると、小脳長期抑圧依存的運動学習が促進された。以上の結果は、脳髄液中の神経変調因子を受容する A1R や GABA<sub>B</sub>R が mGluR1 を機能修飾してシナプス可塑性と学習を制御する可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：Our electrophysiological analyses in cultured mouse cerebellar Purkinje cells suggest that ligand-activated adenosine A1 receptor (A1R) impedes cerebellar long-term depression (LTD) by decreasing the glutamate-sensitivity of type-1 metabotropic glutamate receptor (mGluR1), a key trigger of induction of cerebellar LTD. Our in-vivo behavioral analyses showed that activation of B-type gamma-amino butyric acid receptor (GABA<sub>B</sub>R) facilitated cerebellar LTD-dependent motor learning. These findings suggest that in response to neuromodulators in the cerebrospinal fluid, A1R and GABA<sub>B</sub>R modulate mGluR1 and thereby regulate induction of synaptic plasticity and learning.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経科学一般

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般、神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：神経科学、生理学、脳・神経、シグナル伝達、シナプス可塑性、学習、記憶、運動

## 1. 研究開始当初の背景

神経系において、特定パターンのニューロン活動がシナプスの伝達強度を長期にわたって変化させる。この現象はシナプス可塑性

と呼ばれ、記憶・学習を支える生物学的メカニズムと広く考えられている。ところで学習成績は覚醒レベル、気分、興味、恐怖などの心理ファクターに大きく左右される。一つの

原因は心理ファクターがシナプス可塑性の起こり易さ(誘導効率)を変化させるためと考えられている。ところが従来、その具体的なメカニズムは殆ど分かっていなかった。

申請者は最近、小脳長期抑圧(小脳LTD、運動学習を支えるシナプス可塑性、平行線維→プルキンエ細胞シナプスの伝達効率が数時間以上にわたって減弱する現象)の分子機構を追究する中で、学習成績が変化するメカニズムを解明するための有力な手がかりを掴んだ。小脳LTDの誘導を主導するのはプルキンエ細胞に発現する1型代謝型グルタミン受容体(mGluR1、興奮性伝達物質グルタミン酸に対するGタンパク共役型受容体GPCR)である。我々は、プルキンエ細胞においてmGluR1が異種のGPCRとヘテロ複合体を形成し、Gタンパク依存のおよび非依存のシグナル・クロストークを起こすことを発見した。しかも、クロストークを起こすGPCR(B型γアミノ酪酸受容体GABA<sub>B</sub>Rおよび1型アデノシン受容体A1R)のリガンド(GABAおよびアデノシン)は脳髄液に蓄積して覚醒レベル、気分、集中力など心理的基調を決定する神経変調因子として働くものである。したがって、これらリガンドがGPCRのクロストークを通じてどのように小脳LTDや小脳LTD依存的学习に影響を及ぼすかが分れば、心理ファクターによる学習制御のしくみの解明に繋がることが期待された。

## 2. 研究の目的

小脳プルキンエ細胞(*in vitro*)→動物個体(*in vivo*)の各レベルにおいて電気生理学・行動学的実験を展開し、GPCRのクロストークが小脳LTDおよび小脳LTD依存の運動学習に与える影響を明らかにするとともに、GPCRのクロストークが小脳LTDに作用する分子・細胞メカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) GPCRのクロストークが小脳LTDに与える影響の解析: 標本として出生直前のマウス胎児から単離した小脳プルキンエ細胞の培養系を用いた。小脳LTDの細胞レベルの素過程は、小脳プルキンエ細胞においてグルタミン酸を受容したmGluR1が細胞内シグナルを媒介し、シナプス後膜に発現するAMPA型グルタミン酸受容体(AMPA)の細胞内回収を促進し、グルタミン酸作動性シナプス後電位が持続的に減弱することである。培養プルキンエ細胞においては、イオン泳動によるグルタミン酸の樹状突起への局所投与(平行線維-プルキンエ細胞シナプス入力に代用、AMPA介在性のシナプス後電流を惹起するとともにmGluR1を活性化する)と細胞体への脱分極

