

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750206

研究課題名(和文) 運動野におけるAMPA受容体シナプス移行を介したスキル学習の神経基盤

研究課題名(英文) Skilled motor training increases synaptic delivery of AMPA receptors at layers II/III synapses in primary motor cortex

研究代表者

木田 裕之(KIDA, Hiroyuki)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70432739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)： 大脳皮質一次運動野では運動学習後、長期にわたりシナプス伝達効率が上昇することが知られているが、そのメカニズムは分かっていない。本研究では、AMPA受容体に着目し、スライスパッチクランプ法を用いてラット(4週齢)一次運動野II/III層のニューロン活動を記録した。学習課題にはローターロードテストを用いた。運動学習後、AMPA受容体のシナプス移行が生じ、長期的にはグルタミン酸の放出も増大した。本研究から運動学習成立において、プレ・ポストシナプス両側で学習段階に応じたダイナミックな可塑的变化が起こることが判明した。

研究成果の概要(英文)： Synaptic plasticity mediated by AMPA glutamate receptors is highly associated with many types of learning. To analyze plasticity in layers II/III area in primary motor cortex, we subjected rats to a rotor rod test. Motor skill consistently improved within 2 days of training, and we prepared acute brain slices for patch clamp analyses. 1-day trained rats exhibited significantly higher AMPA/NMDA ratios and miniature EPSC amplitude than untrained rats, suggesting an increase in postsynaptic AMPA receptors in the early phase of motor learning. Animals trained for 2 days showed a significantly higher miniature EPSC amplitude and frequency than untrained rats. Paired-pulse analysis of evoked EPSC significantly decreased after 2-days training, suggesting increased presynaptic glutamate release at the late phase of learning. Here we revealed that motor training induces dynamic changes in glutamatergic plasticity in layers II/III neurons of the primary motor cortex.

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス可塑性 運動学習 一次運動野

1. 研究開始当初の背景

脳における活動依存的なシナプス可塑性は学習・記憶の神経基盤であり、運動におけるスキル学習にも関与している。随意運動の起点となる大脳皮質一次運動野では、運動課題後には浅層における水平結合を介した LTP の誘導や樹状突起におけるスパイン形態の再モデリングが起こる。これらの知見は、一次運動野の経験依存的な可塑性を示唆し、運動学習の背景になっている。

グルタミン酸は中枢神経系における主要な興奮性神経伝達物質であり、AMPA 受容体はシナプス後部の細胞膜上にダイナミックに輸送されることにより、学習を成立させることが知られている。しかしながら、運動スキル学習と AMPA 受容体シナプス移行のダイナミクスは不明である。

2. 研究の目的

本研究では AMPA 受容体の挙動に着目し、運動学習後にみられる可塑的变化をスライスパッチクランプ法により検討した。

3. 研究の方法

運動学習の効果を評価するために、ローターロッドテストを用いた。運動試験は 1 日 10 試行とし、最長で 2 日連続行った。

運動直後 (30 分後)、脳スライス標本を作製し、大脳皮質一次運動野の II/III 層の細胞からホールセル・パッチクランプ記録を行った。

(1). Current clamp

一次運動野 II/III 層ニューロンにおける電気生理学的特性を調べるため、電流固定法によるスライスパッチ実験を行った。

(2). Voltage clamp

電流刺激によるシナプス後電流を記録するために、電位固定法によるスライスパッチ実験を行った。

(3). Miniature EPSC

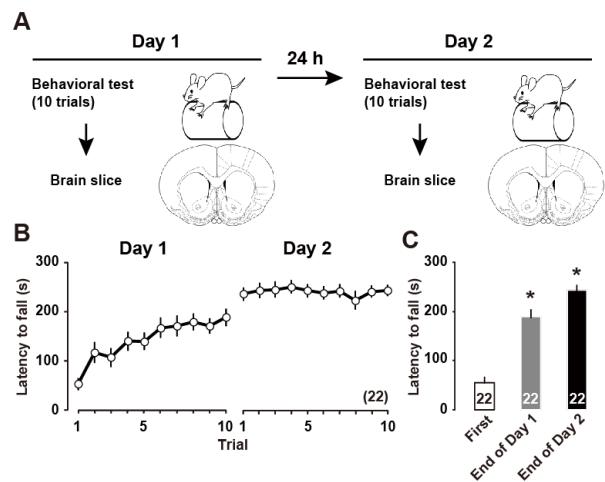
活動電位の発生を抑え、シナプス前終末から自発的に放出される 1 シナプス小胞あたりのグルタミン酸放出による AMPA 受容体由来の微小興奮性シナプス後電流 (miniature EPSC; mEPSC) を記録した。

