

「脳を知る」

平成 10 年度採択研究代表者

小西 史朗

(株)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伝達によって達成されている。したがってシナプス伝達機構の解明は、脳に関する理解を著しく深めるであろう。脳の正常な機能および神経疾患に、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十分進んでいない。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盤を探りたい。

これまで我々は、モノアミン(セロトニンおよびノルアドレナリン)を含有する神経の活動により、小脳 GABA シナプスの伝達効率が長期に増強することを見出した。この事実は、モノアミン系の働きを選択的に修飾する薬物は、脳の抑制性シナプス活動を高めて一部の神経疾患に対する薬物療法の新しい道を開く可能性を示している。たとえば現代病の代表の一つ不安神経症などは、GABA シナプス増強薬(ベンゾジアゼピン・トランキライザー)によって緩和されるので、脳の抑制性シナプスは抗不安・抗鬱の有力な治療標的となる。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。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

I. 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

① 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、GABA_B 受容体作用薬である baclofen 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別の機構によって神経伝達物質放出を阻害する証拠を得た。おそらく GABA_B 受容体活性化は遊離装置に直接影響するものと想定し、この可能性をさらに検討している。

また、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見出した。タキキニン受容体と GABA ニューロンの形態学的な相関関係を、抗タキキニン NK1 および NK3 受容体抗体および抗 GABA 合成酵素 GAD 抗体を用いた免疫組織化学によって検討し、論文作製中である。

② 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。この作用機構には、2つの独立した過程が関与していることを示した。

第一は、ノルアドレナリンによる BC 細胞の $\beta 2$ 受容体活性化→細胞内 cAMP 生成の増加→過分極活性化カチオンチャンネル(I_h) 活動の促進(cAMP のチャンネル直接作用)→BC の脱分極→スパイク発射の増加→PC から記録される自発的 GABA シナプス活動の頻度増加の機構である。

第二は、 $\beta 2$ 受容体刺激→cAMP 生成増加→cAMP 依存性キナーゼ(PKA)の活性化→蛋白リン酸化→BC 神経終末の GABA 放出の増加→PC から記録される電気刺激誘発性 GABA 電流の振幅増大の機構である。

最近、海馬 CA3 領域の興奮性シナプスにおける長期増強は、cAMP-PKA 依存性の過分極活性化カチオンチャンネル I_h 活性化によって仲介されることが報告された。このような機構が、小脳 GABA シナプスでも介在する可能性を検証した。 β アドレナリン受容体アゴニストである isoprotrenol は、PKA 阻害薬である H-89 で処理したあとでも I_h を増大し、電気刺激で誘発される GABA シナプス電流の β -アゴニストによる増強は I_h チャンネル阻害薬で影響されなかった。したがって小脳 GABA シナプスは、海馬 CA3 グルタミン酸シナプスの場合とは異なる機構で伝達効率の増強が起こると推定される。これらの結果について、論文作製中である。

③ 小脳 GABA シナプスの AMPA 受容体を介する前シナプス抑制

小脳 BC-PC 間 GABA シナプスの抑制性伝達は、登上線維から放出された興奮性伝達物質によってシナプス前抑制を受け、この抑制は BC の AMPA 受容体によって仲介されることを見出した。この作用機序をさらに解析し、以下のような反応過程の関与が示唆されてきた。

BC の AMPA 受容体活性化→GTP 結合蛋白(Gi/Go)の介在→P/Q 型カルシウムチャンネル活性の低下→GABA 放出の低下のシグナル伝達経路でシナプス前抑制が起こると推定された。グルタミン酸取り込み阻害薬(TBOA)の効果を調べ、登上線維の終末からシナプス間隙へ放出された興奮性伝達物質は、BC 神経終末の AMPA 受容体を刺激できる可能性が示された。

また、前シナプス性 AMPA 受容体が実際に小脳の GABA 含有介在ニューロン神経終末に存在する可能性を、免疫二重染色と共焦点レーザー顕微鏡によって検索し、さらに免疫電顕による観察も行っている。

