

海馬細胞外 Zn^{2+} 流入を介した
神経細胞内 Zn^{2+} 動態制御の破綻による認知機能障害

Cognitive decline by dysregulation of intracellular Zn^{2+} dynamics
via extracellular Zn^{2+} influx in the hippocampus

本論文は静岡県立大学大学院薬学研究科

博士論文である

2018 年 12 月

December 2018

静岡県立大学 薬学部 統合生理学

鈴木 美希

Miki Suzuki

略語表

本論文で用いた略語を以下に示す

ACSF	artificial cerebrospinal fluid
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptor
CA	cornus ammonis
CaEDTA	ethylenediaminetetraacetic acid, calcium, disodium salt
CaMKII	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione
DG	dentate gyrus
DMSO	dimethyl sulfoxide
fEPSP	field excitatory postsynaptic potential
GABA	gamma-aminobutyric acid
GC	glucocorticoid
Glu	glutamate
HFS	high frequency stimulation
HPA	hypothalamic-pituitary-adrenal
LTP	long-term potentiation
LTD	long-term depression
MC	mineralocorticoid
NMDAR	<i>N</i> -methyl- <i>D</i> -aspartate receptor
PS	population spike
ROI	region of interest
SEM	standard error of the mean

目次

緒論	1
本論	5
第1章 認知機能に対する海馬CA1細胞内 Zn^{2+} シグナリングの関与	5
1-1 序論	5
1-2 実験方法	7
1-2-1 実験動物	7
1-2-2 試薬の調製	7
1-2-2-1 ZnAF-2DA（細胞内 Zn^{2+} キレーター、細胞内 Zn^{2+} 蛍光プローブ）	7
1-2-2-2 Calcium orange AM（細胞内 Ca^{2+} 蛍光プローブ）	7
1-2-2-3 CaEDTA（細胞外 Zn^{2+} キレーター）	7
1-2-2-4 KCl	7
1-2-3 全脳スライスの作成	8
1-2-4 麻酔下CA1 LTPの誘導	8
1-2-5 海馬CA1細胞内 Zn^{2+} イメージング	8
1-2-5-1 麻酔下ラット海馬CA1へのZnAF-2DA投与	8
1-2-5-2 細胞内 Ca^{2+} および Zn^{2+} 蛍光強度の測定	9
1-2-6 物体認識試験	9
1-2-6-1 海馬CA1へカニューレを挿入した動物の作成	9
1-2-6-2 物体認識試験	9
1-3 実験結果	10
1-3-1 細胞外および細胞内 Zn^{2+} キレーターによる海馬CA1領域のLTP誘導の抑制	10
1-3-2 ZnAF-2DAによる海馬CA1領域細胞内 Zn^{2+} キレート効果	12
1-3-3 海馬CA1領域への細胞内 Zn^{2+} キレーター投与による物体認識記憶の獲得障害	14
1-3-4 海馬CA1領域への $ZnCl_2$ またはKCl投与による物体認識記憶の獲得障害	16
1-3-5 $ZnCl_2$ 灌流による海馬CA1 LTP誘導の障害	17
1-4 考察	20
第2章 ストレス負荷によるグルココルチコイドを介した学習記憶障害に対する海馬CA1細胞内 Zn^{2+} シグナリングの関与	23
2-1 序論	23
2-2 実験方法	25
2-2-1 試薬の調製	25
2-2-1-1 コルチコステロン	25

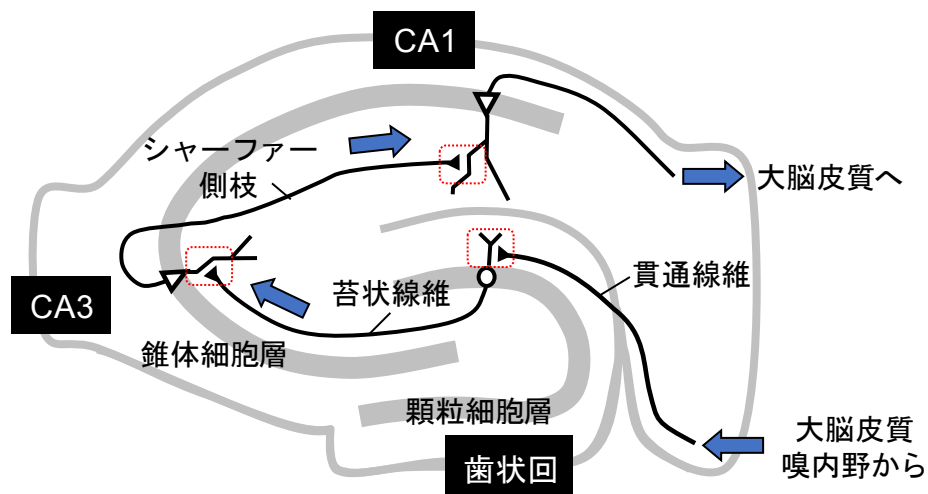
2-2-1-2 ZnAF-2 (細胞外 Zn^{2+} 蛍光プローブ)	25
2-2-1-3 CNQX (AMPA受容体阻害剤)	25
2-2-1-4 スピロノラクトン (ミネラルコルチコイド受容体阻害剤)	25
2-2-1-5 ミフェプリストン (グルココルチコイド受容体阻害剤)	25
2-2-2 水浸ストレス負荷	25
2-2-3 海馬スライスの作成	25
2-2-4 <i>In vivo</i> マイクロダイアリシスでのコルチコステロン灌流時の海馬細胞外 Zn^{2+} の測定	26
2-2-4-1 麻酔下ラット海馬CA1へのコルチコステロンの灌流	26
2-2-4-2 細胞外 Zn^{2+} 濃度の測定	26
2-2-5 <i>In vivo</i> 海馬細胞内 Zn^{2+} イメージング	26
2-2-5-1 麻酔下ラットにおけるコルチコステロン投与後の細胞内 Zn^{2+} イメージング	26
2-2-5-2 覚醒下ラットにおける水浸ストレス負荷後の細胞内 Zn^{2+} イメージング	26
2-2-6 <i>In vitro</i> イメージング	27
2-2-6-1 細胞内 Zn^{2+} および細胞内 Ca^{2+} イメージング	27
2-2-6-2 細胞外 Zn^{2+} イメージング	27
2-2-7 <i>In vivo</i> CA1 LTPの誘導	27
2-2-7-1 麻酔下 <i>in vivo</i> CA1 LTPの誘導	27
2-2-7-2 覚醒下 <i>in vivo</i> CA1 LTPの誘導	28
2-2-8 リン酸化CaMKIIタンパク質発現量の検出	28
2-3 実験結果	29
2-3-1 コルチコステロン灌流による海馬CA1の細胞外 Zn^{2+} の増加	29
2-3-2 コルチコステロンによる海馬CA1の細胞内 Zn^{2+} の増加	30
2-3-3 コルチコステロンによるAMPA受容体活性化を介した細胞内 Zn^{2+} レベルの増加	31
2-3-4 コルチコステロンによるLTP誘導の減弱と Zn^{2+} の関与	32
2-3-5 コルチコステロン灌流後のCA1 LTP誘導の減弱に対する Zn^{2+} の関与	35
2-3-6 コルチコステロン灌流によるリン酸化CaMKIIタンパク質発現量の減少に対する Zn^{2+} の関与	37
2-3-7 コルチコステロンによるLTP抑制に対するミネラルコルチコイド受容体およびグルココルチコイド受容体の関与	38
2-3-8 コルチコステロンによる細胞内外の Zn^{2+} 動態の変化に対するミネラルコルチコイド受容体およびグルココルチコイド受容体の関与	40
2-3-9 コルチコステロンによる細胞外 Zn^{2+} 増加に対するミネラルコルチコイド受容体の関与	43
2-3-10 コルチコステロンによるCaMKIIリン酸化タンパク質発現量の減弱に対するミネラルコルチコイド受容体の関与	44
2-3-11 水浸ストレス負荷による海馬CA1細胞内 Zn^{2+} の増加	45

2-3-12 水浸ストレス負荷による覚醒下海馬CA1 LTPの減弱に対する Zn^{2+} の関与	46
2-4 考察	47
第3章 海馬歯状回顆粒細胞内への過剰な Zn^{2+} 流入による認知機能障害	51
3-1 序論	51
3-2 実験方法	53
3-2-1 麻酔下 <i>in vivo</i> DG LTPの誘導	53
3-2-2 <i>In vivo</i> 海馬歯状回細胞内 Zn^{2+} イメージング	53
3-2-3 海馬歯状回へ局所投与後の物体認識試験	53
3-3 実験結果	55
3-3-1 高カリウム刺激による海馬歯状回LTP誘導の障害と物体認識記憶獲得障害に対する Zn^{2+} の関与	55
3-3-2 LTP誘導後または学習後の高カリウム刺激による歯状回LTP誘導の障害または物体認識記憶の獲得障害に対する Zn^{2+} の関与	58
3-3-3 高カリウム刺激による海馬歯状回の細胞内 Zn^{2+} の増加	61
3-4 考察	64
総括	65
謝辞	66
参考文献	67

緒論

人間は、新しい情報を学習し、記憶として保持する。それら学習と記憶のシステムが失われた世界とは、人も場所も言葉もその全てが理解できない、嬉しかったことも悲しかったことも楽しかったこともその全てが思い出せない、そんな世界であろうか。その世界での生活が困難であることは明確であり、我々にとって学習と記憶は欠かせない機能であることを再認させられる。しかし、我々の脳において、多くの情報がどのように処理されて記憶されるのか、一方で保持された記憶が消失するのか、それら解析は急速に進んではいるものの、その全貌は未だに明らかではない。したがって、記憶が形成され、ときに障害される機構を解析することは、我々の生活の質を上げ、認知機能の障害メカニズムの解明や治療にも繋がる。

海馬は、学習・記憶に関与する脳領域である。海馬の損傷により、経験した出来事を記憶できなくなる前向性の健忘が生じる^[1]。視覚や嗅覚などの各感覚器官からの情報は、大脳皮質で受け取られた後、嗅内野から貫通線維を介して海馬歯状回顆粒細胞（貫通線維－歯状回顆粒細胞シナプス）に入力され、苔状線維を介して海馬 CA3 錐体細胞（苔状線維－海馬 CA3 錐体細胞シナプス）、シャーフアー側枝を介して海馬 CA1 錐体細胞（シャーフアー側枝－海馬 CA1 錐体細胞シナプス）へ送られ、再び大脳皮質に戻され、記憶され则认为られている (Scheme. 1) ^[2]。

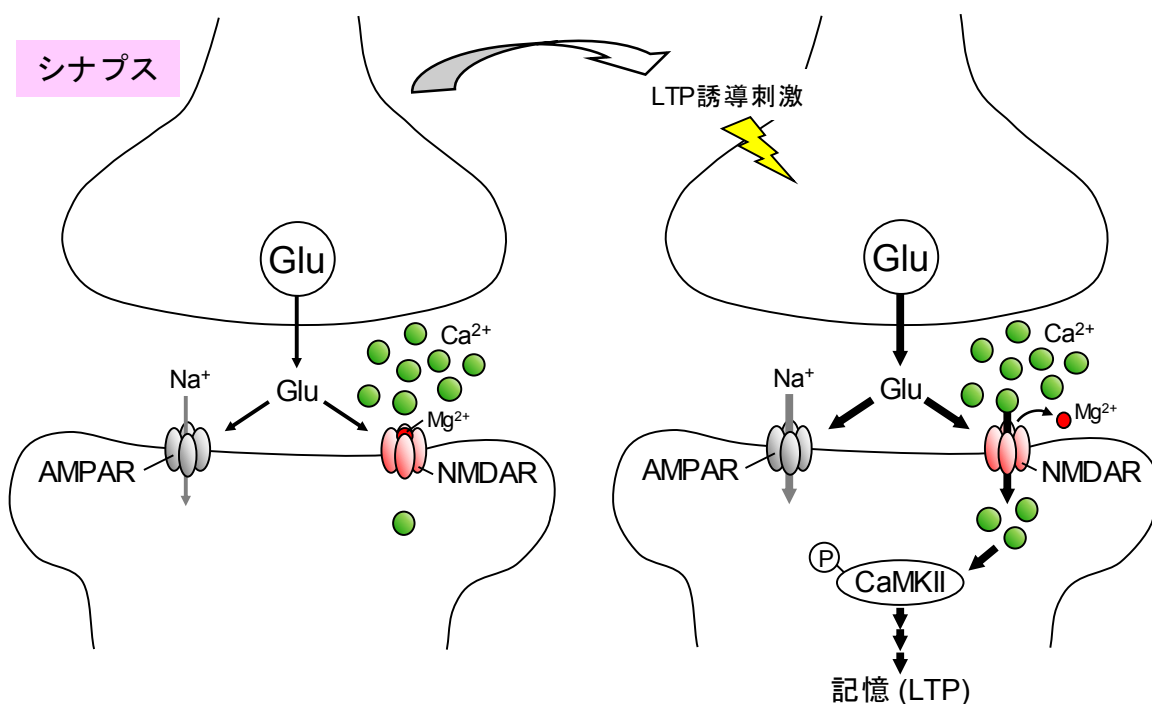


Scheme. 1 Trisynaptic circuit of the hippocampus.

海馬歯状回、CA3、CA1 領域のシナプスは、グルタミン酸作動性神経により形成されている。神経終末からシナプス間隙に放出されたグルタミン酸は、主にシナプス後膜に存在するグルタミン酸受容体の α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptor (AMPA) 受容体や *N*-methyl-*D*-aspartate (NMDA) 受容体を活性化することで、神経細胞間で興奮性のシグナルを伝達する。AMPA 受容体は Na^+ に対する透過性を、NMDA 受容体は Na^+ および Ca^{2+} に対する透過性を示すことが知られている。静止膜電位においては、NMDA 受容体活性化を介した Na^+ や Ca^{2+} 流入は Mg^{2+} によりブロックされているため、プレシナプスからグルタミン酸

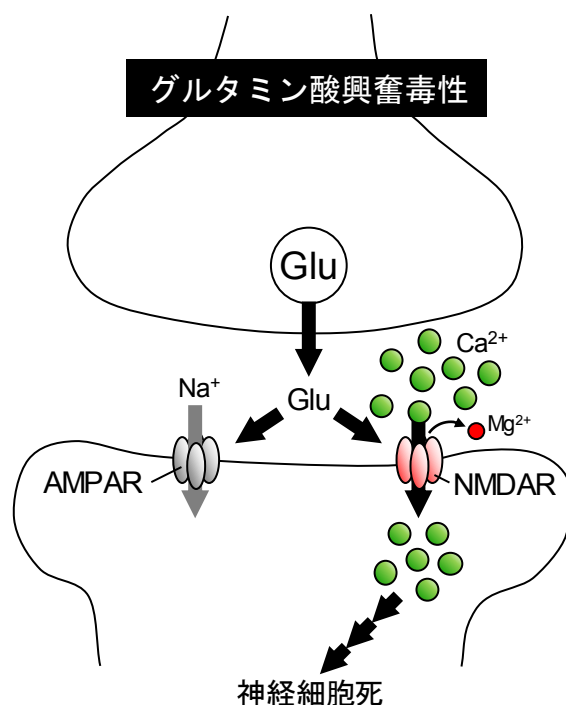
が放出されると、ポストシナプスの AMPA 受容体などが活性化され、細胞内へ Na^+ が流入する (Scheme. 2 左)。細胞内への Na^+ 流入に伴い、ポストシナプスの膜電位がプラス方向に変化 (脱分極) し、興奮性シナプス後電位 (excitatory postsynaptic potential, EPSP) が発生すると、NMDA 受容体の Mg^{2+} のブロックが外れ、細胞内への Ca^{2+} 流入が生じる。

記憶の形成には、シナプスの可塑的な変化が関与する。その一つに、神経伝達効率が增大する長期増強 (long-term potentiation: LTP) が存在する。LTP が、1973 年にウサギの海馬で初めて発見されて以降^[3]、記憶の分子レベルでの解析が盛んに行われてきた^{[4][5]}。海馬の貫通線維-歯状回顆粒細胞シナプスならびにシャーファー側枝-CA1 錐体細胞シナプスにおいて、LTP の誘導は、NMDA 受容体活性化によるポストシナプスへの Ca^{2+} 流入がトリガーとなっている。つまり、テタヌス刺激 (LTP 誘導刺激) によりポストシナプスの脱分極が生じると、NMDA 受容体の Mg^{2+} ブロックが外れ、細胞内へ Ca^{2+} が流入する。テタヌス刺激により細胞内へ流入した Ca^{2+} は、 Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) といった Ca^{2+} 依存性酵素を活性化させ、ポストシナプス膜上への AMPA 受容体の挿入や、ポストシナプスの肥厚を促進することで、神経伝達効率の持続的な増加 (LTP) を引き起す (Scheme. 2 右)。これこそが記憶の分子メカニズムとされている^{[6][7]}。



Scheme. 2 Induction of LTP by influx of Ca^{2+} .

一方で、細胞外グルタミン酸濃度の過剰な増加は、グルタミン酸興奮毒性として知られ、脳虚血、てんかん、さらにはアルツハイマー病などの神経疾患における神経細胞死の共通メカニズムとされている。過剰な細胞外グルタミン酸レベルの上昇は、NMDA 受容体活性化を介して、ポストシナプスへ過剰な Ca^{2+} を流入させ、神経細胞死を惹起させる (Scheme. 3)。したがって、細胞外グルタミン酸シグナルを介した細胞内 Ca^{2+} シグナリングは認知機能に不可欠であり、そのホメオスタシスの破綻は神経疾患と密接に関係する、と広く一般的に考えられている。また、上述のようにほとんどの AMPA 受容体は、 Ca^{2+} に対する透過性は示さないが、そのサブユニットに GluR2 を含まない AMPA 受容体は Ca^{2+} を透過する Ca^{2+} 透過型 AMPA 受容体として知られている^[8]。 Ca^{2+} 透過型の AMPA 受容体は、NMDA 受容体と異なり、 Mg^{2+} によるブロックがないため、近年は虚血や神経変性疾患といったグルタミン酸毒性が惹起されやすく、注目が集まっている^[9]。



Scheme. 3 Neuronal death by excess influx of Ca^{2+} via glutamate-induced activation of NMDA receptors.

海馬には、グルタミン酸とともに亜鉛イオン (Zn^{2+}) を放出する亜鉛作動性シナプスが存在する。すべての苔状線維神経終末、約 50 % のシャーフター側枝神経終末のシナプス小胞に Zn^{2+} は高濃度に存在する (100–300 μM)^[10]。亜鉛は、カルシウムと同様に多くのタンパク質と相互作用するが、細胞外で遊離型として存在する Zn^{2+} は、10 nM 程度であり^[11]、細胞外 Ca^{2+} 濃度 (1.3 mM) と比べ圧倒的に低い。また、 Ca^{2+} と同様に、 Zn^{2+} も、 Ca^{2+} 透過型 AMPA 受容体や NMDA 受容体の活性化を介して細胞内へ取り込まれるため、細胞内 Zn^{2+} は定常時に約 100 pM と極めて低い濃度ではあるが維持されている^[12]。

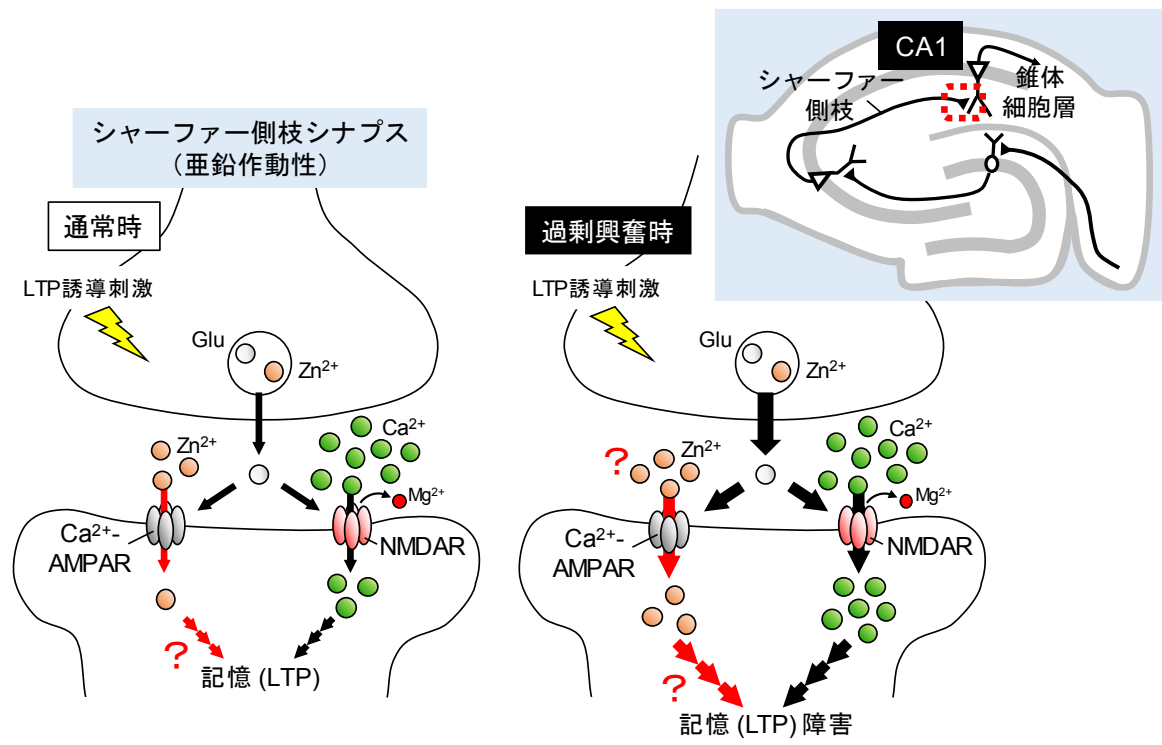
Ca^{2+} と同様に、ピコモルレベルで細胞内に存在する Zn^{2+} も、シグナル因子として働き、記憶の形成に関与するのであろうか。これまでに海馬スライスを用いた *in vitro* の検討が行われ、海馬歯状回、CA3、CA1 領域において、細胞内 Zn^{2+} が LTP 誘導に関与すること^{[13][14]}、細胞内 Zn^{2+} 動態制御の破綻は LTP 誘導を障害すること^[15]が明らかにされてきた。しかし、*in vivo* で海馬 LTP 誘導におけるシナプス Zn^{2+} の役割は明らかでなかった。そこで本研究では、*in vivo* の手法を用いて、グルタミン酸シグナルを介したシナプス Zn^{2+} シグナリングが認知機能に関与するのか、また、グルタミン酸の過剰なシグナルにより細胞内 Zn^{2+} 動態の制御が破綻すると認知機能が障害されるのか検討した。第一章では、シャーファー側枝—CA1 錐体細胞シナプスにおけるグルタミン酸シグナルを介したシナプス Zn^{2+} 動態と認知機能との関連性を検討した。また、生体にストレスが負荷されると副腎皮質からグルココルチコイドが分泌され、血中グルココルチコイド濃度が上昇し、脳脊髄液中のグルココルチコイド濃度も上昇する。グルココルチコイドには神経終末からのグルタミン酸放出を促進させる作用がある^[16]。すなわち、ストレス負荷により海馬細胞外のグルタミン酸レベルが増加し、認知機能が障害される。第二章では、ストレス負荷時のこの認知機能障害に対する Zn^{2+} の関与を、シナプス Zn^{2+} の神経毒性に脆弱であることが報告されている海馬 CA1 領域において検討した。一方、海馬歯状回領域は神経新生が観察される部位であり、幹細胞の約 50%は神経細胞にはならずアポトーシスを起こす。アポトーシスに伴い細胞内から細胞外に流出した K^{+} により歯状回顆粒細胞は脱分極刺激を受けやすくなると想定される。そこで、第三章においては、グルタミン酸作動性貫通線維の過剰興奮に伴う認知機能障害に対する細胞外 Zn^{2+} の関与を、老化に対して脆弱性が報告されている歯状回領域において検討した。

本論

第1章 認知機能に対する海馬 CA1 細胞内 Zn^{2+} シグナリングの関与

1-1 序論

海馬はグルタミン酸作動性神経回路で、貫通線維－歯状回顆粒細胞、苔状線維－CA3 錐体細胞、シャーファー側枝－CA1 錐体細胞においてシナプスを形成する。脳科学の研究手法の進歩から、各シナプス固有の記憶形成に対する役割も明らかにされつつあり、CA1 領域は空間記憶の獲得に必要であること、CA3 領域は素早い空間記憶の獲得や限られた情報から記憶を想起する場合に必要であることが示されている^[17-19]。しかし、海馬各領域が担う記憶形成に対する役割は、未だ不明な点が多く、 Zn^{2+} の関与についても十分には明らかにされていない。海馬 CA1 領域において、ポストシナプスの NMDA 受容体依存性に誘導される LTP は、電気生理学的な手法を用いて測定できる。シャーファー側枝を電気刺激し、その投射先である放線層で、記録電極周囲のシナプスでの集合電位を記録すると、シナプス伝達効率の指標とされている集合興奮性シナプス後電位 (field excitatory postsynaptic potential, fEPSP) が記録される。そこで、高頻度刺激により fEPSP の傾き (slope) や振幅の大きさ (amplitude) が、上昇した状態が長期的に持続する現象を LTP として記録出来る。これまでに、海馬 CA1 領域において、シャーファー側枝神経終末から細胞外へ放出された Zn^{2+} は、グルタミン酸受容体である Ca^{2+} 透過型 AMPA 受容体活性化を介して CA1 錐体細胞内へ取り込まれ^{[20][21]}、シャーファー側枝－CA1 錐体細胞間の LTP 誘導に関与すること^{[22][14]}が海馬スライスを用いた *in vitro* の検討により示されている。一方で、神経終末から細胞外へ過剰に放出された Zn^{2+} は、 Ca^{2+} 透過型 AMPA 受容体活性化を介してポストシナプスへ流入し、 Ca^{2+} と同様に神経細胞死を惹起することが示された^[23]。これまで Ca^{2+} 蛍光プローブを用いることで、 Ca^{2+} の神経細胞死への関与が報告されてきたが、それら従来の Ca^{2+} 蛍光プローブは、 Ca^{2+} よりも Zn^{2+} に対する親和性が高く (Fura2 は 100 倍^[24])、近年は Ca^{2+} ではなくむしろ Zn^{2+} が神経細胞死を惹起するのではないかと考えられるようになった^[25]。したがって、神経細胞死と同様に、 Zn^{2+} は記憶の形成にも関与する可能性がある。そこで本章では、*in vivo* で海馬 CA1 領域に細胞内および細胞外 Zn^{2+} キレーターを投与し、記憶の分子メカニズムである LTP 誘導に対する作用、物体認識記憶の獲得への作用を検討した。また、シャーファー側枝シナプス過剰興奮による記憶獲得障害への Zn^{2+} の関与を検討するとともに、障害を惹起する細胞外 Zn^{2+} レベルについても検討した (Scheme. 4)。



Scheme. 4

1-2 実験方法

1-2-1 実験動物

5–9 週齢の Wistar 系雄性ラット（日本 SLC（株））を用いた。実験動物は、温度 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ の環境下、8:00–20:00 を明期とする 12 時間明暗周期で飼育し、飼料および飲料水は自由摂取とした。なお、実験動物の取り扱い、静岡県立大学動物実験規定を遵守して行った。