パルス(登上線維-プルキンエ細胞シナプス入力に代用、パッチクランプ法による)を組み合わせた誘導刺激によって上記素過程を引き起こすことができる(*in-vitro* LTD、グルタミン酸によって誘発されたAMPA介在性シナプス後電流の持続的減弱として観察される)。本研究では、培養プルキンエ細胞にさまざまな薬理学的操作を加えながら*in-vitro* LTDを測定し、その深度を比較することで、GPCRのクロストークが小脳LTDに与える影響を推定した。

(2) GPCRのクロストークが運動学習に与える影響の解析: 標本として成熟マウス個体を用いた。動く物体を眼球が追従する反射(視機性動眼反射、OKR)は小脳依存の反射であり、動物に長時間にわたり動く物体を呈示した際に追従性が向上する現象(OKR順応)は小脳LTDに依存した運動学習の一種であることが知られている。我々はマウスの小脳片葉にGABA<sub>B</sub>Rアゴニスト等あるいはコントロール生理食塩水を注入して、GABA<sub>B</sub>RによるmGluR1シグナル増強を誘発させた場合とそうでない場合とで、OKR順応の時間推移と度合いを比較した。同様の比較を、やはり小脳LTD依存のことが知られている回転棒タスク(回転する棒に乗っていられる時間を測定する、この時間はトレーニングによって延長する)についても行った。

## 4. 研究成果

### (1) GPCRのクロストークと小脳LTD

正常食塩水で灌流している条件では、誘導刺激後グルタミン酸誘発電流の振幅が約30%減弱し、この減弱は1時間の観察期間を通して持続した(*in-vitro* LTD)。これに対して、細胞外液に数十~数百nMレベルのA1R選択的アゴニストR-PIAもしくはCCPAを添加すると、*in-vitro* LTDが全く誘導されなくなった。これらの結果は、プルキンエ細胞に発現するA1Rは、リガンドを受容すると小脳LTDの誘導を阻害することを示唆している。

内在性のA1Rアゴニストであるアデノシンも脳髄液中に蓄積しうることが示唆されている数十~数百nMの濃度でR-PIAおよびCCPAと同様の*in-vitro* LTD阻害効果を発揮した。この結果は、脳髄液に含まれるアデノシンによって生理条件下で小脳LTDの阻害が引き起こされる可能性を示唆している。

R-PIAは誘導刺激の期間中のみ細胞外液中に存在していれば、誘導刺激前後を通して存在していた場合と同様に、*in-vitro* LTDを阻害した。また誘導刺激後だけにR-PIAを投与した場合は、*in-vitro* LTDの阻害が観られなかった。これらの結果は、リガンドを受容したA1Rが*in-vitro* LTDの維持プロセスではなく*in-vitro* LTDの誘導プロセスに作用して

阻害効果を発揮していることを示唆している。

in-vitro LTDを誘導する十分要素はi. mGluR1のプルキンエ細胞内シグナリングとii. 電位依存性カルシウム・チャンネルを通じたカルシウム・イオンの細胞内流入であることが知られている。我々は、in-vitro LTDを阻害する数十～数百nMのR-PIAが電位依存性チャンネルを介したカルシウム・イオン流入に殆ど影響を与えないことを明らかにした。この結果は、A1RがmGluR1のプルキンエ細胞内シグナリングを減弱させることでglu-LTD阻害効果を発揮していることを示唆している。

R-PIAは不飽和濃度のDHPG (mGluR1アゴニスト) によって誘発されたmGluR1介在性陽イオン電流を減弱させたが、飽和濃度のDHPGによる陽イオン電流は減弱させなかった。また、TPA (PKC活性化剤) によってmGluR1細胞内シグナル・カスケードの下流を強制的に活性化してin-vitro LTDを誘導した場合、R-PIAはこのin-vitro LTDを阻害しなかった。これらの結果は、リガンドを受容したA1RがmGluR1自体もしくはシグナル・カスケードの上流に作用して、mGluR1のグルタミン酸感受性を低下させることによって、in-vitro LTDを阻害していることを示唆している。

