

学位申請論文

Dアミノ酸酸化酵素欠損マウスでは海馬CA1領域における NMDA受容体活性は促進され、長期増強が増強される

獨協医科大学 麻酔科学

渡辺 正嗣

要旨 N-メチル-Dアスパラギン酸 (NMDA) 受容体の機能を調節するDアミノ酸はDアミノ酸酸化酵素 (DAO) によって代謝される。本研究では、空間学習能力や海馬の長期増強 (LTP) におけるDAOの役割について検討するために、DAO欠損マウスにおける空間認識能を評価できるMorris水迷路試験と海馬スライス標本における海馬CA1領域のLTPとNMDA受容体活性について調べ、正常なマウスと比較検討した。Morris水迷路試験を1週間続けた後に得られた学習能力は、DAO欠損マウスは正常マウスと比較して優れていた。正常マウスと比べてDAO欠損マウスでは海馬CA1領域のLTPが亢進していた。また、DAO欠損マウスは正常マウスと比較して、海馬CA1領域の錐体細胞で観察される興奮性シナプス後電流のNMDA成分の割合が大きかった。これらの結果から、DAO欠損マウスでは脳内のDアミノ酸が増加することにより、海馬CA1領域のNMDA受容体が活性化し、LTPが増強されることにより空間学習能が促進されていることが推測された。

Key Words : 海馬, Dアミノ酸, Dアミノ酸酸化酵素, NMDA受容体, 長期増強

緒言

学習や記憶には、長期増強 (LTP) と呼ばれている神経細胞間の特異的なシナプス結合の強さが長時間にわたり変化する現象などが必要となる。海馬のLTPは学習と密接に関連しているように見える。事実、学習のための海馬のN-メチル-Dアスパラギン酸 (NMDA) 受容体の活性化の重要性¹⁻³⁾ や、LTPと学習行動の関係⁴⁻⁶⁾ についての多くの研究がある。

Dアミノ酸の一つであるDセリンやDアラニンは、NMDA受容体グリシン結合部位の作動物質であり、NMDA受容体の機能を増強することが明らかにされている⁷⁻⁹⁾。脳内のDアミノ酸の存在に関する報告は数多くある¹⁰⁻¹⁴⁾。Dアミノ酸は、Dアミノ酸酸化酵素 (DAO) によって代謝されるが、このDAOが欠損したマウスでは通常のマウスと比較して脳内のDアミノ酸濃度が上昇している^{15,16)}。また、CA1のLTPにはNMDA受容体の活性が深く関与している。したがって、DAO欠損マウス

では脳内のDアミノ酸濃度が増加し、CA1領域におけるNMDA受容体によって惹起されるLTPが増強していることが考えられる。

本研究では、DAO欠損マウスにおける海馬CA1領域のLTPと空間学習は通常のマウスと比較して優れているのではないかとこの仮説のもとに、DAO欠損マウスにおけるMorris水迷路試験による空間学習能と海馬スライス標本のCA1領域におけるLTPとNMDA活性について調べ、正常なマウスと比較検討した。

対象と方法

本研究は動物実験に関する獨協医科大学の倫理委員会の承認を得たのちに動物実験ガイドラインに沿って実験を行った。

1. 実験動物

ddY/DAO⁺ (正常マウス) と ddY/DAO⁻ (DAO欠損マウス) の交配を2回繰り返し作製したマウス (F₂マウス) を用いた。これらの系統マウスはKonnoら¹⁷⁾ によって長期にわたってF₁間の交配を行ってDAO欠損以外の遺伝的差異による影響が除外されている。DAO⁻マウスと同腹の兄弟をコントロールとして使用した。マウスの遺伝子型は、実験終了後にマウスの尾より同定した。

