

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590232

研究課題名（和文） 海馬学習依存的な AMPA 受容体シナプス移行におけるアセチルコリンの役割

研究課題名（英文） **Acetylcholine mediates learning-dependent AMPA receptor delivery into the CA3-CA1 synapses**

研究代表者

美津島 大 (MITSUSHIMA DAI)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：70264603

研究成果の概要（和文）：

ラットを用い受動的回避学習(IA task)を行い、海馬における AMPA 受容体のシナプス移行を解析した。パッチクランプ法により AMPA 受容体のシナプス移行を検討したところ、学習依存的なシナプス移行が確認された。次に、シナプス移行を阻止するペプチド(MPR-DD)を、両側の CA1 ニューロンに広範発現させると、学習成績が強く低下し、文脈学習が損なわれた。In vivo ACh 分泌動態をみると、学習後に CA1 領域でのアセチルコリン分泌量が上昇した。スコポラミンは学習の成立を阻止し、AMPA 受容体のシナプス移行を阻止した。以上より、学習依存的な海馬 ACh 分泌が、CA1 錐体細胞における AMPA 受容体のシナプス移行に必要であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

By combining *in vivo* gene delivery with *in vitro* patch-clamp recordings, we found that hippocampal-dependent inhibitory avoidance (IA) learning drives recombinant GluR1, an AMPA receptor subunit, into synapses formed between CA3 and CA1 pyramidal neurons. Bilateral expression of delivery blocker further revealed that contextual learning requires AMPA receptor delivery in CA1 synapses. Pretreatment of scopolamine, not only impaired the IA learning, but also blocked the AMPA receptor delivery. In paired-recording study, scopolamine pretreatment successfully blocked the effect of mutated fragment of GluR1 cytoplasmic tail (GFP-MPR-DD), a construct inhibits learning-dependent synaptic delivery of AMPA receptors. Conversely, expression of control fragment (GFP-MPR-AA) did not affect the learning-dependent delivery. Further, extracellular acetylcholine level at CA1 region significantly increased during and after IA learning for 60 min. Control animals (such as naive, shock only, or walk through rats) did not show the increase. These results suggest that cholinergic activation is required for learning-dependent AMPA receptor delivery into the CA3-CA1 synapses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：海馬、アセチルコリン、学習・記憶、AMPA 受容体、シナプス移行

## 1. 研究開始当初の背景

ストレス負荷や学習タスクを課すと海馬体内アセチルコリン(ACh)分泌が急性的に上昇するが(Mitsushima et al, 2003, 2008)、このACh分泌反応はエピソード記憶の固定化や情動反応に必要不可欠であることが知られている(Gold, 2004)。海馬体内ACh分泌はネットワークレベルでは海馬に $\theta$ 波を発生させ(Lee et al, 1994)、細胞レベルでは、海馬新生ニューロン数を増加させ(Tozuka et al, 2005)、CA1錐体細胞におけるシナプス可塑性を高めるが(Fernández de Sevilla et al, 2008; Shinoe et al, 2005)、ACh分泌が学習・記憶の分子メカニズムにどのような影響を持つのか未解明である。特定のシナプスを連続刺激するとシナプス伝達効率が長期にわたり増強し(LTP)、この現象は学習・記憶の細胞レベルのメカニズムであると考えられている。Malinowらはグルタミン酸の受容体であるAMPA受容体に着目し、Sindbis virusを用いて*in vitro*の培養海馬スライスに組換えAMPA受容体を発現させ、LTP誘導時にAMPA受容体の一つであるGluR1がシナプスに移行することを発見した(Shi et al, 2001)。また、高橋らはラットバレル皮質において数種類存在するAMPA受容体のうち、GluR1のシナプス移行が経験依存的に起こることを*in vivo*で初めて見いだした(Takahashi et al, 2003)。しかし、何がどの様にAMPA受容体のシナプス移行を制御しているのか、統合的な*in vivo*メカニズムを解明する必要があった。

