

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870852

研究課題名(和文)細胞内ムスカリン受容体によるシナプス可塑性制御機構の解明と認知症との関連性

研究課題名(英文)The role of intracellular muscarinic M1 receptor in the regulation of synaptic plasticity and spatial memory

研究代表者

益岡 尚由(MASUOKA, Takayoshi)

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号：80509307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ムスカリン性アセチルコリン受容体は脳内に広く発現しており、学習記憶や情動などの神経精神機能の調節に深く関与している。本研究では、ゴルジ体や小胞体など細胞内に発現するムスカリンM1受容体による海馬シナプス伝達長期増強(LTP)の促進効果の作用機序と、空間記憶学習における細胞内M1受容体の関与を明らかにする研究を実施した。その結果、ポストシナプス側の神経細胞に存在する細胞内M1受容体が、シナプス後膜における伝達効率を向上させることによりLTPの促進が引き起こされることが明らかになった。一方、細胞内M1受容体によるLTP促進効果は、空間記憶学習にはほとんど関与していないことも明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Muscarinic acetylcholine receptors are well known to broadly express in brain and contribute to neuropsychological function such as memory and emotion. In present study, we performed experiments to clarify the regulatory mechanism of hippocampal long-term potentiation (LTP) mediated by intracellular M1 receptor expressing in Golgi and endoplasmic reticulum, and the contribution of the intracellular M1 receptor on spatial memory. As a result, it was suggested that intracellular M1 receptor expressing postsynaptic neurons facilitates the efficiency of synaptic transmission on postsynaptic membrane. On the other hand, it was also revealed that LTP facilitation induced by intracellular M1 receptor hardly affect spatial learning.

研究分野：神経薬理学

キーワード：ムスカリン受容体 シナプス伝達長期増強 海馬 空間記憶課題

## 1. 研究開始当初の背景

Gタンパク共役型受容体(GPCR)は細胞表面に発現して細胞外の化学情報を細胞内に伝える役割を果たすと考えられてきたが、近年、一部のGPCRは細胞表面だけではなくゴルジ体・小胞体・核膜などの細胞内小器官にも機能的に発現しており、様々な生理機能に關与していることが明らかにされつつある。GPCRであるムスカリン性アセチルコリン受容体(M1-M5)は脳内に広く発現しており、学習記憶や情動などの神経精神機能の調節に深く關与していることが知られている。本受容体サブタイプのM1受容体は、大脳皮質や海馬など特定の脳領域で、細胞表面だけでなくゴルジ体や小胞体に数多く発現しており、細胞内にアセチルコリンが取り込まれることにより活性化されて、MAPキナーゼ経路を活性化することが明らかになっている(Uwada et al, J Neurochem. 118:958-967, 2011)。これまでに、記憶の形成や想起に關与する重要な神経機構である海馬CA1シナプスにおけるシナプス伝達長期増強(LTP)の促進に細胞内M1受容体が深く關与していることを明らかにしてきた。しかしながら、細胞内M1受容体によるLTP促進の分子機構ならびに細胞内M1受容体により制御される生理機能に關しては未解明なままである。

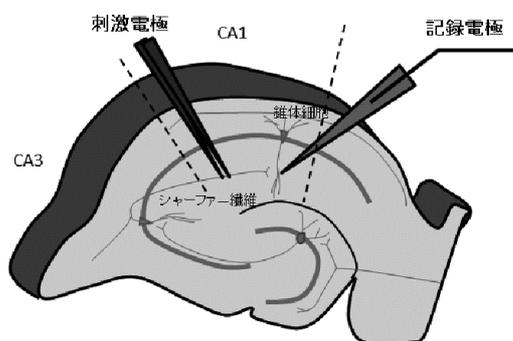
## 2. 研究の目的

本研究では、初めに海馬の細胞内M1受容体によるLTP促進効果の作用機構について電気生理学的に追求することを目的とした。さらに、海馬におけるCA1領域におけるLTPは学習記憶を支える神経基盤と考えられていることから、細胞内M1受容体を介したLTPの生理学的意義について空間学習に焦点を絞って明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 海馬CA1シナプスにおける細胞内M1受容体を介したLTP促進の作用機序解明