(4). Paired-pulse ratio

シナプス前終末からの伝達物質放出確率を検討するため、電位を -60mV に固定し、連続電気刺激応答を調べた。

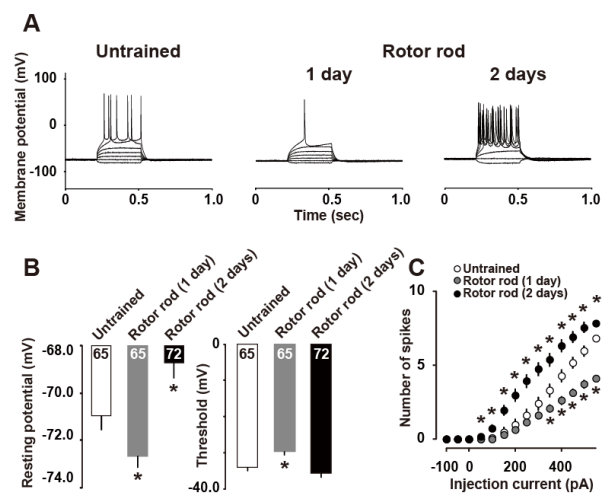
4. 研究成果

運動試験は加速モード (4-40 rpm) で 1 日または 2 日間連続で行い、1 日 10 試行とした。回転棒上の平均滞在時間を図 1B に表す。1 日目のトレーニングでは回数を経るごとに回転棒上の滞在時間は延長が見られた。2 日目の試行後には運動スコアはプラトーになった。テストした動物全てにおいて (n = 22)、滞在時間の延長が見られ、平均の滞在時間は前日より有意に増大した (paired t test, p < 0.05、図 1C)。



(図 1)

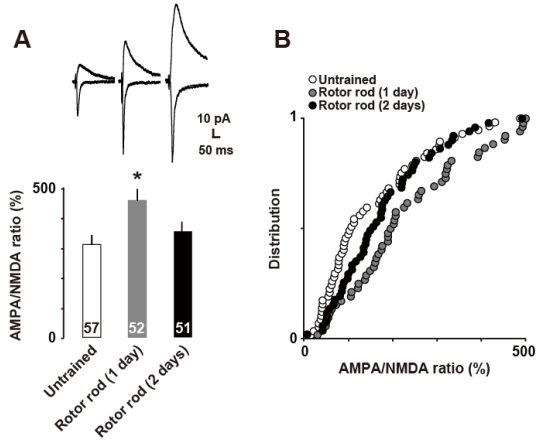
運動学習後、運動野浅層ニューロンの電気生理的特性変化を調べるために、電流注入によって誘発された応答を測定した。図 2A は運動学習後の典型的なニューロン応答の例で、コントロール群では 400 pA で初めて活動電位が誘発されたのに対し、初日の運動直後では 500 pA、運動 2 日群では 150 pA で活動電位を誘発した。静止膜電位はコントロール群 (n = 65)、運動 1 日群 (n = 72) よりも運動 2 日群 (n = 72) は有意に高く、活動電位を発生させる閾値に近づいていると考えられた (ANOVA, p < 0.05, Fisher's test, p < 0.05, 図 2B)。注入電流と発火頻度の関係性を調べるために、500 ミリ秒、-100 - 550 pA の各注入電流に対する平均活動電位数をプロットした。50 pA 以上の電流では、運動 2 日群においてコントロール群に対して有意にスパイク数の増加が見られ、350 pA 以上の電流で運動 1 日群では減少した (ANOVA, p < 0.05, Fisher's test, p < 0.05, 図 2C)。



(図 2)