## 2. 研究の目的

我々は、過去に体験した重大なストレス事象に関し、いつでも何が起こったかを容易に想起することができる。ストレス曝露は急性的に海馬機能を高め、エピソード記憶の固定化を促進するが、動物実験ではcontextual fear learningやinhibitory avoidance (IA) taskを用いて学習レベルを評価することができる。本研究ではIA taskを用いた*in vivo*海馬依存性学習の、細胞レベル・分子レベルに至る統合的なメカニズム解明を目指す。Malinowらは、LTPの発生メカニズムとしてAMPA受容体の一つであるGluR1がシナプスに移行することを発見したが、何がどの様にAMPA受容体のシナプス移行を制御するのか、統合的な*in vivo*メカニズムを解明する必要がある。そこで我々は海馬体内ACh分泌反応に着目し、学習依存的なACh分泌反応が海馬錐体細胞におけるAMPA受容体のシナプス移行を促しているのではないかと仮説を立てた。本研究では、学習課題実験、*in vivo* microdialysis法、recombinant Herpes virus injection、パッチクラン

プ法などを組み合わせ、個体レベルにおける海馬学習依存的なAMPA受容体のシナプス移行と、海馬体内ACh分泌の役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

実験には4-5週齢の雄性SDラットを用い、学習課題にはinhibitory avoidance (IA) taskを使う。まず、明るい部屋にラットを入れ、暗い部屋に自発的に移動した後、速やかにドアを閉め、電気ショック(1.6mA, 2秒)を負荷する。30分後に明るい部屋にラットを再び入れ、明るい部屋に留まる時間を計測し、文脈学習の成績として評価した。

パッチクランプ法ではMalinowらが開発した「電気生理学的標識法」を用いて組換えAMPA受容体のシナプスへの挿入を検討する。生体内のAMPA受容体は、膜電位が負のときも正のときもイオンがイオンチャネルを通過できる。従っていずれの場合もシナプス前神経の刺激に対するevoked EPSCが記録されるが、組換え受容体は膜電位が負の場合のみイオンがイオンチャネルを通過できる。これを内向き整流という。もしこの内向き整流を示す組換え受容体がシナプスに挿入された場合、挿入されていないシナプスに比べてより内向きの整流を示すようになる。この方法を用い、まずIA task依存性の海馬CA3-CA1シナプスにおけるAMPA受容体シナプス移行を確認する。次にIA taskの20分前にscopolamineまたはsalineを投与して学習の阻止を行い、IA task成績確認後、AMPA受容体のシナプス移行に及ぼす影響を検討する。さらに、AChの作用が海馬特異的であることを示すため、IA taskを行わないラットから急性スライスを作成し、*in vitro*で50 $\mu$ MのACh agonist (CCh) をbath treatmentし、AMPA受容体シナプス移行についても解析する。scopolamine存在下でも実験を行い、CChの作用を阻止できるか検討する。

内在性GluR1のシナプス移行を阻止するため、海馬CA1ニューロンにdelivery blockerを発現させる(GluR1-c-tail or MPR-DD)。まず、ダブルパッチクランプ法で、GluR1-c-tailやMPR-DDが学習依存的なAMPA受容体のシナプス移行を阻止できるか確認し、次にGluR1-c-tailやMPR-DDを両側のCA1ニューロン群に強制発現させ、学習機能を低下させるかどうかを確認する。強制発現細胞数と学習成績の相関関係について、組織学的に解析を進めるため、MAP2やNeuNなどneuron markerとの免疫組織染色も進め、DAPIによるcounter stainも行う。また、痛みに対する反応の低下、自発行動量の増加、情動反応の低下が学習機能の低下として捉えられている可能性は否定できない。そこで、背側海馬のCA1領域に

GluR1-c-tailやMPR-DDを強制発現させた動物で、shock test、spontaneous locomotor activity、Y-maze testを行い、AMPA受容体のシナプス移行阻止がこれらの機能にどのような影響を及ぼすか検討する。コントロールとしてはGFPやMPR-AAを発現させ、結果を比較検討する。

遺伝子導入による副作用がないかどうか検討するため、通常のCA1ニューロンや、GluR1-c-tail、MPR-DD、MPR-AA発現細胞でcurrent clamp法による電気生理学的解析を行い、series resistance、access resistance、静止膜電位、活動電位の発生数を比較検討する。