研究にはラットの海馬急性スライス標本



を用いた。フィールド記録法およびホールセルパッチクランプ法により、シャープファー繊維-CA1錐体細胞間のシナプス応答をフィールド電位またはシナプス電流として計測して解析した。LTPはシャープファー繊維を高頻度刺激(100Hz, 1s)して誘導する方法を用いた。

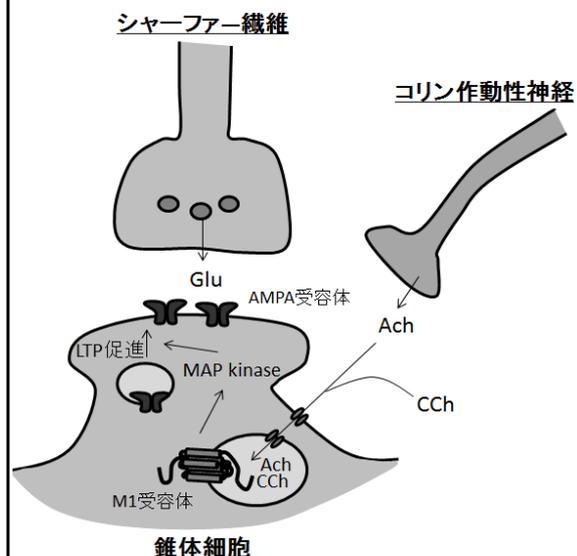
(2) 学習・記憶に対する細胞内M1受容体の解析

空間記憶学習として最もよく知られているモリス水迷路および新奇物体探索課題を用いて検討した。本実験には、細胞膜を通過できるM1受容体拮抗薬ピレンゼピン、通過できないM1受容体拮抗薬MT7を側脳室内に投与することにより検討した。

## 4. 研究成果

(1) 細胞内M1受容体を介した海馬シナプス伝達長期増強の作用機序

フィールド記録実験において、高頻度刺激により誘導したLTPはムスカリン受容体作用薬カルバコール(CCh)により顕著に増強した。CChにより誘発された遅発層のLTP促進は、選択的に細胞表面のM1受容体を遮断するペプチド性M1受容体遮断薬MT7存在下では変化しないのに対し、細胞表面および細胞内のM1受容体を非選択的に遮断するピレンゼピンにより抑制された。また、このCCh誘発LTP促進は、細胞内へのCCh取り込み阻害薬TEA、もしくは細胞内M1受容体の細胞内シグナル伝達分子であるMAPキナーゼの阻害薬PD-98059により消失したことから、細胞内のM1受容体刺激に起因することが明らかになった。一方で、CChによるLTP促進はpaired pulse ratioを変化させないことからポストシナプス側のシナプス伝達効率向上によるものであると考えられた。最後に、ピペット



内に M1 受容体遮断薬ピレンゼピンを封入して CA1 錐体細胞にホールセルパッチすることにより細胞内 M1 受容体を遮断したところ、CCh による LTP 促進は消失したことから、CA1 錐体細胞内の M1 受容体刺激が LTP 増強に関与していることが示唆された。

## (2) 学習・記憶に対する細胞内 M1 受容体の解析

選択的に細胞表面の M1 受容体を遮断する MT7 もしくは細胞表面および細胞内の M1 受容体を非選択的に遮断するピレンゼピンを側脳室に学習課題試行 5 分前に投与して、モリス水迷路または新奇物体探索課題を実施した。その結果、いずれの課題・いずれの薬物投与群においても、有意な記憶障害効果は観察されなかった。

次に、浸透圧ポンプを用いて両薬物を持続投与したラットを用いて、モリス水迷路および新奇物体探索課題を実施した。その結果、MT7 投与群において記憶障害は全く観察されなかったが、ピレンゼピン投与群では記憶障害傾向が観察された。しかしながら、M1 受容体の空間記憶に対する役割は、当初予想していたものよりも小さく、明確な差は得られなかった。今後 M1 受容体の寄与が大きいと考えられる他の学習課題を用いて神経精神機能に対する役割を再検証する必要がある。