1-2-2 試薬の調製

1-2-2-1 ZnAF-2DA（細胞内 Zn^{2+} キレーター、細胞内 Zn^{2+} 蛍光プローブ）

ZnAF-2DA（積水メディカル（株）より譲渡）を、DMSO（和光純薬工業（株））で 5 mM とし、さらに各実験で利用する溶媒で希釈して用いた。ZnAF-2DA は ZnAF-2 にアセチル基が導入された膜透過型 Zn^{2+} 蛍光プローブであり、細胞内へ取り込まれると、エステラーゼにより膜非透過型の ZnAF-2 となる。細胞内 ZnAF-2 は Zn^{2+} と結合する。また、ZnAF-2 は Zn^{2+} と結合することで緑色の蛍光を発するため、細胞内 Zn^{2+} 検出試薬としても用いた。

1-2-2-2 Calcium orange AM（細胞内 Ca^{2+} 蛍光プローブ）

Calcium orange AM（インビトロジェン（株））を、DMSO で溶解し 10 mM とし、10% Cremophore (SIGMA) 5 μl を添加し、リンゲル液 (119 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.3 mM MgSO_4 , 1.0 mM NaH_2PO_4 , 2.5 mM CaCl_2 , 26.2 mM NaHCO_3 , 11 mM D-グルコース、pH 7.3) で希釈して最終濃度 10 μM として用いた。

1-2-2-3 CaEDTA（細胞外 Zn^{2+} キレーター）

LTP 測定時には、CaEDTA（和光純薬工業（株））を、人工脳脊髄液 (ACSF : 127 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 0.9 mM MgCl_2 , 1.2 mM Na_2HPO_4 , 1.3 mM CaCl_2 , 21 mM NaHCO_3 , 3.4 mM D-グルコース、pH 7.3) で溶解し、最終濃度 1 または 10 mM で用いた。物体認識試験においては、生理食塩水 (NaCl 0.9%) で溶解し、最終濃度 10 mM で用いた。

1-2-2-4 KCl

塩化カリウム（和光純薬工業（株））を生理食塩水で最終濃度 100 mM となるように調製した。

1-2-3 全脳スライスの作成

ラットを断頭し、全脳を取り出した後、氷冷したコリンリンゲル液 (124 mM 塩化コリン、2.5 mM KCl、2.5 mM MgCl₂、1.25 mM NaH₂PO₄、0.5 mM CaCl₂、26 mM NaHCO₃、10 mM グルコース、pH 7.3) で 5 分間冷却した。その後、ビブラトーム (ZERO-1、堂阪イーエム (株)) を用いて、400 μ m の厚さで冠状面の全脳スライスを作成した。

1-2-4 麻酔下 CA1 LTP の誘導

抱水クロラル水溶液で麻酔したラットの頭部をステレオ装置に保定し、2 本のタンゲステン線からなる刺激電極を、Bregma の後方 4.3 mm、右 3.8 mm、深さ 1.8–2.2 mm に、記録電極付き透析膜プローブ (E-A-I-12-01、エイコム (株)) を、Bregma の後方 3.3 mm、右 2.2 mm、深さ 1.8–2.2 mm の位置に挿入した。刺激電極に ISOLATOR (フジサワラボ (株)) を、記録電極に Measurement and Analysis System for LTP (フジサワラボ (株)) を接続し、興奮性シナプス後電位 (fEPSP) を測定した。シャーファー側枝に刺激電極を、その投射先である CA1 錐体細胞層とシナプスを形成する放線層に記録電極を挿入すると、下向きでマイナス電位の fEPSP が観察されるため、fEPSP の傾き (slope) の値を、シナプス活動の強さの指標として測定した。透析膜プローブに ACSF を灌流しながら、fEPSP の slope の最大値の約 30% が現れる電流を用い、0.05 Hz のテスト刺激でベースラインとして、fEPSP をモニターした。高頻度刺激 (100 Hz、0.5 秒、3 回、10 秒間隔または 100 Hz、1 秒、4 回、130 秒間隔) により LTP を誘導した後、テスト刺激で fEPSP のモニターを 60 分間続け、最後の 10 分間の fEPSP slope または amplitude の平均値を誘導された LTP の大きさとして評価した。

1-2-5 海馬 CA1 細胞内 Zn²⁺イメージング

1-2-5-1 麻酔下ラット海馬 CA1 への ZnAF-2DA 投与

ラットに抱水クロラル水溶液 (和光純薬工業 (株)) を腹腔内投与 (30 mg/kg、0.9 % NaCl) し、麻酔した後、頭部をステレオ装置 (NARISHIGE (株)) に固定した。頭蓋骨を露出させた後、Bregma の後方 3.3 mm、左右 1.8 mm の位置に穴を開け、インジェクションカニューレ (CXMI-6、エイコム (株)) を 2.4 mm の深さに挿入した。チューブ (JT-10、エイコム (株)) を通じて、ハミルトンシリンジ (Hamilton Company) を用いて、生理食塩水で 100 μ M に希釈した ZnAF-2DA を、0.25 μ l/min の流速で 4 分間投与し、5 分後に断頭し、全脳スライスを作成した。

1-2-5-2 細胞内 Ca^{2+} および Zn^{2+} 蛍光強度の測定

海馬の各細胞体層を明確に観察するために、全脳スライスを $10\ \mu\text{M}$ の Ca Orange AM 溶液に浸し、30 分間静置し、リングル液中に戻して 20 分以上静置した後、測定に用いた。リングル液 2 ml を満たした Glass Base Dish (IWAKI (株)) に、作成した全脳スライスを移し、共焦点レーザースキャン顕微鏡 (LSM510, Carl Zeiss) にて、対物レンズ 10 倍、スキャン速度 1 Hz で、CA1 錐体細胞層、CA3 錐体細胞層、歯状回顆粒細胞層の Calcium orange (励起波長 543 nm、測定波長 560 nm) と ZnAF-2 (励起波長 488 nm、測定波長 505–530 nm) の蛍光強度を測定した。また、測定開始 30 秒後に、KCl 溶液を最終濃度 50 mM となるよう添加し、さらに 2 分間 ZnAF-2 蛍光強度を測定した。

1-2-6 物体認識試験

1-2-6-1 海馬 CA1 ヘカニューレを挿入した動物の作成

抱水クロラル水溶液で麻酔したラットの頭部をステレオ装置に保定し、Bregma の後方 3.3 mm、左右 1.8 mm の位置に、ステレオ用ガイド (CXSG-6, エイコム (株)) を用いて、ガイドカニューレ (CXG-6, エイコム (株)) を 2.4 mm の深さに挿入した。アロンアルファ (コニシ (株)) を用いて、ガイドカニューレを固定した。1 週間後、ガイドカニューレにインジェクションカニューレを挿入し、覚醒下、生理食塩水で最終濃度 $100\ \mu\text{M}$ に希釈した ZnAF-2DA を、 $0.25\ \mu\text{l}/\text{min}$ の流速で 4 または 8 分間投与した。1 時間後、物体認識試験の Training を行った。

1-2-6-2 物体認識試験

薄暗くした実験室内に、黒色のプラスチック板で四方面および底面を覆った木箱 (675 mm×580 mm×285 mm) を設置した。試験実施前日において Habituation としてラットを木箱の中に置き、10 分間自由に行動させた。試験当日、箱の中に赤色のコップまたは白色の徳利のいずれか片方を 400 mm の間隔で 2 つ設置し、物体を覚えさせるために (Training)、ラットを箱内に置き 5 分間自由に行動させた。1 時間後、箱の中にコップと徳利を同様の間隔で 1 つずつ設置し、物体を覚えていたかテストするために (Test)、ラットを箱内に置き 3 分間自由に行動させ、各オブジェクトに触れている探索時間を記録した。Training で設置したオブジェクトを Familiar、Test で初めて設置したオブジェクトを Novel とし、Novel を認識する割合として、Recognition index を求めた。Training と Test のいずれかで 2 つのオブジェクトに触れている時間が合計で 20 秒以下となった場合、学習不成立とみなし棄却した。

1-3 実験結果

1-3-1 細胞外および細胞内 Zn^{2+} キレーターによる海馬 CA1 領域の LTP 誘導の抑制

ラットから作製した海馬スライスにおいて、細胞外 Zn^{2+} キレーターである CaEDTA または細胞内 Zn^{2+} キレーターである ZnAF-2DA 灌流下、海馬 CA1 領域の LTP 誘導は抑制され、シヤーフアー側枝神経終末から放出された Zn^{2+} が CA1 錐体細胞に取り込まれ LTP の誘導に必要であることが示唆された^[14]。そこで、麻酔下ラットの海馬 CA1 領域において、CaEDTA (1 mM、10 mM) または ZnAF-2DA (0.1 mM) を灌流下、LTP を誘導した。1 mM の CaEDTA の灌流では ACSF 群と比較し、LTP 誘導に変化は無かったが、10 mM の CaEDTA では有意に抑制された (amplitude; ACSF, $177.2 \pm 16.7\%$; 1 mM CaEDTA, $171.0 \pm 9.1\%$; 10 mM CaEDTA, $94.2 \pm 4.4\%$; slope; ACSF, $140.4 \pm 6.3\%$; 1 mM CaEDTA, $158.5 \pm 13.0\%$; 10 mM CaEDTA, $95.5 \pm 4.4\%$) (Fig. 1)。また、ZnAF-2DA の灌流によっても、海馬 CA1 領域の LTP は完全に抑制された (amplitude; ZnAF-2DA, $80.5 \pm 8.0\%$; slope; ZnAF-2DA, $83.0 \pm 6.2\%$) (Fig. 1)。

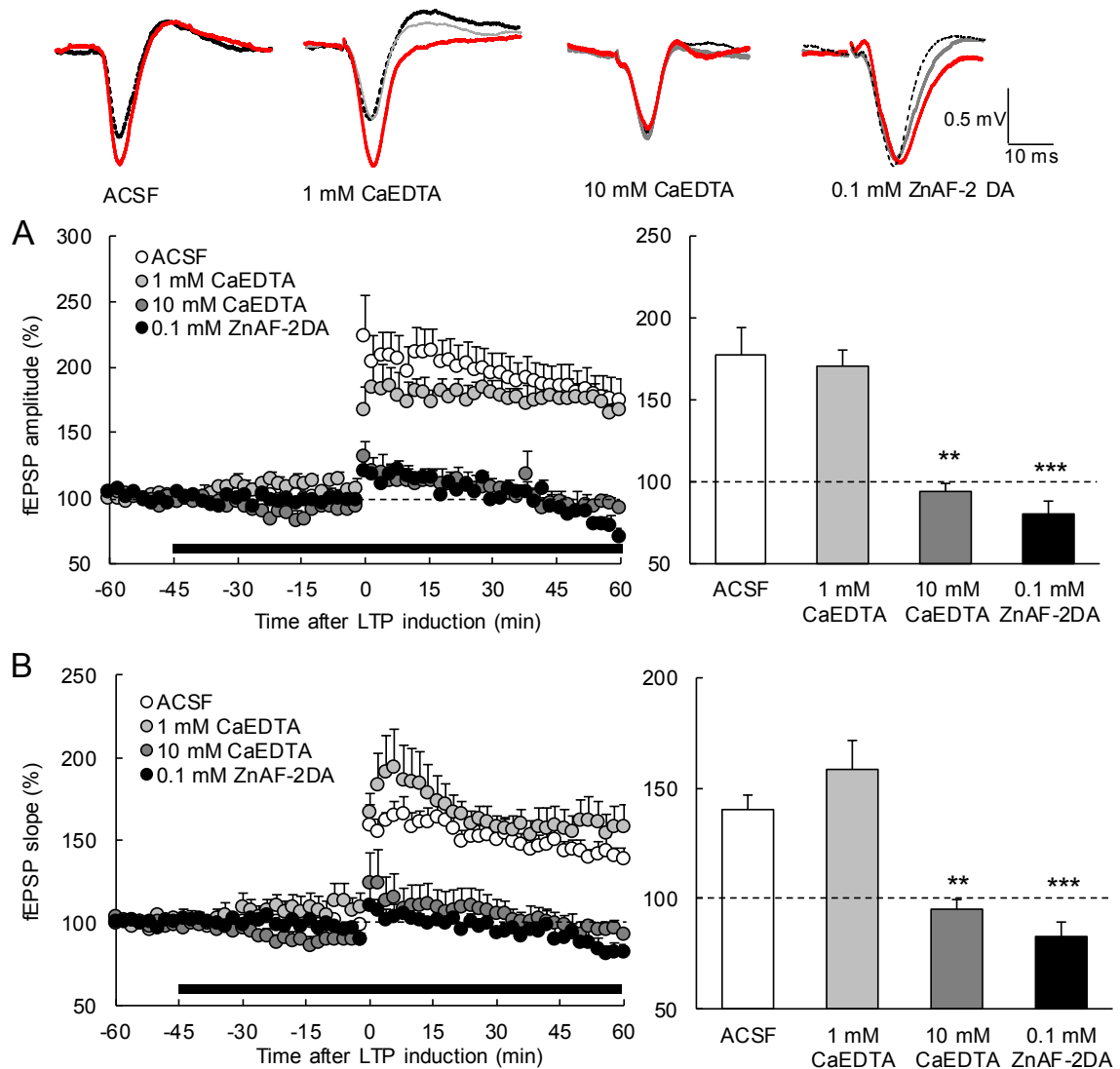


Fig. 1. Involvement of extracellular Zn^{2+} influx in *in vivo* CA1 LTP. The recording region was perfused with ACSF and test stimuli (0.05 Hz) were delivered to the Schaffer collateral/commissural pathway of the anesthetized rats. The perfusate was changed with zinc chelators in ACSF (ACSF, n=7; 1 mM CaEDTA, n=3; 10 mM CaEDTA, n=4; 0.1 mM ZnAF-2DA, n=4) as shown by the black bar. HFS (three trains of 50 pulses at 100 Hz separated by 10 s) was delivered at time 0 min. Representative fEPSP recordings at time -50 (dotted line), -10 (gray line), and 30–60 min (red line) are shown (upper). Each point and line (mean \pm SEM), which is the mean of 120 s, shows fEPSP amplitude (A) and slope (B) (left). Each bar and line (mean \pm SEM) represents the averaged fEPSP amplitude (A) and slope (B) of the last 10 min (right). **p<0.01, ***p<0.001 (Dunnett's test) vs. ACSF.

1-3-2 ZnAF-2DA による海馬 CA1 領域細胞内 Zn^{2+} キレート効果

麻醉下ラット海馬 CA1 領域へ細胞内 Zn^{2+} 蛍光試薬である ZnAF-2DA を局所投与し、1 時間後、海馬スライスを作成し、ZnAF-2 蛍光強度を測定した。ZnAF-2 の蛍光は、投与領域である CA1 領域の放線層においてのみ観察され、歯状回領域では見られなかった (Fig. 2B CA1, DG)。また、非特異的に神経を脱分極させる高カリウム溶液 (50 mM KCl) を添加し、神経を過剰興奮させると、海馬 CA1 領域の ZnAF-2 蛍光強度は増加した (Fig. 2B +KCl)。

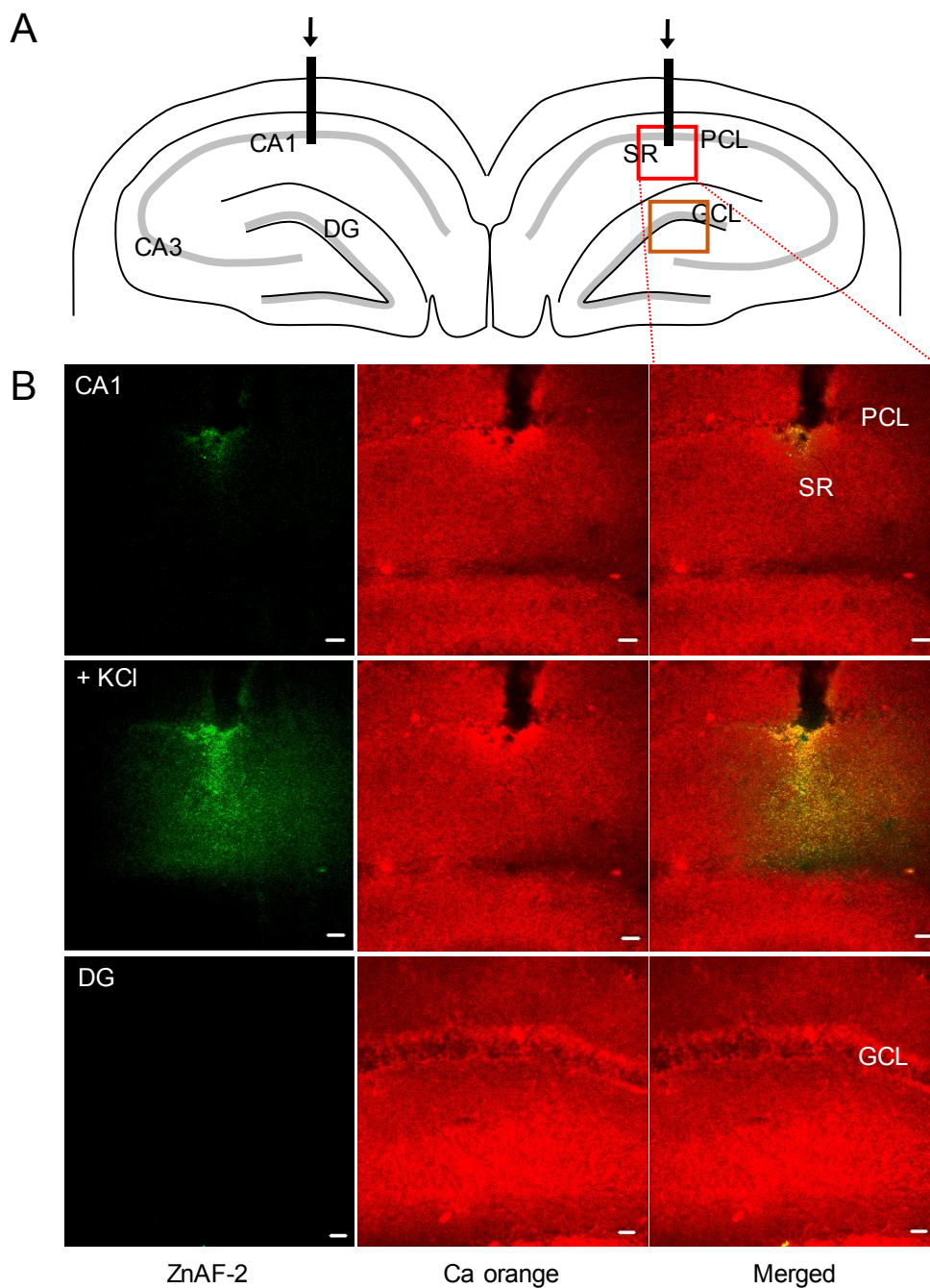


Fig. 2. Chelation of intracellular Zn^{2+} signaling in the CA1. (A) ZnAF-2DA (100 μM) was bilaterally injected into the stratum radiatum in the CA1 of anesthetized rats at the rate of 0.25 $\mu\text{l}/\text{min}$ for 4 min through injection cannulas, as illustrated in the brain map. (B) Brain slices were prepared from rats 1 h after injection. Intracellular fluorescence of ZnAF-2 (left) and calcium orange (middle; merged, right) was measured in the CA1 (the red square) and the dentate gyrus (DG, the dark red square). The upper and lower images are the basal levels in the CA1 and DG, respectively. The middle images are obtained in the CA1 130 sec after stimulation with 50 mM KCl. PCL, pyramidal cell layer; SR, stratum radiatum; GCL, granule cell layer. Bars, 50 μm .

1-3-3 海馬 CA1 領域への細胞内 Zn^{2+} キレーター投与による物体認識記憶の獲得障害

海馬 CA1 領域にインジェクションカニューレを固定したラットに、覚醒下でインジェクションカニューレを介して ZnAF-2DA を投与し、1 時間後に物体認識試験を行った。Training および Test において、ラットが物体に興味を示した時間 (Approach time) は、群間で差が無いことを確認した (Training; saline, $25.2 \pm 2.5\%$; 100 pmol ZnAF-2DA, $28.4 \pm 1.7\%$; 200 pmol ZnAF-2DA, $25.6 \pm 2.6\%$; Test; saline, $24.3 \pm 1.7\%$; 100 pmol ZnAF-2DA, $24.7 \pm 1.9\%$; 200 pmol ZnAF-2DA, $27.1 \pm 1.6\%$) (Fig. 3A)。Saline 投与群では、Training と比較し Test において、ラットが新規物体に興味を示した時間の割合 (Recognition index) は有意に増加したため、物体認識記憶が獲得された (Fig. 3B Saline)。ZnAF-2DA 投与により、Test での recognition index は Saline 群と比較して有意に抑制され、物体認識記憶の獲得が抑制された (recognition index: Training; saline, $50.1 \pm 2.1\%$; 100 pmol ZnAF-2DA, $49.7 \pm 2.4\%$; 200 pmol ZnAF-2DA, $52.7 \pm 1.7\%$; Test; saline, $70.4 \pm 4.6\%$; 100 pmol ZnAF-2DA, $57.5 \pm 3.0\%$; 200 pmol ZnAF-2DA, $48.3 \pm 1.3\%$)。ZnAF-2DA は、濃度依存的に物体認識記憶の獲得を障害した (Fig. 3B)。

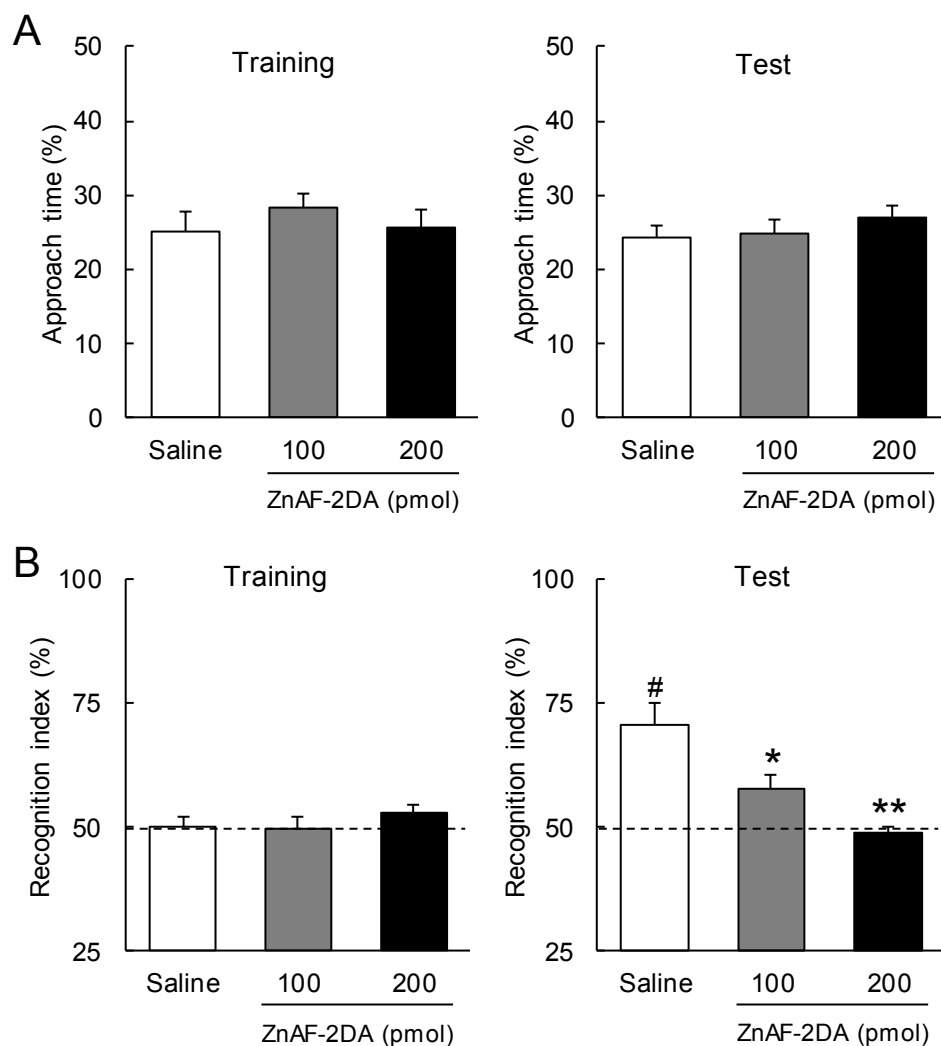


Fig. 3. Memory deficit due to blockade of intracellular Zn^{2+} signaling in the CA1. Twenty-four hours after habituation, ZnAF-2DA (100 μM) in saline was bilaterally injected into the CA1 stratum radiatum of unanesthetized rats at the rate of 0.25 $\mu\text{l}/\text{min}$ for 4 min or 8 min. One hour later, rats were subjected to object recognition test. (A) There is no significance in the approach time to the objects in the training or test (saline, $n=11$; 100 pmol ZnAF-2DA, $n=13$; 200 pmol ZnAF-2DA, $n=7$). (B) Recognition index was not elevated by the pretreatment with ZnAF-2DA. # $p<0.05$ (paired t-test), vs. training: * $p<0.05$; ** $p<0.01$ (Dunnett's test), vs. saline.