*In vivo* microdialysis法ではペントバルビタール麻酔下で、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。実験前日に、先端0.5mmが半透膜からなるmicrodialysis用プローブはガイドカニューラを介して、背側海馬の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、マイクロポンプを用いて、人工脳脊髄液(流速1.2 $\mu$ l/分)を環流する。自由行動状態を維持し、翌日からサンプリングを行い、脳内環流液の採取とAChの定量を続けながらIA taskを行う。実験終了後は凍結切片を作成し、プローブ刺入部位の確認を行う。

環流液中のACh含量は、酵素カラムと電気化学検出器を組み合わせた高感度エゼリンフリーHPLCシステム(Eicom Co.)により定量する。オートインジェクタを用いて、環流液を内部標準物質(エチルホモコリン)と混合し、HPLCによる連続的な測定を行う。混合溶液中のAChは、分離カラムにより分離、酵素カラムにより過酸化水素に変換し、過酸化水素を電気化学検出器により検出する。検出した波形はインターフェースを介してコンピュータ上に記録し、波形を解析してAChの定量を行う。また、サンプル中のACh濃度は、*in vitro*実験により算出した各プローブの回収率で補正し、脳内の局所濃度を算定する。

#### 4. 研究成果

海馬は時間や場所の情報を統合し、文脈記憶の形成に中心的な役割を持つが、シナプス、分子のメカニズムは明らかでない。本研究では4-5週齢のラットを実験に用い、inhibitory avoidance (IA) taskによる学習課題を負荷した。学習成立後、海馬急性スライスを作成しCA1錐体細胞のパッチクランプ解析を行い、Schaffer線維を電気刺激した際のevoked EPSCを記録し、AMPA/NMDA比を求めた。IA学習が成立した群と、taskは行わずcontextの提示なしにshockのみを加えた群、IA taskを行わないコントロール群で比較し、海馬学習が内在性AMPA受容体のシ

ナプス移行をもたらし、AMPA/NMDA比を上昇させることを確認した。Recombinant virus (Herpes GluR1-GFP)をラット海馬に注入し、海馬CA1錐体細胞でGluR1サブユニットを含むAMPA受容体がシナプス移行を確認した。IA学習が成立したラットではGluR1サブユニットを含むAMPA受容体のシナプス移行が見られる一方、学習課題を行っていないコントロールや、contextの提示なしに電気ショックのみを負荷したコントロールではAMPA受容体のシナプス移行が見られないことから、GluR1のシナプス移行は学習依存的であることが確認された。これら実験ではScopolamineを投与によりAMPA受容体のシナプス移行が阻害されたことから、ムスカリン受容体を介し、AChがGluR1サブユニットをシナプス移行させることが示された。AChの作用が海馬特異的であることを示すため、IA taskを行わないラットから急性スライスを作成し、*in vitro*でACh agonist (CCh) をbath treatmentし、AMPA受容体シナプス移行についても解析した。CChはGluR1サブユニットを含むAMPA受容体のシナプス移行を誘導し、AMPA/NMDA比も上昇させたが、scopolamine存在下では両作用が阻止された。

学習依存的なGluR1のシナプス移行を阻止するフラグメントである(GluR1-c-tailまたはMPR-DD)を広範に両側海馬のCA1 neuronに強制発現させると、IA学習成績を強く低下させることが判明した。以上より、GluR1 subunitを含むAMPA受容体のシナプス移行が学習の成立に必要なことが示された。さらに、muscarinic ACh receptorの阻害薬であるscopolamineを学習の20分前に投与しておくこと、IA学習が阻止され、GluR1-c-tailやMPR-DDの発現細胞で観察された、GluR1のシナプス移行阻止作用が認められなかった。一方、コントロールとして用いたMPR-AAの発現では、非学習群、IA学習群、scopolamine投与群いずれもAMPA受容体のシナプス移行に影響しなかった。

Current clamp法により、GluR1-c-tail、MPR-DD、MPR-AA発現がCA1ニューロンに及ぼす影響を検討したが、これらのフラグメント発現は静止膜電位、current injectionにより誘発される活動電位発生数などに悪影響を示さなかった。