平成19年10月30日受付, 平成19年11月16日受理
別刷請求先: 渡辺正嗣

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林880
獨協医科大学 麻酔科学

2. Morrisの水迷路試験

Morrisの水迷路試験では、生後2～4ヶ月の正常マウスとDAO欠損マウスの2種類の成熟雄マウスを使用した。

Morris水迷路試験はMorris¹⁸⁾が報告したマウスの高次脳機能の一つである空間認識能を評価するもので、十分な水深の円形プールに被験マウスを泳がせ、水面下に設置したプラットホーム上に逃れることを繰り返し学習させ、プラットホームにたどり着くまでの時間を測定するものである。本研究では、26～29℃に設定した水を満たした直径70cmのプールを使用した。そして、プールの4分の1円内の中心に、泳ぐマウスからは見えないように直径10cmのプラットホームを水深1.5cmに設置した。

入水訓練では、マウスを無作為にプールの東西南北の内側の端から水中に放した。もしマウスが120秒以内にプラットホームにたどり着くことができなかった場合はマウスを人為的にプラットホームに移した。入水訓練は3回の試行を1訓練とし、一日2回の訓練を8日間連続して行った。

そして、マウスの泳いだ軌跡はプールの直上に設定したコンピュータービデオシステムによって記録し、プラットホームに到達するまでの時間（到達時間）を空間認識能として測定し、8日間の経時的な変化を観察した。

3. 海馬スライス標本を用いた電気生理学的検討

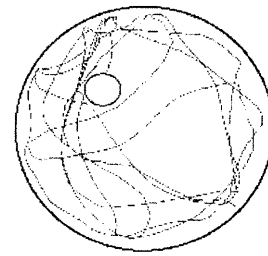
1) スライス標本の作製

マウスの海馬標本の作製はFreyら¹⁹⁾の方法に準じて行った。ペントバルビタール麻酔下に生後6～10週のDAO欠損マウスと正常マウスの2種類の成熟雄マウスを断頭後、脳を摘出し、マイクロスライサー（堂阪EM）により、厚さ400 μ mの海馬スライス標本作製した。そして、スライスを95%O₂、5%CO₂で飽和した人工脳脊髄液（NaCl 124mM, KCl 3.2mM, NaH₂PO₄ 1.25mM, NaHCO₃ 26.0mM, CaCl₂ 2.5mM, MgCl₂ 1.3mM）で灌流した記録チャンバーに移し、実験を行った。

2) 海馬スライス標本のCA1領域における興奮性シナプス後場電位（fEPSP）の記録

fEPSPの記録はPower JMらの²⁰⁾方法に準じて行った。正立顕微鏡に装備したノマルスキー微分干渉装置によって、海馬のCA1領域を直視し、放線状層に3MのNaCl（1～5M Ω ）で満たした記録用微小ガラス電極を置いて、CA1領域のSchaffer側枝をタングステン微小電極により刺激し、観察されるfEPSPを記録した。刺激の強さは、fEPSPの電圧が1.5mV以下になるように調節し、

Dアミノ酸化酵素欠損マウス



正常マウス

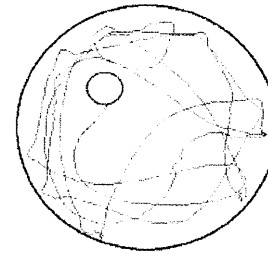


図1 コンピュータービデオシステムによって記録されたMorrisの水迷路における訓練1日目（1回目）のマウスが泳いだ軌跡の実例。

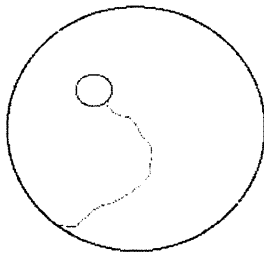
両マウスとも、水迷路に放たれた後にプラットフォームに達するまでに相当の距離を泳いでいた。

fEPSPは増幅装置を介してコンピューター処理することによって記録した（instruNetとSuperScopeII, MA, USA）。そして、LTPは1秒間の高頻度刺激（100 Hz）後のfEPSPの傾きの変化を観察することによって評価した。なお、fEPSPの傾きは得られたfEPSPの波形をSuperScopeII softwareにより解析し、高頻度刺激前の値に対する変化率として算出した。

