

「脳を知る」
平成10年度採択研究代表者

小西 史朗

(三菱化学生命科学研究所、室長)

「抑制性シナプス可塑性の分子機構の解明」

1. 研究実施の概要

脳の働きは、興奮性および抑制性シナプスにおける化学物質で仲介される情報伝達によって達成されている。したがってシナプス伝達の仕組みを明らかにできれば、脳に関する理解は著しく深まるであろう。脳の正常な機能および神経疾患において、抑制性シナプスは興奮性シナプスに劣らず重要な役割を果たしている。しかし抑制性シナプスに関する研究は、興奮性シナプスに比べて著しく立ち遅れている。本研究は、抑制性シナプス制御機構の分子基盤を明らかにすることを第一の狙いとしている。また、このような研究から得られた成果に基づき、抑制性シナプスの働きを選択的に修飾する薬物を探索し、不安や抑鬱などの神経疾患に対する薬物療法の基礎を造りたい。

これまで我々は、小脳の GABA 作動性抑制性シナプスにおいてモノアミン（セロトニンおよびノルアドレナリン）を含む神経の活動により、GABA シナプスの伝達効率が長時間にわたって増強することを発見した。この成果は、モノアミン系の働きを選択的に修飾する薬物を見出すことができれば、脳の抑制性シナプス活動を高めて一部の神経疾患を治療するための新しい道が開ける可能性を示している。たとえば多くの現代人が抱える不安（神経症）などは、GABA シナプスを増強する薬物（ベンゾジアゼピン・トランクライザー）によって緩和されるので、脳の抑制性シナプス活動は不安に密接に関連した役割を果たすと考えられる。したがって本研究が目的としている抑制性シナプス機構の解明と修飾物質の探索は、神経疾患の薬物療法の考案に貢献できると期待される。

現在、GABA シナプス可塑性の分子機構や動物の不安モデルを用いて、不安刺激によって引き起こされるシナプス伝達の変化や不安中枢における物質的变化を電気生理学的・分子生物学的手法によって探索している。また、GABA シナプス増強作用を仲介するモノアミン受容体サブタイプ分子を選択的に刺激する薬物も合わせて探索している。このような研究から得られる成果は、抑制性シナプスの情報伝達がどのように制御されるかについて基礎的な理解を深めるだけでなく、神経疾患を薬物によって治療するための応用面にも寄与できると予想される。

2. 研究実施内容

・抑制性シナプス制御機構の解明

A. 脳スライス - パッチクランプ法によるシナプス機構の解明

扁桃体のシナプス機構

これまで扁桃体で GABA_B 受容体の刺激に伴い興奮性および抑制性シナプス伝達が前シナプス抑制を受けることを報告した。この GABA_B 受容体で仲介される前シナプス抑制の作用機序を検討した。GABA_B 受容体作用薬である baclofen は、扁桃体の主細胞から記録したグルタミン酸作動性興奮性後シナプス電流をシナプス前性に抑制した。Baclofen で誘発される抑制効果は Ca チャネル阻害あるいは K チャネル活性化に依存しないことが示された。したがって GABA_B 受容体の活性化は前シナプス終末の神経伝達物質放出に関わる装置に直接的に影響する可能性が示唆された。

タキキニン・ペプチドが扁桃体の GABA シナプスを増強することを先に見出した。この増強作用に関与する受容体サブタイプと形態学的基質を明らかにするため、タキキニン(NK1 および NK3)受容体と GABA 合成酵素 GAD の免疫組織化学的な検索を実施中である。

小脳 GABA シナプスのモノアミン受容体による増強機構

先にバスケット細胞(BC)プルキンエ細胞(PC)間 GABA シナプスの伝達効率がモノアミン作動性神経の活動に伴い長期増強することを報告した。この作用機構をさらに解析し、noradrenaline によって BC の、 β 2-アドレナリン受容体が刺激されると少なくとも2種類の異なった機構によって GABA 伝達の増強が起きることを明らかにした。第一は、細胞内 cAMP 生成が高まり、これが過分極活性化カチオンチャンネルに働いて、このチャンネルの活性化を促進し、BC に脱分極に続くスパイク発射の増加を起こして自発的 GABA シナプス活動を増加させた。第二は、 β 2 受容体刺激に伴い生成された cAMP は cAMP 依存性キナーゼを活性化し、BC 神経終末における GABA 放出プールを増大して GABA 伝達を促進することが示唆された。また β 2-アドレナリン受容体で仲介される GABA シナプスの増強には、RNA および蛋白合成に依存する長期増強と非依存的な短期増強の複数の成分が存在することが示された。