1-3-4 海馬 CA1 領域への ZnCl_2 または KCl 投与による物体認識記憶の獲得障害

ラットの海馬 CA1 領域へ固定したインジェクションカニューレを介して覚醒下で塩化亜鉛 (9.8 nmol/rat) を投与し、物体認識試験を行った。Control 群において、Training と比較し Test の Recognition index は有意に増加し、物体認識記憶が獲得された。 ZnCl_2 群において、Test の recognition index は Training と比較して増加せず、物体認識記憶の獲得が障害された (recognition index: Control, $64.0 \pm 2.8\%$; ZnCl_2 , $55.0 \pm 4.7\%$) (Fig. 4A)。また、同様に海馬 CA1 領域へ KCl を投与した後、物体認識試験を行った。Control 群および $\text{KCl}+\text{CaEDTA}$ 群において、Test の Recognition index は Training と比較し有意に増加し、物体認識記憶が獲得された。一方で、 KCl 投与群では、Test の recognition index は Training と比較し増加せず、物体認識記憶の獲得が抑制された (recognition index: Control, $68.9 \pm 3.2\%$; KCl , $59.0 \pm 2.9\%$; $\text{KCl}+\text{CaEDTA}$, $63.2 \pm 3.2\%$) (Fig. 4B) [26]。

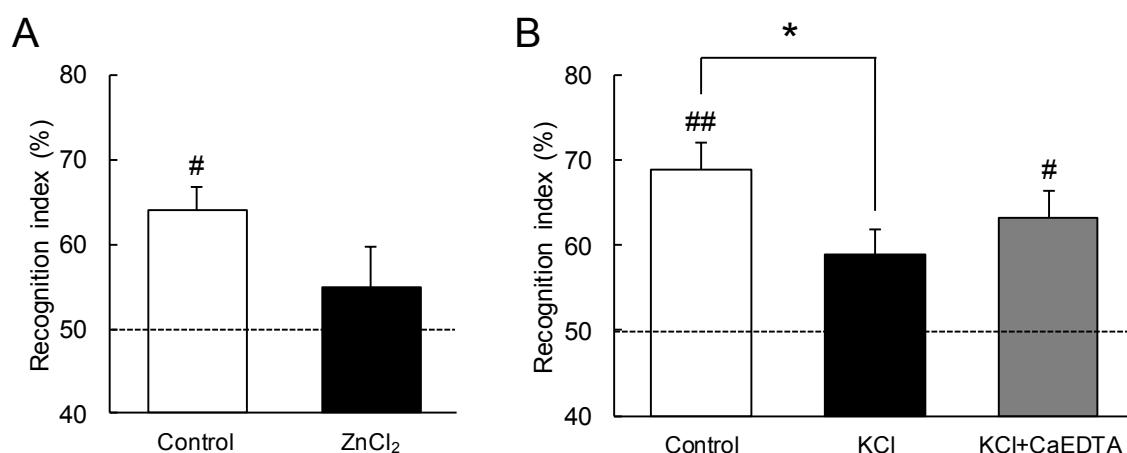


Fig. 4. Memory deficit after injection of ZnCl_2 or KCl into the CA1. (A) Twenty-four hours after habituation, ZnCl_2 in DMSO was bilaterally injected into the CA1 stratum radiatum of unanesthetized rats at the rate of $0.5 \mu\text{l/min}$ for 1 min (Control, $n=3$; ZnCl_2 , $n=9$). One hour later, rats were subjected to object recognition test. Each bar and line represent the mean \pm SEM. #, $p < 0.05$ (paired t-test), vs. training. (B) Twenty-four hours after habituation, KCl 100 mM ($n=15$) and KCl 100 mM + CaEDTA ($n=8$) in saline was bilaterally injected into the CA1 stratum radiatum of unanesthetized rats at the rate of $0.5 \mu\text{l/min}$ for 2 min. One hour later, rats were subjected to object recognition test. Each bar and line represent the mean \pm SEM. #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$ (paired t-test), vs. training; * $p < 0.05$ (Tukey's test), vs. saline ($n=9$).

1-3-5 ZnCl₂ 灌流による海馬 CA1 LTP 誘導の障害

どれほどの細胞外 Zn²⁺レベルが認知機能を障害するのかを明らかにするため、想定される細胞外 Zn²⁺濃度の 10 倍である 0.1 μM ZnCl₂を灌流し、麻酔下ラットの海馬 CA1 領域において LTP を誘導した。LTP 誘導の 60 分前から 60 分後まで 0.1 μM の ZnCl₂灌流下 LTP を誘導すると、fEPSP の slope は抑制されたが、amplitude には変化が見られなかった。同様に想定される細胞外 Zn²⁺濃度の 100 倍である 1 μM の ZnCl₂を灌流すると、fEPSP の slope と amplitude はともにベースレベルが減弱し、LTP 誘導も抑制された (amplitude; ACSF, 203.7±8.5%; 0.1 μM Zn, 201.5±10.1%; 1 μM Zn, 99.4±4.3%; slope; ACSF, 168.2±6.0%; 0.1 μM Zn, 143.6±6.7%; 1 μM Zn, 94.1±8.8%) (Fig. 5A, 5B)。LTP を誘導することなく 1 μM の ZnCl₂を灌流し fEPSP を測定すると、60 分において fEPSP amplitude は 82.3±4.4%、slope は 79.3±5.0%となり、1 μM の ZnCl₂はベースレベルでのシナプス神経伝達を抑制した (Fig. 5A, 5B no LTP)。また、麻酔下ラットの CA1 領域において、1 μM ZnCl₂を LTP 誘導 60 分前から 40 分前まで灌流した群では LTP は抑制されたが、LTP 誘導 10 分前から 10 分後まで灌流した群では LTP は抑制されなかった (ACSF, 172.6±4.4%; Zn²⁺ -60/-40, 146.9±8.5%; Zn²⁺ -10/10, 179.3±3.2%) (Fig. 5C)。

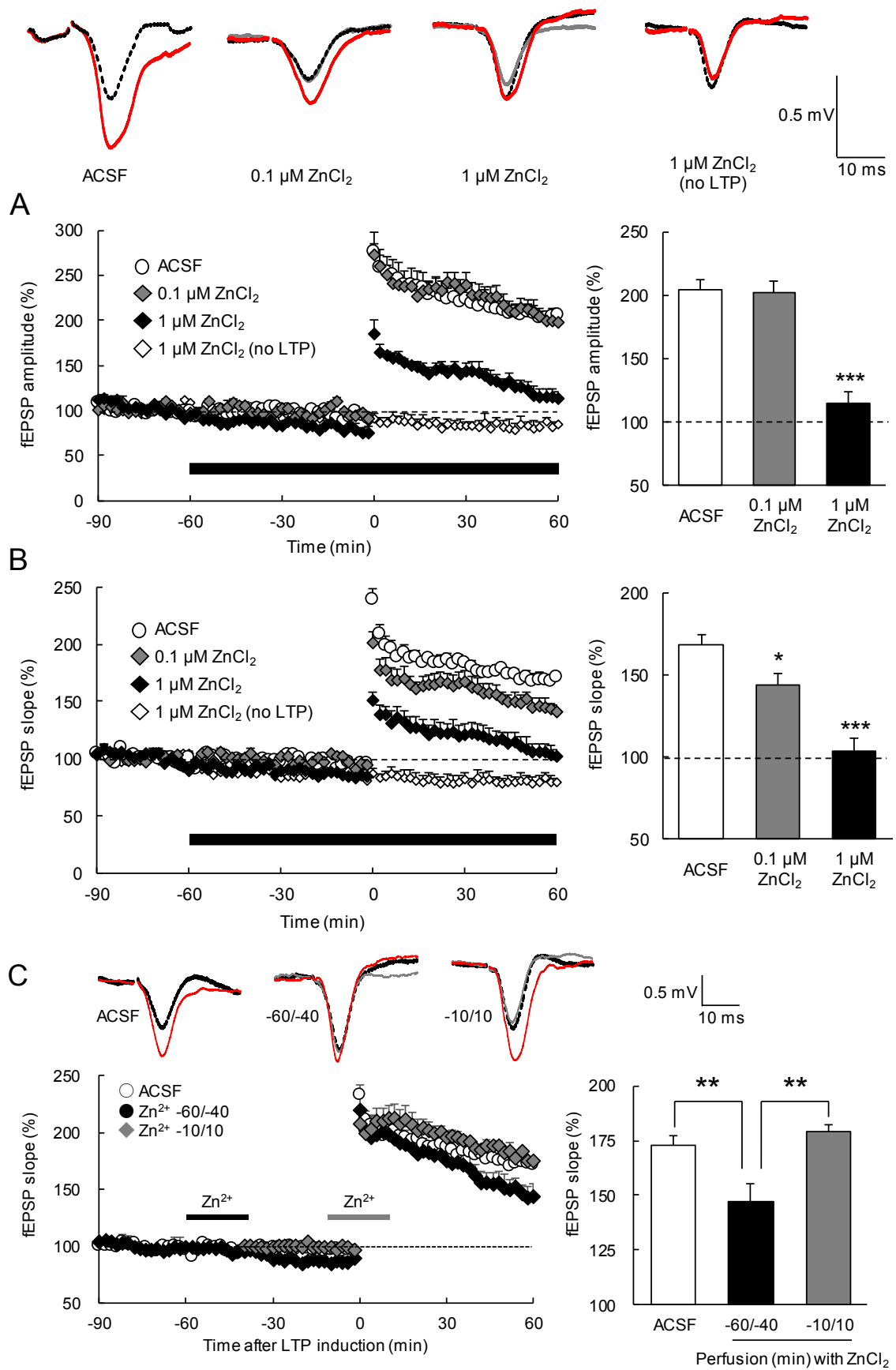
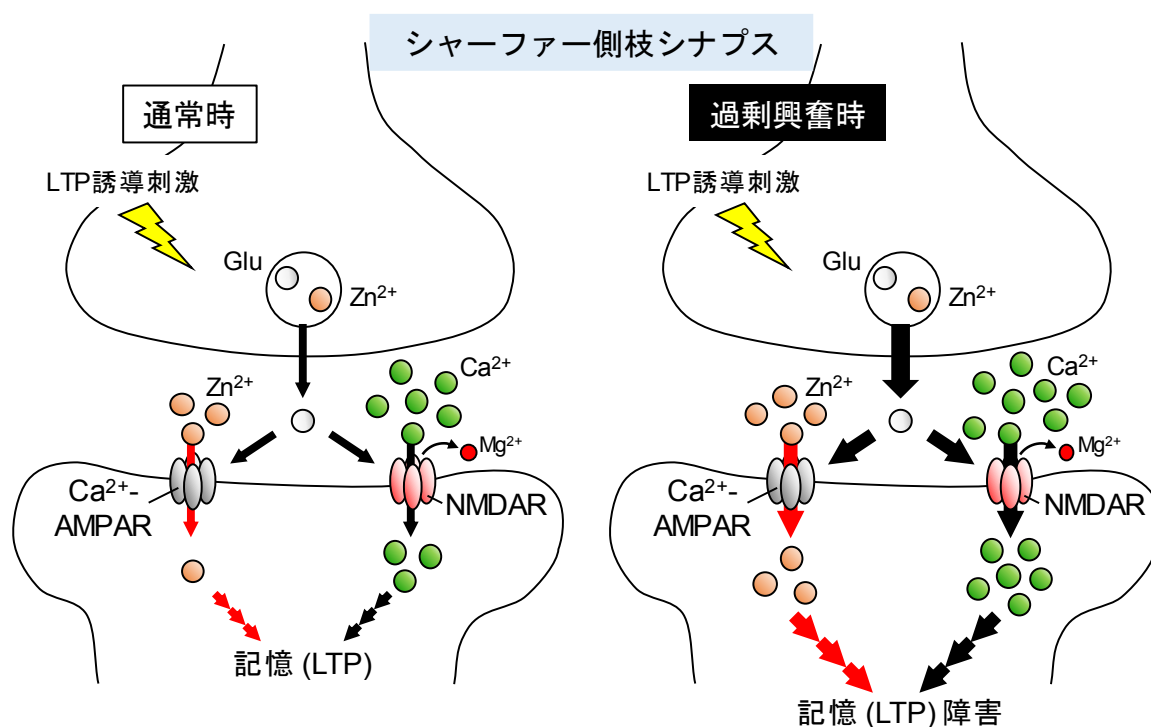


Fig. 5 Inhibition of CA1 LTP by increase in extracellular Zn^{2+} . The recording region was perfused with ACSF and test stimuli (0.05 Hz) were delivered to the Schaffer collateral/commissural pathway of the anesthetized rats. A given time later, the perfusate was changed with $ZnCl_2$ in ACSF (ACSF, $n=6$; 0.1 μM $ZnCl_2$, $n=5$; 1 μM $ZnCl_2$, $n=5$) as shown by the black bar and HFS (four trains of 100 pulses at 100 Hz separated by 130 s) was delivered at time 0 min. In another experiment, fEPSP amplitude and slope were continued to measure without the delivery of HFS under perfusion with 1 μM $ZnCl_2$ ($n=4$). Representative fEPSP recordings at time -70 (dotted line), -10 (gray line), and 30–60 min (black line) are shown (upper). Each point and line (the mean \pm SEM), which is the mean of 120 s (six points), shows fEPSP amplitude (A) and slope (B) (left). Each bar and line (mean \pm SEM) represents the averaged fEPSP amplitude (A) and slope (B) of the last 10 min (time 50–60 min) (right). * $p<0.05$, *** $p<0.001$ (Dunnett's test), vs. control. (C) LTP was induced under the hippocampal pre-perfusion with 1 μM $ZnCl_2$ in ACSF for 20 min as shown by the black bar (time -60– -40 min, $n = 7$) and the hippocampal perfusion with 1 μM $ZnCl_2$ in ACSF for 20 min as shown by the gray bar (time -10– 10 min, $n = 8$) in anesthetized rats (left). The magnitude of LTP (right). ** $p < 0.01$ (Tukey's test).(ACSF, $n = 21$). Representative fEPSP recordings at the time - 70 min (black dotted line), - 50 or -5 min (gray line) and 50 min (red line) are shown (upper).

1-4 考察

海馬スライスにおいて細胞外 Zn^{2+} キレーターである CaEDTA 灌流下では CA1 領域の LTP 誘導は抑制され、CA1 領域の LTP には細胞外から細胞内に取り込まれる Zn^{2+} が必要であることが示されている^[14]。しかし、海馬スライスを作製することで 75%もの内在性 Zn^{2+} が減少してしまうため^[27]、内在性 Zn^{2+} の LTP 誘導に対する作用を検討するためには *in vivo* での検討が必要であった。そこで、麻酔下ラットのシャーファー側枝-CA1 錐体細胞シナプスにおいて灌流プローブ付きの記録電極を用いて、記録電極周辺に局限して CaEDTA を灌流し LTP を誘導した。海馬 CA1 の LTP は、1 mM の CaEDTA では変化がなかったが、10 mM の CaEDTA では有意に抑制された (Fig. 1)。100 μM の Zn^{2+} をキレートするためには、10 mM の CaEDTA は 0.5 秒、1 mM の CaEDTA は 2 秒以上を要することが報告されている^[28]。LTP を誘導する高頻度刺激 (100 Hz, 0.5 秒) 時において、細胞外 Zn^{2+} レベルの増加をキレートするためには、10 mM の CaEDTA が必要であったと考えられる。また、細胞内 Zn^{2+} キレーターである ZnAF-2DA 灌流下において、LTP 誘導は有意に抑制された (Fig. 1)。したがって、シャーファー側枝-海馬 CA1 錐体細胞間のシナプスにおいて、細胞外から細胞内に取り込まれる Zn^{2+} が LTP の誘導に必要であることが *in vivo* にて示された。記憶の分子メカニズムとされる LTP 誘導に対して Zn^{2+} の必要性が示されたことから、記憶の獲得に対する作用を検討した。海馬 CA1 領域へ ZnAF-2DA を投与すると CA1 領域のみに ZnAF-2 の蛍光が見られ、CA1 細胞内 Zn^{2+} がキレートされたことが確認できた。高カリウム溶液を用いて神経を過剰興奮させると、ZnAF-2 の蛍光が増加したことから、海馬 CA1 領域へ ZnAF-2DA を局所投与した 1 時間後において、神経興奮による細胞内 Zn^{2+} レベルの増加、すなわち学習時の神経興奮による細胞内 Zn^{2+} の増加をキレート出来ることが示唆された (Fig. 2)。そこで、ZnAF-2DA を投与した 1 時間後に物体認識試験を行うと、物体認識記憶の獲得は障害されたため、海馬 CA1 領域の細胞内 Zn^{2+} は物体認識記憶の獲得に必要であることが示された (Fig. 3)。 Ca^{2+} に限らず、LTP 誘導ならびに物体認識記憶の獲得に対して海馬 CA1 の細胞内 Zn^{2+} シグナリングの必要性が示され (Scheme. 5; 左図)、海馬 CA1 LTP の誘導が物体認識記憶の獲得に繋がることが示された。 Zn^{2+} は足場タンパク質である Shank3 のシナプス後肥厚への移行や、シナプス後肥厚の維持に関与する^[29]。したがって、海馬 CA1 領域において、細胞外から細胞内に取り込まれた Zn^{2+} は、足場タンパク質の形成を促進することでシナプス可塑性に関与する可能性がある。

海馬 CA1 領域において CA1 錐体細胞内 Zn^{2+} は記憶の獲得に必要であることが示された一方で、 $ZnCl_2$ の投与は物体認識記憶の獲得を障害した (Fig. 4A)。また、CA1 へ KCl を投与し神経を過剰興奮させると物体認識記憶の獲得は障害されたが、その障害は細胞外 Zn^{2+} キレーターである CaEDTA の同時投与により改善された (Fig. 4B)。すなわち、グルタミン酸作動性神経の過剰興奮による認知機能障害に細胞外 Zn^{2+} の関与が示唆された (Scheme. 5)。



Scheme. 5

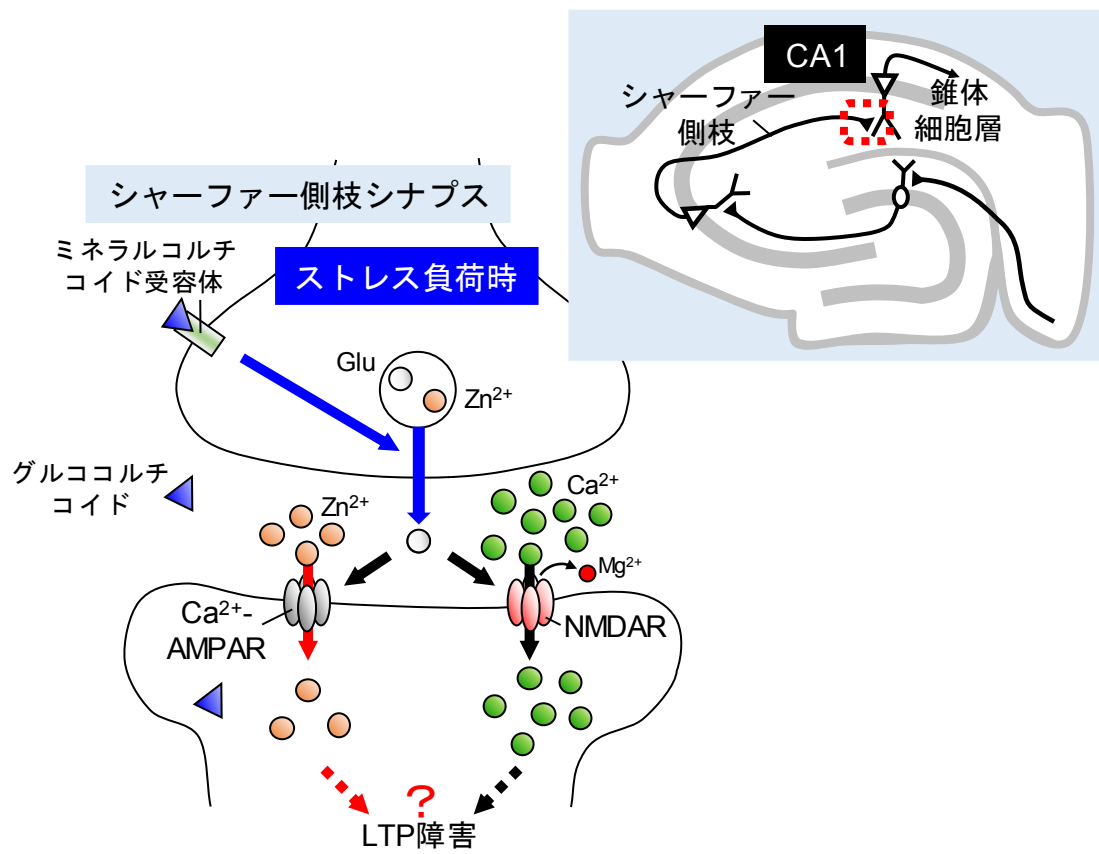
そこで、*in vivo* において $ZnCl_2$ を灌流することで CA1 LTP はどれほどの細胞外 Zn^{2+} レベルで障害されるのかを検証したところ、CA1 LTP は $1\ \mu M$ の $ZnCl_2$ 灌流により抑制され、 $100\ nM$ $ZnCl_2$ 灌流によっても fEPSP slope を指標にした場合では抑制された (Fig. 5)。シャーファー側枝を電気刺激すると、終末から放出されたグルタミン酸が、ポストシナプスのグルタミン酸受容体に結合し、細胞内へ Na イオンが流入し脱分極が生じるため (興奮性シナプス後電位 ; EPSP)、海馬 CA1 領域の放線層の細胞外においた記録電極周辺では集合電位を記録できる (field EPSP ; fEPSP)。これらは複数のシナプス応答を集合電位として記録するため、fEPSP の大きさ (amplitude) ではなく、立ち上がり部分の傾き (slope) の解析が、シナプスの活動の強さを表すパラメータであるとされている。したがって、fEPSP slope による解析から、想定される細胞外 Zn^{2+} レベルの 10 倍である $100\ nM$ であっても CA1 LTP が抑制されることが示された。これまでシナプス小胞内の Zn^{2+} レベルは $100\text{--}300\ \mu M$ であると報告されており^[30]、*in vitro* ではマイクロモルレベルの Zn^{2+} が広くその作用解析に用いられてきた^[22] ^[31]。海馬スライスを用いた検討から、CA1 LTP は $ZnCl_2$ $1\text{--}5\ \mu M$ の灌流により促進され、 $30\ \mu M$ の灌流により障害されることが示されている^[14]。しかし、*in vivo* では予想に反して、LTP 誘導を障害する細胞外 Zn^{2+} レベルはナノレベルであることが示され、*in vivo* でのさらなる検討が必要である

ことを示唆する結果となった。また、これまでに海馬 CA1 領域において細胞外 Zn^{2+} は高頻度刺激による開口放出を抑制すること^[32]、NMDA 受容体活性化による Ca^{2+} の流入に拮抗すること^{[22][33]}が示されているため、LTP 誘導時の $1\ \mu\text{M}$ ZnCl_2 灌流は LTP 誘導に対して抑制的に働くと予想された。しかし、CA1 LTP 誘導中の $1\ \mu\text{M}$ ZnCl_2 灌流では LTP は抑制されなかった (Fig. 5C)。LTP 誘導時の細胞外 Zn^{2+} レベルは $1\ \mu\text{M}$ 程度にまで上昇していることが推察される。一方で、CA1 LTP 誘導前にのみ $1\ \mu\text{M}$ の ZnCl_2 を灌流すると CA1 LTP は抑制された (Fig. 5C)。細胞外 Ca^{2+} と Zn^{2+} が同濃度の *in vitro* 条件では、 Ca^{2+} 透過型 AMPA 受容体活性化によって、錐体細胞内へ Ca^{2+} は Zn^{2+} の約 2 倍量流入する一方で、 Ca^{2+} と Zn^{2+} の流入はお互いに拮抗しないことが報告されている^[20]。定常時には細胞外 Zn^{2+} レベルは約 $10\ \text{nM}$ (Ca^{2+} の 10^5 分の 1) であるため、AMPA 受容体活性化を介した Zn^{2+} 流入量は Ca^{2+} と比べて極めて少ないと想定される。しかし、細胞内 Zn^{2+} レベルも約 $100\ \text{pM}$ (Ca^{2+} の 10^3 分の 1) と極めて低レベルに維持されているため、極めて低濃度の Zn^{2+} 流入であっても、一定レベルまでは細胞内で記憶形成に利用される一方で、LTP 誘導の一定期間前に神経が過剰興奮し、 Zn^{2+} が錐体細胞内に過剰に流入すると、LTP 誘導に関連する足場タンパク質や CaMKII などに予め結合し、足場タンパク質によるスパインの拡大や形成、CaMKII のリン酸化などを阻害し、認知機能障害に関与すると考えられる。

第2章 ストレス負荷によるグルココルチコイドを介した学習記憶障害に対する海馬 CA1 細胞内 Zn^{2+} シグナリングの関与

2-1 序論

ストレスによる海馬細胞外グルタミン酸レベルの増加は認知機能を障害することが知られている^[34]。ストレス負荷に伴い視床下部－下垂体－副腎皮質系 (Hypothalamic-pituitary-adrenal axis; HPA axis) が活性化すると、グルココルチコイド (マウス、ラットではコルチコステロン) が副腎皮質から分泌され、血中グルココルチコイド濃度が上昇する。過度にストレスが負荷されると、グルココルチコイドが長期にわたり過剰に分泌され記憶学習能が低下する^{[35][36]}。グルココルチコイドは海馬へ移行し、細胞質内や細胞膜上に存在するグルココルチコイド受容体^[37]やミネラルコルチコイド受容体^[38]に結合する。細胞質のミネラルコルチコイド受容体はグルココルチコイドに対する親和性が高く (Kd 値; 0.5 nM)、一方で、グルココルチコイド受容体は親和性が低い (Kd 値; 5 nM) ^[39]。そのため、生理的条件下ではミネラルコルチコイド受容体が活性化され、ストレス負荷時や日内変動のピーク時ではグルココルチコイド受容体が活性化される。ミネラルコルチコイド受容体の阻害は認知機能を障害し^[40]、グルココルチコイド受容体の阻害はストレス負荷による認知機能障害を改善する^[41]。すなわち、グルココルチコイドは細胞質内に存在するミネラルコルチコイド受容体やグルココルチコイド受容体と結合し、遺伝子発現を介する比較的遅い反応によって、記憶学習能に影響を与える^{[42][43]}。一方で、細胞膜上のミネラルコルチコイドおよびグルココルチコイド受容体はグルココルチコイドの結合により遺伝子発現を介さない速い反応を示すことが近年注目されている^[44]。細胞膜上のミネラルコルチコイド受容体は、細胞質ミネラルコルチコイド受容体、グルココルチコイド受容体と比べてグルココルチコイドに対する親和性は低い (Kd 値; 10 nM) ^[16]。ストレス負荷による海馬細胞外グルココルチコイドレベルの上昇に伴い、細胞膜のミネラルコルチコイド受容体にグルココルチコイドが結合すると、遺伝子発現を介さない速い反応により、神経終末からグルタミン酸の放出を促進させ^{[16][45]}、記憶学習能に影響を与えたとの報告がある^{[46][47]}。したがって、ストレス負荷時にシャーファー側枝－CA1 錐体細胞間のシナプスではグルココルチコイドの細胞膜ミネラルコルチコイド受容体への結合を介して、グルタミン酸とともに Zn^{2+} の放出が促進され、細胞内へ過剰に Zn^{2+} が取り込まれ記憶を障害すると考えられる。これまでに、*in vitro* の解析ではグルココルチコイドによる CA1 LTP 誘導の障害に細胞内 Zn^{2+} レベルの増加が関与することが示されている^[48]。しかし、ストレス誘発性の記憶障害に対するシナプス Zn^{2+} の作用について、*in vivo* での検討は全く行われていない。そこで、細胞膜上のミネラルコルチコイドやグルココルチコイド受容体活性化を介した速い反応に着目し、ストレス負荷時のグルココルチコイドを介したグルタミン酸シグナル過多による認知機能障害に対する Zn^{2+} の関与を *in vivo* で検討した。



Scheme 6

2-2 実験方法

2-2-1 試薬の調製

2-2-1-1 コルチコステロン

コルチコステロン（和光純薬工業（株））をエタノール（和光純薬工業（株））で 0.5 $\mu\text{g/ml}$ に溶解し、リンゲルまたは ACSF で希釈して用いた。

2-2-1-2 ZnAF-2（細胞外 Zn^{2+} 蛍光プローブ）

ZnAF-2（積水メディカル（株）より譲渡）を、DMSO で 5 mM とし、リンゲルまたは ACSF で希釈して用いた。

2-2-1-3 CNQX（AMPA 受容体阻害剤）

CNQX（SIGMA（株））をリンゲルで 10 μM に希釈して用いた。

2-2-1-4 スピロノラクトン（ミネラルコルチコイド受容体阻害剤）

スピロノラクトン（和光純薬工業（株））をエタノールで 10 mg/ml に溶解し、リンゲルまたは ACSF で 100 μM に希釈して用いた。また、プロピレングリコール（和光純薬工業（株））で 25 mg/ml に溶解し、2 ml/kg で腹腔内投与に用いた。

