

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26500017

研究課題名(和文) 食品状相が性特異的に学習機能を変容する分子基盤

研究課題名(英文) Molecular mechanism for the sex difference in learning ability by feeding environment

研究代表者

船橋 利也 (Funabashi, Toshiya)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：70229102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：海馬は人において、記憶や学習に密接に関係しています。ラットをもちいて、いくつかの海馬に依存した学習機能を解析して、粉状型餌で飼育した場合は、通常の固形型餌で飼育した場合より良い学習成績を示すことがわかりました。電気生理学および生化学的な解析をした結果、記憶に関係しているAMPA受容体の海馬における機能が、餌を通常型から粉状型にすると良くなることが支持されました。また、粉状型群では海馬のシナプスに余裕が生じた、すなわち、海馬機能に余裕が出来たと思われました。変化の主因がエストロゲンであることを明らかにしました。

研究成果の概要(英文)：Powdered pellet diet enhanced hippocampus-related brain higher functions such as learning ability only in female rats. This molecular basis was revealed by electrophysiological and biochemical experiments that the functional changes in the AMPA receptor subunit composition which was associated with learning ability. Also, powdered pellet enhanced synaptic function in the hippocampus. These changes were related to estrogen.

研究分野：生理学

キーワード：性差 環境 学習機能 海馬 AMPA受容体サブユニット シナプス 記憶

1. 研究開始当初の背景

脳には形態的・機能的な性的二型性が存在する。ホルモン環境の性差や、遺伝的・内分泌学的な影響を受けてホルモン感受性が変化する。例えばエストロジェンのネガティブフィードバック作用に性的二型性はなく、雌雄ともにエストロジェンは、性腺刺激ホルモン放出ホルモンニューロンの活動を抑制する。しかし、エストロジェンのポジティブフィードバック作用は雌性のみに存在する。その機序の一つに AMPA 受容体が関与している事を申請者は最近明らかにした。このように性的二型性は、様々な脳機能の性差として表現され、例えばヒトでは、摂食障害やうつ病、そして自閉症など発症の性差、すなわち疾患の脆弱性として現れているのではないかと申請者は考えるようになった。一方、興奮性神経伝達物質グルタミン酸の受容体、AMPA 受容体が、学習依存性にシナプスに挿入され、その数が増加することより電流応答が大きくなる(シナプスの伝達効率が上昇する)ということが学習成立の分子基盤と言われている。AMPA 受容体は GluR1~GluR4 のサブユニットから構成される 4 量体であり、通常は GluR2 を含んでいる。しかし、GluR2 を欠いているために、受容体 1 分子当たりの電流応答が大きいという特性を持つ GluR2-lacking AMPA 受容体が存在することが報告されている。この GluR2-lacking の存在は、シナプスの伝達効率が AMPA 受容体の数だけではなく、AMPA 受容体を構成するサブユニットの違いによっても決定される可能性を示唆している(図1)。

1.

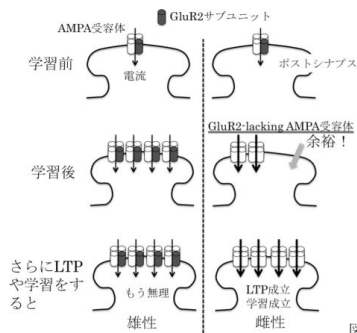


図 1

つに AMPA 受容体サブユニットの構成の変化がある事を、ラットを用いて検証する。具体的には、餌を通常型(固形=Hard)の場合と柔らかく(粉状=Powder)した場合にわけ、雌雄ラットを用いて研究する。平成 26 年度は、性特異的に餌の形状が、1)海馬依存性の学習機能に影響するかどうかを、受動的回避学習課題および恐怖条件付け学習課題を観察する事から明らかにする。同時に、パッチクランプ法により AMPA 受容体のサブユニット構成を調べる。また、生化学的な方法で、餌の形状により変化する遺伝子を探索する。平成 27 年度は、性特異的に餌の形状が、2)海馬シナプス機能に影響するか、シナプス機能の予備能力を検証する。具体的には学習課題を負荷することにより海馬機能を飽和さ