*In vivo* microdialysis法により、自由行動状態での海馬体内ACh分泌動態を検討したところ、学習依存的な海馬体内ACh分泌反応が約60分間記録された。一方、何も課題を負荷していないラットではACh分泌反応は見られなかった。さらに、Shockのみを負荷した群や、新規環境の提示を行ったWalking群

でもACh分泌反応が見られたが、反応は小さく、30分以内に反応は消失した。

本研究により、文脈学習依存的な内在性AMPA受容体のCA3-CA1シナプスへの移行には、muscarinic ACh receptorを介した、背側海馬におけるcholinergic activationが必要であることが解った。

#### 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 12 件)

1. Solinger JA, Paolinelli R, Klöss H, Scorza FB, Marchesi S, Sauder U, Mitsushima D, Capuani F, Stürzenbaum SR, Cassata G. The Caenorhabditis elegans Elongator complex regulates neuronal alpha-tubulin acetylation. PLoS Genet, 6: e1000820. Jan, 2010.

2. Higashida T, Jitsuki S, Kubo A, Mitsushima D, Kamiya Y, Kanno H. Skin-derived precursors differentiate into dopaminergic neuronal cells in the brains of Parkinson's disease model rats. J Neurosurg, 113:648-655, 2010.

3. Furuta M, Mitsushima D, Shinohara K, Kimura F, Funabashi T. Food availability affects orexin A/ hypocretin-1-induced inhibition of pulsatile luteinizing hormone secretion in female rats. Neuroendocrinology, 91:41-47, 2010.

4. Hagiwara H, Kimura F, Mitsushima D, Funabashi T. Formalin-induced nociceptive behavior and c-Fos expression in middle-aged female rats. Physiol Behav, 100:101-104, 2010.

5. Mitsushima D, Takase K, Funabashi T, Kimura F. Gonadal steroids maintain 24-h acetylcholine release in the hippocampus: organizational and activational effects in behaving rats. J Neurosci, 29:3808-3815, 2009.

6. Takase K, Kimura F, Yagami T, Mitsushima D. Sex-specific 24-h acetylcholine release profile in the medial prefrontal cortex: simultaneous measurement of spontaneous locomotor activity in behaving rats. Neuroscience, 159:7-15, 2009.

7. Jitsuki S, Kimura F, Funabashi T, Takahashi T, Mitsushima D. Sex-specific 24-h profile of extracellular serotonin levels in the medial prefrontal cortex. Brain Res, 1260:30-37, 2009.

8. Tin-Tin-Win-Shwe, Mitsushima D, Yamamoto S, Funabashi T, Fujimaki H. Strain differences in extracellular amino acid neurotransmitter levels

in the hippocampi of MHC-congenic mice in response to toluene exposure. Neuroimmunomodulation, 16:185-190, 2009.

9. Tin-Tin-Win-Shwe, Hojo R, Mitsushima D, Nakajima D, Yamamoto S, Fujimaki H. Establishment of a mouse model to assess brain neurotransmitter level and learning performance simultaneously following toxic chemical exposure: using in vivo microdialysis and schedule-controlled operant behavior. J UOEH, 31:1-11, 2009.

10. Win-Shwe TT, Mitsushima D, Yamamoto S, Fujitani Y, Funabashi T, Hirano S, Fujimaki H. Extracellular glutamate level and NMDA receptor subunit expression in mouse olfactory bulb following nanoparticle-rich diesel exhaust exposure. Inhal Toxicol, 21:828-836, 2009.

11. Funabashi T, Hagiwara H, Mogi K, Mitsushima D, Shinohara K, Kimura F. Sex differences in the responses of orexin neurons in the lateral hypothalamic area and feeding behavior to fasting. Neurosci Lett, 463:31-34, 2009.

12. Hagiwara H, Ishida M, Arita J, Mitsushima D, Takahashi T, Kimura F, Funabashi T. The cAMP response element-binding protein in the bed nucleus of the stria terminalis modulates the formalin-induced pain behavior in the female rat. Eur J Neurosci, 30:2379-2386, 2009.