2-2-1-5 ミフェプリストン（グルココルチコイド受容体阻害剤）

ミフェプリストン（Cayman）をエタノールで 1 mg/ml に溶解し、リンゲルまたは ACSF で 10 μM に希釈して用いた。また、プロピレングリコールで 10 mg/ml に溶解し、2 ml/kg で腹腔内投与に用いた。

2-2-2 水浸ストレス負荷

直径 19.2 cm、高さ 45 cm の円柱形の透明なプラスチック容器に 400 ml の水道水 ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) を入れ、その中にラットを 30 分間放置した。

2-2-3 海馬スライスの作成

ラットを断頭し、全脳を取り出した後、氷冷したコリンリンゲル液で 1 分間冷却した。その後、小脳をカットし、次に大脳を左右 2 つに分け、コリンリンゲル液中でさらに 3 分間冷却した。右脳左脳それぞれから海馬を取り出した後、ビブラトーム（ZERO-1、堂阪イーエム（株））を用いて、400 μm の厚さで海馬スライスを作成した。

2-2-4 *In vivo* マイクロダイアリシスでのコルチコステロン灌流時の海馬細胞外 Zn^{2+} の測定

2-2-4-1 麻酔下ラット海馬 CA1 へのコルチコステロンの灌流

抱水クロラル水溶液で麻酔したラットの頭部をステレオ装置に保定し、透析膜プローブ (A-I-12-01、エイコム (株)) を Bregma の後方 3.3 mm、左右 2.2 mm、深さ 2.2 mm の位置に挿入した後、ACSF を 2.0 μ l/min で 2 時間以上灌流した。その後、ベースとして ACSF を 30 分間、ACSF で 500 ng/ml に希釈したコルチコステロンを 20 分間、さらに ACSF に戻して 40 分間灌流した。その後、CaEDTA (1 mM) を 30 分間灌流した。また、コルチコステロンと同時に、100 μ M スピロノラクトンを灌流した。

2-2-4-2 細胞外 Zn^{2+} 濃度の測定

2-1-4-1 において、灌流液を 5 分毎回収 (10 μ l/sample) した。回収した灌流液に、1 sample 毎に、ZnAF-2 (1 μ M) を添加 (50 μ l) し、プレートリーダー (ARVO sx、Perkin Elmer) にて、ZnAF-2 蛍光強度 (励起波長 485 nm、測定波長 535 nm) を測定した。

2-2-5 *In vivo* 海馬細胞内 Zn^{2+} イメージング

2-2-5-1 麻酔下ラットにおけるコルチコステロン投与後の細胞内 Zn^{2+} イメージング

抱水クロラル水溶液で麻酔したラットの頭部をステレオ装置に保定し、インジェクションカニューレを Bregma の後方 3.3 mm、左右 2.2 mm、深さ 2.2 mm の位置に挿入し、30 分放置した。その後、ACSF で希釈した ZnAF-2DA (100 μ M) とコルチコステロン (500 ng/ml) を 0.25 μ l/min の流速で、16 分間投与した。投与終了から 5 分後、全脳スライスを作成し、コリンリングル中で 20 分間以上静置した。コリンリングル液 3 ml を満たした Dish に、作製した全脳スライスに移し、共焦点レーザー स्क্যান顕微鏡 (Nikon A1 confocal microscopes、Nikon) にて、海馬 CA1 放線層の ZnAF-2 (励起波長 488.4 nm、測定波長 500-550 nm) の蛍光強度を測定した。

2-2-5-2 覚醒下ラットにおける水浸ストレス負荷後の細胞内 Zn^{2+} イメージング

抱水クロラル水溶液で麻酔したラットの頭部をステレオ装置に保定し、ガイドカニューレを Bregma の後方 3.3 mm、左右 2.2 mm、深さ 2.0 mm の位置に挿入し、アロンアルファを用いて固定した。1 週間後、覚醒下にて、ACSF で 100 μ M に希釈した ZnAF-2DA を 0.25 μ l/min の流速で、4 分間投与した。投与終了から 5 分後、水浸ストレスを 30 分間負荷し、全脳スライスを作成した。コリンリングル液 3 ml を満たした Dish に、作製した全脳スライスに移し、共焦点レーザー स्क্যান顕微鏡 (Nikon A1) にて、海馬 CA1 放線層の ZnAF-2 蛍光強度を測定した。

2-2-6 *In vitro* イメージング

2-2-6-1 細胞内 Zn^{2+} および細胞内 Ca^{2+} イメージング

ラットから作製した全脳スライスを、リングルで希釈した ZnAF-2DA (10 μ M) と Ca Orange AM (10 μ M) 溶液に浸し、30 分間静置し、リングル液中に戻して 20 分以上静置した後、測定に用いた。リングル液 2 ml を満たした Dish に、作成した全脳スライスに移し、共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡 (Nikon) にて、海馬 CA1 放線層の Calcium orange (励起波長 543 nm、測定波長 560 nm) と ZnAF-2 (励起波長 488 nm、測定波長 505-530 nm) の蛍光強度を測定した。また、測定開始 60 秒後に、コルチコステロンを最終濃度 500 ng/ml となるよう添加し、さらに 3 分間 ZnAF-2 および Ca Orange の蛍光強度を測定した。Dish のリングル中に CNQX、スピロノラクトンまたはミフェプリストン存在下、コルチコステロンを添加し同様に蛍光強度を測定した。

2-2-6-2 細胞外 Zn^{2+} イメージング

ラットから作製した全脳スライスを、リングル液中で 20 分以上静置した後、測定に用いた。リングル液で調製した 10 μ M の ZnAF-2 溶液 2 ml を満たした Dish に、作製した全脳スライスに移し、共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡 (Nikon) にて、海馬 CA1 放線層の ZnAF-2 (励起波長 488 nm、測定波長 505-530 nm) の蛍光強度を測定した。また、測定開始 60 秒後に、コルチコステロンを最終濃度 500 ng/ml となるよう添加し、さらに 3 分間 ZnAF-2 の蛍光強度を測定した。Dish の ZnAF-2 溶液中にスピロノラクトンまたはミフェプリストン存在下、コルチコステロンを添加し同様に蛍光強度を測定した。

2-2-7 *In vivo* CA1 LTP の誘導

2-2-7-1 麻酔下 *in vivo* CA1 LTP の誘導

1-1-4 と同様の方法で、ACSF 灌流下ベースラインを測定後、高頻度刺激 (100 Hz、1 秒、4 回、130 秒間隔) により LTP を誘導した。

2-2-7-2 覚醒下 *in vivo* CA1 LTP の誘導

抱水クロラル水溶液で麻酔したラットの頭部をステレオ装置に保定し、2本のタングステン線からなる刺激電極を、Bregmaの後方4.3 mm、右3.8 mm、深さ1.8-2.2 mmに、インジェクションカニューレ付き記録電極を、Bregmaの後方3.3 mm、右2.2 mm、深さ1.8-2.2 mmの位置に挿入した。fEPSPがモニターできることを確認した後、アロンアルファを用いて固定した。以降の検討はすべて覚醒下で行った。翌日、fEPSP slopeの最大値を測定し、その約30%が現れる電流を測定電流とした。最大値を測定した1時間後、ベースとしてfEPSP slopeを20分間測定した。ベースライン測定の5分後、ACSFで100 μ Mに希釈したZnAF-2DAをインジェクションカニューレを介して海馬CA1領域へ覚醒下で0.25 μ l/minの流速で、4分間投与した。投与終了から5分後、水浸ストレスを30分間負荷した。水浸ストレス開始から4時間後に高頻度刺激(100 Hz、1秒、4回、130秒間隔)し、LTPを誘導した。高頻度刺激の10分前から10分間(誘導前のfEPSP)、高頻度刺激の50分後から10分間(誘導後のfEPSP)のfEPSPをモニターした。誘導後のfEPSPの大きさを平均し、誘導されたLTPの大きさとして評価した。

2-2-8 リン酸化CaMKIIタンパク質発現量の検出

2-1-4-1でコルチコステロンを灌流したラットから、海馬スライスを作成し、灌流プローブ挿入部位のスライスのCA1領域のみを氷冷したLysis buffer(20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、1% Triton X-100、1 mM sodium pyrophosphate、1 mM sodium orthovanadate、5 mM NaF、2 mM β -glycerophosphate、2 μ g/ml leupeptin、2 μ g/ml pepstatin A、2 μ g/ml aprotinin、1 mM dithiothreitol、pH 7.5)でホモジナイズした。5分間氷上で静置した後、遠心分離機(H-9R、(株)コクサン)にて遠心し(3000 g、5分、4°C)、上清とサンプルバッファー(250 mM Tris-HCl、8% sodium dodecyl sulfate、40% Glycerol、0.02% Bromophenol blue (BPB)、4 mM dithiothreitol、pH 6.8)を3:1で混合し、95°Cで5分間熱し、ウエスタンブロット用サンプルとした。残りの上清を用いてタンパク測定(Pierce BCA protein assay Kit、Thermo Scientific)を行った。同様のタンパク量となるように、ウエスタンブロット用サンプルを各ウェルに添加し、SDS-PAGE(20 mA/1枚、70-90分間)を行った。その後、メンブレン(Immobilion-P、Millipore)に転写(200 mA/1枚、60分間)し、室温で60分間ブロッキング(Ez Block Chemi、ATTO)した。一次抗体は、リン酸化CaMKII抗体(Cell Signaling)または α -Tubulin抗体でインキュベーションした(4°C、over night)。TBS-T(150 mM NaCl、25 mM Tris-HCl、0.1% Triton X-20、pH 7.5)で洗浄した後、二次抗体(Anti-Rabbit IgG、HRP-linked Antibody、Cell Signaling)でインキュベーションした(室温、1時間)。洗浄した後、発色液(EzWestLumi One)に浸し、Luminograph Iで検出した。

2-3 実験結果

2-3-1 コルチコステロン灌流による海馬 CA1 の細胞外 Zn^{2+} の増加

グルココルチコイドによる海馬 CA1 領域の細胞外 Zn^{2+} レベルの変化を *in vivo* で明らかにするため、麻酔下ラットの海馬 CA1 領域に透析膜プローブを挿入し 500 ng/ml コルチコステロンを灌流 (2 μ l/min) し、回収した灌流液に ZnAF-2 を添加しその蛍光強度を測定した。500 ng/ml コルチコステロンの 20 分間の灌流により海馬細胞外液中の Zn^{2+} レベルが有意に増加した (Fig. 6 CS (30–50))。その増加はコルチコステロン灌流後少なくとも 30 分間は持続した (CS (30–50), $110.8 \pm 2.9\%$; ACSF (50–90), $110.7 \pm 2.8\%$) (Fig. 6 ACSF (50–90))。コルチコステロン灌流後に細胞外 Zn^{2+} キレート剤である CaEDTA を灌流すると、回収した灌流液の Zn^{2+} レベルは減少したことから、細胞外 Zn^{2+} が本手法により検出されたことが確認された (CaEDTA (90–120), $74.4 \pm 3.2\%$) (Fig. 6 CaEDTA (90–120))。

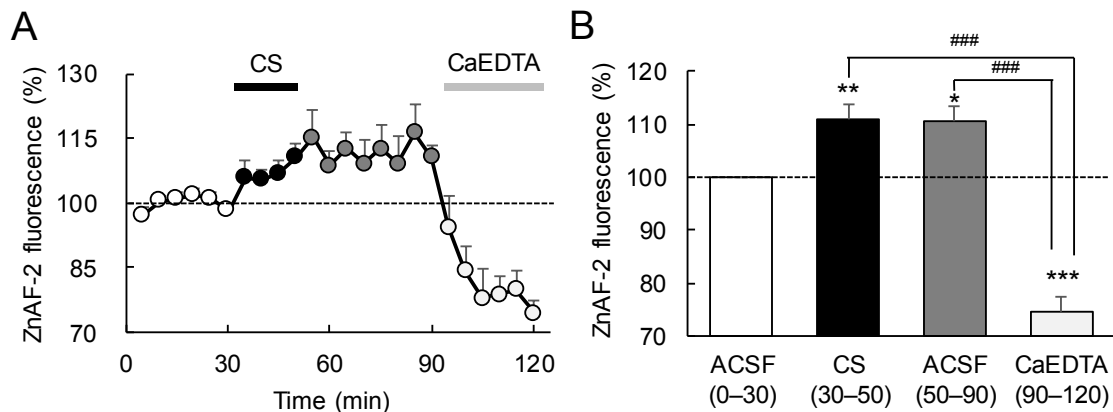


Fig. 6 Increase in extracellular Zn^{2+} by the perfusion with corticosterone in the hippocampal CA1 *in vivo*. (A) The hippocampal CA1 was perfused with 500 ng/ml corticosterone (CS) for 20 min (time, 30–50 min) as shown by the black bar ($n = 15$). Forty minutes after finishing corticosterone perfusion, the hippocampal CA1 was perfused with 1 mM CaEDTA for 30 min (time, 90–120 min) as shown by the light gray bar. Each point and line represents ZnAF-2 fluorescence in the perfusate collected for 5 min that is the ratio (%) of ZnAF-2 fluorescence in each perfusate to basal ZnAF-2 fluorescence in perfusate under the perfusion with ACSF for 30 min (time, 0–30 min). Basal ZnAF-2 fluorescence in perfusate is expressed as 100%. (B) Each bar and line represents the rate (%) of each averaged ZnAF-2 fluorescence to the basal ZnAF-2 fluorescence. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, vs. ACSF for 0–30 min; ### $p < 0.005$ (Tukey's test)

2-3-2 コルチコステロンによる海馬 CA1 の細胞内 Zn^{2+} の増加

グルココルチコイドによる海馬 CA1 の細胞内 Zn^{2+} レベルの変化を *in vivo* で明らかにするため、麻酔下ラットの海馬 CA1 領域にインジェクションカニューレを挿入し、細胞内 Zn^{2+} 検出試薬である ZnAF-2DA とともに 500 ng/ml コルチコステロンを流速 0.25 μ l/min で、16 分間投与した。投与終了から 5 分後、海馬スライスを作製し、海馬 CA1 領域放線層の ZnAF-2 蛍光強度を観察した (Fig. 7A)。コルチコステロンにより、海馬 CA1 放線層の ZnAF-2 蛍光強度が有意に増加し、コルチコステロンによる細胞内 Zn^{2+} レベルの増加が示された (Control; 100.0 ± 14.8 , +CS; 206.4 ± 17.2) (Fig. 7B)。

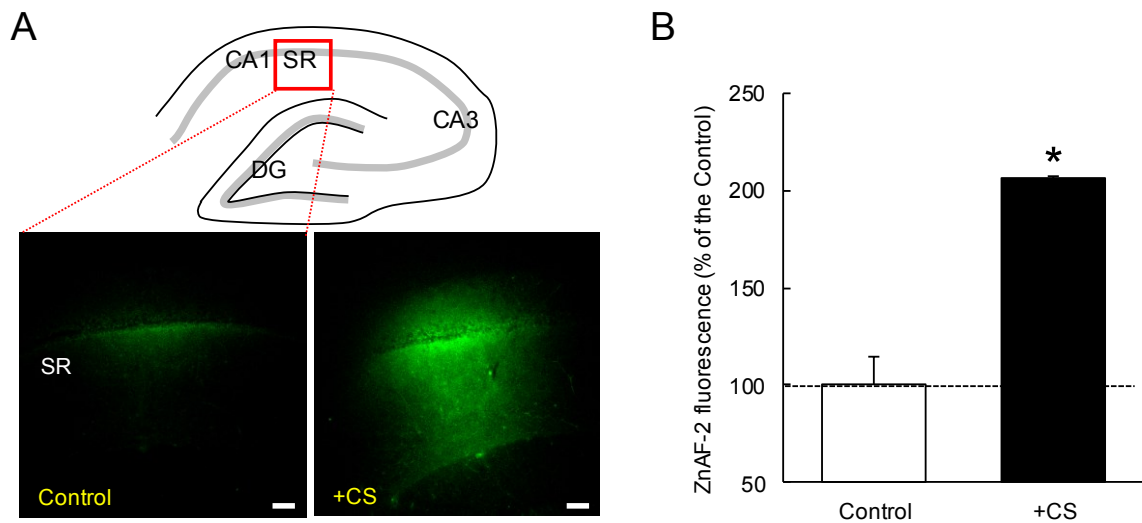


Fig. 7 Increase in intracellular Zn^{2+} by the injection of corticosterone into the hippocampal CA1 *in vivo*. (A) Corticosterone (CS, 500 ng/ml) in ACSF containing ZnAF-2DA (100 μ M) was bilaterally injected into the CA1 of anesthetized rats at the rate of 0.25 μ l/min for 16 min, as illustrated in the brain map above fluorescence images from the right hippocampus. Five minutes after injection, coronal brain slices were prepared. Intracellular ZnAF-2 fluorescence was measured in the CA1. SR stratum radiatum layer. Bars 100 μ m. (B) At least five regions of interest were set in the CA1. Each bar and line represents fluorescence intensity in the stratum radiatum after injection of ACSF (control: n = 7), corticosterone (+CS: n = 4). * $p < 0.01$ (t-test).

2-3-3 コルチコステロンによる AMPA 受容体活性化を介した細胞内 Zn^{2+} レベルの増加

海馬スライスを用いた *in vitro* の検討において、コルチコステロンにより細胞外から細胞内への Zn^{2+} 流入が増加することが示されている^[48]。グルココルチコイドによる細胞内 Zn^{2+} 増加の機構を明らかにするために、海馬スライスに AMPA 受容体阻害剤 (CNQX) 存在下コルチコステロンを添加し、細胞内 Ca^{2+} および Zn^{2+} レベルを検証した。コルチコステロンによる細胞内 Ca^{2+} および Zn^{2+} の増加は、CNQX 存在下有意に抑制された (Fig. 8A, 8B)。以上からコルチコステロンにより、海馬 CA1 において AMPA 受容体活性化を介して、細胞外から細胞内への Zn^{2+} 流入が増加することが示された。

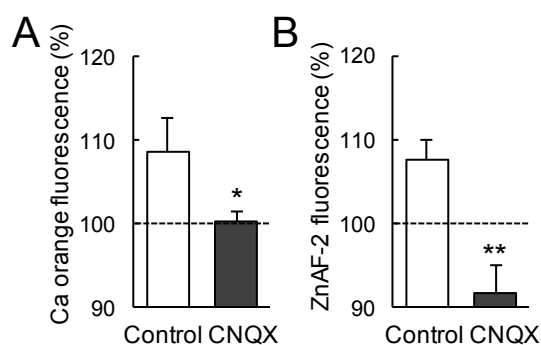


Fig. 8 Corticosterone-induced increase in intracellular Ca^{2+} and Zn^{2+} by activation of AMPAR. Corticosterone (the final concentration, 500 ng/ml) was added to brain slices bathed in Ringer solution or 10 μ M CNQX in Ringer solution 60 s after measuring the basal level of intracellular (A) Ca orange or (B) ZnAF-2 fluorescence, and the changes in intracellular Ca orange or ZnAF-2 fluorescence were measured in the same manner (A: control, $n = 11$; CNQX, $n = 5$. B: control, $n = 12$; CNQX, $n = 5$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs. control (t-test).

2-3-4 コルチコステロンによる LTP 誘導の減弱と Zn^{2+} の関与

グルココルチコイドの LTP 誘導に対する作用を検討するために、麻酔下ラットの海馬 CA1 領域に 50 ng/ml コルチコステロンを LTP 誘導の高頻度刺激の 25 分前から 5 分前、10 分前から 10 分後、5 分後から 25 分後の 20 分間灌流し、CA1 LTP を誘導した。コルチコステロンの LTP 誘導前および誘導後の灌流は、LTP 誘導を抑制しなかった (A: ACSF, $175.2 \pm 7.1\%$; CS 50, $187.2 \pm 9.6\%$. B: ACSF, $168.2 \pm 6.0\%$; CS 50, $161.7 \pm 12.2\%$.) (Fig. 9A, 9B)。高頻度刺激中のコルチコステロンの灌流により CA1 LTP 誘導は有意に抑制された。この抑制は細胞外 Zn^{2+} キレーターである CaEDTA との同時灌流により阻止された。5 ng/ml のコルチコステロンの灌流では高頻度刺激中においても LTP 誘導は抑制されなかった (C: ACSF, $174.6 \pm 5.8\%$; CS 5, $169.0 \pm 5.84\%$; CS 50, $142.0 \pm 11.2\%$; CS 50/CaEDTA, $178.9 \pm 11.02\%$) (Fig. 9C)。また、1 μ M $ZnCl_2$ を 5 ng/ml コルチコステロンと同時に灌流すると、LTP 誘導の減弱が促進された (D: $ZnCl_2$, $179.3 \pm 3.2\%$; $ZnCl_2$ +CS 5, $158.5 \pm 7.6\%$) (Fig. 9D)。

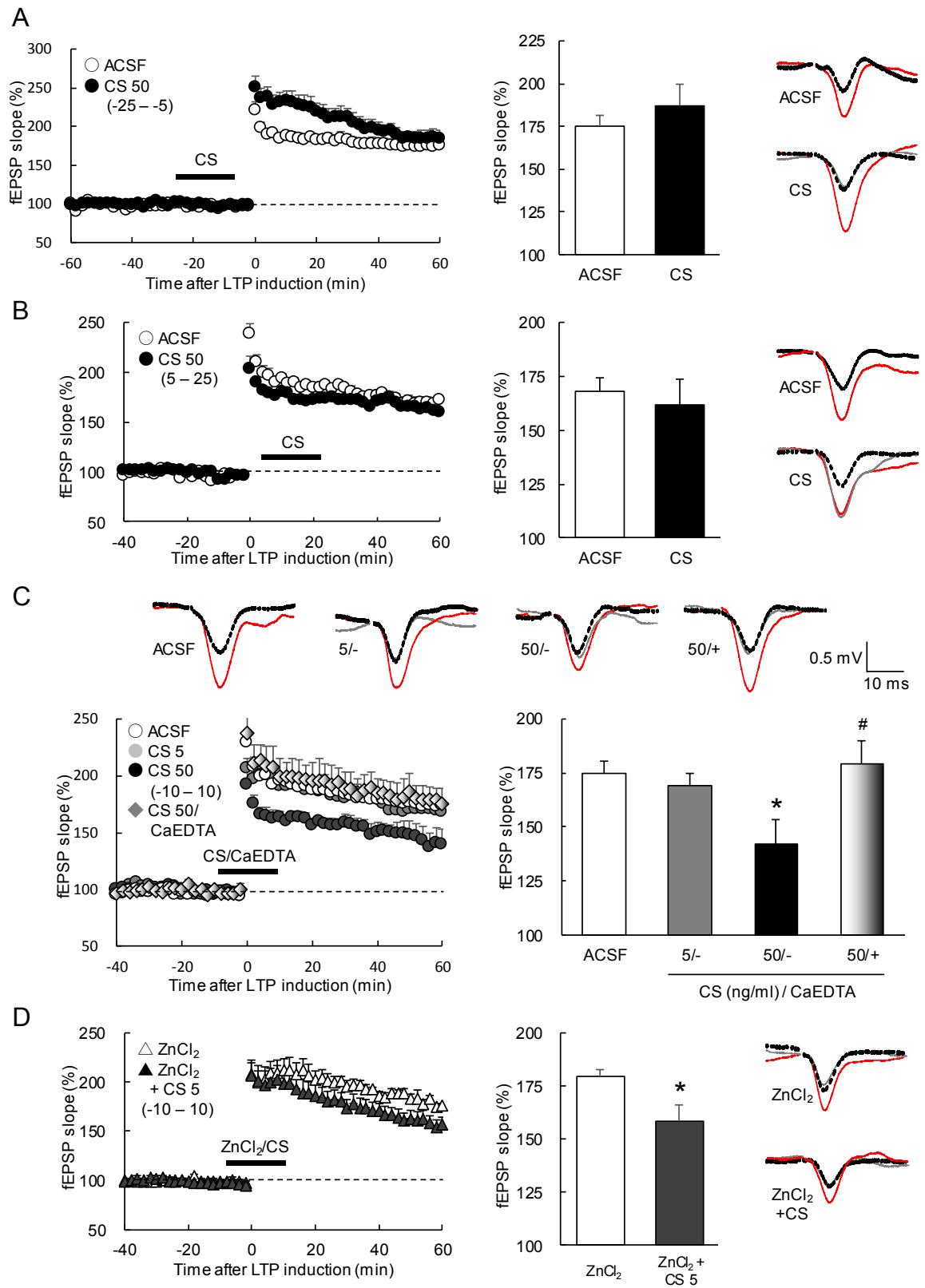


Fig. 9 Rescue of corticosterone-induced attenuation of CA1 LTP by extracellular Zn^{2+} chelator when LTP was induced. (A) LTP was induced under hippocampal pre- or post-perfusion with 50 ng/ml corticosterone (CS) (ACSF, $n = 11$; CS 50, $n = 10$.) as shown by the black bar (left). The magnitude of LTP (middle). Representative fEPSP recordings at the time -50 min (black dotted line), -10 min (gray line), and 50 min (red line) are shown (right). (B) LTP was induced under hippocampal post-perfusion with 50 ng/ml corticosterone as shown by the black bar (ACSF, $n = 6$; CS 50, $n = 5$) as shown by the black bar (left). The magnitude of LTP (middle). Representative fEPSP recordings at the time -30 min (black dotted line), 10 min (gray line), and 50 min (red line) are shown (right). (C) LTP was induced under hippocampal perfusion with 5 ng/ml corticosterone (CS) ($n = 8$), 50 ng/ml corticosterone ($n = 7$), or 50 ng/ml corticosterone +1 mM CaEDTA ($n = 5$) as shown by the black bar (left). The magnitude of LTP (right). * $p < 0.05$, vs. ACSF ($n = 14$), # $p < 0.05$, vs. CS 50 (Tukey's test). Representative fEPSP recordings at the time -30 min (black dotted line), -5 min (gray line), and 50 min (red line) are shown (upper). (D) LTP was induced under hippocampal perfusion with 1 μ M $ZnCl_2$ ($n = 8$) or 1 μ M $ZnCl_2$ + 5 ng/ml corticosterone ($n = 9$) as shown by the black bar (left). The magnitude of LTP (middle). * $p < 0.05$, vs. $ZnCl_2$ + CS 5 (t-test). Representative fEPSP recordings at the time -30 min (black dotted line), -5 min (gray line), and 50 min (red line) are shown (right).

2-3-5 コルチコステロン灌流後の CA1 LTP 誘導の減弱に対する Zn^{2+} の関与

麻酔下ラットの海馬 CA1 領域に LTP 誘導 60 分前から 20 分間コルチコステロンを灌流すると、海馬 CA1 領域の LTP 誘導は、50 ng/ml コルチコステロンでは抑制されなかったのに対して、500 ng/ml コルチコステロンでは有意に抑制された。また、500 ng/ml コルチコステロンによる LTP 誘導の抑制は、コルチコステロンと細胞外 Zn^{2+} キレーターである CaEDTA の同時灌流により阻止された (A: ACSF; 172.6 ± 4.4 , CS 50; 166.1 ± 8.4 , CS 500; 138.1 ± 3.9 , CS 500/CaEDTA; 163.4 ± 7.4) (Fig. 10A)。さらに、コルチコステロン灌流後に、30 分または 100 分間 CaEDTA を灌流した場合でも、コルチコステロンによる LTP 誘導の抑制は阻止された (B: ACSF; 172.6 ± 4.4 , CS 500; 138.1 ± 3.9 , CS 500/CaEDTA 100; 169.4 ± 7.4 , CS 500/CaEDTA 30; 171.7 ± 14.1) (Fig. 10B)。

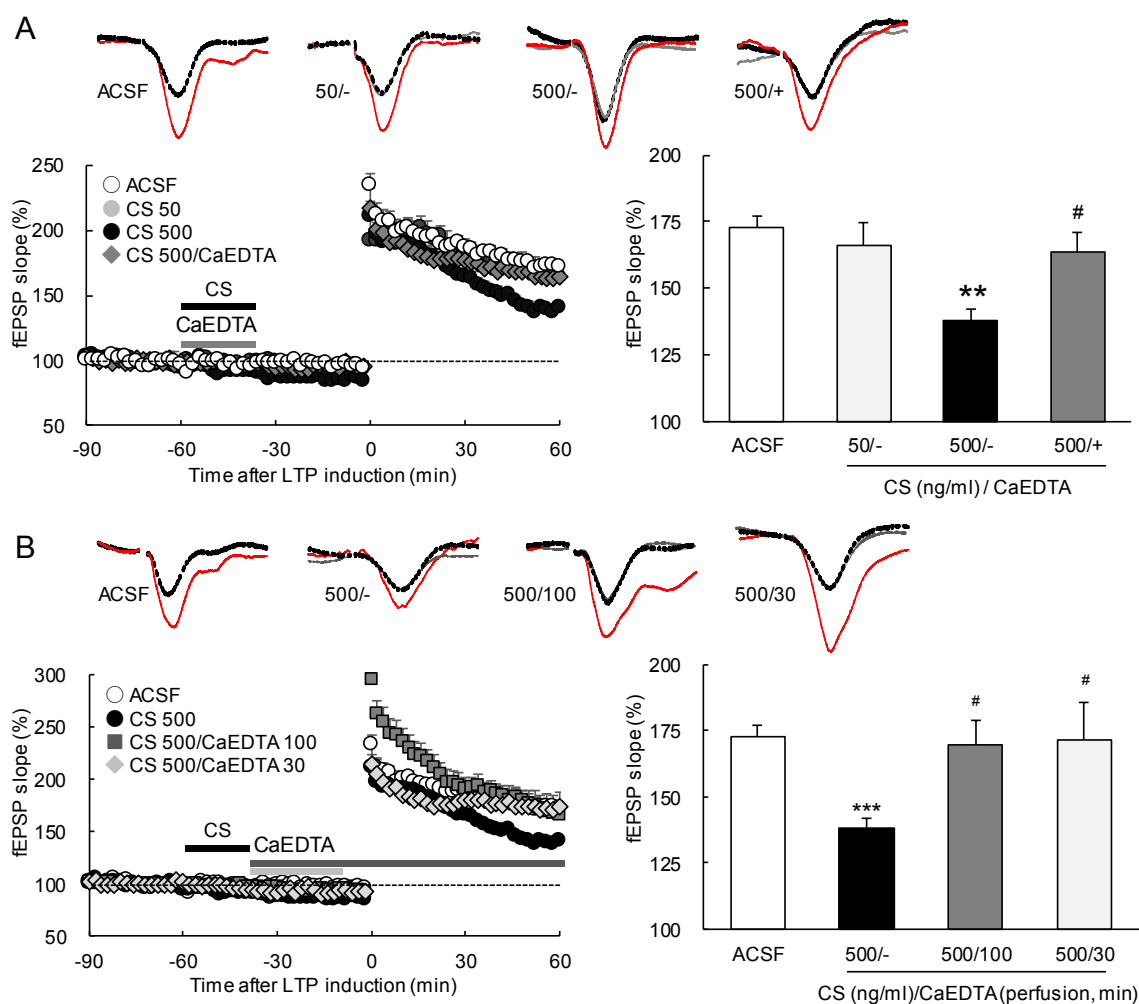


Fig. 10 Rescue of corticosterone-induced attenuation of CA1 LTP by extracellular Zn^{2+} chelator prior to LTP induction. (A) LTP was induced under hippocampal pre-perfusion with 50 ng/ml corticosterone (CS) (n = 7), 500 ng/ml corticosterone (n = 13), or 500 ng/ml corticosterone + 1 mM CaEDTA (n = 12) as shown by the black and gray bars (left). The magnitude of LTP (right). $^{**}p < 0.01$, vs. ACSF (n = 21), $^{#}p < 0.05$, vs. CS 500. Representative fEPSP recordings at the time -70 min (black dotted line), -50 min (gray line), and 50 min (red line) are shown (upper). (B) LTP was induced under hippocampal pre-perfusion with 500 ng/ml corticosterone as shown by the black bar (n = 13) and induced under hippocampal perfusion with 1 mM CaEDTA for 100 min (n = 7) or for 30 min (n = 7), as shown by the gray and light gray bars, respectively, after 500 ng/ml corticosterone pre-perfusion (left). The magnitude of LTP (right). $^{***}p < 0.005$, vs. ACSF (n = 21), $^{#}p < 0.05$, vs. CS 500 (Tukey's test). Representative fEPSP recordings at the time -70 min (black dotted line), -5 min (gray line), and 50 min (red line) are shown (upper)

2-3-6 コルチコステロン灌流によるリン酸化 CaMKII タンパク質発現量の減少に対する Zn^{2+} の関与

コルチコステロンによる細胞内 Zn^{2+} レベルの増加により LTP 誘導が減弱する機構を明らかにするため、麻酔下ラットの海馬 CA1 領域をコルチコステロンで灌流後、CA1 領域のカルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ (CaMKII) のリン酸化タンパク質発現量のベースレベルをウエスタンブロット法にて測定した。コルチコステロンの灌流によりリン酸化 CaMKII α と β のタンパク質発現量は有意に減弱し、細胞外 Zn^{2+} キレート剤である CaEDTA との同時灌流によりその減弱は阻止された (α : ACSF (-CS), 100.0 ± 4.5 ; ACSF (+CS), 48.4 ± 9.4 ; CaEDTA (-CS), 96.8 ± 10.8 ; CaEDTA (+CS), 120.1 ± 13.5) (β : ACSF (-CS), 100.0 ± 3.1 ; ACSF (+CS), 46.4 ± 10.7 ; CaEDTA (-CS), 106.8 ± 9.4 ; CaEDTA (+CS), 87.5 ± 14.5) (Fig. 11)。

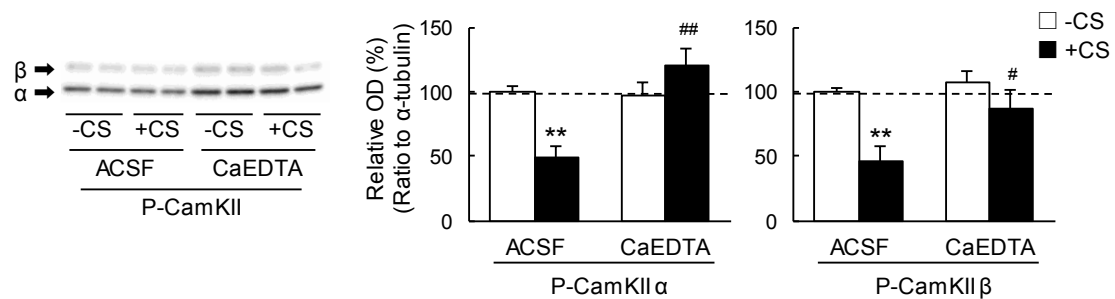


Fig. 11 Decrease of phosphorylated CaMKII level by corticosterone-induced increase in intracellular Zn^{2+} . The hippocampal CA1 was perfused with ACSF containing 500 ng/ml corticosterone (CS) and ACSF containing 500 ng/ml corticosterone + 1 mM CaEDTA for 20 min. Forty minutes later, phosphorylated CaMKII (P-CaMKII) levels were determined in hippocampal CA1 tissues. Representative images show P-CaMKII α and β protein expressions (left). Each bar and line represents the rate (%) of normalized P-CaMKII level by α -tubulin level in hippocampal CA1 tissues to that in hippocampal CA1 tissues perfused with ACSF, which is expressed as 100%. (middle and right). (ACSF (-CS), $n = 14$; ACSF (+CS), $n = 8$; CaEDTA (-CS), $n = 12$; CaEDTA (+CS), $n = 6$) ** $p < 0.01$, vs. ACSF (-CS); # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$, vs. ACSF (+CS) (Tukey's test)

2-3-7 コルチコステロンによる LTP 抑制に対するミネラルコルチコイド受容体およびグルココルチコイド受容体の関与

ミネラルコルチコイド受容体阻害剤であるスピロノラクトンまたはグルココルチコイド受容体阻害剤であるミフェプリストンをコルチコステロン灌流 10 分前から灌流後までの 30 分間灌流し、麻酔下ラットで海馬 CA1 領域の LTP を誘導した。コルチコステロンによる LTP 誘導の抑制はスピロノラクトンやミフェプリストンの灌流により阻止された (Fig. 12A, 12B)。また、スピロノラクトンおよびミフェプリストンの単独灌流は LTP 誘導に影響しないことを確認した (A: ACSF; 172.3 ± 5.9 , CS; 147.8 ± 5.6 , SP; 166.9 ± 12.4 , CS/SP; 174.0 ± 7.9) (B: ACSF; 172.3 ± 5.9 , CS; 147.8 ± 5.6 , MI; 177.5 ± 6.3 , CS/MI; 196.4 ± 3.2)。

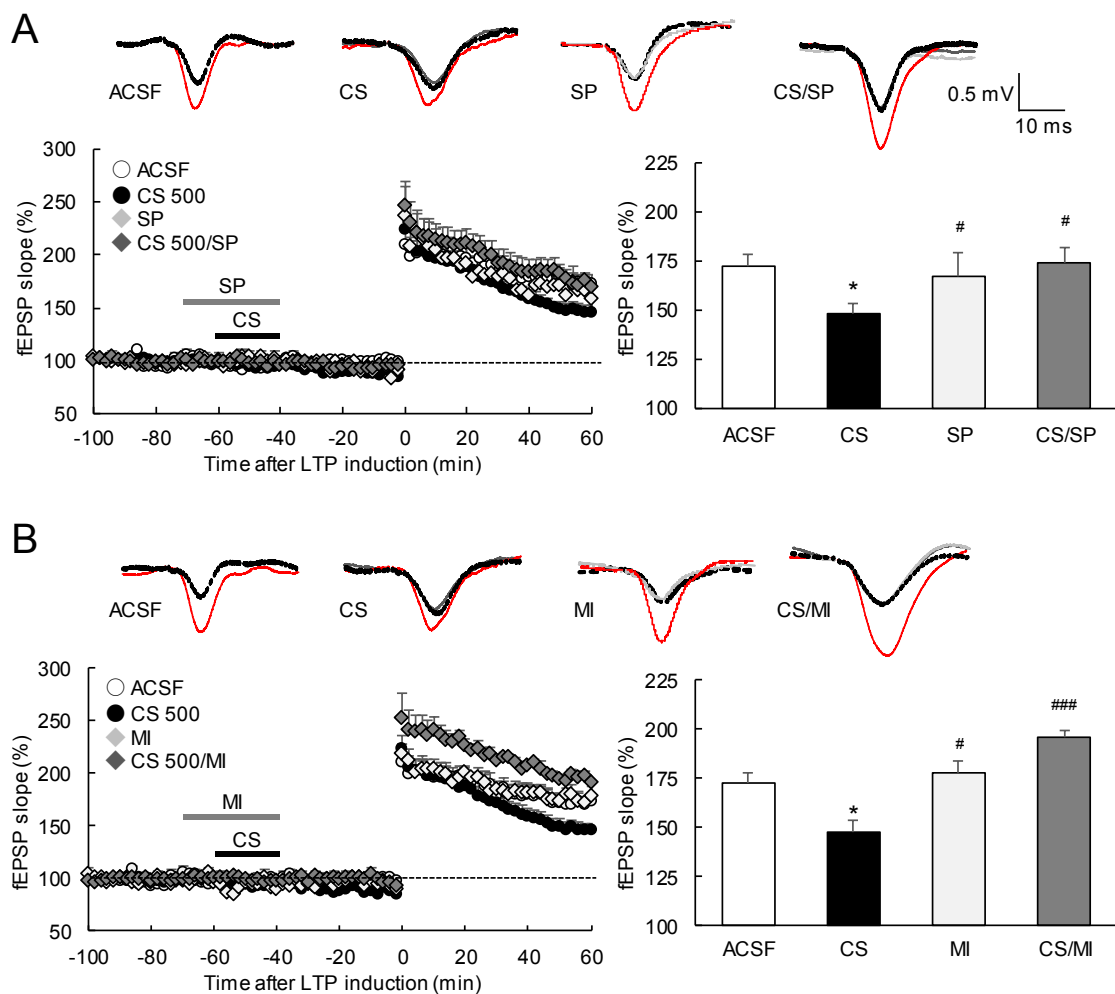


Fig. 12 MC and GC receptor antagonists rescue corticosterone-induced attenuation of CA1 LTP. (A) LTP was induced under hippocampal pre-perfusion with 500 ng/ml corticosterone (CS) in ACSF as shown by the black bar or/and 100 μ M spironolactone (SP) in ACSF as shown by the gray bar in anesthetized rats (left). The magnitude of LTP (right). ACSF, n = 13; CS, n = 11; SP, n = 6; SP/CS, n = 7. * $p < 0.05$, vs.ACSF, # $p < 0.05$, vs. CS 500 (Tukey's test). Representative fEPSP recordings at the time -80 min (black dotted line), -50 min (gray line), and 50 min (red line) are shown (upper). (B) LTP was induced under hippocampal pre-perfusion with 500 ng/ml corticosterone in ACSF as shown by the black bar or/and 10 μ M mifepristone (MI) in ACSF as shown by the gray bar in anesthetized rats (left). The magnitude of LTP (right). ACSF, n = 13; CS, n = 11; MI, n = 4; MI/CS, n = 5. * $p < 0.05$, vs. ACSF, # $p < 0.05$, ### $p < 0.005$, vs. CS 500 (Tukey's test). Representative fEPSP recordings at the time -80 min (black dotted line), -50 min (gray line), and 50 min (red line) are shown (upper).

2-3-8 コルチコステロンによる細胞内外の Zn^{2+} 動態の変化に対するミネラルコルチコイド受容体およびグルココルチコイド受容体の関与

コルチコステロンは細胞膜上のミネラルコルチコイド受容体およびグルココルチコイド受容体を活性化し、速い反応によって Zn^{2+} 動態を変化させるのか検討するため、ミネラルコルチコイド受容体阻害剤（スピロノラクトン）またはグルココルチコイド受容体阻害剤（ミフェプリストン）存在下、海馬スライスにコルチコステロンを添加し 120 秒間の細胞内外の Zn^{2+} 動態の変化を測定した。コルチコステロンによる海馬 CA1 領域放線層の細胞外 Zn^{2+} レベルの増加は、スピロノラクトン存在下有意に抑制されたが、ミフェプリストン存在下では抑制されなかった（A, B: Control, 116.9 ± 2.6 ; SP, 103.8 ± 2.9 ; MI, 114.2 ± 3.4 ）（Fig. 13A, 13B）。コルチコステロンによる海馬 CA1 領域放線層の細胞内 Ca^{2+} レベルの増加は、スピロノラクトン存在下完全に抑制されたが、ミフェプリストンによる変化は見られなかった（C, D: Control, 104.7 ± 1.5 ; SP, 100.3 ± 1.0 ; MI, 102.4 ± 1.1 ）（Fig. 13C, 13D）。コルチコステロンによる海馬 CA1 領域放線層の細胞内 Zn^{2+} レベルの増加は、スピロノラクトン存在下有意に抑制され、ミフェプリストン存在下では抑制傾向がみられ（E, F: Control, 105.3 ± 1.9 ; SP, 99.5 ± 1.3 ; MI, 100.6 ± 1.4 ）（Fig. 13E, 13F）、180 秒後では有意に細胞内 Zn^{2+} レベルがミフェプリストンにより抑制された（Control, 107.1 ± 2.5 ; SP, 99.2 ± 1.8 ; MI, 99.4 ± 1.8 , $p < 0.05$, vs. control）。

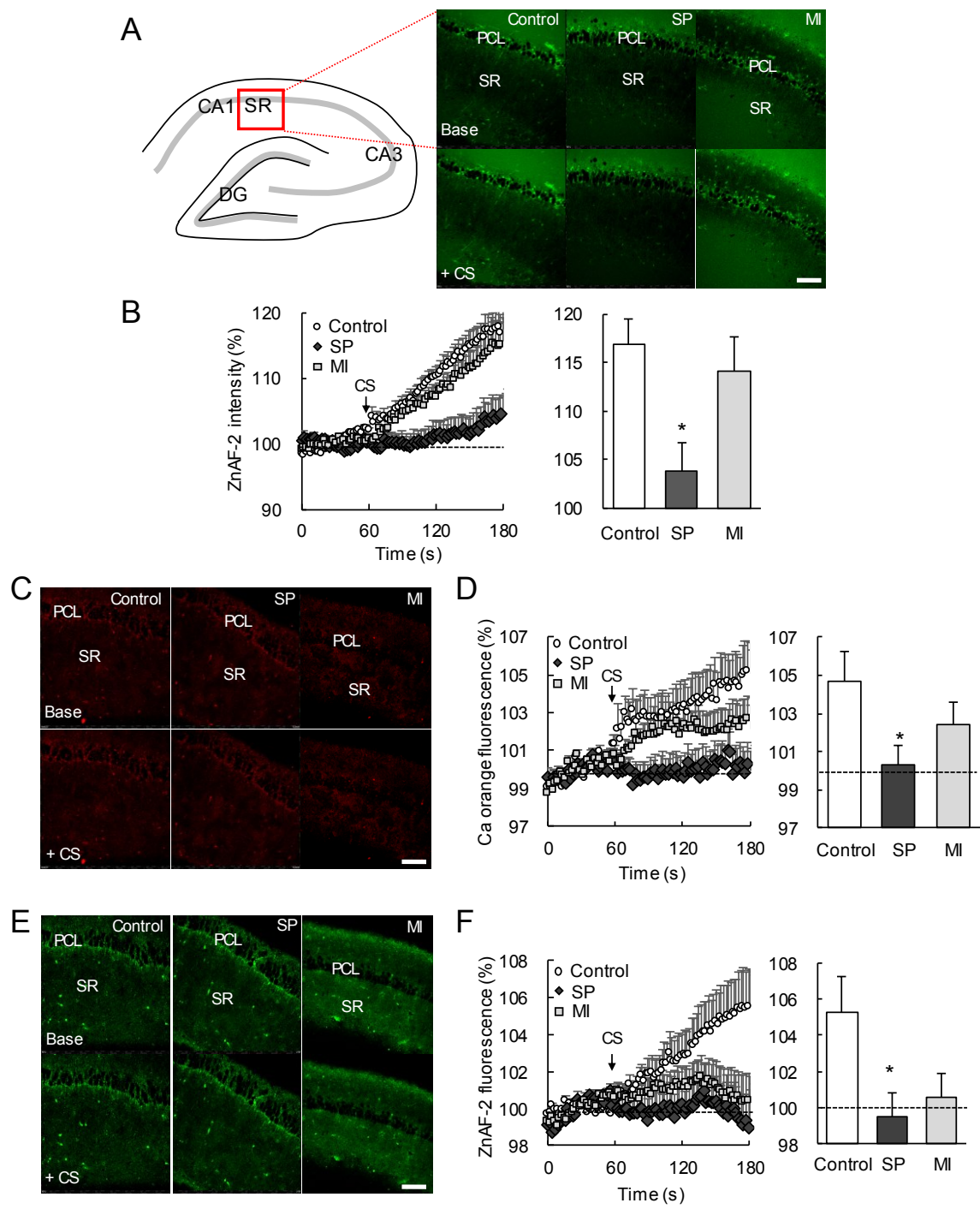


Fig. 13 Corticosterone-induced synaptic Zn^{2+} dynamics is differentially modulated by membrane MC and GC receptors in the hippocampal CA1. (A) The area surrounded with the red line in the CA1 was imaged in brain slices with extracellular ZnAF-2. Extracellular ZnAF-2 fluorescence in the CA1 of brain slices bathed in Ringer solution containing 10 μM ZnAF-2 and 100 μM spironolactone (SP) or in Ringer solution containing 10 μM ZnAF-2 and 10 μM mifepristone (MI). Extracellular ZnAF-2 fluorescence was imaged in the CA1 of brain slices at time 0 s (base) and 180 s (+ CS). PCL pyramidal cell layer, SR stratum radiatum. Bar, 50 μm . (B) Corticosterone was added to brain slices bathed in Ringer solution containing 10 μM ZnAF-2 as shown by the arrow 60 s after measuring the basal level of extracellular ZnAF-2 fluorescence, and the changes in extracellular ZnAF-2 fluorescence were measured for 120 s (control, $n = 10$; SP, $n = 9$; MI, $n = 14$). Each point and line represents the rate of ZnAF-2 fluorescence to the basal ZnAF-2 fluorescence (left). Each bar and line represents the rate (%) of the averaged ZnAF-2 fluorescence of the last 20 s (time 160–180 s) to the basal ZnAF-2 fluorescence, which was expressed as 100% (right). * $p < 0.05$, vs. control (Tukey's test). (C, D) Intracellular Ca orange fluorescence was imaged in the CA1 of brain slices, which were pre-loaded with calcium orange AM instead of adding ZnAF-2 to Ringer solution. Corticosterone was added to brain slices bathed in Ringer solution, 100 μM SP in Ringer solution, or 10 μM MI in Ringer solution in the same manner as (A) (Control, $n = 26$; SP, $n = 23$; MI, $n = 27$). * $p < 0.05$, vs. control (Tukey's test). (E, F) Intracellular ZnAF-2 fluorescence was imaged in the CA1 of brain slices, which were pre-loaded with ZnAF-2DA instead of adding ZnAF-2 to Ringer solution. Corticosterone was added to brain slices bathed in Ringer solution, 100 μM SP in Ringer solution, or 10 μM MI in Ringer solution in the same manner as (A) (Control, $n = 13$; SP, $n = 12$; MI, $n = 13$). * $p < 0.05$, vs. control (Tukey's test).

2-3-9 コルチコステロンによる細胞外 Zn^{2+} 増加に対するミネラルコルチコイド受容体の関与

コルチコステロンによる細胞外 Zn^{2+} 増加に対するミネラルコルチコイド受容体活性化の関与を明らかにするため、麻酔下ラット海馬 CA1 領域へコルチコステロンと同時にミネラルコルチコイド受容体阻害剤（スピロノラクトン）を灌流し、細胞外 Zn^{2+} レベルを測定した。コルチコステロンによる細胞外 Zn^{2+} レベルの増加は、スピロノラクトン同時灌流により有意に抑制された（スピロノラクトン灌流終了時, time 35-40 min, CS; $110.6 \pm 2.7\%$, CS+SP; $102.0 \pm 1.9\%$) (Fig. 14)。

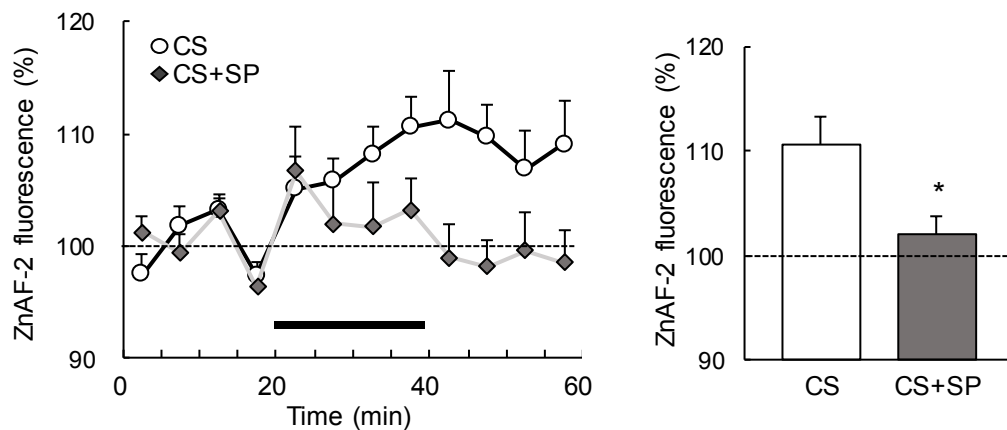


Fig. 14 Corticosterone-induced increase in extracellular Zn^{2+} level canceled by co-perfusion with spironolactone. The hippocampal CA1 was perfused with 500 ng/ml corticosterone (CS, $n = 26$) and spironolactone (SP, $n = 14$) for 20 min (time, 20–40 min) as shown by the black bar. Each point and line represents ZnAF-2 fluorescence that is the ratio (%) of ZnAF-2 fluorescence in each perfusate to basal ZnAF-2 fluorescence in perfusate under the perfusion with ACSF for 20 min (time, 0–20 min, left). Basal ZnAF-2 fluorescence in perfusate is expressed as 100%. Each bar and line represents the rate (%) of each averaged ZnAF-2 fluorescence to the basal ZnAF-2 fluorescence (time, 35–40 min, right). * $p < 0.05$, vs. CS (t-test)

2-3-10 コルチコステロンによる CaMKII リン酸化タンパク質発現量の減弱に対するミネラルコルチコイド受容体の関与

コルチコステロンによる CaMKII リン酸化タンパク質発現量の減少に対するミネラルコルチコイド受容体の関与を明らかにするため、海馬 CA1 にコルチコステロンと同時にミネラルコルチコイド受容体阻害剤であるスピロノラクトンを灌流した後、海馬サンプルを作製し CaMKII リン酸化タンパク質発現量を検討した。コルチコステロンによるリン酸化 CaMKII タンパク質発現量の減少は、 α 型 β 型ともにスピロノラクトンにより有意に阻止された (α : ACSF (-CS), 100.0 ± 2.9 ; ACSF (+CS), 75.7 ± 6.6 ; SP (-CS), 84.6 ± 5.7 ; SP (+CS), 102.4 ± 4.2) (β : ACSF (-CS), 100.0 ± 2.3 ; ACSF (+CS), 75.7 ± 7.3 ; SP (-CS), 101.7 ± 10.3 ; SP (+CS), 110.9 ± 4.1) (Fig. 15)。

