

## 平成20年度 研究戦略プロジェクト事業 研究成果報告書

平成21年7月1日

公立大学法人横浜市立大学  
理事長 様

平成20年度 研究戦略プロジェクト事業 (W20009) で行った研究成果等は下記のとおりです。

### 記

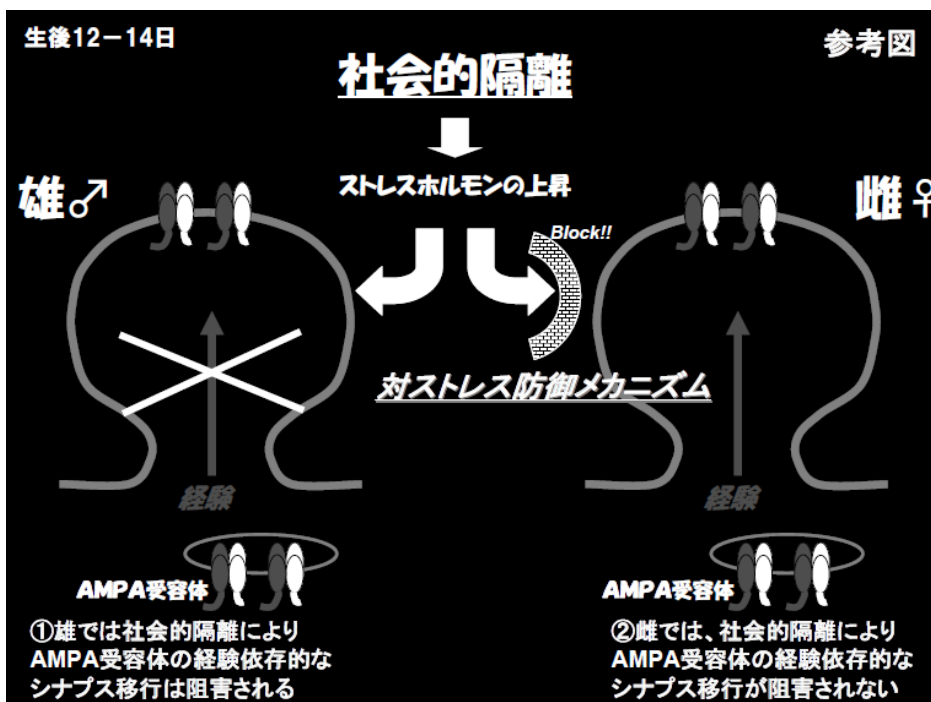
1 研究者情報	研究代表者氏名 (所属・職位)	多田 敬典 (大学院医学研究科生理学・助教)			
	2 事業情報	新規・継続の分け			
	研究費の区分	若手人材育成推進費 (自然科学)			
	研究課題名	幼児期における社会的隔離が経験依存的なAMPA受容体のシナプス移行に及ぼす影響の分子メカニズムとその性差の検討			
	研究実施期間	平成20年7月1日 ~ 平成21年3月31日			
	研究ユニットの構成 ※研究代表者も含む ※研究計画書と相違のないようご注意ください。	所属名・企業名等	役職名	氏名	役割
		横浜市立大学大学院 医学研究科生理学	助教	多田敬典	電気生理学的解析 分子生物学的解析
3 研究概要					
<p>幼少期の経験は、その後の発達に多大な影響を及ぼす。また、その影響には顕著な性差が認められる。提案者の研究室では現在までに、生後まもない時期に社会的隔離をほどこした雄性ラットにおいてグルタミン酸受容体の一つAMPA受容体が経験依存的にシナプスへの移行が阻害されることにより、脳内の回路形成に影響がもたらすことが示されてきた。本研究では、その分子メカニズムに迫るべく社会的隔離されたラットサンプルを用い、プロテオミクス解析を行う。さらに雌性ラットを用いることにより、幼少期の社会的隔離の影響に性差が生じるのか雄性ラットとの比較解析を行う。</p> <p>本研究は、幼児期の社会的隔離に端を発する精神疾患の治療薬開発にもつながると予想される。また、その影響の性特異性を分子レベルで解明することにより、創薬開発の性別化という全く新しい概念を提唱することができ、近年最も注目を集めている各性に適した医療を実現する性差医療への多大な貢献が期待される。</p>					

#### 4 研究成果

※研究成果については、2,000 字程度で記入して下さい。(絵、図入りも可)

※地域貢献促進費の方は課題提案者に提出する報告書(必須)をご提出頂きますので、この欄は記載しないで結構です。その他の方は別紙を用意せず、この枠の中に記入するようにして下さい。(枚数は問いません)