3) 海馬スライス標本のCA1領域錐体細胞からの興奮性シナプス後電流（EPSC）の記録

正立顕微鏡に装備したノマルスキー微分干渉装置によって、海馬のCA1領域を直視し、Otsuboら²¹⁾の方法によりホールセルパッチクランプ記録を行った。ホールセルパッチクランプ記録は、Cs gluconate 122.5mM, CsCl 17.5mM, EGTA 0.2mM, HEPES 10mM, NaCl 8mM, Mg-ATP 2mM, Na₃-GTP 3mMの組成の内液（pH 7.2）を満たしたガラス管電極を記録する錐体細胞の細胞膜に密着させ、ギガシールを形成した後にガラス管電極に陰圧を掛けることにより細胞膜を破り、膜電位を固定して行った。そして、海馬CA1領域に置いたタングステン微小電極によりSchaffer側枝を電気刺激することにより誘発されるEPSCを記録した。更に、EPSCを、膜電位を-70mVに固定して50 μ MのAPV存在下に観察され

Dアミノ酸化酵素欠損マウス



正常マウス

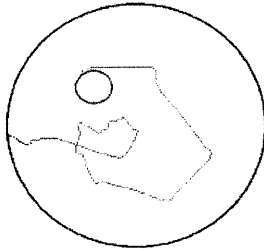


図2 コンピュータービデオシステムによって記録されたMorrisの水迷路における訓練8日目(16回目)のマウスが泳いだ軌跡の実例。

両マウスとも、水迷路に放たれた後にプラットフォームに達するまで距離は短くなっていたが、Dアミノ酸化酵素欠損マウスでは正常マウスと比較してより短かった。

る non-NMDA (AMPA) 成分と、膜電位を +50 mV に固定して CNQX5 μ M の存在下に観察される NMDA の成分の2つに分離し、NMDA 成分と non-NMDA 成分の比率を算出した。必要な場合には、正常マウスで NMDA 成分を測定した後、DAO (1 単位/mL) を灌流液に加ええた。

4. 統計学的処理

得られたデータは平均 \pm 標準誤差で表示した。継時的な変化の統計学的処理は一元配置分散分析と Neumann-Keuls post hoc test を用いて、 $p < 0.05$ を統計学的有意差の基準とした。また、DAO 欠損マウスと正常マウスの比較には、二元配置分散分析と two-tailed Student's t 検定で統計学的処理を行い、 $p < 0.05$ を統計学的有意差の基準とした。

結 果

1. Morris の水迷路試験 (空間認識学習能の評価)

Morris の水迷路試験の実例を図1 (訓練1日目, 第1回目), 図2 (訓練8日目, 第16回) に示す。1日目では DAO 欠損マウス ($n = 16$) と正常マウス ($n = 21$) とともにプラットフォームに到達するまでの泳いだ軌跡が長く、両マウス間に差はなかった。8日目では両マウスともプラ

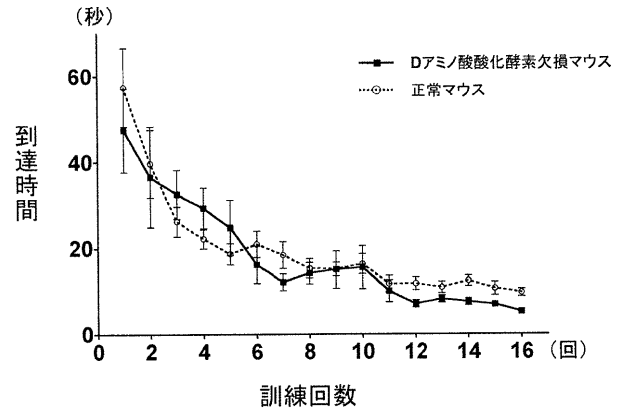


図3 マウスがMorris水迷路に放たれてからプラットフォームに達するまでの時間(到達時間)の訓練期間中の推移。

訓練は1日2回、8日間連続して行われた。到達時間は平均 \pm 標準誤差で示す。両マウスとも訓練開始4回目より、訓練第1回目と比較して有意に到達時間が短縮している。訓練12回目よりDアミノ酸化酵素欠損マウスでは正常マウスと比較して到達時間が有意に短い。