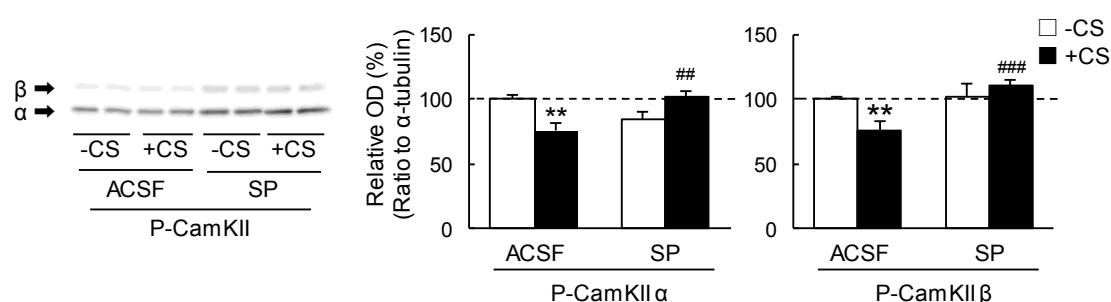


Fig. 15 Corticosterone-induced decrease in phosphorylated CaMKII level canceled by co-perfusion with spironolactone. The hippocampal CA1 was perfused with AF containing 500 ng/ml corticosterone (CS) and ACSF containing 500 ng/ml corticosterone + 100 μ M spironolactone (SP) for 20 min. Forty minutes later, phosphorylated CaMKII (P-CaMKII) levels were determined in hippocampal CA1 tissues. Image shows P-CaMKII α and β protein expressions (left). Each bar and line represents the rate (%) of normalized P-CaMKII level by α -tubulin level in hippocampal CA1 tissues to that in hippocampal CA1 tissues perfused with ACSF, which is expressed as 100%. (middle and right). ACSF (-CS), $n = 27$; ACSF (+CS), $n = 24$; SP (-CS), $n = 15$; SP (+CS), $n = 16$. ** $p < 0.01$, vs. ACSF (-CS); # $p < 0.05$; ### $p < 0.01$, #### $p < 0.005$, vs. ACSF (+CS) (Tukey's test)

2-3-11 水浸ストレス負荷による海馬 CA1 細胞内 Zn^{2+} の増加

ストレス負荷による海馬 CA1 領域の細胞内 Zn^{2+} レベルの変化を明らかにするため、ラット海馬 CA1 領域へインジェクションカニューレを挿入し固定後、固定したカニューレを介して覚醒下で細胞内 Zn^{2+} 蛍光試薬である ZnAF-2DA (100 μ M) を流速 0.25 μ l/min で 4 分間投与した後、水浸ストレスを 30 分間負荷し、直後に海馬スライスを作製し、CA1 放線層の ZnAF-2 蛍光強度を測定した (Fig. 16A)。海馬 CA1 放線層の ZnAF-2 蛍光強度は水浸ストレスの負荷により有意に増加した (Control, 100.0 ± 6.0 ; Stress, 140.6 ± 22.4) (Fig. 16B)。

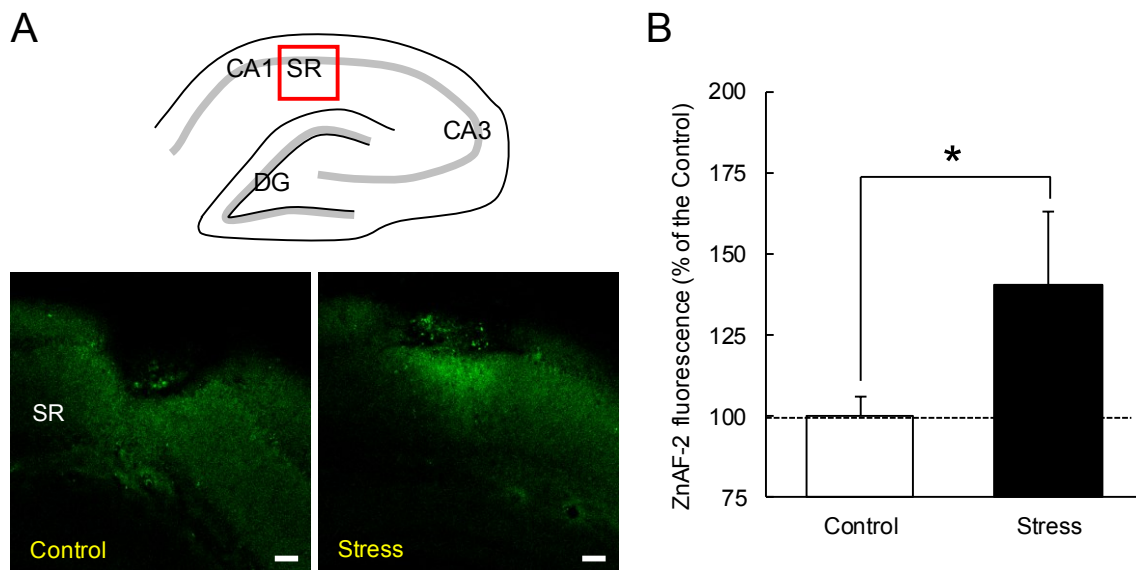


Fig. 16 Increase in intracellular Zn^{2+} at the hippocampal CA1 after exposure to water immersion stress. (A) ACSF containing ZnAF-2DA (100 μ M) was bilaterally injected into the CA1 of unanesthetized rats at the rate of 0.25 μ l/min for 4 min, as illustrated in the brain map above fluorescence images from the right hippocampus. Five minutes after injection, rats were exposed to water immersion stress for 30 min. After stress exposure, coronal brain slices were prepared. Intracellular ZnAF-2 fluorescence was measured in the CA1. SR stratum radiatum layer. Bars 100 μ m. (B) At least five regions of interest were set in the CA1. Each bar and line represents fluorescence intensity in the stratum radiatum after exposure to stress (Control, $n = 10$; Stress, $n = 5$). * $p < 0.05$ (t-test).

2-3-12 水浸ストレス負荷による覚醒下海馬 CA1 LTP の減弱に対する Zn^{2+} の関与

刺激電極、カニューレ付記録電極をラット海馬 CA1 へ挿入し固定した後、覚醒下にて、ZnAF-2DA (100 μ M) を流速 0.25 μ l/min で 4 分間投与した後、水浸ストレスを 30 分間負荷した。4 時間後、覚醒下で LTP を誘導した。覚醒下ラット海馬 CA1 の LTP 誘導は水浸ストレス負荷により減弱し、その減弱は細胞内 Zn^{2+} キレーターである ZnAF-2DA の前投与により阻止された (ACSF, 123.7 \pm 4.2; ACSF+Stress, 104.1 \pm 7.5; ZnAF-2DA+Stress, 127.5 \pm 4.7) (Fig. 17)。

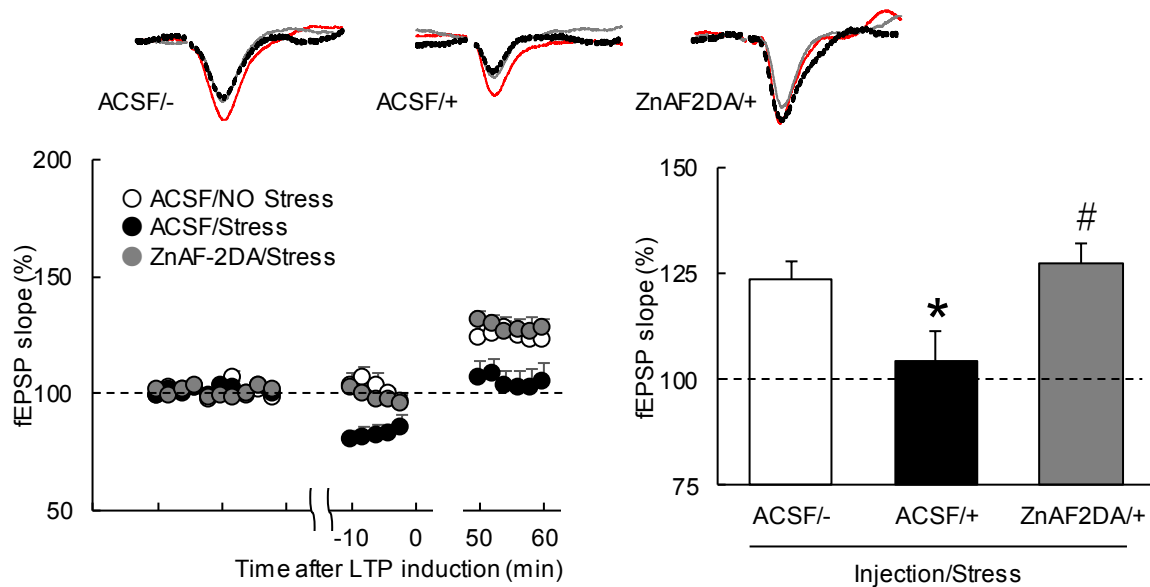


Fig. 17 Rescue of stress-induced attenuation of CA1 LTP by intracellular Zn^{2+} chelator. ACSF containing ZnAF-2DA (100 μ M) was injected into the CA1 of unanesthetized rats at the rate of 0.25 μ l/min for 4 min. Five minutes after injection, rats were exposed to water immersion stress for 30 min. Four hours after stress exposure, LTP was induced (left). The magnitude of LTP (right). ACSF (-), $n = 9$; ACSF (+), $n = 8$; ZnAF-2DA (+), $n = 6$. * $p < 0.05$, vs. ACSF (-), # $p < 0.05$, vs. ACSF (+) (Tukey's test). Representative fEPSP recordings at the base line (black dotted line), -5 min (gray line), and 50 min (red line) are shown (upper).

2-4 考察

ストレスによるグルタミン酸レベルの増加は認知機能を障害する。それら認知機能障害にはストレス負荷時に分泌されるグルココルチコイドが関与する^[49]。グルココルチコイドは、ミネラルコルチコイド受容体やグルココルチコイド受容体に結合する。古典的に細胞質内に存在するミネラルコルチコイド受容体やグルココルチコイド受容体はグルココルチコイドの結合により核内へ移行し転写調節因子として、遺伝子発現を伴う遅い応答を行う。細胞質内のミネラルコルチコイド受容体は、グルココルチコイド受容体と比較してグルココルチコイドへの親和性が 10 倍程度高いためほぼ飽和しており、細胞生存等に関与する^{[45][50]}。一方でグルココルチコイド受容体は、ストレス負荷時や日内変動におけるピーク時においてグルココルチコイドとの結合率が增加する。近年、細胞膜上に存在するミネラルコルチコイド受容体やグルココルチコイド受容体が遺伝子発現を伴わない速い応答を呈することが注目されている^[51]。コルチコステロン投与による認知機能障害はミネラルコルチコイド受容体阻害剤で改善され、タンパク合成阻害剤では変化がないとの報告がある^[52]。この障害に細胞膜ミネラルコルチコイド受容体活性化を介した速い反応が関与すると考えられる。細胞膜上のミネラルコルチコイド受容体は、通常時に飽和状態である細胞質のミネラルコルチコイド受容体と比較してグルココルチコイドに対する親和性は低く、 K_d 値は 10 nM 程度であり^[16]、細胞膜上にはグルココルチコイドが結合していないミネラルコルチコイド受容体が存在する。海馬 CA1 領域において、プレシナプス膜上に存在するミネラルコルチコイド受容体はグルタミン酸の放出確率を増大させること、ポストシナプスに存在するミネラルコルチコイド受容体は K^+ チャネルを抑制し細胞の興奮性を高めることが知られ^[53]、ストレス負荷時の細胞膜上のミネラルコルチコイド受容体やグルココルチコイド受容体活性化は、細胞外グルタミン酸レベルを増加させ認知機能を低下させると考えられている^{[54][55]}。そこで、グルココルチコイドによる細胞内外の Zn^{2+} レベルの変化を解析した。麻酔下ラットにおいて海馬 CA1 領域にコルチコステロンを灌流すると細胞外液中の Zn^{2+} レベルが増加し (Fig. 6)、細胞外 Zn^{2+} レベルの増加はミネラルコルチコイド受容体阻害剤存在下で有意に抑制された (Fig. 14)。また、コルチコステロンの海馬 CA1 投与では細胞内 Zn^{2+} レベルも増加した (Fig. 7)。海馬スライスに AMPA 受容体阻害剤存在下コルチコステロンを添加すると、細胞内 Ca^{2+} および Zn^{2+} レベルの増加はブロックされた (Fig. 8)。コルチコステロンは細胞膜ミネラルコルチコイド受容体活性化を介してシャーフアー側枝終末からのグルタミン酸と Zn^{2+} の放出を増加させ、AMPA 受容体活性化を介して CA1 錐体細胞内への Ca^{2+} や Zn^{2+} の流入を増加させることが示された。

海馬において、ストレスは LTP を障害し、長期抑圧、long-term depression (LTD) を促進するとの報告が存在するが、ストレス負荷の強度や期間、経過時間によってシナプス可塑性に対する作用は異なる^[56]。適度なストレスは認知機能に対して促進的に働く一方で、過度な慢性的なストレスは学習記憶を障害する^{[57][58]}。麻酔下ラットにおいて海馬 CA1 領域に 50 ng/ml コルチコステロンを LTP 誘導 5 分前までの 20 分間または LTP 誘導 5 分後から 20 分間灌流しても LTP 誘導に有意な変化は見られなかった (Fig. 9A, 9B)。LTP 誘導前の灌流では促進傾向が見られた。コルチコステロンを LTP 誘導の直前に灌流することで LTP が促進される

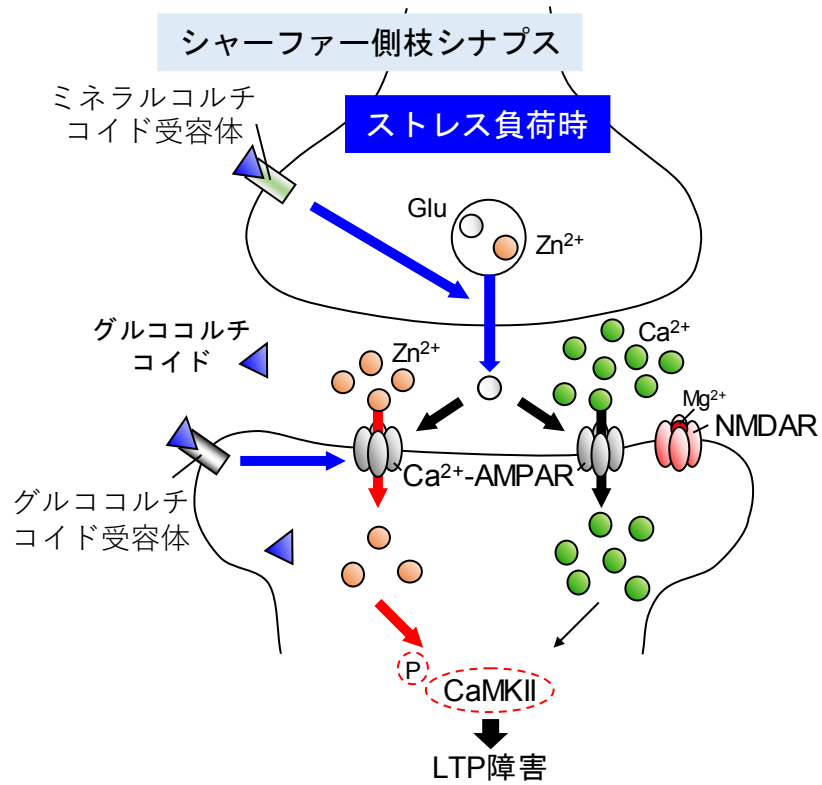
こと^[59]、コルチコステロンが Ca^{2+} 透過型の AMPA 受容体を膜上に移行させ、LTP を促進させることが報告されている^{[60][61][62]}。したがって、コルチコステロンによる AMPA 受容体の増加により、細胞内 Zn^{2+} がピコモル濃度の範囲で増加し LTP 誘導が促進される可能性が考えられる。コルチコステロンによる LTP 誘導の促進に対する Zn^{2+} の関与を詳細に検討する必要がある。

LTP 誘導時に 50 ng/ml のコルチコステロンを灌流すると、CA1 LTP は減弱し、この減弱は CaEDTA 存在下で改善された (Fig. 9C)。コルチコステロンによる LTP 障害にシナプス Zn^{2+} 動態が関与することが *in vivo* で初めて示された。高頻度刺激中のコルチコステロンによる細胞外から細胞内への過剰な Zn^{2+} 流入が LTP 誘導を減弱することが示されたため、それぞれ単独では LTP 誘導に変化を与えない 1 μM ZnCl_2 と 5 ng/ml コルチコステロンを同時に灌流すると LTP 誘導は減弱することが示された (Fig. 9D)。細胞外液中の Zn^{2+} レベルの増加によりコルチコステロンによる LTP 誘導の減弱が促進された。CA1 LTP は 50 ng/ml コルチコステロンの LTP 誘導 1 時間前の灌流では抑制されなかったが、500 ng/ml の灌流では抑制された。同様に、この減弱は CaEDTA 存在下で改善された (Fig. 10A)。コルチコステロン灌流後に CaEDTA を灌流した場合でもコルチコステロンによる LTP 誘導の減弱は改善された (Fig. 10B)。コルチコステロンによる細胞外 Zn^{2+} レベルの増加は細胞外コルチコステロンレベルが低下しても持続することが要因であると考えられる。虚血による海馬 CA1 領域の細胞死は、虚血から 48-60 時間後における CaEDTA 投与により改善される^[63]。したがって、ストレス負荷時だけでなく、ストレス負荷後であっても、過剰な細胞内 Zn^{2+} 流入を阻害することで後の認知機能障害を阻止できる可能性がある。

CaMKII のリン酸化レベルは、海馬 CA1 領域において LTP 誘導後に増加するが^{[64][65]}、慢性ストレス負荷によりベースの CaMKII リン酸化レベルが低下し、LTP 誘導が減弱する^[66]。さらに、LTP 誘導には、CaMKII のリン酸化だけでなく、CaMKII が作用する部位も重要であることが知られており^[7]、海馬には α 型および β 型の CaMKII が存在し、 α 型の CaMKII は CA1 領域の LTP 誘導に^[67]、 β 型の CaMKII は α 型 CaMKII のシナプスへの移行に関与する^{[68][69]}。そこで、 α 型および β 型のリン酸化 CaMKII タンパク質発現量を解析した。コルチコステロンはリン酸化 CaMKII タンパク質のベースレベルでの発現量を α 型および β 型ともに低下させ、それらの低下は CaEDTA 同時灌流により阻止された (Fig. 11)。 Zn^{2+} は CaMKII に結合し、直接的に活性を阻害することが知られている^[70]が、*in vitro* での高濃度 Zn^{2+} を用いた報告である。本検討では、海馬細胞内 Zn^{2+} レベルは、グルココルチコイドによって、直接的に CaMKII を抑制するレベルにまで達していないと考えている。CaMKII は苔状線維-CA1 錐体細胞間のグルタミン酸作動性神経において神経伝達物質の放出を抑制するとの報告がある^[71]。したがって、ストレス負荷時にプレシナプスに存在する CaMKII の活性化が抑制されることで、グルタミン酸とともに Zn^{2+} の細胞外への放出が促進され、細胞内 Zn^{2+} 取り込みが亢進し、LTP 誘導を抑制した可能性もある。

コルチコステロンによるシナプスでの Zn^{2+} や Ca^{2+} の動態変化をその細胞膜受容体に着目し、秒単位での作用を海馬スライスで検討すると、コルチコステロンによる細胞外および細胞内の Zn^{2+} レベルの増加はミネラルコルチコイド受容体阻害剤であるスピロノラクトン存在下阻止された (Fig. 13)。スピロノラクトンはコルチコステロンと同時に灌流することで *in vivo* での細胞外 Zn^{2+} レベルの増加、CaMKII リン酸化レベルの減少、CA1 LTP 誘導の抑制すべてを阻害した (Fig. 12A, 14, 15)。コルチコステロンによりシャーファー側枝からミネラルコルチコイド受容体活性化を介してグルタミン酸とともに細胞外に放出された Zn^{2+} は AMPA 受容体活性化を介して CA1 錐体細胞に取り込まれ、CaMKII リン酸化レベルを低下させ、LTP 誘導を抑制することが示された。脳内の細胞外コルチコステロンレベルは約 1-2 ng/ml であり^[72]、細胞膜上のミネラルコルチコイド受容体を活性化させグルタミン酸の放出を促進するためには、少なくとも 5 ng/ml のコルチコステロンが必要である^[16]。そのことから、本検討の 50 ng/ml のコルチコステロン灌流では、細胞外コルチコステロンレベルが 5 ng/ml に達しておらず、十分にミネラルコルチコイド受容体が活性化されていなかったことが考えられる。しかし、500 ng/ml コルチコステロン灌流では、細胞膜上のミネラルコルチコイド受容体が活性化によりグルタミン酸が放出され、AMPA 受容体活性化を介して細胞内への Zn^{2+} 流入が増加し、LTP 誘導が抑制されたと考えられる。また、グルココルチコイド受容体阻害剤であるミフェプリストンによってもコルチコステロンによる LTP 誘導の障害は阻止された (Fig. 12B)。ミフェプリストンは細胞外 Zn^{2+} の増加は抑制しなかったが、細胞内 Zn^{2+} の増加を抑制した (Fig. 13)。コルチコステロンは細胞膜のグルココルチコイド受容体活性化により non-genomic な作用を介して海馬 CA1 領域のスパイン合成を促進する^{[73][74]}。コルチコステロンはグルココルチコイド受容体活性化を介して、何らかのメカニズムで細胞内 Zn^{2+} レベルを増加させ、LTP 誘導を抑制することが示唆された。コルチコステロンによる細胞内 Ca^{2+} レベルの増加は、スピロノラクトンのみで抑制されミフェプリストンでは変化しなかった (Fig. 13C, 13D)。コルチコステロンによる LTP 誘導の抑制には、必ずしも細胞内 Ca^{2+} レベルの増加が伴うわけではないことが示され、細胞内 Ca^{2+} ではなく細胞内 Zn^{2+} レベルの増加が重要であることが示唆された。

急性ストレスは物体認識記憶を障害する^{[75][76][77][78]}。実際のストレス負荷による認知機能障害に対する Zn^{2+} の関与を検討した。CA1 領域にインジェクションカニューレを挿入し固定後、覚醒下で ZnAF-2DA を投与し、直後に水浸ストレスを負荷し、海馬スライスを作製し、海馬 CA1 領域の ZnAF-2 蛍光強度を検出すると、ストレス負荷により海馬細胞内 Zn^{2+} レベルが増加することが示された (Fig. 16)。さらに、水浸ストレス負荷前に海馬 CA1 領域の細胞内 Zn^{2+} を ZnAF-2DA でキレートすると、水浸ストレス負荷による覚醒下海馬 CA1 LTP 誘導の抑制が阻止された (Fig. 17)。したがって、ストレス負荷時に分泌されるグルココルチコイドは、海馬 CA1 において細胞膜上の受容体に結合し、シャーファー側枝からのグルタミン酸と Zn^{2+} の放出を増加させ、CA1 錐体細胞内 Zn^{2+} レベルを増加させること、この増加により CaMKII リン酸化レベルが低下して LTP 誘導が抑制され、認知機能が障害されることが示唆された (Scheme. 7)。

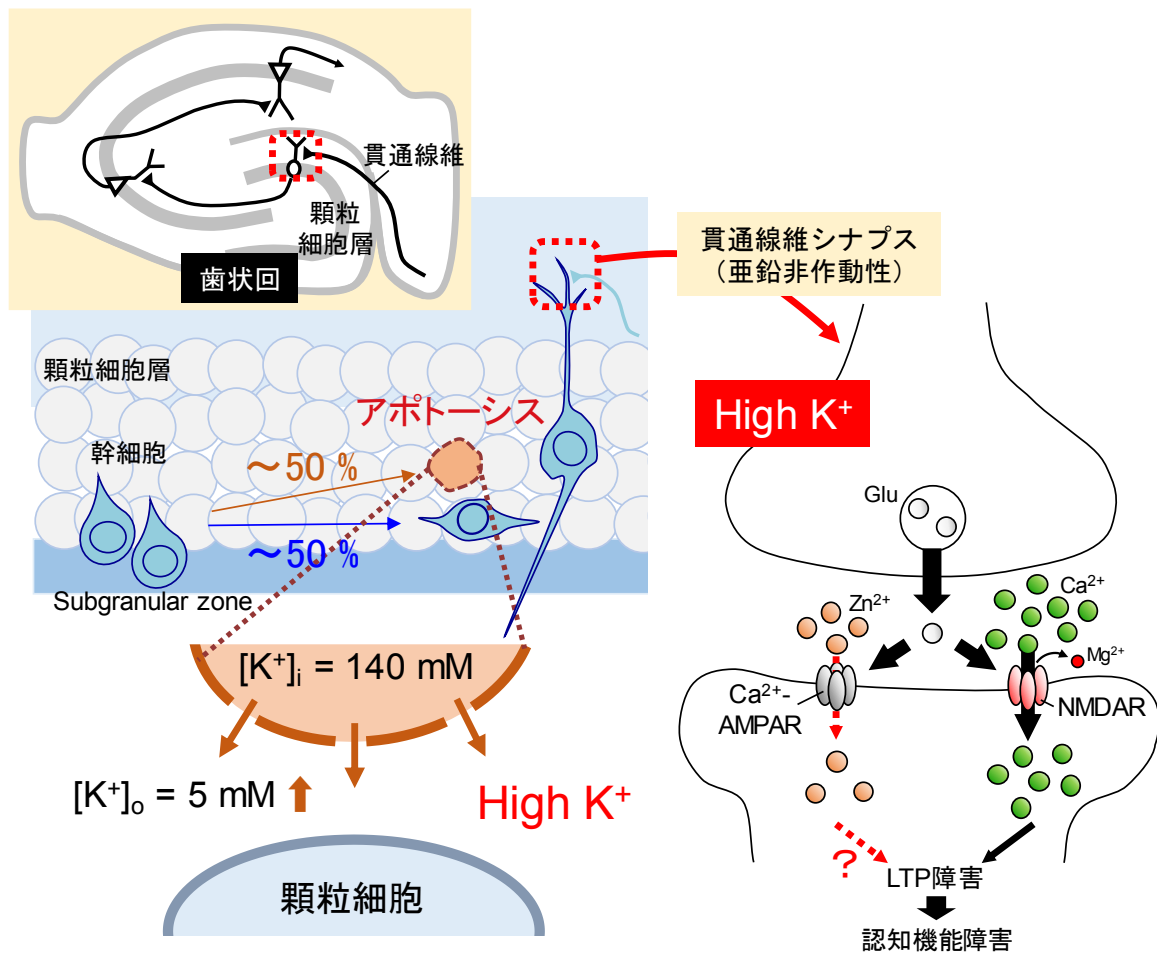


Scheme. 7

第3章 海馬歯状回顆粒細胞内への過剰な Zn^{2+} 流入による認知機能障害

3-1 序論

海馬 CA1 錐体細胞は、脳虚血時のグルタミン酸興奮毒性に対して脆弱であることが知られている^{[27][79]}。一方、歯状回顆粒細胞は虚血時のグルタミン酸興奮毒性に対して脆弱であるとの報告はないが^{[23][80]}、老化に脆弱な部位であることが知られている。しかし、その原因は明らかではない。海馬歯状回は他の海馬領域と異なり、神経幹細胞から神経新生が誘導される^[81]。神経新生と同時に、増加した幹細胞の約 50%はアポトーシスを起こす。アポトーシスにより細胞内 K^+ が細胞外に流出し^[82]、非特異的な脱分極が誘導されと考えられる。ところで、歯状回貫通線維は亜鉛非作動性神経であり、シャーファー側枝と異なり Zn^{2+} を放出しない。しかし、アポトーシスによる細胞外 K^+ 濃度の上昇により、細胞外グルタミン酸レベルが増加することで細胞外に存在する Zn^{2+} が細胞内へ流入し、認知機能を障害する可能性がある (Scheme. 8)。そこで第三章では、細胞外 K^+ レベル増加に伴う貫通線維興奮時に認知機能が障害され、この障害に細胞外から顆粒細胞内への Zn^{2+} 流入が関与するかを検討した。



Scheme. 8

3-2 実験方法

3-2-1 麻酔下 *in vivo* DG LTP の誘導

抱水クロラル水溶液で麻酔したラットの頭部をステレオ装置に保定し、2本のタングステン線からなる刺激電極を、Bregmaの後方8.0 mm、右4.5 mm、深さ3.0-3.5 mmに、インジェクションカニューレ付き記録電極（EIM-60、エイコム（株））を、Bregmaの後方4.0 mm、右2.5 mm、深さ3.0-3.5 mmの位置に挿入した。貫通線維に刺激電極を、その投射先である顆粒細胞層に記録電極を挿入すると、興奮性シナプス後電位（fEPSP）は、上向きのプラス電位で記録される。細胞体において活動電位が発生すると、下向きのPopulation spike（PS）が観察されるため、PSの大きさ（Amplitude）を、発火した細胞体の数の指標として測定した。PSのamplitudeの最大値の約40%が現れる電流を用い、0.05 Hzのテスト刺激でベースラインとして、PSを30分間モニターした。ベースをモニター後、生理食塩水、100 mM KClまたは100 mM KCl + 10 mM CaEDTAを投与流速0.25 μ l/minで4分間または8分間投与し、60分後に高頻度刺激（200 Hz、0.1秒、10回、10秒間隔）によりLTPを誘導した。その後もテスト刺激でPSのモニターを60分間続け、最後の10分間のPSのamplitudeの平均値を誘導されたLTPの大きさとして評価した。また、ベースをモニター後、LTPを誘導し、その5分後に生理食塩水、100 mM KClまたは100 mM KCl + 1 mM CaEDTAを流速0.25 μ l/minで4分間投与した。LTPを誘導した60分後までPSのモニターを続けた。

3-2-2 *In vivo* 海馬歯状回細胞内 Zn^{2+} イメージング

抱水クロラル水溶液で麻酔したラットの頭部をステレオ装置に保定し、インジェクションカニューレをBregmaの後方4.0 mm、左右2.5 mm、深さ3.2 mmの位置に挿入した。30分後、生理食塩水で希釈したZnAF-2DA（100 μ M）とともに、生理食塩水、KCl（100 mM）、KCl + CaEDTA（10 mM）、KCl + CNQX（2 mM）を流速0.25 μ l/minで8分間投与した。投与終了から5分後、全脳スライスを作成した。海馬の測定領域を明確にするため、全脳スライスを5 μ MのCalcium Orange AM溶液に浸し、30分間静置し、リングル液中に戻して20分以上静置した後、測定に用いた。リングル液2 mlを満たしたDishに、作成した全脳スライスに移し、共焦点レーザースキャン顕微鏡（LSM510、Carl Zeiss）にて、歯状回顆粒細胞層のCalcium orange（励起波長543 nm、測定波長560 nm）とZnAF-2（励起波長488 nm、測定波長505-530 nm）の蛍光強度を測定した。

3-2-3 海馬歯状回へ局所投与後の物体認識試験

抱水クロラル水溶液で麻酔したラットの頭部をステレオ装置に保定し、Bregmaの後方4.0 mm、左右2.5 mmの位置に、ステレオ用ガイドを用いて、ガイドカニューレを3.2 mmの深さに挿入し、アロンアルファで固定した。1週間後、ガイドカニューレにインジェクションカニューレを挿入し、覚醒下、生理食塩水、100 mM KClまたは100 mM KCl + 10 mM CaEDTAを流速0.25 μ l/minで、8分間かけて投与し、1-2-6-2と同様に物体認識試験を行った。投与は、

物体認識試験の Training を行う 1 時間前または Training を行った 5 分後に行った。

3-3 実験結果

3-3-1 高カリウム刺激による海馬歯状回 LTP 誘導の障害と物体認識記憶獲得障害に対する Zn^{2+} の関与

100 mM KCl を海馬歯状回領域に局所投与した 1 時間後に歯状回 LTP を誘導した。100 nmol の KCl 投与（流速 0.25 $\mu\text{l}/\text{min}$ で 4 分間の合計 1 μl を投与）では歯状回 LTP は変化しなかったが、その倍量である 200 nmol の KCl 投与（流速 0.25 $\mu\text{l}/\text{min}$ で 8 分間の合計 2 μl を投与）では有意に抑制された。その抑制は細胞外 Zn^{2+} キレーターである 20 nmol の CaEDTA (10 mM) との同時投与で阻止された (saline, $250.9 \pm 15.0\%$; 100 nmol KCl, $250.8 \pm 18.7\%$; 200 nmol KCl, $156.6 \pm 25.0\%$; 200 nmol KCl+20 nmol CaEDTA, $250.3 \pm 8.0\%$) (Fig. 18A, 18B)。また、覚醒下固定したカニニューレを介して海馬歯状回領域に KCl を投与した 1 時間後に物体認識試験の Training を行いその 1 時間後に Test を行った。物体に興味を示した時間は、群間による有意な差は無かった (Approach time: saline, $25.3 \pm 2.0\%$; KCl, $26.5 \pm 2.3\%$; KCl + CaEDTA, $25.5 \pm 2.4\%$)。海馬歯状回への 200 nmol KCl 投与により物体認識記憶の獲得は有意に抑制されたが、その障害は 20 nmol CaEDTA の同時投与により阻止された (recognition index; saline, $66.3 \pm 1.5\%$; KCl, $51.4 \pm 2.6\%$; KCl + CaEDTA, $66.5 \pm 4.0\%$) (Fig. 18C)。

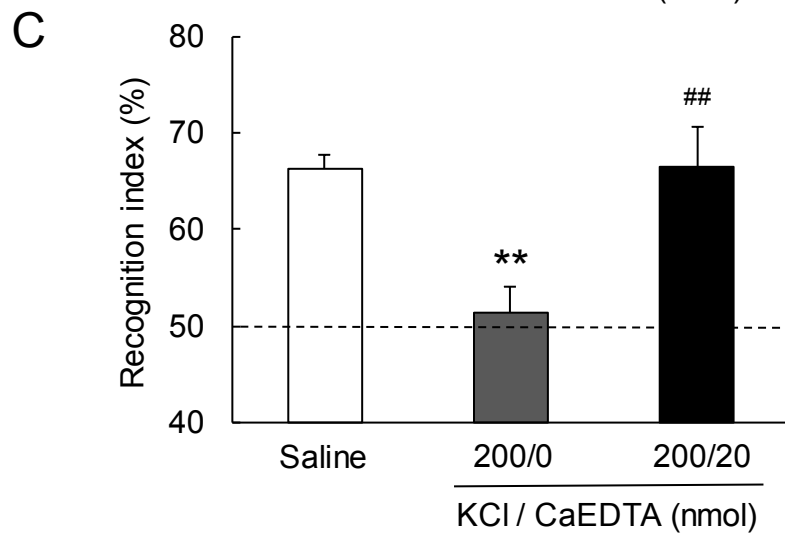
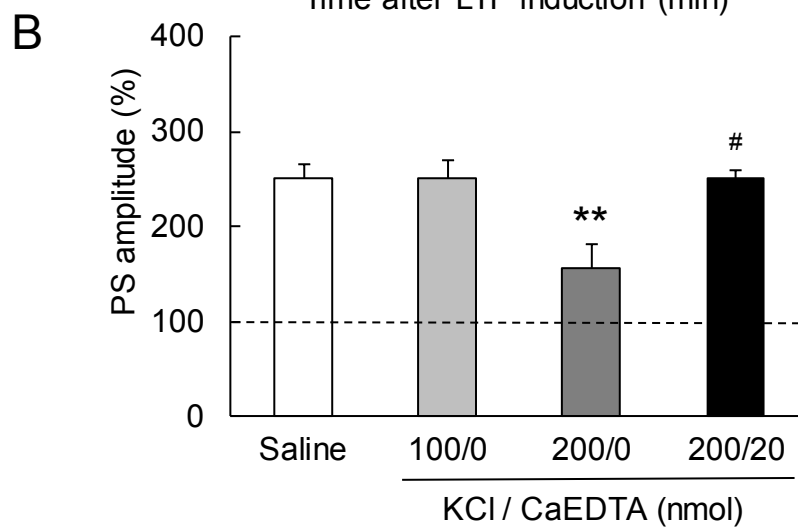
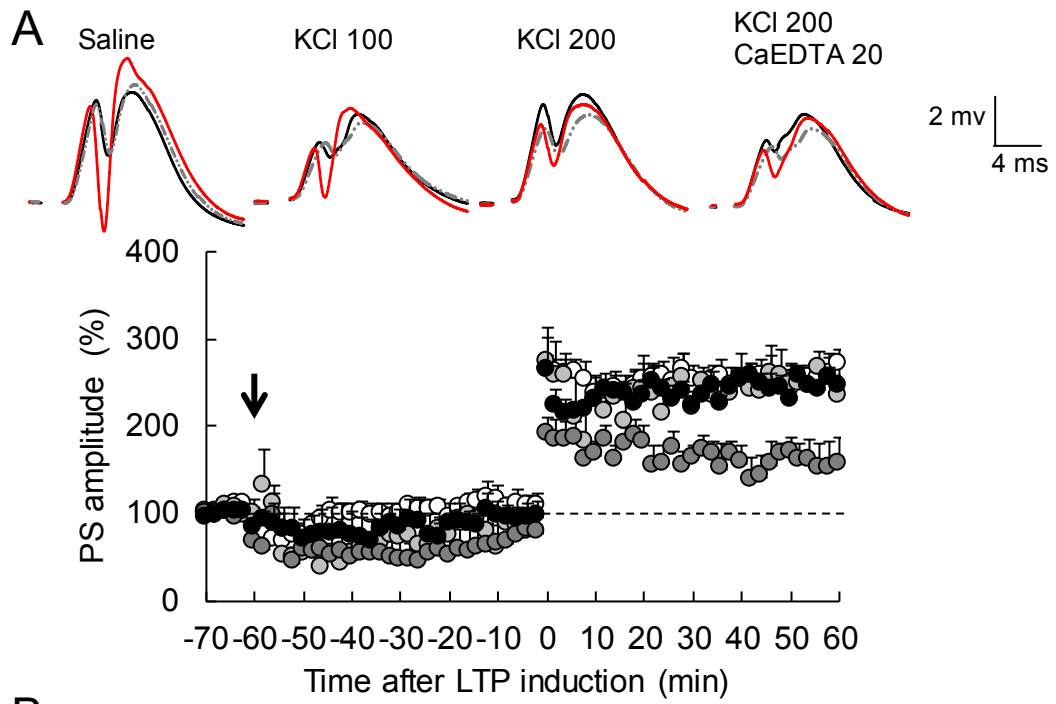


Fig. 18 High K⁺-induced impairments of LTP and memory. (A) LTP was induced 1 h after injection of saline (1 μ l, control, n = 7), 100 nmol KCl (100 mM, 1 μ l, n = 4), 200 nmol KCl (100 mM, 2 μ l, n = 6), or 200 nmol KCl + 20 nmol CaEDTA (100mM KCl + 10 mM CaEDTA, 2 μ l, n = 4) via an injection cannula. The arrow shows the time of injection. Representative fEPSP recordings at the time -70 min (black line before injection), -20 min (after injection; dotted line) and 50 min (after tetanic stimulation; red line) are shown (upper side). (B) The magnitude of LTP. **, p < 0.01, vs. saline, #, p < 0.05, vs. 200 nmol KCl (Tukey's test). (C) The object recognition test was performed 1 h after bilateral injection of saline (1 μ l, control, n = 9), 200 nmol KCl (100 mM, 2 μ l, n = 8), or 200 nmol KCl + 20 nmol CaEDTA (100 mM KCl + 10 mM CaEDTA, 2 μ l, n = 8). **, p < 0.01, vs. saline, ##, p < 0.01, vs. 200 nmol KCl (Tukey's test).

3-3-2 LTP 誘導後または学習後の高カリウム刺激による歯状回 LTP 誘導の障害または物体認識記憶の獲得障害に対する Zn^{2+} の関与

麻酔下ラット歯状回領域において、LTP を誘導した 5 分後に 200 nmol KCl を局所投与したところ、LTP は有意に抑制され、その抑制は 20 nmol CaEDTA との同時投与により阻止された (saline, $219.7 \pm 21.7\%$; 200 nmol KCl, $124.9 \pm 18.6\%$; 200 nmol KCl + 20 nmol CaEDTA, $213.4 \pm 19.4\%$) (Fig. 19A, 19B)。また、物体認識試験の Training 実施 5 分後に歯状回へ KCl を投与し、Test を行った。物体認識試験において、物体に興味を示す時間は群間において有意な差はなかった (Approach time: saline, $29.0 \pm 2.7\%$; 200 nmol KCl, $21.9 \pm 4.6\%$; 200 nmol KCl + 20 nmol CaEDTA, $26.5 \pm 4.2\%$)。Training 後の KCl 投与により、物体認識記憶の獲得が障害され、その障害は CaEDTA により回避された (saline, $65.7 \pm 3.3\%$; 200 nmol KCl, $51.6 \pm 2.8\%$; 200 nmol KCl + 20 nmol CaEDTA, $69.2 \pm 4.8\%$) (Fig. 19C)。さらに、別の物体を用いて、24 時間後に再度物体認識試験を行ったところ、KCl 投与群においても物体認識記憶が獲得され、KCl による物体認識記憶の獲得障害は一過性であることが示された (24 hour-approach time: saline, $21.3 \pm 3.8\%$; KCl, $21.4 \pm 3.2\%$, 24 hour-recognition index, saline, $72.5 \pm 3.8\%$; KCl, $67.9 \pm 2.4\%$) (Fig. 19D)。

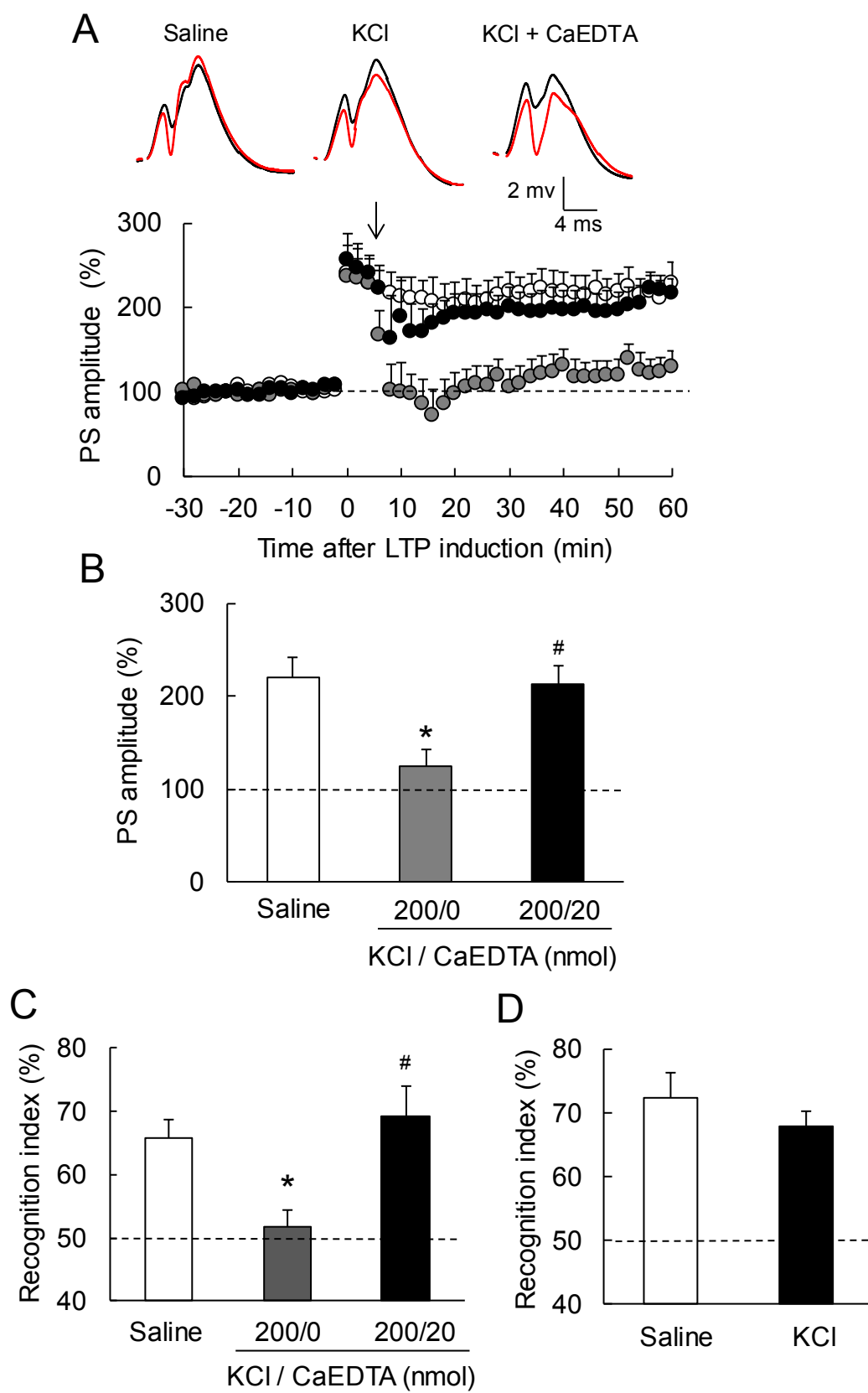


Fig. 19 High K⁺-induced impairments after LTP induction and learning. (A) Saline (1 μ l, control, n = 6), 200 nmol KCl (100 mM, 2 μ l, n = 5), or 200 nmol KCl + 20 nmol CaEDTA (100 mM KCl + 10 mM CaEDTA, 2 μ l, n = 6) was injected 5 min after LTP induction. The arrow shows the time of injection. Representative fEPSP recordings at the time -20 min (before tetanic stimulation; black line) and 50 min (after tetanic stimulation; red line) are shown (upper side). (B) The magnitude of LTP. *, p < 0.05, vs. saline, #, p < 0.05, vs. 200 nmol KCl (Tukey's test). (C) Saline (1 μ l, control, n = 7), 200 nmol KCl (100 mM, 2 μ l, n = 6), or 200 nmol KCl + 20 nmol CaEDTA (100 mM KCl + 10 mM CaEDTA, 2 μ l, n = 7) was injected 5 min after training of the object recognition test. *, p < 0.05, vs. saline, #, p < 0.05, vs. 200 nmol KCl (Tukey's test). (D) Another object recognition test was performed 24 h after the experiment (C) by using the same rat.

3-3-3 高カリウム刺激による海馬歯状回の細胞内 Zn^{2+} の増加

海馬 CA1 領域において、高カリウム刺激によりシャープファー側枝から Zn^{2+} が放出され、錐体細胞内の Zn^{2+} レベルが増加することを示してきた^[26]。海馬歯状回に投射する嗅内野内側貫通線維は小胞内に Zn^{2+} を含まないが、グルタミン酸作動性神経の興奮により細胞外に存在する Zn^{2+} が細胞内へ流入する可能性がある。そこで高カリウム刺激による細胞内 Zn^{2+} レベルの変化を測定するため、海馬歯状回に細胞内亜鉛検出試薬として ZnAF-2DA を KCl と同時に投与したところ、海馬歯状回領域において ZnAF-2 の蛍光が観察され、CA1 や CA3 領域では検出されないことを確認した (Fig. 20A)。海馬歯状回顆粒細胞層において KCl 投与により細胞内 Zn^{2+} レベルが有意に上昇し、その増加は細胞外 Zn^{2+} キレーターである CaEDTA との同時投与により阻止された。また、AMPA 受容体アンタゴニストである CNQX を KCl と同時に投与すると、高 K 刺激による細胞内 Zn^{2+} レベルの増加は阻止された (Fig. 20B, 20C)。高カリウム刺激により、細胞外 Zn^{2+} が AMPA 受容体活性化を介して細胞内に流入することが示唆された。

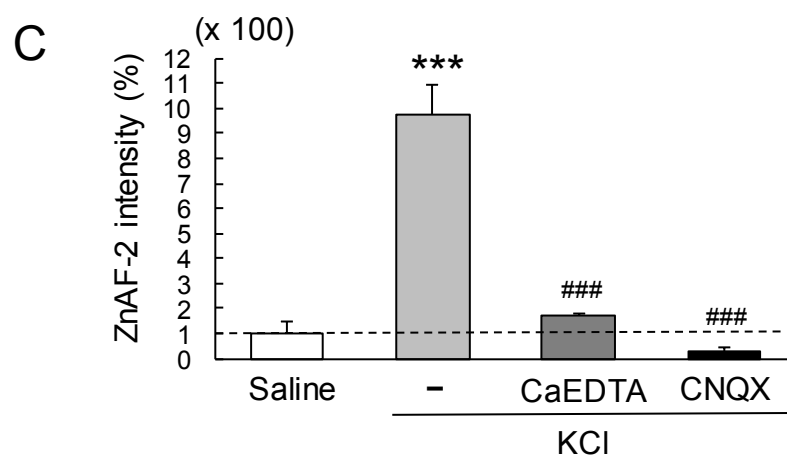
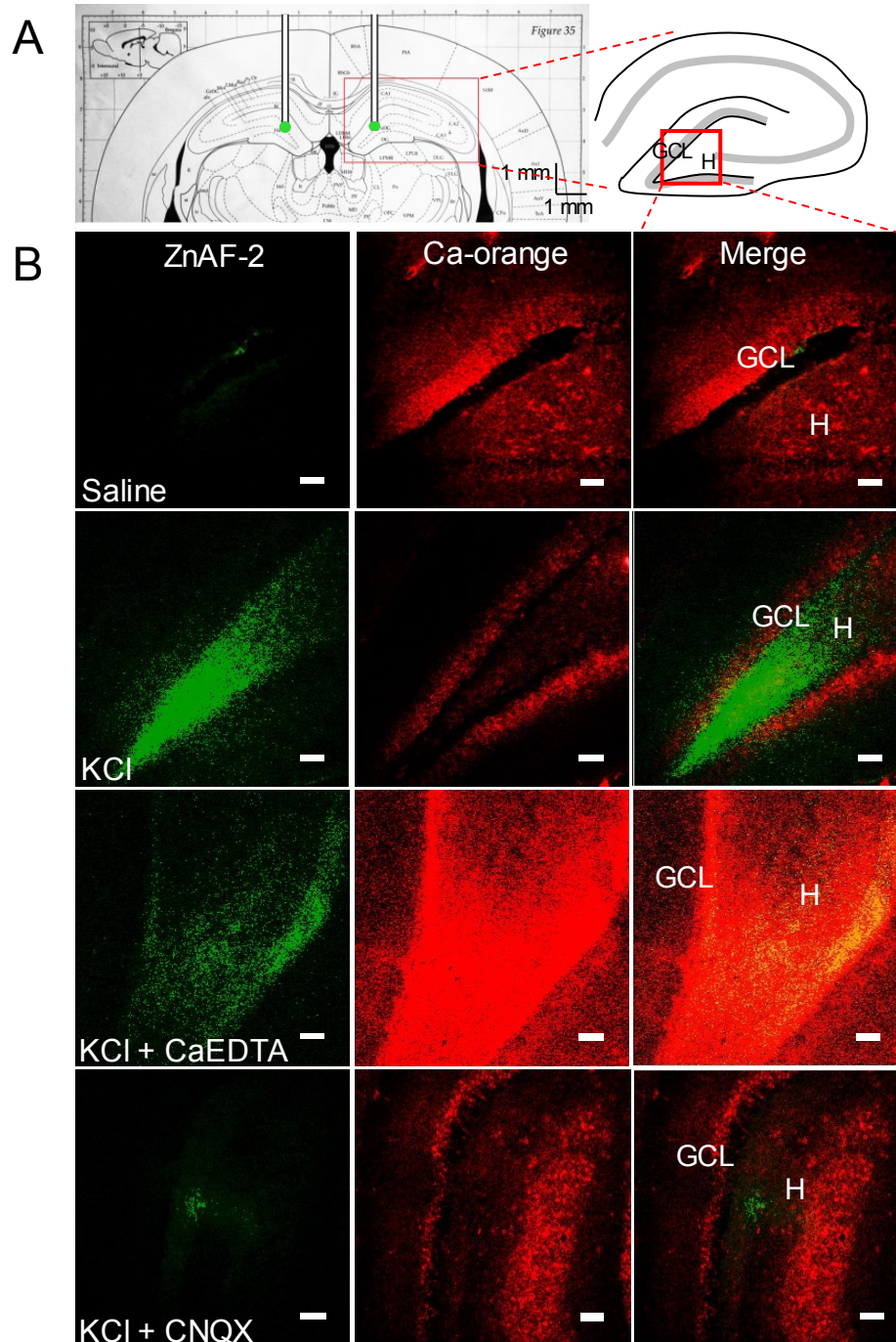
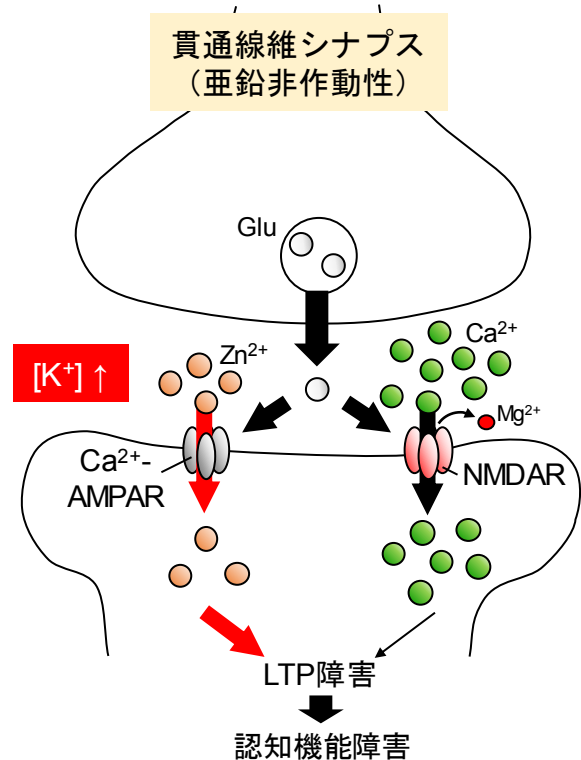


Fig. 20 High K^+ -induced increase in Zn^{2+} influx in the dentate gyrus and its inhibition with CaEDTA and CNQX. (A) An illustration of bilateral injection into the dentate gyrus at the rate of 0.25 μ l/ min for 8 min via injection cannulas (left). The area surrounded with the red line in the dentate gyrus is imaged in B (right). (B) Five minutes after injection of KCl (100 mM), KCl + CaEDTA (10 mM), and KCl + CNQX (2 mM) in saline containing ZnAF-2DA (100 μ M), coronal brain slices (400 μ m) were prepared and stained calcium orange AM to identify each region in the hippocampus. Intracellular ZnAF-2 and calcium orange fluorescence were measured in the hippocampus. GCL, granule cell layer; H, hilus. Bars, 50 μ m. (C) Each bar and line represents the rate (%) of fluorescence intensity after injection of KCl (n = 4), KCl + CaEDTA (n = 4) or KCl + CNQX (n = 5) to that after injection of saline (n = 7), which was represented as 100%. ***, $p < 0.001$, vs. saline; ###, $p < 0.001$, vs. KCl (Tukey's test).