## 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 5 件)

Masuoka T, Nakamura T, Kudo M, Yoshida J, Takaoka Y, Kato N, Ishibashi T, Imaizumi N, Nishio M. Biphasic modulation by mGlu5 receptors of TRPV1-mediated intracellular calcium elevation in sensory neurons contributes to heat sensitivity. *Br J Pharmacol*, 査読有, 2015;172(4):1020-1033, DOI: 10.1111/bph.12962

Masuoka T, Ishibashi T, and Nishio M. Biphasic modulation of noxious heat sensitivity in sensory neurons by peripheral metabotropic glutamate receptors. *Inflamm Cell Signal*, 査読有, 2015; 2: e602, DOI: 10.14800/ics.602

Yoshiki H, Uwada J, Anisuzzaman AS, Umada H, Hayashi R, Kainoh M, Masuoka T, Nishio M, Muramatsu I. Pharmacologically distinct phenotypes of 1B-adrenoceptors: variation in

binding and functional affinities for antagonists. *Br J Pharmacol*, 査読有, 2014;171(21):4890-4901, doi: 10.1111/bph.12813

Uwada J, Yoshiki H, Masuoka T, Nishio M, Muramatsu I. Intracellular localization of the M1 muscarinic acetylcholine receptor through clathrin-dependent constitutive internalization is mediated by a C-terminal tryptophan-based motif. *J Cell Sci*, 査読有, 2014 15;127(Pt 14):3131-3140, DOI:10.1242/jcs.148478

Anisuzzaman AS, Uwada J, Masuoka T, Yoshiki H, Nishio M, Ikegaya Y, Takahashi N, Matsuki N, Fujibayashi Y, Yonekura Y, Momiyama T, Muramatsu I. Novel contribution of cell surface and intracellular M1-muscarinic acetylcholine receptors to synaptic plasticity in hippocampus. *J Neurochem*, 査読有, 2013;126(3):360-371, DOI: 10.1111/jnc.12306

### [学会発表](計 6 件)

Masuoka T, Gallar J, Belmonte C. Effects of sodium channel blocker amitriptyline on the spontaneous and stimulus-evoked activity of corneal cold-sensitive nerve terminals in intact and tear-deficit guinea-pig eye. The association for Research in vision and Ophthalmology 2015、2015 年 5 月 3 日~7 日、Denver (米国)

Imaizumi N, Yoshida J, Ishibashi T, Masuoka T, Nishio M. Resveratrol Downregulated Caveolin-1 in A431 Cells、第 88 回日本薬理学会年会 2015 年 3 月 18 日~20 日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

Gallar J, Masuoka T, Belmonte C. Effects of amitriptyline on the spontaneous and stimulus-evoked activity of corneal cold-sensitive nerve terminals. Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics 2015, 2015 年 2 月 26 日~3 月 1 日、Charleston (米国)

Masuoka T, Kudo M, Yoshida J, Takaoka Y, Ishibashi T, Nishio M. Metabotropic glutamate receptor type 5 biphasically modulates heat pain behavior in mice、第 87 回日本薬理学会年会、仙台国際センター(宮城県・仙台市)2014 年 3 月 20 日

益岡尚由, 末梢性代謝型グルタミン酸受容体による痛みの調節機構の解析, 科学技術振興機構さきがけ研究 21, 第 14 回「知と構成」領域懇話会、グランドホテル白山 (石川県・白山市) 2013 年 11 月 30 日

Masuoka T, Nakamura T, Yoshida J, Yuki Takaoka 1, Noriko Imaizumi 1, Ishibashi T, Nishio M. Modulation of TRPV1 and voltage-gated calcium channels by peripheral metabotropic glutamate receptors type 5 contributes to heat hyper- and hypoalgesia in mice, Society for Neuroscience 2013, 2013 年 11 月 12 日, San Diego (米国)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

益岡 尚由 (MASUOKA, Takayoshi)

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 80509307