[学会発表] (計 11 件)

1. Mitsushima D, Takahashi T. Cholinergic activation is required for learning-dependent AMPA receptor delivery into the CA3-CA1 synapses. Society for Neuroscience, Washington DC, USA, 2011. 11月予定

2. Mitsushima D, Takahashi T. Contextual learning requires synaptic AMPA receptor delivery at Schaffer collateral synapses in the dorsal hippocampus. Invited speaker in Annual Congress of NeuroTalk, Dalian, China, 2011.

3. Mitsushima D. Sex steroids activate sex-specific and time-dependent acetylcholine release in the hippocampus. Invited speaker in World Congress of Endocrinology, Xiamen, China, 2011.

4. Mitsushima D, Takahashi T. Contextual learning requires synaptic AMPA receptor delivery in the hippocampus: effect of delivery blocking in behaving rats. Cold Spring Harbor

Laboratory Meeting: Molecules to Circuits & Behavior, NewYork, USA, 2011.

5. Mitsushima D, Ishihara K, Sano A, Takahashi T. Contextual learning requires synaptic AMPA receptor delivery in the hippocampus. Society for Neuroscience, SanDiego, USA, 2010.

6. Mitsushima D, Ishihara K, Kamiya Y, Takahashi T. Learning requires synaptic delivery of AMPA receptors at Schaffer collateral synapses in the dorsal hippocampus. International Union of Physiological Sciences, Kyoto, Japan, 2009.

7. Mitsushima D, Ishihara K, Kamiya Y, Takahashi T. Hippocampal learning requires synaptic delivery of AMPA receptors at CA3-CA1 synapses. Society for Neuroscience, Chicago, USA, 2009.

8. Miyazaki T, Takase K, Tada H, Mitsushima D, Takahashi T. Social isolation produces glucocorticoid-mediated disruption of cortical circuit formation. International Union of Physiological Sciences, Kyoto, Japan, 2009.

9. 美津島 大 自由行動ラットにおける海馬学習のメカニズム：アセチルコリンによるAMPA受容体のシナプス移行 大阪大学基礎工学部 未来ラボシステム講演会 特別講演, 吹田, 2008.

10. 美津島 大 脳機能の発達と性差：生殖機能と高次機能 北海道大学大学院歯学研究セミナー, 特別講演 札幌, 2008.

11. Mitsushima D. Gonadal steroids maintain 24-h acetylcholine release in the dorsal hippocampus: organizational and activational effects in behaving rats. Invited speaker in US/Japan Neurosteroid Symposium, Gifu, Japan, 2008.

[図書] (計5件)

1. Mitsushima D. Sex differences in the cholinergic system in rats: behavioural consequences. In: Current Topics in Behavioral Neurosciences (CTBN) book series. Editor: Prof. Jo Neil. Springer, Heidelberg, Germany. in press, 2011.

2. 美津島 大、他数十名の執筆者と共著 ストレス科学事典 日本ストレス学会 財団法人パブリックリサーチセンター監修 実務教育出版, 2011.

3. Mitsushima D. Sex Steroids and Acetylcholine Release in Hippocampus. In: Vitamins and Hormones - Hormones of the limbic system. Editor: Prof. Gerald Litwack. Academic Press /Elsevier, NY, USA. 82:263-277, 2010

4. Takase K & Mitsushima D. Sex difference in learning and memory: effects of sex differentiation, development, and environments on the basal forebrain cholinergic system. In: Horizons in Neuroscience Research, Volume 2. Editor: Dr. Andres Costa and Eugenio Villalba, Nova Science Publisher Inc, NY, USA. 2010.

5. Tin-Tin-Win-Shwe & Mitsushima D. Neural network controlling GnRH neurons in sexual dimorphism of gonadotropin release. In: Current Trends in Endocrinology. Editor: Prof. Ninu Joseph. Research Trends, Kerala. 4, 65-75, 2010.

[その他]

ホームページ等

1. 日本生理学会 サイエンストピックス NO.64 <http://physiology.jp/exec/page/stopics64/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

美津島 大 (MITSUSHIMA DAI)  
横浜市立大学・医学部・准教授  
研究者番号：70264603

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：