ラットの幼児期である生後 8 日から 10 日はバレル皮質第 4 層から第 2/3 層へのシナプスが形成され始める時期であるが、この時期に AMPA 受容体の一つ GluR1 がひげの経験依存的にシナプスへ移行することが組替え AMPA 受容体を用いた「電気生理学的標識」と *in vivo* インジェクション法を組み合わせた方法で明らかにされている(Takahashi et al., Science, 2003)。ストレスの一つである社会的隔離(生後 7 から 11 日目の間、毎日 6 時間ラットを母親および他のラットから隔離)を施すと経験依存的なバレル皮質における生後 12-14 日目の GluR1 のシナプス移行がストレスホルモンの血中濃度の上昇により雄ラットで阻害される(Miyazaki et al., preliminary data : 参考図①)。



ストレスには性差が生じるとされる報告が多数あり(Tolin DF & Foa EB, Psychol Bull, 2006)、社会的隔離においても行動学的研究から性差が生じることが知られていることから(Sandstrom et al, Horm Behav., Behav Brain Res., 2005)、提案者は、社会的隔離による AMPA 受容体のシナプス移行にも性差が生じ、AMPA 受容体を通して社会的隔離を始めとしたストレスメカニズムに迫れると考え研究を行った。

雌ラットでも、雄同様に社会的

隔離(生後 7 から 11 日目)を施すとストレスホルモンの血中濃度の上昇が優位に見られた。にもかかわらず、生後 12-14 日目の GluR1 のシナプス移行が阻害されず、正常なシナプス移行がされることを発見した(Tada et al., preliminary data, 参考図②)。また面白いことに生後 1 日目にテストステロンプロピオネイトを処置して脳を雄性化した雌ラットで社会的隔離後に同様の電気生理学的解析を行うと、雄ラットと同じく GluR1 のシナプス移行が阻害された。このことから脳の性分化も社会的隔離による AMPA 受容体のシナプス移行阻害機構の一つの要因になることが示唆された。

さらにストレスホルモンを正常ラットに投与(生後 7 から 11 日目の間、毎日コルチコステロンを 4.17ug 投与、母親および他のラットから隔離しない)すると、血中でのストレスホルモンは雄・雌ラットどちらも社会的隔離時と同様の上昇を示した。しかしながら、AMPA 受容体のシナプス移行に関しては社会的隔離を施したラット同様に雄では生後 12-14 日目の GluR1 のシナプス移行が阻害されたが、雌では阻害されることはなかった。以上の結果より、雌ラットバレル皮質細胞内においてはストレスに耐えうるストレス防御メカニズムが存在し、それがストレスによる AMPA 受容体の修飾異常を防ぐことにより、正常なシナプス移行を可能にしていると考えさらに研究を進めた。

AMPA 受容体の修飾異常を解析するのに、GluR1 をバレル皮質より精製し、横浜市立大学生体超分子相関科学研究室(プロテオミクス解析センター)の平野久研究室と共同で質量分析機による解析を行った。バレル皮質では GluR1 の発現が少ないことから、SBP(Streptavidin Binding Peptide)を付加した GluR1 をバレル皮質内で高発現させ TAP(Tandem Affinity Purification)法に精製を試みた。社会的隔離を施したラットと社

会的隔離をしていないコントロールラット、さらにそれぞれの雄と雌のラットのバレル皮質から SBP-GluR1 タンパク質を精製し、iTRAQ 法によりすべてのペプチドを同時にラベル化し、社会的隔離による GluR1 の修飾変化、結合分子の変化を質量分析機 (LC/MSMS) により網羅的に同定・定量を試みた。計 5 回による iTRAQ 法・質量分析により、コントロール雄・雌ラット、社会的隔離を施した雌ラットで変化せずに、社会的隔離を施した雄ラットのみで変化したいくつかの分子の同定に成功した。現在同定したタンパク質を発現もしくはノックダウンさせることにより社会的隔離の効果を電気生理学的、分子生物学的に解析中であり、社会的隔離の詳細な分子メカニズムの解明につながるものと予想される。同時にストレスにより引き起こされる精神疾患に対する効果的な創薬のターゲットになりうると考えられる。

## 5 研究成果の活用 (予定)

例) 平成 22 年度 科学研究費補助金 (基盤 S) に申請予定

例) 第〇会 〇〇学会に論文発表予定

例) 研究成果が横浜市〇〇事業に活用され、当該事業の PR イベントが開催された際に広報チラシ等に「横浜市立大学 研究戦略プロジェクト事業」との関連を記載した。

- ・平成 22 年度 科学研究費補助金若手研究 (B) へ申請予定
- ・第 36 回国際生理学会世界大会 研究成果発表予定
- ・第 32 回日本神経科学大会 研究成果発表予定

※ページ数は増えても構いません。

以上