3-4 考察

海馬 CA1 領域への 100 nmol KCl 投与により物体認識記憶の獲得は障害されたが^[26]、海馬歯状回への同量の KCl 投与では歯状回 LTP 誘導を介した物体認識記憶の獲得は障害されなかった (Fig. 18)。このことから、歯状回顆粒細胞は CA1 錐体細胞と比較し、高カリウムによる脱分極刺激による障害を受けにくいことが示された。歯状回顆粒細胞にはシナプス小胞内に Zn^{2+} を含まない内側貫通線維が投射するため、高カリウムによる脱分極刺激では細胞外 Zn^{2+} レベルは上昇しないと考えられる。そのため 2 倍量に相当する 200 nmol KCl を歯状回に投与することで、より長期にわたり脱分極刺激を加えた。その結果、細胞外 Zn^{2+} 流入時間が長くなり歯状回においても LTP 誘導が障害されたと考えられる。また、歯状回 LTP 誘導後に KCl を投与した場合においても、LTP 誘導は障害された (Fig. 19)。Ca 透過型の AMPA 受容体は、 Zn^{2+} の細胞内への主要な流入経路であるが、LTP 誘導時の高頻度刺激により後シナプス表面で一過性に増加する^[83]。そのため、LTP 誘導直後の高カリウム刺激により、細胞内 Zn^{2+} の増加が顕著となり、LTP が抑制されたと考えられる。さらに、物体認識試験の Training の 1 時間前または 5 分後の KCl の投与により、LTP 障害と一致して物体認識記憶は障害された。これら高カリウム誘発性の LTP 障害や物体認識記憶獲得障害は細胞外 Zn^{2+} キレーターである CaEDTA により阻止された。高カリウム刺激による歯状回顆粒細胞内 Zn^{2+} レベルの増加は、AMPA 受容体阻害剤である CNQX および細胞外 Zn^{2+} キレーターである CaEDTA の同時投与により抑制されたことから (Fig. 20)、高カリウム刺激により AMPA 受容体活性化を介して顆粒細胞への Zn^{2+} 流入が増加したと考えられる。

ZnAF-2 は Zn^{2+} 特異的な検出試薬であり、 Ca^{2+} など他の二価カチオンとは反応しない^[84]。KCl により Ca 透過型の AMPA 受容体を介して Ca^{2+} 流入も増加するが、CaEDTA の障害阻止効果 (ZnEDTA 形成により Ca^{2+} 遊離) から考えて、顆粒細胞内で増加した Zn^{2+} により、LTP の減弱を介して記憶が障害されることが示唆された。一方、高カリウム刺激 24 時間後に物体認識試験を行うと、記憶獲得は障害されなかった (Fig. 19D)。このことから、一過性の記憶学習障害が惹起されたと考えられる。以上より、歯状回顆粒細胞内 Zn^{2+} 制御の破綻は CA1 錐体細胞と同様に物体認識記憶障害の一因であることが示唆された (Scheme. 9)。



Scheme. 9

総括

記憶形成に関与する海馬は、グルタミン酸作動性神経回路を形成しており、その神経終末には Zn^{2+} を含むものが存在する。これまでに、記憶形成における細胞外グルタミン酸シグナルを介した細胞内 Ca^{2+} シグナリングの重要性が報告されてきたが、細胞内 Zn^{2+} シグナリングの生理的意義、記憶形成への役割については十分に解明されていない。本研究では、海馬神経細胞内 Zn^{2+} シグナリングは記憶形成に関与するのか、そしてグルタミン酸神経過剰興奮に伴う細胞内 Zn^{2+} 動態制御の破綻は認知機能障害をもたらすのか *in vivo* において検討を行った。

第一章では、シャーフアー側枝から放出される Zn^{2+} は AMPA 受容体活性化を介して CA1 錐体細胞内に流入し LTP に関与すること、また物体認識記憶の獲得に必要であることが示された。一方で、シャーフアー側枝が過剰興奮すると、細胞外で増加したグルタミン酸は Zn^{2+} を CA1 錐体細胞に過剰に流入させ、物体認識記憶を障害した。すなわち、グルタミン酸シグナルを介したシナプス Zn^{2+} 動態は記憶と密接に関係することが *in vivo* で明らかとなった。

第二章では、グルタミン酸興奮毒性を惹起するストレスに着目した。コルチコステロンによりミネラルコルチコイド受容体が活性化され、シャーフアー側枝からグルタミン酸とともに Zn^{2+} が放出され、AMPA 受容体活性化を介して速やかに CA1 錐体細胞に取り込まれ、リン酸化 CaMKII のベースレベルを低下させ、LTP を減弱することが *in vivo* で初めて明らかとなった。さらに、水浸ストレス負荷により、CA1 錐体細胞内 Zn^{2+} レベルが増加し、LTP が減弱すること、この減弱は ZnAF-2DA で改善されることが示され、急性ストレス暴露によるシナプス Zn^{2+} の神経毒性が覚醒下で示された。

第三章では、神経新生が誘導される海馬歯状回では、幹細胞のアポトーシスに伴う細胞内 K^{+} の細胞外流出により、顆粒細胞が脱分極刺激を受けやすくなると想定し、細胞外 Zn^{2+} の神経毒性を検討した。細胞外 K^{+} 濃度を一過性に増加させると、貫通線維興奮により認知機能が障害され、この障害に細胞外 Zn^{2+} が関与することを明らかにした。貫通線維終末から Zn^{2+} が放出されない歯状回においてもグルタミン酸が過剰に放出されることにより、AMPA 受容体活性化を介して細胞外 Zn^{2+} が歯状回顆粒細胞に過剰に流入し、認知機能を障害することが示された。

本研究により、海馬細胞外 Zn^{2+} 流入を介した神経細胞内 Zn^{2+} 動態変化は認知機能と密接に関係すること、神経細胞内 Zn^{2+} 動態制御の破綻は認知機能を障害することが *in vivo* において明らかとなった。海馬神経細胞内 Zn^{2+} 動態制御はストレス負荷や加齢による認知機能障害の予防や治療の新たなターゲットになると考えられる。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を賜わり、数々の有益な御指導、御鞭撻を賜りました静岡県立大学薬学部統合生理学分野 武田厚司教授に深く感謝いたします。

本研究をはじめ、あらゆる場面で御指導・御協力下さいました静岡県立大学薬学部統合生理学分野の玉野春南特任講師に心より感謝いたします。

本論文の副査を引き受けていただきました静岡県立大学薬学部薬理学分野 石川智久教授、静岡県立大学薬学部生化学分野 鈴木隆教授、静岡県立大学薬学部医薬品情報解析学分野 山田浩教授のご厚情に拝謝致します。

実験に協力して下さいました大橋加純さん、土屋友香さん、天白宗和君、中田裕之君、藤瀬裕貴君、芳賀寿々佳さん、大根田直矢君、佐藤祐一君、田村公太郎君、待寺りさ子さんに心より深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり様々な面でご協力頂いた静岡県立大学薬学部統合生理学分野の皆様は厚く御礼申し上げます。

また、本研究を遂行するにあたり過分なご協力をいただいた静岡県立大学動物センターの皆様は深く感謝するとともに、犠牲になりましたラット達に謹んで哀悼の意を表します。

最後に、研究遂行中、論文執筆中において、あらゆる面でサポートしてくれた両親、兄、姉、弟ならびに亡き祖母に対し、心から深く感謝致します。

ありがとうございました。

参考文献

1. W. B. Scoville, B. Milner, Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **20**, 11–21 (1957).
2. G. Neves, S. F. Cooke, T. V. P. Bliss, Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci* **9**, 65–75 (2008).
3. T. V. Bliss, T. Lomo, Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* **232**, 331–356 (1973).
4. M. A. Lynch, Long-term Potentiation and Memory. *Physiol Rev* **84**, 87–136 (2004).
5. R. A. Nicoll, A Brief History of Long-Term Potentiation. *Neuron* **93**, 281–290 (2017).
6. R. C. Malenka, Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell* **78**, 535–538 (1994).
7. Halt, A. R., Dallapiazza, R. F., Zhou, Y., Stein, I. S., Qian, H., Juntti, S., Wojcik, S., Brose, N., Silva, A. J. & Hell, J. W. CaMKII binding to GluN2B is critical during memory consolidation. *EMBO J* **31**, 1203–1216 (2012).
8. P. H. Seeburg, F. Single, T. Kuner, M. Higuchi, R. Sprengel, Genetic manipulation of key determinants of ion flow in glutamate receptor channels in the mouse. *Brain Res* **907**, 233–243 (2001).
9. S. Kwak, J. H. Weiss, Calcium-permeable AMPA Channels in Neurodegenerative Disease and Ischemia. *Curr Opin Neurobiol* **16**, 281–287 (2006).
10. C. B. Sindreu, H. Varoqui, J. D. Erickson, J. Pérez-Clausell, Boutons Containing Vesicular Zinc Define a Subpopulation of Synapses with Low AMPAR Content in Rat Hippocampus. *Cereb Cortex* **13**, 823–829 (2003).
11. C. J. Frederickson, L. J. Giblin, A. Krezel, D. J. McAdoo, R. N. Muelle, Y. Zeng, R. V. Balaji, R. Masalha, R. B. Thompson, C. A. Fierke, J. M. Sarvey, M. de Valdenbro, D. S. Prough, M. H. Zornow, Concentrations of extracellular free zinc (pZn)_e in the central nervous system during simple anesthetization, ischemia and reperfusion. *Exp Neurol* **198**, 285–293 (2006).
12. R. A. Colvin, A. I. Bush, I. Volitakis, C. P. Fontaine, D. Thomas, K. Kikuchi, W. R. Holmes, Insights into Zn²⁺ homeostasis in neurons from experimental and modeling studies. *Am J Physiol Cell Physiol* **294**, C726–C742 (2008).
13. M. Ando, N. Oku, A. Takeda, Zinc-mediated attenuation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation induced by forskolin. *Neurochem Int* **57**, 608–614 (2010).
14. A. Takeda, S. Fuke, M. Ando, N. Oku, Positive modulation of long-term potentiation at hippocampal CA1 synapses by low micromolar concentrations of zinc. *Neuroscience* **158**, 585–591 (2009).
15. A. Takeda, M. Suzuki, M. Tempaku, K. Ohashi, H. Tamano, Influx of extracellular Zn²⁺ into the hippocampal CA1 neurons is required for cognitive performance via long-term potentiation. *Neuroscience* **304**, 209–216 (2015).
16. H. Karst, S. Berger, M. Turiault, F. Tronche, G. Schutz, M. Joels, Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proc Natl Acad Sci* **102**, 19204–19207 (2005).
17. T. Nakashiba, J. Z. Young, T. J. McHugh, D. L. Buhl, S. Tonegawa, Transgenic inhibition of synaptic transmission reveals role of CA3 output in hippocampal learning. *Science* **319**, 1260–1264 (2008).
18. K. Nakazawa, M. C. Quirk, R. A. Chitwood, M. Watanabe, M. F. Yeckel, L. D. Sun, A. Kato, C. A. Carr, D. Johnston, M. A. Wilson, S. Tonegawa, Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. *Science* **297**, 211–218 (2002).
19. K. Nakazawa, L. D. Sun, M. C. Quirk, L. Rondi-Reig, M. A. Wilson, S. Tonegawa, Hippocampal CA3 NMDA receptors are crucial for memory acquisition of one-time experience. *Neuron* **38**, 305–315 (2003).

20. Y. Jia, J. M. Jeng, S. L. Sensi, J. H. Weiss, Zn^{2+} currents are mediated by calcium-permeable AMPA/kainate channels in cultured murine hippocampal neurones. *J Physiol* **543**, 35–48 (2002).
21. J. H. Weiss, S. L. Sensi, J. Y. Koh, Zn^{2+} : A novel ionic mediator of neural injury in brain disease. *Trends in Pharmacological Sciences* **21**, 395–401 (2000).
22. Y. Izumi, Y. P. Auberson, C. F. Zorumski, Zinc Modulates Bidirectional Hippocampal Plasticity by Effects on NMDA Receptors. *J Neurosci* **26**, 7181–7188 (2006).
23. Kyung-M. Noh, H. Yokota, T. Mashiko, P. E. Castillo, R. S. Zukin, M. V. L. Bennett, Blockade of calcium-permeable AMPA receptors protects hippocampal neurons against global ischemia-induced death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12230–5 (2005).
24. D. Atar, P. H. Backx, M. M. Appel, W. D. Gao, E. Marban, Excitation-transcription Coupling Mediated by Zinc Influx through Voltage-dependent Calcium Channels. *J Biol Chem* **270**, 2473–2477 (1995).
25. S. L. Sensi, P. Paoletti, A. I. Bush, I. Sekler, Zinc in the physiology and pathology of the CNS. *Nat Rev Neurosci* **10**, 780–791 (2009).
26. A. Takeda, S. Takada, M. Nakamura, M. Suzuki, H. Tamano, M. Ando, N. Oku, Transient Increase in Zn^{2+} in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons Causes Reversible Memory Deficit. *PLoS One* **6**, e28615 (2011).
27. S. W. Suh, G. Danscher, M. S. Jensen, R. Thompson, M. Motamedi, C. J. Frederickson, Release of synaptic zinc is substantially depressed by conventional brain slice preparations. *Brain Res* **879**, 7–12 (2000).
28. P. Paoletti, A. M. Vergnano, B. Barbour, M. Casado, Zinc at glutamatergic synapses. *Neuroscience* **158**, 126–136 (2009).
29. J. H. Tao-Cheng, D. Toy, C. A. Winters, T. S. Reese, A. Dosemeci, Zinc Stabilizes Shank3 at the Postsynaptic Density of Hippocampal Synapses. *PLoS One* **11**, e0153979 (2016).
30. C. J. Frederickson, M. A. Klitenick, W. I. Manton, J. B. Kirkpatrick, Cytoarchitectonic distribution of zinc in the hippocampus of man and the rat. *Brain Res* **273**, 335–339 (1983).
31. R. A. Lorca, C. Rozas, S. Loyola, S. Moreira-Ramos, M. L. Zeise, A. Kirkwood, J. P. Huidobro-Toro, B. Morales, Zinc enhances long-term potentiation through P2X receptor modulation in the hippocampal CA1 region. *Eur J Neurosci* **33**, 1175–1185 (2011).
32. A. Takeda, S. Fuke, W. Tsutsumi, N. Oku, Negative modulation of presynaptic activity by zinc released from schaffer collaterals. *J Neurosci Res* **85**, 3666–3672 (2007).
33. G. A. Kerchner, L. M. T. Canzoniero, S. P. Yu, C. Ling, D. W. Choi, Zn^{2+} current is mediated by voltage-gated Ca^{2+} channels and enhanced by extracellular acidity in mouse cortical neurones. *J Physiol* **528**, 39–52 (2000).
34. C. Sandi, Glucocorticoids act on glutamatergic pathways to affect memory processes. *Trends in Neurosciences* **34**, 165–176 (2011).
35. B. S. McEwen, N. P. Bowles, J. D. Gray, M. N. Hill, R. G. Hunter, I. N. Karatsoreos, C. Nasca, Mechanisms of stress in the brain. *Nat Neurosci* **18**, 1353–63 (2015).
36. M. Joëls, E. R. de Kloet, The brain mineralocorticoid receptor: A saga in three episodes. *J Endocrinol* **234**, T49–T66 (2017).
37. M. Jafari, R. R. Seese, A. H. Babayan, C. M. Gall, J. C. Lauterborn, Glucocorticoid receptors are localized to dendritic spines and influence local actin signaling. *Mol Neurobiol* **46**, 304–315 (2012).
38. E. M. Prager, J. Brielmaier, H. C. Bergstrom, J. McGuire, L. R. Johnson, Localization of mineralocorticoid receptors at mammalian synapses. *PLoS One* **5**, (2010).
39. E. R. de Kloet, E. Vreugdenhil, M. S. Oitzl, M. Joëls, Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease. *Endocr Rev* **19**, 269–301 (1998).

40. C. Otte, S. Moritz, A. Yassouridis, M. Koop, A. M. Madrischewski, K. Wiedemann, M. Kellner, Blockade of the mineralocorticoid receptor in healthy men: Effects on experimentally induced panic symptoms, stress hormones, and cognition. *Neuropsychopharmacology* **32**, 232–238 (2007).
41. M. Joëls, Functional actions of corticosteroids in the hippocampus. *Eur J Pharmacol* **583**, 312–321 (2008).
42. E. R. de Kloet, M. Joëls, F. Holsboer, Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* **6**, 463–475 (2005).
43. E. R. de Kloet, M. S. Oitzl, M. Joëls, Stress and cognition: Are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci* **22**, 422–426 (1999).
44. N. K. Evanson, J. P. Herman, R. R. Sakai, E. G. Krause, Nongenomic actions of adrenal steroids in the central nervous system. *J Neuroendocrinol* **22**, 846–861 (2010).
45. M. Joëls, H. Karst, R. DeRijk, E. R. de Kloet, The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. *Trends Neurosci* **31**, 1–7 (2008).
46. J. D. Gray, J. F. Kogan, J. Marrocco, B. S. McEwen, Genomic and epigenomic mechanisms of glucocorticoids in the brain. *Nature Reviews Endocrinology* **13**, 661–673 (2017).
47. F. L. Groeneweg, H. Karst, E. R. de Kloet, M. Joëls, Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. *Molecular and Cellular Endocrinology* **350**, 299–309 (2012).
48. A. Takeda, M. Suzuki, H. Tamano, S. Takada, K. Ide, N. Oku, Involvement of glucocorticoid-mediated Zn^{2+} signaling in attenuation of hippocampal CA1 LTP by acute stress. *Neurochem Int* **60**, 394–399 (2012).
49. M. Popoli, Z. Yan, B. S. McEwen, G. Sanacora, The stressed synapse: The impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci* **13**, 22–37 (2012).
50. N. A. Datson, P. J. van Der, E. R. de Kloet, E. Vreugdenhil, Identification of corticosteroid-responsive genes in rat hippocampus using serial analysis of gene expression. *Eur.J.Neurosci.* **14**, 675–689 (2001).
51. E. R. de Kloet, H. Karst, M. Joëls, Corticosteroid hormones in the central stress response: Quick-and-slow. *Frontiers in Neuroendocrinology* **29**, 268–272 (2008).
52. M. Khaksari, A. Rashidy-Pour, A. A. Vafaei, Central mineralocorticoid receptors are indispensable for corticosterone-induced impairment of memory retrieval in rats. *Neuroscience* **149**, 729–738 (2007).
53. J. E. Olijslagers, E. R. De Kloet, Y. Elgersma, G. M. Van Woerden, M. Joëls, H. Karst, Rapid changes in hippocampal CA1 pyramidal cell function via pre- as well as postsynaptic membrane mineralocorticoid receptors. *Eur J Neurosci* **27**, 2542–2550 (2008).
54. A. A. Sajadi, S. A. Samaei, A. Rashidy-Pour, Intra-hippocampal microinjections of anisomycin did not block glucocorticoid-induced impairment of memory retrieval in rats: An evidence for non-genomic effects of glucocorticoids. *Behav Brain Res* **173**, 158–162 (2006).
55. R. Dorey, C. Piérard, S. Shinkaruk, C. Tronche, F. Chauveau, M. Baudonnat, D. Béracochéa, Membrane Mineralocorticoid but not Glucocorticoid Receptors of the Dorsal Hippocampus Mediate the Rapid Effects of Corticosterone on Memory Retrieval. *Neuropsychopharmacology* **36**, 2639–2649 (2011).
56. M. Joëls, H. J. Krugers, LTP after stress: Up or down? *Neural Plast* **2007**, (2007).
57. C. Pavlides, L. G. Nivón, B. S. McEwen, Effects of chronic stress on hippocampal long-term potentiation. *Hippocampus* **12**, 245–257 (2002).
58. W. Xiong, H. Wei, X. Xiang, J. Cao, Z. Dong, Y. Wang, T. Xu, L. Xu, The effect of acute stress on LTP and LTD induction in the hippocampal CA1 region of anesthetized rats at three different ages. *Brain Res* **1005**, 187–192 (2004).
59. O. Wiegert, M. Joëls, H. Krugers, Timing is essential for rapid effects of corticosterone on synaptic potentiation in the mouse hippocampus. *Learn Mem* **13**, 110–113 (2006).

60. S. Martin, J. M. Henley, D. Holman, M. Zhou, O. Wiegert, M. van Spronsena, M. Joëls, C. C. Hoogenraad, H. J. Krugers, Corticosterone alters AMPAR mobility and facilitates bidirectional synaptic plasticity. *PLoS One* **4**, (2009).
61. L. Conboy, C. Sandi, Stress at Learning Facilitates Memory Formation by Regulating AMPA Receptor Trafficking Through a Glucocorticoid Action. *Neuropsychopharmacology* **35**, 674–685 (2010).
62. G. Whitehead, J. Jo, E. L. Hogg, T. Piers, Dong-H. Kim, G. Seaton, H. Seok, G. Bru-Mercier, G. H. Son, P. Regan, L. Hildebrandt, E. Waite, Byeong-C. Kim, T. L. Kerrigan, K. Kim, D. J. Whitcomb, G. L. Collingridge, S. L. Lightman, K. Cho, Acute stress causes rapid synaptic insertion of Ca²⁺-permeable AMPA receptors to facilitate long-term potentiation in the hippocampus. *Brain* **136**, 3753–65 (2013).
63. A. Calderone, Late Calcium EDTA Rescues Hippocampal CA1 Neurons from Global Ischemia-Induced Death. *J Neurosci* **24**, 9903–9913 (2004).
64. Y. Ouyang, A. Rosenstein, G. Kreiman, E. M. Schuman, M. B. Kennedy, Tetanic Stimulation Leads to Increased Accumulation of Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II via Dendritic Protein Synthesis in Hippocampal Neurons. *J Neurosci* **19**, 7823–7833 (1999).
65. M. Racaniello, A. Cardinale, C. Mollinari, M. D’Antuono, G. De Chiara, V. Tancredi, D. Merlo, Phosphorylation Changes of CaMKII, ERK1/2, PKB/Akt Kinases and CREB Activation during Early Long-Term Potentiation at Schaffer Collateral-CA1 Mouse Hippocampal Synapses. *Neurochem Res* **35**, 239–246 (2010).
66. N. Z. Gerges, A. M. Aleisa, L. A. Schwarz, K. A. Alkadhi, Reduced basal CaMKII levels in hippocampal CA1 region: Possible cause of stress-induced impairment of LTP in chronically stressed rats. *Hippocampus* **14**, 402–410 (2004).
67. K. P. Giese, N. B. Fedorov, R. K. Filipkowski, A. J. Silva, Autophosphorylation at Thr286 of the a calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science* **279**, 870–873 (1998).
68. N. Z. Borgesius, G. M. van Woerden, G. H. S. Buitendijk, N. Keijzer, D. Jaarsma, C. C. Hoogenraad, Y. Elgersma, β CaMKII plays a nonenzymatic role in hippocampal synaptic plasticity and learning by targeting α CaMKII to synapses. *J Neurosci* **31**, 10141–10148 (2011).
69. K. A. Skelding, J. A. P. Rostas, Regulation of CaMKII in vivo: The importance of targeting and the intracellular microenvironment. *Neurochemical Research* **34**, 1792–1804 (2009).
70. I. Lengyel, S. Fieuw-Makaroff, A. L. Hall, A. T. Sim, J. A. Rostas, P. R. Dunkley, Modulation of the phosphorylation and activity of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II by zinc. *J Neurochem* **75**, 594–605 (2000).
71. H. L. Hinds, I. Goussakov, K. Nakazawa, S. Tonegawa, V. Y. Bolshakov, Essential function of alpha-calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in neurotransmitter release at a glutamatergic central synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4275–80 (2003).
72. S. K. Droste, L. De Groote, S. L. Lightman, J. M. H. M. Reul, A. C. E. Linthorst, The ultradian and circadian rhythms of free corticosterone in the brain are not affected by gender: An in vivo microdialysis study in wistar rats. *J Neuroendocrinol* **21**, 132–140 (2009).
73. Y. Komatsuzaki, G. Murakami, T. Tsurugizawa, H. Mukai, N. Tanabe, K. Mitsushashi, M. Kawata, T. Kimoto, Y. Ooishi, S. Kawato, Rapid spinogenesis of pyramidal neurons induced by activation of glucocorticoid receptors in adult male rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun* **335**, 1002–1007 (2005).
74. Y. Komatsuzaki, Y. Hatanaka, G. Murakami, H. Mukai, Y. Hojo, M. Saito, T. Kimoto, S. Kawato, Corticosterone induces rapid spinogenesis via synaptic glucocorticoid receptors and kinase networks in hippocampus. *PLoS One* **7**, (2012).
75. S. Li, Y. X. Fan, W. Wang, Y. Y. Tang, Effects of acute restraint stress on different components of memory as assessed by object-recognition and object-location tasks in mice. *Behav Brain Res* **227**, 199–207 (2012).

76. E. Nelissen, J. Prickaerts, A. Blokland, Acute stress negatively affects object recognition early memory consolidation and memory retrieval unrelated to state-dependency. *Behav Brain Res* **345**, 9–12 (2018).
77. C. Tronche, C. Piérard, M. Coutan, F. Chauveau, P. Liscia, D. Béracochéa, Increased stress-induced intra-hippocampus corticosterone rise associated with memory impairments in middle-aged mice. *Neurobiol Learn Mem* **93**, 343–351 (2010).
78. F. Chauveau, C. Tronche, C. Piérard, P. Liscia, I. Drouet, M. Coutan, D. Béracochéa, Rapid stress-induced corticosterone rise in the hippocampus reverses serial memory retrieval pattern. *Hippocampus* **20**, 196–207 (2010).
79. E. H. Lo, T. Dalkara, M. A. Moskowitz, Neurological diseases: Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci* **4**, 399–414 (2003).
80. J. H. Kim, B. G. Jang, B. Y. Choi, L. M. Kwon, M. Sohn, H. K. Song, S. W. Suh, Zinc Chelation Reduces Hippocampal Neurogenesis after Pilocarpine-Induced Seizure. *PLoS One* **7**, (2012).
81. A. Joseph, G. D. Das, Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* **124**, 319–335 (1965).
82. D. Liu, J. R. Slevin, C. Lu, S. L. Chan, M. Hansson, E. Elmer, M. P. Mattson, Involvement of mitochondrial K^+ release and cellular efflux in ischemic and apoptotic neuronal death. *J Neurochem* **86**, 966–979 (2003).
83. J. A. Kauer, R. C. Malenka, LTP: AMPA receptors trading places. *Nat Neurosci* **9**, 593–594 (2006).
84. T. Hirano, K. Kikuchi, Y. Urano, T. Nagano, Improvement and biological applications of fluorescent probes for zinc, ZnAFs. *J Am Chem Soc* **124**, 6555–6562 (2002).