④ 代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 による GABA シナプスの制御

これまで mGluR1 の活性化によって、小脳 GABA シナプスが抑制されることを見出し、その機序の解析を進め、論文にまとめている。

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

① 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、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。このため小胞 GABA/Glycine トランスポーター(vGAT)あるいは GABA 合成酵素(GAD) 遺伝子に GFP 遺伝子を挿入して、GABA ニューロンを選択的に標識したマウスの作出を実施した。これらの動物から脳スライスを作製し、GABA 含有ニューロンおよびその終末に自家蛍光を観察した。またこれらの動物に由来するスライス標本を用いてパッチクランプ法により、GABA シナプス伝達の性質を解析中である。

② GABA_A 受容体のシナプス部位への標的配送機構の解析

シナプス後膜への Ca 流入に伴い、GABA_A 受容体の感受性は長期増強を受ける。この過程は rebound potentiation (RP)と呼ばれている。細胞質で合成された GABA_A 受容体が細胞膜へ配送される過程が促進されることが RP の原因であると想定して、解析を進めている。RP が再現性よく起こる条件を確立して、さらに RP の成立機構を検討している。

また、酵母2ハイブリッド法およびアフィニティ分離法を利用して、GABA_A 受容体と相互作用する蛋白の探索を進めている。このような候補蛋白の一つとして、シナプス小胞関連蛋白が同定されてきた。この蛋白が GABA_A 受容体と相互作用することを免疫沈降法によって証明した。また免疫組織化学および機能的アッセイも実施して、この相互作用の生理的意義を検討中である。

③ 新しいシナプス可塑性調節因子の探索

恐怖条件づけ・モノアミン刺激などの生理的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実施している。これまで分別的cDNA スクリーニング法および二次元電気泳動法による分析を行った。同定された中には、酵母の小胞蛋白輸送系に関与する蛋白が見出され、現在この蛋白の cDNA グローニングを行い、ノックアウト動物作製のベクターおよび培養細胞に過剰発現させるための遺伝子導入ベクターを作製中である。

C. 5-HT₄ 型受容体サブタイプのノックアウト動物

セロトニン受容体5-HT₄型受容体サブタイプ遺伝子ノックアウトマウスをフランスの V. Compan (CNRS9023, Montpellier)から入手し、小脳 GABA シナプスに対するセロトニンの効果を検討中である。

3. 研究実施体制

(1) 生理・分子生物学グループ(三菱化学生命科学研究所)

① 研究者名:小西史朗(室長)

② 研究項目:抑制性シナプス可塑性の解明・抗不安薬の基礎確立

(2) 神経薬理学グループ(東京医科歯科大学医学部保健衛生学科)

- ① 研究者名: 吉岡耕一 (助教授)
- ② 研究項目: 抑制性シナプス制御機構の量子解析

(3) 神経化学グループ(日本医科大学薬理学)

- ① 研究者名: 鈴木秀典 (教授)
- ② 研究項目: 抑制回路の神経ペプチド受容体機構の解析

(4) 分子薬理学グループ(群馬大学医学部薬理学)

- ① 研究者名: 赤木宏行 (助教授)
- ② 研究項目: 抑制性グリシン・シナプス機構の解析

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Konishi S, Saitow F, Satake S, Yamada J, Ikebuchi Y, Suzuki H, Molecular mechanism underlying facilitation of cerebellar GABA-mediated transmission following activation of monoaminergic afferent fibers. Biogenic Amines 16, 115-125, 2001.
- Hirono M, Yoshioka T, Konishi S, GABAB receptor activation enhances mGluR-mediated responses at cerebellar excitatory synapses. Nature Neuroscience 4, 1207-1216, 2001
- Murakoshi T, Song S-Y, Konishi S, Tanabe T, Multiple G-protein receptors mediate presynaptic inhibition at single excitatory synapses in the rat visual cortex. Neuroscience Letters 309, 117-120, 2001
- 吉岡耕一, 神経伝達機構の解析へのノンパラメトリック密度推定法の応用
数理統計研究所共同研究レポート 143「ノンパラメトリック統計モデルの推定と平滑化法」,
201-215, 2001

(2) 特許出願

国内1件