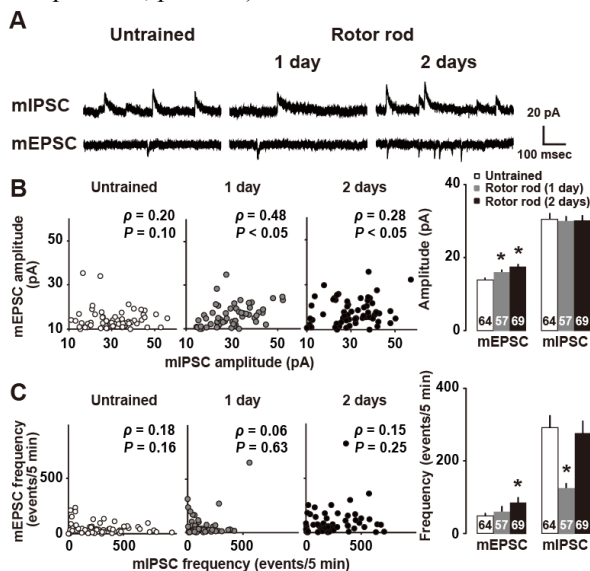
運動学習後のシナプス結合の変化を観察するため、電位固定下で運動野 II/III 層電気刺激を行い AMPA 電流 (-60 mV) と NMDA 電流 (+40 mV) を同一ニューロンより記録し、60-100 回のトレースを平均した。運動後は、AMPA 電流の増加が観察され、2 日後には NMDA 電流の増加を示すニューロンも見ら

れた(図3A)。NMDA電流に対するAMPA電流の割合をAMPA/NMDA比として算出したところ、運動学習1日目直後のみがコントロール群に対し、有意に増加した(ANOVA,  $p < 0.05$ , Fisher's test,  $p < 0.05$ , 図3A, 図3B)。



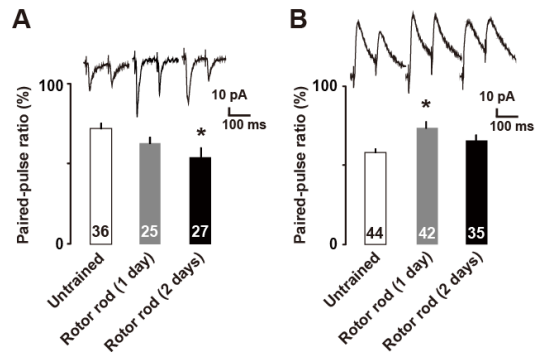
(図3)

シナプス前細胞側の可塑性とシナプス後細胞側を細胞ごとに網羅的に解析するため、 $0.5 \mu\text{M}$ のTTX存在下で、 $-60 \text{ mV}$ に膜電位を固定して1シナプス小胞あたりの微小興奮性シナプス後電流(mEPSC)を5分間記録した(図4A)。コントロール群( $n = 64$ )に対し、運動1日目( $n = 69$ )では振幅のみ、運動2日目( $n = 69$ )では頻度・振幅ともに有意な増加が観察された(ANOVA,  $p < 0.05$ , Fisher's test,  $p < 0.05$ , 図4B, 図4C)。さらに、膜電位を $+15 \text{ mV}$ に固定して、微小抑制性シナプス後電流(mIPSC)を同一細胞から記録したところ(図4A)、1日目では頻度のみが低下したが(ANOVA,  $p < 0.05$ , Fisher's test,  $p < 0.05$ , 図4B)、2日目では頻度、振幅ともに有意差は観察されなかった。シナプス後細胞における興奮性入力と抑制性入力の関係を調べるために、mEPSCとmIPSCの頻度・振幅についてニューロンごとにプロットしたところ、振幅においてのみ有意な相関を示した(図4B, Spearman,  $p < 0.05$ )。



(図4)

運動学習後にはmEPSCの頻度も上昇したことから、シナプス前終末からの伝達物質放出確率が上昇している可能性がある。この点を詳細に検討するため短刺激間インターバル(ISI)において、paired pulseテストを行った。ISIを100ミリ秒、200ミリ秒として、1発目の反応に対する2発目の反応の比をPPR(paired pulse ratio)と定義して算出した。コントロール群( $n = 36$ )、1日運動群( $n = 21$ )とで比較すると2日運動群( $n = 27$ )のみ有意に減少した(ANOVA,  $p < 0.05$ , Fisher's test,  $p < 0.05$ , 図5A)。抑制のPPRは1日運動群( $n = 42$ )のみ有意に上昇した(ANOVA,  $p < 0.05$ , Fisher's test,  $p < 0.05$ , 図5B)。



(図5)

## 結論

本研究で扱った運動は、数時間程度の練習で生じる「短期運動学習」にあたり、結果は以下のように要約される。運動学習成立後(1)電気生理学的特性が変化した、(2)初期ではAMPA/NMDA比は増加していたが、後期では変化が見られなかった、(3)AMPA受容体を介するmEPSCの振幅および頻度は増加した、(4)長期的にはグルタミン酸の放出確率が増加した。本研究より、一次運動野のII/III層ニューロンにおける興奮性シナプスでは、プレ・ポストシナプス両側で運動学習段階に応じたダイナミックな可塑的变化が起こることが判明した。

## 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7件)

1. Effects of hypothermia on ex vivo microglial production of pro- and anti-inflammatory cytokines and nitric oxide in hypoxic-ischemic brain-injured mice.