2. 研究の目的

本研究では、食品の形状によって脳の高次機能が性特異的に変容する事、その機序の 1

せ、他の学習課題への影響、および、LTP(long-term potentiation)の occlusion(飽和)を検討する。平成 28 年度は、性特異的に餌の形状が、3)海馬機能にのみ影響を及ぼすかについて、恐怖条件付け学習を、海馬依存性(文脈刺激)、もしくは、扁桃体依存性(音刺激)にして、検証する。

3. 研究の方法

(1) 行動解析

受動的回避学習

受動的回避学習装置は、ドアで隔たれた明るい部屋と暗い部屋の2連部屋からなり、動物を明るい部屋におくと速やかに暗い部屋に移動する。暗い部屋に移動した時にドアを閉めて床のグリッドから電気ショック(0.8-1.6 mA、2 秒)を与える。その後再び明るい部屋に入ると受動的回避学習が成立しているので、明るい部屋に行かない。行動しないこと(明るい部屋に行かない)により電気ショックを回避する学習海馬依存性である事がわかっている。

恐怖条件付け

目印をした部屋に移して(文脈刺激)、床のグリッドから電気ショック(0.8-1.6 mA、2 秒)を与え、動物はすくみ行動(freezing)をとる。再びその部屋に移すとその部屋を覚えていて、すくみ行動をとる。10分間観察し、動物の行動をテレビカメラでパソコン上にデータを取り込み、すくみ行動をとっていた時間を計測する。海馬依存性である事がわかっている。また、同じ条件付けで、電気ショックとベルの音を連合させると、扁桃体依存性の学習となる。

Y 迷路学習

動物をY迷路の一つの選択肢に置き、5 分間の自発的交替行動(spontaneous alternation)を算出する。自発的交替行動は探索行動で、自発的に異なる選択肢に入る性質を利用し、既に入った選択肢を記憶していることにより可能となる行動で、迷路の上にテレビカメラを置き、接続したパソコン上にデータを取り込み、自動解析する。

(2) 電気生理学的解析

イソフルラン麻酔をしてから脳を摘出し、スライス切片をリニア振動型ビプラトームで作成する。我々が改良した 2 段階インキュベーション法を用いる。記録は、パッチクランプ膜電位固定法を用いる。また、電気刺激は、シェーファー線維を刺激することにより行う。

AMPA/NMDA 比の解析

ビククリン存在下に、-60 mV に膜電位を固定した時の電気刺激により電流応答

(excitatory post synaptic current, EPSC) を記録し、また、+40 mV の EPSC を記録する。-60 mV の EPSC (AMPA 受容体成分) を電気刺激 150 msec 後の+40 mV の EPSC (NMDA 受容体成分) で除した値を計算する。

シナプス入力の解析

TTX 存在下に-60 mV に膜電位を固定し、ビ

ククリン存在下では miniature EPSC (mEPSC) CNQX 存在下では miniature inhibitory post synaptic current (mIPSC) を記録し、mini analysis を用いて、mEPSC と mIPSC の起こる頻度と振幅を検討する。

AMPA 受容体のサブユニット構成

ピククリンおよび APV 存在下 (NMDA 受容体成分を切る) に電気刺激し、膜電位 -60 mV にした時の EPSC を +40 mV の EPSC で割った値を rectification index (RI) と定義する。通常は 1.5 ~ 1.6 であるが、GluR2-lacking 受容体があると、約 2.0 になる。つまり、RI があがると GluR2-lacking 受容体があるという、機能的な解析となる。

LTP の検討

膜電位を -60 mV に固定する。テタヌス刺激は paired 刺激で、0 mV の脱分極刺激と、3-10 Hz 90 秒間の電気刺激を同時に行う。テタヌス刺激前に、10 秒間に 1 回電気刺激し、その 30 回 (すなわち 5 分間) の平均を 100% として、その後 1 時間、10 秒間に 1 回電気刺激をして、経過を観察する。

(3) 生化学的解析

ウエスタンブロット

動物をイソフルレン麻酔して脳を摘出し、実態顕微鏡下で目的の領域を切り出し、液体窒素で凍結する。サンプルから定型的に蛋白質を抽出する。シナプトソーム分画の場合は、組織サンプルを、シナプトソーム分画用バッファにてホモジナイズを行い、フィルターを通して採集する。遠心後、上清を捨て、ペレットを再度シナプトソーム分画用バッファにて溶解する。それら蛋白サンプルは、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法を用いて、泳動を行い、メンブレン (PVDF 膜) に転写する。PVDF 膜に転写する。転写後、ブロッキング剤を用いてブロッキング処理を行い、目的の蛋白質の 1 次抗体を反応させる。反応後、膜を洗浄し、2 次抗体 (HRP 標識抗体) にて反応させ、化学発光法にて検出する。

4. 研究成果

(1) 行動解析として、高架式十字迷路、受動的回避学習、Morris 水迷路を行った。その結果、高架式十字迷路や受動的回避学習には差がなかったが、Morris 水迷路では、粉状型で飼育した場合に、良い成績を示した。

(2) 電気生理学的解析として、パッチクランプ法により急性スライスをもちいて、AMPA 受容体のサブユニット構成を調べた。その結果、rectification index (RI) が餌を通常型から粉状型にすると約 2.0 になった。つまり、RI があがり GluR2-lacking 受容体があるということを電気生理学的に示した。また、受動的回避学習をしていないと、Hard 群でも Powder 群でも海馬の LTP が誘導出来た。しかし、Hard 群では、受動的回避学習を行ってから LTP を誘導すると、もはや LTP は誘導されなかった。一方、Powder 群では、受動的回避

学習を行っても LTP を誘導できた。この結果から、Powder 群ではシナプスに余裕が生じた、すなわち、海馬機能に余裕が出来たと思われる。その結果、LTP の occlusion がおこらなかったと推察している。また、これらの行動上の変化と電気生理学的な変化の主因がエストロゲンであることを明らかにした。

(3) 海馬を摘出し粗蛋白では、通常型と粉状型で飼育した場合に差がなかったが、シナプトソーム分画にしたところ、AMPA 受容体サブユニット GluR1 が刺激依存性にシナプスに挿入されることを確認した。さらに、粉状型で飼育した場合には AMPA 受容体サブユニット GluR2 が減少することから、AMPA 受容体サブユニット構成が粉状型で飼育した場合には変化する事が生化学的にも明らかとなった。とくに 831 番目の GluR1 のアミノ酸が鍵を握っている可能性が示唆された。

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)

Kurosaka M, Ogura Y, Funabashi T, Akema T. Early Growth Response 3 (Egr3) Contributes a Maintenance of C2C12 Myoblast Proliferation. *J Cell Physiol.*, 査読有り, 2017; 232(5):1114-1122. 10.1002/jcp.25574

Kurosaka M, Ogura Y, Funabashi T, Akema T. Involvement of Transient Receptor Potential Cation Channel Vanilloid 1 (TRPV1) in Myoblast Fusion. *J Cell Physiol.*, 査読有り, 2016; 231(10):2275-85. 10.1002/jcp.25345.

Tada H, Koide M, Ara W, Shibata Y, Funabashi T, Suyama K, Goto T, Takahashi T. Estrous Cycle-Dependent Phasic Changes in the Stoichiometry of Hippocampal Synaptic AMPA Receptors in Rats. *PLoS One*, 査読有り, 2015; 10(6):e013135.

Fukushima A, Ogura Y, Furuta M, Kakehashi C, Funabashi T, Akema T. Ketogenic diet does not impair spatial ability controlled by the hippocampus in male rats. *Brain Res.*, 査読有り, 2015; 1622:36-42

Furuta M, Ninomiya-Baba M, Chiba S, Funabashi T, Akema T, Kunugi H. Exposure to social defeat stress in adolescence improves the working memory and anxiety-like behavior of adult female rats with intrauterine growth restriction,

independently of hippocampal neurogenesis. *Horm Behav.*, 査読有り, 2015; 70:30-7. 10.1016/y.ynbeh.2015.01.010.
Fukushima A, Hagiwara H, Fujioka H, Kimura F, Funabashi T, Akema T. (2015) Sex differences in feeding behavior in rats: the relationship with neuronal activation in the hypothalamus. *Front Neurosci.*, 査読有り, 9: 88. doi: 10.3389/fnins.2015.00088.
Fukushima A, Hagiwara Y, Yoshioka N, Kimura F, Akema T, Funabashi T. (2014) Expression of phosphorylated cyclic AMP response element-binding protein in melanin-concentrating hormone neurons and orexin neurons in male and female rats during ad libitum feeding. *Neuroreport*, 査読有り, 25: 766-770. 10.1097/WNR.000000000000172

[学会発表](計27件)

小倉裕司, 船橋利也, Egr3 抑制はマウス筋が細胞の静止性に関与する分子を増加させる, 第94回日本生理学会大会(2017年3月), 浜松コンベンションセンター, 静岡県浜松市

萩原裕子, 崎村建司, 井樋慶一, 船橋利也, CRF-Venus Δ Neoマウスの分界条床核外側部CRHニューロンのシナプス入力性の性差と痛み反応の性差, 第94回日本生理学会大会(2017年3月), 浜松コンベンションセンター, 静岡県浜松市

藤岡仁美, 明間立雄, 船橋利也, 雌ラットにおけるプロスタグランジンE2のGnRHニューロン微小EPSCへの影響, 第94回日本生理学会大会(2017年3月), 浜松コンベンションセンター, 静岡県浜松市

藤原清悦, 久保田隆, 船橋利也, 明間立雄, 恐怖条件付け後の海馬高周波と関連した海馬-扁桃体間の γ 活動, 第94回日本生理学会大会(2017年3月), 浜松コンベンションセンター, 静岡県浜松市

古田都, 福島篤, 船橋利也, 妊娠-出産-子育ての経験が視床下部TIDAニューロンへの興奮性シナプス入力へ及ぼす影響, 第94回日本生理学会大会(2017年3月), 浜松コンベンションセンター, 静岡県浜松市

福島篤, 船橋利也, マウス中枢神経系のPDGFR α 系を介する摂食調節作用は, 末梢とは異なる, 第12回環境生理学プレコングレス(2017年3月), 浜松ホテル, 静岡県浜松市

小倉裕司, 船橋利也, Early growth response 3 (Egr3)の筋芽細胞における役割.

第四回若手による骨格筋細胞研究会(2016年11月)

藤原清悦, 久保田隆, 船橋利也, 明間立雄, Gamma band oscillation between hippocampus and amygdala associated with hippocampal high frequency oscillation and fear memory, ライフエンジニアリングシンポジウム2016(2016年11月), 九州工業大学, 福岡県飯塚市

福島篤, 萩原裕子, 船橋利也, 視床下部PDGF受容体 α を介した摂食調節作用に関する研究, 第43回日本神経内分泌学会(2016年10月) 浜松コンベンションセンター, 静岡県浜松市

小倉裕司, 黒坂光寿, 船橋利也, Early growth response 3 (Egr3)は筋芽細胞の増殖に関与する, 第2回日本筋学会学術集会(2016年8月) 国立精神神経医療研究センター, 東京都小平市

萩原裕子, 崎村建司, 井樋慶一, 明間立雄, 船橋利也, 分界条床核におけるCRHニューロンのシナプス入力性の性差, 第39回日本神経科学大会(2016年7月), パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市

古田都, 福島篤, 船橋利也, 幼弱期雌性ラットにおけるニコチン投与および母性様行動の成体期における母性行動と空間学習に及ぼす影響, 第39回日本神経科学大会(2016年7月) パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市

藤岡仁美, 福島篤, 船橋利也, 明間立雄, リポポリサッカライドによるLHサージ状分泌抑制に関与する終板脈絡器官のIL-1 β 産生細胞の特徴, 第39回日本神経科学大会(2016年7月) パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市

藤原清悦, 久保田隆, 船橋利也, 明間立雄, 恐怖条件付け後における海馬高周波出現時の扁桃体 θ および γ 活動, 第39回日本神経科学大会(2016年7月) パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市

藤岡仁美, 福島篤, 船橋利也, 明間立雄, ミノサイクリンはリポポリサッカライドによるLHパルス状分泌抑制を回復しない, 第93回日本生理学会大会(2016年3月), 札幌コンベンションセンター, 北海道札幌市

古田都, 福島篤, 明間立雄, 船橋利也, 雌性ラットの幼弱期ニコチン投与ならびに母性行動が成体期の母性行動および空間学習に及ぼす影響, 第93回日本生理学会大会(2016年3月) 札幌コンベンションセンター, 北海道札幌市

藤原清悦, 久保田隆, 船橋利也, 明間立雄, 第海馬高周波と恐怖記憶に関連する扁桃体

の θ 活動と γ 活動、93 回日本生理学会大会 (2016 年 3 月) 札幌コンベンションセンター、北海道札幌市

黒坂光寿、小倉裕司、船橋利也、明間立雄、STAT6 シグナルは筋サテライト細胞の分化と融合を制御する、第 93 回日本生理学会大会 (2016 年 3 月) 札幌コンベンションセンター、北海道札幌市

小倉裕司、黒坂光寿、船橋利也、明間立雄、Early growth response 3 (Egr3) は筋芽細胞の増殖に関与する、第 93 回日本生理学会大会 (2016 年 3 月) 札幌コンベンションセンター、北海道札幌市

福島篤、萩原裕子、明間立雄、船橋利也、肝臓の PDGFR α 系を介した STAT5 のリン酸化は高脂肪食による肥満と糖耐性の低下に関与する、第 93 回日本生理学会大会 (2016 年 3 月) 札幌コンベンションセンター、北海道札幌市

②① 萩原裕子、福島篤、明間立雄、船橋利也、血小板由来成長因子はマウスの視床下部による摂食調節に関与する、第 93 回日本生理学会大会 (2016 年 3 月) 札幌コンベンションセンター、北海道札幌市

②② 藤岡仁美、船橋利也、明間立雄、プロスタグランジン E2 の GnRH ニューロン miniature EPSC への影響、第 42 回日本神経内分泌学会 (2015 年 9 月)、仙台市戦災復興記念館、宮城県仙台市

②③ 古田 都、福島篤、船橋利也、明間立雄、妊娠、出産、子育て経験後の学習機能の向上と AMPA 受容体サブユニットの構成の変化、第 42 回日本神経内分泌学会 (2015 年 9 月)、仙台市戦災復興記念館、宮城県仙台市

②④ 福島篤、萩原裕子、船橋利也、明間立雄、絶食によりマウス視床下部のオリゴデンドロサイト前駆細胞の PDGFR α を介したシグナルは刺激されるが、高脂肪食によりこの調節系が障害される、第 42 回日本神経内分泌学会 (2015 年 9 月)、仙台市戦災復興記念館、宮城県仙台市

②⑤ 萩原裕子、福島篤、明間立雄、船橋利也、エストロゲンによる摂食調節は視床下部のオリゴデンドロサイト前駆細胞の PDGFR α を介する、第 42 回日本神経内分泌学会 (2015 年 9 月)、仙台市戦災復興記念館、宮城県仙台市

②⑥ Furuta M, Fukushima A, Funabashi T, Akema T, The effect of maternal experiences on hippocampal neural plasticity and spatial learning, The 38th Annual Meeting of the

Japan Neuroscience Society (2015, 7), 神戸国際会議場、兵庫県神戸市

②⑦ Fujiwara SE, Kubota T, Funabashi T, Akema T, Synchronous theta band oscillation between hippocampus and amygdala associated with hippocampal high frequency oscillation during rest time after aversive stimuli correlate with freezing behavior, The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (2015, 7), 神戸国際会議場、兵庫県神戸市

〔図書〕(計 2 件)

船橋利也 (2016) 14 内分泌系の生理学・オックスフォード・生理学(原書 4 版)・丸善(東京), pp. 264-269.

船橋利也 (2014) 第 16 編 生殖・小澤誠司、福田康一郎(編) 標準生理学・医学書院(東京)・pp.1003-1033

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.marianna-u.ac.jp/physiology/index.html>

<http://seiri.webcrow.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船橋 利也 (Funabashi, Toshiya)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：70229102

(2) 研究分担者

長谷 都 (Nagatani, Miyako)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20450611

藤岡仁美 (Fujioka, Hitomi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：50410064

萩原裕子 (Hagiwara, Hiroko)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：90468207