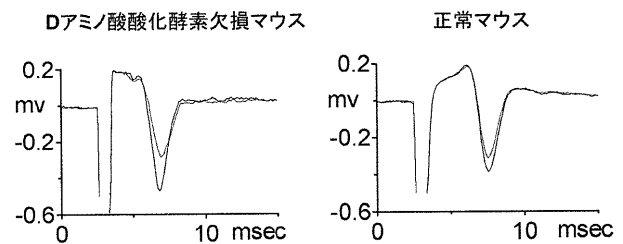


図4 海馬スライス標本のCA1領域における興奮性シナプス後場電流 (fEPSP) の記録の実例。

典型的なDアミノ酸化酵素欠損 (DAO) マウス (a) と正常マウス (b) の高頻度刺激 (100 Hz, 1 秒) 前 (細線) と後 (太線) の fEPSP を示した。Dアミノ酸化酵素欠損マウスでは正常マウスと比較して高頻度刺激後の fEPSP の傾きの増加が多い。

トホームに達するまでの泳いだ軌跡が短くなっているが、DAO 欠損マウスと正常マウス間に明らかな差が生じていた。図3に両マウスの計16回の訓練 (1日2回, 8日間) における到達時間の推移を示す。両マウスとも回数を重ねる度に到達時間が短くなり、両マウスとも4回目以降は初回と比べて到達時間が有意に短縮していた。一方、両マウスの比較では、12回目の訓練以降は DAO 欠損マウスが正常マウスと比べて有意に到達時間が短かった ($p < 0.05$)。

2. 海馬スライス標本のCA1領域における fEPSP の記録 (LTP の評価)

図4に DAO 欠損マウスと正常マウスの高頻度刺激を

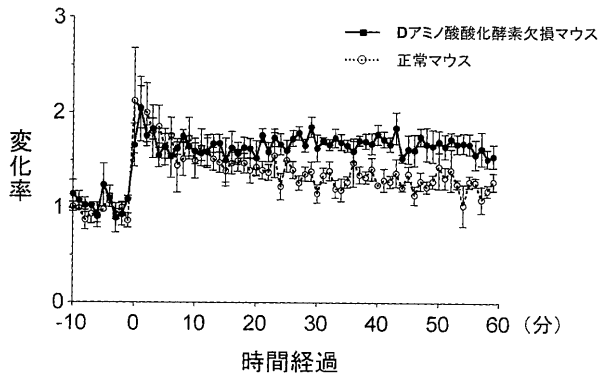


図5 高頻度刺激後の海馬スライス標本のCA1領域における興奮性シナプス後電流 (fEPSP) の傾きの推移。高頻度刺激 (100 Hz, 1秒) 前後のfEPSPの傾きの推移は刺激直前の値を1.0として、その変化率を平均 \pm 標準誤差で示す。高頻度刺激後、両マウスともfEPSPの傾きは有意に大きい。高頻度刺激10分前から10分後まで両マウスのfEPSPの傾きの大きさに有意な差はないが、高頻度刺激後11分から60分までは正常マウスと比較してDアミノ酸化酵素欠損マウスのfEPSPの傾きは有意に大きい ($p < 0.05$)。

与えた前後のfEPSPを示す。DAO欠損マウスが正常マウスと比較して、高頻度刺激後のfEPSPの傾きがより大きくなっていた。図5に両マウスの高頻度刺激10分前から60分後までのfEPSPの傾きの変化率の推移を示す。両マウスとも、高頻度刺激前に比べ高頻度刺激後のfEPSPの傾きの増加が有意に多かった。高頻度刺激10分前から10分後までの間、fEPSPの傾きの変化率に有意な差は認められなかったが、高頻度刺激11分から60分後までのfEPSPの変化率は、DAO欠損マウスは正常マウスと比べて有意に大きかった。

3. 海馬スライス標本のCA1領域錐体細胞からのEPSCの記録 (グルタミン酸受容体成分の評価)

図6に両マウスのNMDAおよびnon-NMDA成分のEPSCsの実例を示す。正常マウスと比較してDAO欠損マウスでは、NMDA成分の大きさが目立った。両マウスのNMDA成分とnon-NMDA成分の比率を図7に示すが、正常マウスと比べてDAO欠損マウスではNMDA成分/non-NMDA成分比は有意に大きかった。 ($p < 0.01$) そして、このNMDA成分/non-NMDA成分比は、灌流液にDAO (1単位/mL) の添加することで減少し、有意な差が見られなかった。

考 察

本研究の結果は、CA1領域のLTPがDAO欠損マウスでは正常なマウスと比較して増強していることを示した。Dアミノ酸の代謝酵素であるDAOが欠損しているマ

Dアミノ酸化酵素欠損マウス

正常マウス

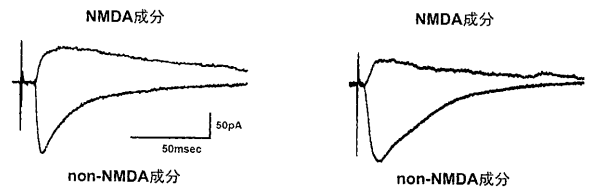


図6 海馬スライス標本のCA1領域錐体細胞からの興奮性シナプス後電流 (EPSC) の記録の実例。

両マウスとも下向きのEPSCは膜電位を -70 mVに固定して $50 \mu\text{M}$ のAPV存在下に観察されるnon-NMDA (AMPA) 成分, 上向きのEPSCsは膜電位を $+50$ mVに固定して $\text{CNQX} 5 \mu\text{M}$ の存在下に観察されるNMDA成分を示す。Dアミノ酸化酵素欠損マウスでは正常マウスと比べて、NMDA成分が大きい。

ウスでは、脳内のDアミノ酸の濃度が上昇していることが報告されている。Dアミノ酸の一つであるDセリンやDアラニンがNMDA受容体グリシン結合部位の作動薬であり、NMDA受容体の機能を増大させる。そのため、DAO欠損マウスの脳内の余剰なDアミノ酸によりNMDA受容体活性は正常マウスと比較して促進されていることが考えられる。事実、本研究において、海馬CA1領域のNMDA成分のシナプス後電流はDAO欠損マウスで顕著となっていることが確認された。そして、このNMDA成分のシナプス後電流はDアミノ酸の分解酵素であるDAOの投与により減弱した。これらの結果は、DAO欠損マウスにおいて、Dアミノ酸の増加が海馬CA1領域のNMDA受容体によって惹起されるLTPを亢進することを示唆している。

海馬の歯状回においてもNMDA受容体によって惹起されるLTPは顕著であり、学習に関与していると考えられている。DAO欠損マウスにおける豊富なDアミノ酸は、歯状回におけるNMDA受容体によって惹起されるLTPを助長するかもしれない。事実、グリシンをはじめDアミノ酸、Dセリン、Dアラニンの投与により海馬のCA1領域や歯状回におけるLTPの発生を助長したことが、多くの報告で示唆されている^{22,23}。それ故に、今回の研究で観察されたDAO欠損マウスにおけるCA1領域のLTPの増大は、歯状回でも観察されると考えられる。

海馬のLTPは学習における細胞レベルの重要な要素と考えられている。DAO欠損マウスが正常マウスと比べて空間認識能が有意に優れているという我々の結果は、豊富なDアミノ酸により増大した海馬のLTPがMorrisの水迷路における学習能力を向上させた可能性が高い。

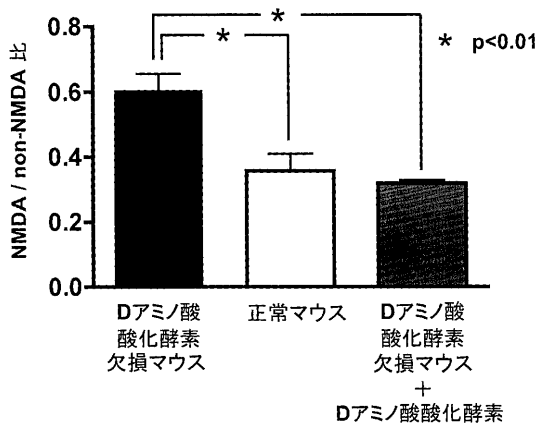


図7 海馬スライス標本のCA1領域錐体細胞からの興奮性シナプス後電流 (EPSC) におけるNMDA成分とnon-NMDA成分の比率とDアミノ酸酸化酵素投与の効果。

Dアミノ酸酸化酵素欠損マウスは正常マウスと比較して、EPSCのnon-NMDA成分に対するNMDA成分の比率が有意に大きい ($p < 0.05$)。Dアミノ酸酸化酵素投与によりこの比率は減少して正常マウスとの有意差が見られなくなった。

Dアミノ酸の一つであるDセリンは主としてNMDA受容体が豊富にある前脳部に存在していると報告されている。DセリンはNMDA受容体のグリシン結合部位に作用し、NMDA受容体の反応を増強する。そして、DAO欠損マウスの前脳部におけるDセリンの濃度は正常マウスと比べて有意に高いとの報告¹⁵⁾もあり、DAO欠損マウスの脳に増えたDセリンが、CA1領域のNMDA受容体を介したLTPを助長し、Morrisの水迷路における学習能力を向上させたと考えられる。

LTPやMorrisの水迷路の学習能力の増強の原因となる他のシナプスの修飾物質として考えられるのが、Dアミノ酸の一つであるDアラニンである。Dアラニンの作用は弱いですが、グリシン結合部位のNMDA受容体の作用物質であり⁸⁾、DAO欠損マウスの海馬のDアラニンの濃度は、正常マウスと比べて5倍に達すると報告されている¹⁶⁾。従って、DAO欠損マウスにおける脳内のDアラニン濃度の上昇はLTPを増強し、水迷路の学習を向上させるであろう。

DAO欠損マウスでは、Dアミノ酸は大脳皮質や海馬付近にも発現しており、これらの脳の部位のDアミノ酸は学習行為に影響すると考えられている。そのため、海馬のDアミノ酸が直接学習行為に影響を及ぼすという事実を証明するためには、DセリンやDアラニンなどのDアミノ酸やDAOを海馬に投与して、その後の空間認識能の変化を観察するなどの更なる研究が必要である。

以上、DAO欠損マウスと正常なマウスを比較すること

で、空間学習に重要な海馬CA1領域のNMDA活性化とそれに引き続くLTPの増強におけるDアミノ酸の役割について調べた。そして、DAO欠損マウスにおける空間学習能の向上は、Dセリンによる海馬CA1領域のNMDA受容体の活性化とLTPの増強が強く関与していることが示唆された。