Matsui T, Kida H, Iha T, Obara T, Nomura S, Fujimiya T, Suzuki M. *Folia Neuropathol.* 52 (2): 151-158 (2014)査読有

<http://www.termia.pl/Original-article-Effects-of-hypothermia-on-ex-vivo-microglial-production-of-pro-and-anti-inflammatory-cytokines-and-nitric-oxide-in-hypoxic-ischemic-brain-injured-mice,20,23038,1,1.html>

2. Spatiotemporal characteristics of surround suppression in the primary visual cortex and the lateral geniculate nucleus of cat.

Shimegi S, Ishikawa A, Kida H, Sakamoto H, Hara S, Sato H. *J Neurophysiol.* 112(3):603-19. (2014)査読有  
doi: 10.1152/jn.00221.2012.

3. スライスパッチクランプ法を用いた一次運動野ニューロンとシナプス機能の解析  
木田裕之、美津島大 山口医学第 63 巻 3 号 189 -193 (2014)査読有  
<http://ci.nii.ac.jp/naid/130004713448>

4. Cortical region-specific engraftment of embryonic stem cell-derived neural progenitor cells restores axonal sprouting to a subcortical target and achieves motor functional recovery in a mouse model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury.

Shinoyama M, Ideguchi M, Kida H, Kajiwara K, Kagawa Y, Maeda Y, Nomura S, Suzuki M. *Front Cell Neurosci.* 21;7:128. (2013)査読有  
doi: 10.3389/fncel.2013.

5. The effect of hypothermia therapy on cortical laminar disruption following ischemic injury in neonatal mice.

Kida H, Nomura S, Shinoyama M, Ideguchi M, Owada Y, Suzuki M. *PLoS One.* 8(7):e68877. (2013)査読有  
doi:10.1371/journal.pone.0068877.

6. Penicillin-induced epileptiform activity elevates focal brain temperature in anesthetized rats.

Tokiwa T, Inoue T, Fujii M, Ishizuka S, Aou S, Kida H, Maruta Y, Yamakawa T, Nomura S, Suzuki M, Yamakawa T. *Neurosci Res.* 76(4):257-60. (2013)査読有  
doi: 10.1016/j.neures.2013.

7. Protective effects of focal brain cooling on photochemically-induced cerebral infarction in rats.

He Y, Fujii M, Inoue T, Nomura S, Maruta Y, Oka F, Shirao S, Owada Y, Kida H, Kunitsugu I, Yamakawa T, Tokiwa T, Yamakawa T, Suzuki M. *Brain Res.* 25;1497:53-60.(2013)査読有 doi: 10.1016/j.brainres.2012.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 運動学習段階に依存したグルタミン酸作動性シナプスの可塑性  
木田裕之、津田廉正、山本由似、大和田祐二、美津島大 2015 年 3 月 21-23 日  
第 92 回日本生理学会 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

2. Motor training changes the properties of layers

II/III neurons in the primary motor cortex and glutamatergic synaptic plasticity. 2014 年 11 月 11-15 日

Kida Hiroyuki, Tsuda Yasumasa, Yamamoto Yui, Owada Yuji, Mitsushima Dai, Society for Neuroscience (Washington DC, U.S.A.)

3. 運動学習段階に依存したグルタミン酸作動性シナプスの可塑性

木田裕之、津田廉正、山本由似、大和田祐二、美津島大 2014 年 10 月 17 日  
山口大学 大学研究推進機構 招待講演(山口県・宇部市)

4. 運動学習段階に依存したグルタミン酸作動性シナプスの可塑性

木田裕之、津田廉正、山本由似、大和田祐二、美津島大 2014 年 9 月 11 日-13 日  
第 37 回日本神経科学大会 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

5. 運動野における AMPA 受容体シナプス移行を介したスキル学習の神経基盤

木田裕之、津田廉正、山本由似、大和田祐二、美津島大 2014 年 3 月 16 日-18 日  
第 91 回日本生理学会 鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島・鹿児島市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~seiri2/index.html>

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
木田裕之 (KIDA, Hiroyuki)  
山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70432739

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし