

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24600006

研究課題名(和文) 成育初期ストレスによる精神的発達障害のメカニズム - ムスカリン受容体の新しい機能

研究課題名(英文) Novel functions of surface and intracellular muscarinic receptors in central nervous system and stress

研究代表者

村松 郁延 (MURAMATSU, Ikunobu)

金沢医科大学・医学部・客員教授

研究者番号：10111965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：代表的“膜”受容体と考えられてきたM1ムスカリン受容体が、大脳皮質や海馬では、細胞膜だけでなく神経細胞内にも存在することを明らかにした。そしてコリン作動性神経から遊離したアセチルコリンは、細胞膜だけでなく、細胞内に取り込まれ細胞内に局在するM1ムスカリン受容体にも作用するという、cholinergic dual transmission説を新たに提唱した。海馬の記憶は、細胞膜と細胞内のM1ムスカリン受容体を介して二重に増強され、ストレスは細胞内M1ムスカリン受容体の発現を抑制した。

研究成果の概要(英文)：M1-muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) exist not only on cell surface but also at intracellular sites in the cerebral cortex and hippocampus. ACh acts on surface and intracellular mAChRs and activates distinct signaling pathways, involving in cholinergic facilitation of long-term potentiation in hippocampus. Stress selectively inhibits the expression of intracellular M1-mAChRs in cerebral cortex and hippocampus, probably leading the reduction of higher brain functions. The present results suggest cholinergic dual transmission in central nervous system and may give a significant clue to explore higher brain functions.

研究分野：薬理学

キーワード：ムスカリン受容体 アセチルコリン 記憶 ストレス

1. 研究開始当初の背景

記憶や学習、心の形成に、脳の器質的および機能的変化が関連することが、近年の神経科学的研究で示唆されている。また、成育初期のストレス(母親からの隔離など)は、その後の精神的発達を障害すると考えられている。しかし、高次脳機能に関する分子メカニズムは未だ不明であり、ブラックボックスとなっていた。

2. 研究の目的

記憶、学習、メンタル形成といった高次脳機能には、中枢コリン作動性神経が重要な役割を果たしている。しかし、コリン作動性神経が、どのような機序で記憶形成などを増強するのか、その分子メカニズムはいまだ十分に解明されていない。我々は、中枢アセチルコリン受容体のうち M1-ムスカリン受容体サブタイプが細胞膜だけでなく神経細胞内にも存在し、生理的に機能しているという興味ある結果を得た。本研究の目的は、中枢神経細胞の膜表面だけでなく細胞内に分布する M1-ムスカリン受容体を高次脳機能と関連付けて解析することにある。そして、その結果をもとにストレスの影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) ムスカリン受容体同定実験:

実験には、ウイスター系雄性ラット(300-350g)から摘出した大脳皮質および海馬の組織切片を用いた。ムスカリン受容体は、親水性リガンド ^3H N-メチルスコポラミン(NMS)と疎水性リガンド ^3H キヌクリギルベンジレート(QNB)の結合を指標に検討した。また、大脳皮質および海馬の初代神経培養細胞に M1-ムスカリン受容体抗体を適用し、M1-ムスカリン受容体の細胞内分布を組織学的に観察した。

(2) ムスカリン受容体の機能実験:

大脳皮質および海馬の培養神経細胞を用いて、ムスカリン受容体を介して惹起されるシグナリング(IP3 産生、ERK リン酸化)を生化学的に調べた。また、ラット海馬スライス標本を用いて、高頻度刺激により惹起される長期増強(LTP)に対するムスカリン受容体の影響を電気生理学的に検討した。

(3) M1-ムスカリン受容体の発現解析:

myc-tagged ムスカリン受容体を N1E 115 神経芽細胞に発現させ、myc 抗体を用いて細胞内局在を調べた。また、各ムスカリン受容体の C 末を入れ換えたキメラ受容体を作成し、どのサブタイプの C 末が細胞内局在に重要か検討した。