謝辞 稿を終えるに当たり、ご指導を賜りました獨協医科大学生理学教室 堀雄一教授、前川正夫助教、獨協医科大学麻酔科学教室 北島敏光教授、山口重樹准教授ならびに両教室のスタッフ一同に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Bolhuis JJ, Reid IC. : Effects of intraventricular infusion of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist AP5 on spatial memory of rats in a radial arm maze. *Behav Brain Res*, **10** : 151-157, 1992.
- 2) Korol DL, Abel TW, Church LT, et al. : Hippocampal synaptic enhancement and spatial learning in the Morris swim task. *Hippocampus*, **3** : 127-132, 1993.
- 3) Morris RG, Anderson E, Lynch GS, et al. : Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*, **319** : 774-776, 1986.
- 4) Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG. : Synaptic plasticity and memory : an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci*, **23** : 649-711, 2000.
- 5) Okada T, Yamada N, Tsuzuki K, et al. : Long-term potentiation in the hippocampal CA1 area and dentate gyrus plays different roles in spatial learning. *Eur J Neurosci*, **17** : 341-349, 2003.
- 6) Sakimura K, Kutsuwada T, Ito I, et al. : Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Nature*, **373** : 151-155, 1995.
- 7) Kemp JA, Leeson PD. : The glycine site of the NMDA receptor--five years on. *Trends Pharmacol Sci*, **14** : 20-25, 1993.
- 8) Kleckner NW, Dingledine R. : Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science*, **241** : 835-837, 1988.
- 9) Vyklícký L Jr, Benveniste M, Mayer ML. : Modulation of N-methyl-D-aspartic acid receptor desensitization by glycine in mouse cultured hippocampal neurones. *J Physiol*, **428** : 313-331, 1990.

- 10) Fisher GH, D'Aniello A, Vetere A, et al. : Free Aspartate and Alanine in normal and Alzheimer brain. *Brain Res Bull*, **26** : 983-985, 1991.
- 11) Hashimoto A, Nishikawa T, Hayashi T, et al. : The presence of free Dserine in rat brain. *FEBS Lett*, **296** : 33-36, 1992.
- 12) Hashimoto A, Oka T. : Free Aspartate and Dserine in the mammalian brain and periphery. *Prog Neurobiol*, **52** : 325-353, 1997.
- 13) Nagata Y, Horiike K, Maeda T. : Distribution of free Dserine in vertebrate brains. *Brain Res*, **634** : 291-295, 1994.
- 14) Schell MJ, Molliver ME, Snyder SH. : Dserine, an endogenous synaptic modulator : localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92** : 3948-3952, 1995.
- 15) Hashimoto A, Nishikawa T, Konno R, et al. : Free Dserine, Aspartate and Alanine in central nervous system and serum in mutant mice lacking Damino acid oxidase. *Neurosci Lett*, **152** : 33-36, 1993.
- 16) Morikawa A, Hamase K, Inoue T, et al. : Determination of free Aspartic acid, Dserine and Alanine in the brain of mutant mice lacking Damino acid oxidase activity. *J Chromatogr B Biomed Sci*, **757** : 119-125, 2001.
- 17) Konno R, Yasumura Y. : Mouse mutant deficient in Damino acid oxidase activity. *Genetics*, **103** : 277-285, 1983.
- 18) Morris RG. : Synaptic plasticity and learning : selective impairment of learning in rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-DAspartate receptor antagonist AP5. *J Neurosci*, **9** : 3040-3057, 1989.
- 19) Frey U, Müller M, Kuhl D. : A different form of long-lasting potentiation revealed in tissue plasminogen activator mutant mice. *J Neurosci*, **16** : 2057-2063, 1996.
- 20) Power JM, Thompson LT, Moyer JR Jr, et al. : Enhanced synaptic transmission in CA1 hippocampus after eyeblink conditioning. *J Neurophysiol*, **78** : 1184-1187, 1997.
- 21) Otsubo T, Nakamura Y, Nagai T, Hori Y. : Facilitatory action of halothane at subanesthetic concentrations on glutamatergic excitatory synaptic transmission in the CA1 area of adult rat hippocampus. *Neurosci Lett*, **337** : 139-142, 2003.
- 22) Mizutani A, Saito H, Abe K. : Evidence for involvement of endogenous glycine in the induction of long-term potentiation in the dentate gyrus of anesthetized rats. *Eur J Pharmacol*, **205** : 303-305, 1991.
- 23) Watanabe Y, Saito H, Abe K. : Effects of glycine and structurally related amino acids on generation of long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Eur J Pharmacol*, **223** : 179-184, 1992.