以上のようにリガンドを受容したA1Rはglu-LTDを阻害することが示唆されたが、同じクラスのGタンパク質 ( $G_{i/o}$ タンパク質) に共役するGABAbRはリガンドを受容するとin-vitro LTDを促進した。またA1Rアゴニストによるin-vitro LTD阻害効果は、百日咳毒素 ( $G_{i/o}$ タンパク質阻害剤) で事前処理した培養プルキンエ細胞においては観察されなかった。さらにin-vitro LTDを阻害する数十～数百nMのA1RアゴニストはmGluR1介在性陽イオン電流を減弱させたが、逆に数十 $\mu$ MのA1Rアゴニストは陽イオン電流を増強した。これらの結果は、A1Rが $G_{i/o}$ タンパク質に依存しない経路を通じてmGluR1のシグナリングを減弱させることでin-vitro LTDを阻害していることを示唆している。

以上の結果は、GPCRがシグナル・カスケードの上流で機能的に相互作用して、シナプス可塑性の誘導効率を調整していることを示唆している。

#### (2) GPCRのクロストークと運動学習

マウス小脳に数nM～数 $\mu$ Mのバクロフェン (GABA<sub>B</sub>Rアゴニスト) を投与すると、回転棒タスクやOKR順応の成績が向上した。

とくにOKR順応に関しては、異なる実験者チーム (研究代表者の研究室に配属された大学学部学生および大学院生) に独立して測定を実施させ、上記知見が高い確度で再現されるとともに、baclofenの時間作用の詳細が明らかになった。すなわち、トレーニング初日

のOKRゲイン増加の時間的推移にはバクロフェン投与群と統御群との間に差異が認められなかったが、トレーニング2日目においてバクロフェン投与群は初日に達成した学習成績を保持していたのに対し、統御群は保持していなかった。同じ手続きにより局所麻酔剤を注入したときはトレーニング初日のOKRゲイン増加が見られなかったことから、小脳片葉のOKR順応に対する関与が確認された。これらの結果は、GABAbRによるmGluR1シグナリングの増強がOKRに関する長期記憶の固定プロセスを促進する可能性を示唆している。また我々はin vivoの小脳片葉で誘発された小脳長期抑圧を、immunoblotによりシナプス画分のAMPA GluR2サブユニットの減少として捉える解析方法を確立した。現在、この方法を用い、GABAbRアゴニストがin vivoで小脳LTDを促進するか否かを精査している。

なお本実験を実施するために、工場のラインを流れる製品を高速に画像解析して品質を検査するマシンビジョン技術を応用した高精度かつ操作容易な小動物用眼球運動測定装置を開発した。

#### 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6件)

- ① Tabata T & Kano M, GABA<sub>B</sub> receptor-mediated modulation of metabotropic glutamate signaling and synaptic plasticity in central neurons. *Advances in Pharmacology*, 査読有, Vol.58, No.1, 2010, pp.149-73
- ② Yamada A, Uesaka N, Hayano Y, Tabata T, Kano M, Yamamoto N, Role of pre- and postsynaptic activity in thalamocortical axon branching, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 査読有, Vol.107, No.16, 2010, pp.7562-7567
- ③ Fujita Y, Shimomura T, Hosoguchi M, Kano M, Fukurotani K, Tabata T, A new multiple-drug applicator with minimal drug cross-talk, leakage, and consumption, *Neuroscience Research*, 査読有, Vol.66, No.4, 2010, pp.412-414
- ④ 田端俊英, 狩野方伸, 小脳プルキンエ細胞の1型代謝型グルタミン酸受容体、生体の科学、査読無、Vol.60, No.5, 2010, pp.370-371
- ⑤ Kano M, Hashimoto K, Tabata T,

- Type-1 metabotropic glutamate receptor in cerebellar Purkinje cells: a key molecule responsible for long-term depression, endocannabinoid signalling and synapse elimination, Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 査読有, Vol. 363 No. 1500, 2008, pp. 2173-2186
- ⑥ 田端俊英、狩野方伸、長期抑圧、生体の科学、査読無、Vol. 59, No. 5, 2008, 432-433

〔学会発表〕(計12件)