小脳 GABA シナプスの AMPA 受容体を介する前シナプス抑制

先に BC-PC 間 GABA シナプス伝達は、登上線維から放出された興奮性伝達物質によって前シナプス抑制を受け、この抑制は BC の AMPA 受容体によって仲介されることを報告した。この作用機序を解析し、AMPA 受容体による抑制には GTP 結合蛋白が介在する可能性が示唆された。

密度推定法の量子解析への応用

有限混合モデルによる密度推定法によるシナプス伝達の量子解析の研究を進めた。従来の二項分布などのパラメトリックなモデルを仮定した推定法では、実験データは必ずしもモデルに適合しない問題があった。有限混合モデルは、密度分布がある基本分布の複数個の混合である場合の推定法であり、量子モデルとして適切なものと考えられる。しかし、従来の制約のない有限混合モデルの推定法には無限大尤度の問題やモデルの非同定性などの問題があるため、直接にはシナプス伝達に適用できなかった。そこで、統計数理研究所の江口真透教授との共同研究によって、混合分布モデルの罰則付き最尤法という新しい推定法を開発した。この方法は混合モデルの分布を決めるのに、パラメトリックなモデルからのずれを罰則として用いるものである。罰則の程度は一つのチューニングパラメータの値で決まるため、その値を客観的に決める方法を開発する必要があった。そのために交差確認法を応用した方法を考案した。この新しい方法は、シミュレーションや実際のデータへの適用したところ、シナプス反応の分布を適切に推定できる方法であることが示された。これらの成果を下記の学会や統計数理研究所共同研究集会において発表した。

B. 抑制性シナプス可塑性に関与する機能分子・形態的变化の探索

GABA 神経終末の形態的变化（発芽）

小脳 GABA シナプスのモノアミンによる長期増強作用に、GABA 終末の発芽が関与する可能性を検証するため、生体下に GABA 終末を可視化できる実験系を確立することを試みている。

GABA 受容体のシナプス部位への標的配送機構

GABA 受容体がシナプス後膜へ正確に標的配送される仕組みは不明である。この問題にアプローチするため、酵母 2 ハイブリッド法およびアフィニティ分離法によって GABA 受容体と相互作用する蛋白を探索中である。

新しいシナプス可塑性調節因子の探索

情動記憶の成立および維持に関与するシナプス機構を理解するため、不安・恐怖の動物モデルを用いて恐怖条件付け刺激に伴って発現が変動する遺伝子および蛋白を体系的（網羅的）にスクリーニングすることを試みている。これまで恐怖刺激に伴って変動する既知および未知の遺伝子と蛋白を同定し、その性質の解析を進めている。

新しい抗不安薬物療法の基礎

モノアミンによる GABA シナプス増強作用に関与する受容体サブタイプの選択的刺激薬を探索することを試みている。ヒト 5-HT₄ 遺伝子を導入した培養細

胞クローンを樹立し、セロトニン刺激によって細胞内 cAMP が著しく増加する実験系を確立した。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Satake S., Saitow F., Yamada J. and Konishi S.

Synaptic activation of AMPA receptors inhibits GABA release from cerebellar interneurons. *Nature Neuroscience* 3, 531-558, 2000.

Saitow F., Satake S., Yamada J. and Konishi S.

β -Adrenergic receptor-mediated presynaptic facilitation of inhibitory GABAergic transmission at cerebellar interneuron-Purkinje cell synapses. *Journal of Neurophysiology* 84, 2016-2025, 2000.

Saitow F. and Konishi S.

Excitability increase induced by β -adrenergic receptor-mediated activation of hyperpolarization-activated cation channels in rat cerebellar basket cells. *Journal of Neurophysiology* 84, 2026-2034, 2000.

Konishi S., Saitow F., Satake S., Yamada J., Ikebuchi Y. and Suzuki H.

Molecular mechanism underlying facilitation of cerebellar GABA-mediated transmission following activation of monoaminergic afferent fibers. *Biogenic Amines* 16, 115-125, 2001.