(4) アセチルコリン(ACh)取り込み実験:

細胞内ムスカリン受容体が機能するためには、内在性アゴニスト ACh は細胞内に取り込まなければならない。大脳皮質および海

馬の小切片を、エステラーゼ阻害薬存在下に ^3H ACh または ^3H choline とインキュベーションし、ACh が中枢神経細胞内に取り込まれるか調べた。

(5) ストレス負荷実験:

5 週令のラットに一日 2 時間拘束ストレスを負荷し、2 週後にムスカリン受容体の細胞内分布を組織片結合実験において調べた。

4. 研究成果

(1) 細胞内 M1-ムスカリン受容体の同定: ラット大脳皮質および海馬切片において、疎水性リガンド ^3H QNB の結合量は、親水性リガンド ^3H NMS の結合に比べ有意に高値を示した。この差は、疎水性リガンド ^3H QNB が細胞内ムスカリン受容体に結合した結果を反映していた。M1 選択的なアンタゴニストを用いた競合実験および M1 抗体を用いた組織化学実験で、細胞内ムスカリン受容体は M1-サブタイプであることが明らかになった。すなわち、M1-サブタイプは細胞膜と細胞内に分布していた。一方、他のムスカリン受容体サブタイプは、細胞膜のみに局在した。

(2) 細胞膜および細胞内 M1-ムスカリン受容体の機能:

生化学実験において、細胞膜 M1-受容体は Gq タンパク質を介して IP3 を産生し細胞内 Ca を上昇することが示された。これに対し、細胞内 M1-受容体は ERK リン酸化系に特異的に共役していた。この結果から、M1-受容体を介するシグナリングは、細胞膜と細胞内で使い分けられていることが示唆された。電気生理実験において、海馬スライスの高頻度刺激で惹起される LTP は、ムスカリン受容体アゴニストにより増強された。細胞膜 M1-受容体は、この LTP 初期相の増強に特異的に関与していた。これに対し、LTP 後期相は細胞内 M1-受容体を介する ERK 系により増強された。細胞内 M1-ムスカリン受容体が機能するためには、コリン作動性神経終末から遊離した ACh は細胞内に取り込まなければならない。そこで ^3H ACh を用いて大脳皮質および海馬の組織片への取り込みを検討した。その結果、 ^3H ACh は特異的に神経組織片に取り込まれ、 ^3H choline 取り込みとは異なる薬理学的特性を示すことが明らかになった。これらの結果から、コリン作動性神経から遊離した ACh は、中枢神経ではシナプス後膜の M1 受容体に作用するだけでなく、細胞内にも取り込まれ、細胞内の M1-受容体にも作用するという、全く新しい神経伝達機序の存在を明らかにした。

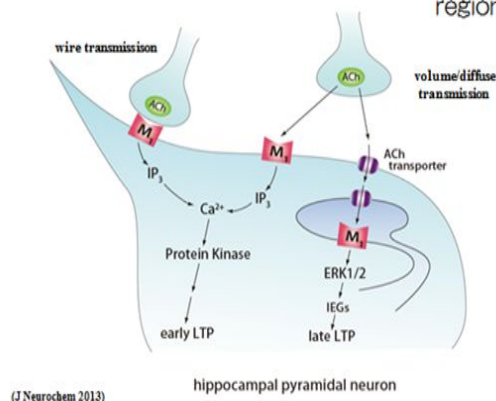
(3) ストレスの影響:

ストレスが、高次脳機能の発達を障害することはよく知られている。本研究で、拘束ストレスをラットに負荷したところ、細胞膜 M1-受容体に変化は認められなかったが、細胞内

M1-受容体が特異的に減少するという興味ある結果を得た。

以上の結果から、中枢神経では ACh は細胞膜と細胞内の両受容体に作用しているという cholinergic dual transmission 説を世界に先駆けて提唱した(下図)。ストレスは中枢のコリン作動性神経系を抑制し、精神的発達障害に関連することが示唆された。