- ① 白井義啓、内山周、田端俊英、マシンビジョン技術を応用した小動物眼球運動学習測定システム、富山大学コラボフェスタ、2010年9月3日、富山
- ② Shirai Y, Sasajima T, Tachikawa K, Takegoshi M, Fukurotani K, Tabata T. Machine vision-based system for measuring optokinetic reflex (OKR) in mice. 日本生理学会大会、2010年5月21日、盛岡
- ③ Tabata T. Interaction between G protein-coupled receptors (GPCRs) regulates synaptic plasticity. 日本生物物理学会年会(招待シンポジウム)、2009年11月1日、徳島
- ④ Kamikubo Y, Shimomura T, Fujita Y, Tabata T, Kashiyama T, Fukurotani K, Sakurai T, Kano M. Adenosine A1 receptor regulates mGluR1 signaling and LTD in cerebellar Purkinje cells. Society for Neuroscience Annual Meeting. 2009年10月19日、米国シカゴ
- ⑤ 上窪祐二、藤田洋介、下村岳司、田端俊英、櫻井隆、狩野方伸、GPCR 相互作用による小脳長期抑圧の促進/抑制、薬理学会関東部会、2009年10月10日、東京
- ⑥ Shimomura T, Fujita Y, Tabata T, Fukurotani K. “Flute” applicator: a new-type multiple-drug applicator with minimal drug contamination and consumption. 日本神経科学大会、2009年9月17日名古屋
- ⑦ Fujita Y, Shimomura T, Kamikubo Y, Tabata T, Fukurotani K, Sakurai T, Kano M. A1 adenosine receptor as a regulator of the long-term depression of the glutamate-responsiveness of cerebellar Purkinje cells. 日本神経科学大会、2009年9月16日、名古屋
- ⑧ Kamikubo Y, Shimomura T, Fujita Y, Tabata T, Sakurai T, Fukurotani K, Kano

M. Bi-directional regulation of cerebellar synaptic plasticity through inter-GPCR interplay. International Congress of Physiological Sciences. 2009年7月27日、京都

- ⑨ Shimomura T, Fujita Y, Kamikubo Y, Tabata T, Fukurotani K, Sakurai T, Kano M. Adenosine A1 receptor-mediated LTD attenuation in cerebellar Purkinje cells. 日本生理学会会若手の会、2009年7月10日、東京
- ⑩ 上窪裕二、田端俊英、藤田洋介、下村岳司、藤田洋介、櫻井隆、狩野方伸、GPCR シグナル・クロストークによる mGluR1 シグナルと小脳 LTD の制御、日本薬理学会年会、2009年3月16日、横浜
- ⑪ 上窪裕二、下村岳司、藤田洋介、田端俊英、狩野方伸、GPCR シグナル・クロストークによる小脳 LTD の制御、生理学研究所研究会シナプス研究会、2008年12月5日、愛知県岡崎市
- ⑫ 原田武志、平井良枝、山崎美和子、橋本浩一、中尾晴美、田端俊英、渡辺雅彦、狩野方伸、饗場篤、ERK は発達期小脳におけるシナプス除去に必要である、日本神経科学大会、2008年7月10日、東京

〔図書〕(計2件)

- ① Tabata T & Kano M. Springer Publishing (New York), Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology, 3<sup>rd</sup> Edition, 2009, pp. 64-86
- ② 田端俊英、狩野方伸、東京大学出版会分子・細胞・シナプスからみる脳(シリーズ脳科学第5巻)、2008、pp. 230-254

〔産業財産権〕

○出願状況(計3件)

- ① 名称：視機性動眼反射測定装置および視機性動眼反射測定方法  
発明者：白井義啓、田端俊英  
権利者：富山大学  
種類：特許  
番号：特願 2009-292739  
出願年月日：平成21年12月24日  
国内外の別：国内
- ② 名称：保定装置  
発明者：白井義啓、田端俊英

権利者：富山大学  
種類：特許  
番号：特願 2009-292725  
出願年月日：平成 21 年 1 2 月 2 4 日  
国内外の別：国内

- ③ 名称：高精度マルチ・ドラッグ・アプリケーション  
ケーター  
発明者：田端俊英、藤田洋介、下村岳志  
権利者：田端俊英  
種類：特許  
番号：特願 2009-010628  
出願年月日：平成 21 年 1 月 21 日  
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

[http://web.me.com/toshihidetabata/Lab\\_NIT/Tabatas\\_group.html](http://web.me.com/toshihidetabata/Lab_NIT/Tabatas_group.html)

## 6. 研究組織

研究代表者

田端 俊英 (TABATA TOSHIHIDE)

富山大学・大学院理工学研究部 (工学)・

准教授

研究者番号：80303270