Cholinergic “dual transmission” in higher brain regions



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

Uwada J, Yoshiki H, Masuoka T, Nishio M, Muramatsu I. Intracellular localization of M1 muscarinic acetylcholine receptor through clathrin-dependent constitutive internalization via a C-terminal tryptophan-based motif. *J Cell Sciences*. 2014 (査読有)
DOI:10.1242/jcs.148478

Yoshiki H, Uwada J, Anisuzzaman ASM, Umada H, Hayashi R, Kainoh M, Masuoka T, Nishio M, Muramatsu I. Pharmacological phenotypes of α_{1B} -adrenoceptors between intact tissues and homogenates, and recombinant system. *British J Pharmacology*, 2014 (査読有)
DOI:10.1111/bps.12813

Khan RIM, Yazawa T, Anisuzzaman ASM, Semba S, Ma Y, Uwada J, Hayashi H, Suzuki Y, Ikeuti H, Uchino Y, Maemoto T, Muramatsu I, Taniguchi T. Activation of focal adhesion kinase via M1 muscarinic acetylcholine receptors is required in restitution of intestinal barrier function after epithelial injury. *Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Basis of*

Disease, 1842/4: 635-645, 2014 (査読有)

DOI:10.1016/j.bbadis.2013.12.007

Anisuzzaman ASM, Uwada J, Masuoka N, Yoshiki H, Nishio M, Ikegaya Y, Takahashi N, Matsuki N, Fujibayashi Y, Yonekura Y, Muramatsu I. Novel contribution of cell surface and intracellular M1-muscarinic acetylcholine receptors to synaptic plasticity in hippocampus. *J Neurochemistry*. 118: 958-967, 2013 (査読有)

DOI: 10.1111/jnc.12306

Morishima S, Anisuzzaman ASM, Uwada J, Yoshiki H, Muramatsu I. Comparison of subcellular distribution and functions between exogenous and endogenous M1 muscarinic acetylcholine receptors. *Life Sciences*, 93: 17-23, 2013 (査読有)

DOI:10.1016/j.lfs.2013.05.013

Yoshiki H, Uwada J, Umada H, Kobayashi T, Takahashi T, Yamakawa T, Yamaguchi A, Yokoyama T, Muramatsu I. Agonist pharmacology at recombinant α_{1A} - and α_{1L} -adrenoceptors. *British J Pharmacology*, 170: 1242-1252, 2013 (査読有)

DOI:10.1111/bph.12403

Khan RIM, Anisuzzaman ASM, Semba S, Ma Y, Uwada J, Hayashi H, Suzuki Y, Takano T, Ikeuti H, Uchino M, Maemoto A, Ushikubi F, Muramatsu I, Taniguchi T. M1 is a major subtype of muscarinic acetylcholine receptors on mouse colonic epithelial cells. *J Gastroenterology*, 48: 885-896, 2013 (査読有)

DOI:10.1007/s00535-012-0718-5

Nishimune A, Yoshiki H, Uwada J, Anisuzzaman ASM, Umada H, Muramatsu I. Phenotype pharmacology of lower urinary tract α_1 -adrenoceptors. *British J Pharmacology*, 165: 1226-1234 (2012) (査読有)

DOI:10.1111/j.1476-5381.2011.01591.x

Ikeda T, Anisuzzaman ASM, Yoshiki H, Sasaki M, Koshiji T, Uwada J, Nishimune A, Muramatsu I. Regional quantification of muscarinic acetylcholine receptors and β -adrenoceptors in human airways. *British J Pharmacology*, 166: 1804-1814,

2012 (査読有)

DOI:10.1111/j.1476-5381.2012.01881.x

〔学会発表〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

村松 郁延 (MURAMATSU, Ikunobu)

金沢医科大学・医学部・客員教授

研究者番号：10111965

(2)研究分担者

西宗 敦 (NISHIMUNE, Atsushi)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：40311310

(3)研究分担者

宇和田 淳介 (UWADA, Jyunsuke)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：70580314