

「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とその応用」

1. 研究実施の概要

脳の働きは、興奮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。しかし興奮性シナプスに比べて、抑制性シナプスに関する研究は、技術的困難のため立ち遅れている。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、抑制性シナプスの伝達効率を選択的に修飾する薬物を探索し不安・抑鬱などの精神疾患に対する薬物療法の可能性も探ろうとしている。

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

I) 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) 小脳GABAシナプスの増強的制御機構

モノアミン作動性神経で仲介される小脳GABAシナプス増強現象に関与する分子機構を解明するため、以下の試みを実施した。

小脳バスケット細胞(BC)-プルキンエ細胞(PC)間GABAシナプスの二重パッチ記録については、これまでの結果から、モノアミンはシナプス前要素のBCに作用して、GABA作動性伝達を促進することが示されていた。そこで前シナプスBCと後シナプスPCから同時にパッチクランプ記録を行い、ノルアドレナリン(NA)を中心にモノアミンの作用をさらに検討し、以下の二点が明らかになった。①NAで β 2-アドレナリン受容体が刺激されると、過分極活性化カチオンチャネル(I_h)の活性が促進され、BCに脱分極が発生して活動電位発射が増加した。その結果、PCに誘発されるGABAシナプス反応の頻度が著しく増加した。これら一連の反応は、フォルスコリンによる細胞内cyclic AMP上昇で模倣され、 I_h チャネル阻害薬ZD7288で強く阻害されたが、キナーゼ阻害薬H-7では変化しなかった。②一方、神経刺激で誘発されるGABAシナプス反応の振幅も β -受容体刺激で増大した。しかし、この効果は I_h チャネル阻害薬ZD7288で影響されず、プロテインキナーゼ阻害薬のH-7、H-89で抑制された。

以上より、BCの β -アドレナリン受容体刺激による細胞内cyclic AMP量上昇に伴って、性質の異なる二相性の反応が引き起こされることが示された。①cyclic AMPは I_h チャネルを直接活性化してBCに脱分極とスパイクを誘発し、GABAシナプス反応の頻度を増加する。②これとは別に、cyclic AMPはプロテインキナーゼ依存性経路を刺激してBC神経終末の伝達物質遊離機構を促進する。第二の反応機構を明らかにするには、さらに実験を要する。

(2) 小脳GABAシナプスの抑制的制御機構

登上線維の刺激によって放出される興奮性伝達物質(おそらくグルタミン酸)は、プルキンエ細胞に後シナプス性興奮作用を引起すと同時に、バスケット細胞にも作用してGABA放出を阻害する二相性機能を仲介することを発見した。バスケット細胞から同時記録を行い、登上線維から放出された伝達物質は神経終末のAMPA型グルタミン酸受容体サブタイプに作用して、GABA放出を阻害することを示す直接的な証拠を得て、これらの結果を論文に発表した。

(3) 扁桃体のシナプス機構

情動中枢におけるGABAシナプス制御の役割を理解するため、扁桃体スライスをを用いてシナプス機構を解析している。神経刺激によって放出された内在性GABAは、神経終末のGABAB受容体に作用して、興奮性シナプス伝達の前シナ

プス性抑制を誘発することを見出した。この作用機序をさらに解析して、以下の成果を得た。①GABAB受容体で仲介されるこのシナプス前抑制には、細胞内cyclic AMPレベルの負調節が関与する。②しかしCaチャンネルやKチャンネルの活性調節は関与していないらしい。おそらくGABAB受容体は伝達物質遊離機構に直接的に共役して、シナプス前抑制を誘発すると推定される。③これとは別に、扁桃体のGABAシナプス伝達は、神経ペプチドであるタキキニン（サブスタンスPなど）によって選択的に増強されることを見出した。これらの作用機構を検討中である。

(4) 神経伝達の新しい量子解析法の開発

① ノンパラメトリック密度推定法の応用

確率密度分布を特定の形に仮定しないで分布を推定する方法（ノンパラメトリック密度推定法と呼ばれる）を量子解析に応用することを試みている。従来の量子解析の方法のひとつとして、伝達物質の放出の確率過程について、二項分布やポアソン分布などの確率分布を仮定して、それらの分布のパラメータを推定する方法がある。神経筋接合部などにおいてはそのような方法が有効であるとみなされているが、中枢のシナプスに当てはまるという保証はなく、実際にこれまで多くの論争がなされてきた。したがって、まず放出過程について、特定の分布を仮定せずに、確率分布の形を推定することが望ましい。そのようにして、例えば、分布に一定間隔のピークが見られれば、その周期を推定することより、quantal sizeが推定できることになる。ノンパラメトリック密度推定法の研究の進歩は近年著しく、ヒストグラムよりもはるかに優れた性質をもつ推定法がいくつか開発されている。その中で、1) 局所尤度推定法と、2) 罰則付き尤度推定法の2つが現在有力な方法として知られている。これらはいずれも尤度に基づいており、最尤法のもつ望ましい性質をもっている。ヒストグラムと違い、これらの方法は滑らかな分布の推定値を与え、優れた推定効率を示す。すなわち、より少数のデータで信頼性をもつ推定値が得られる。通常定常なシナプス反応を得られる数には限度があるので、これは重要な問題である。

そこで、上記の2つの推定法を用いて、シナプス電流の振幅の分布を解析できるように、プログラムを開発した。この方法を用いて以下のような結果を得ている。

- 1) 小脳バスケット細胞-プルキンエ細胞間の抑制性シナプス電流を解析したところ、ヒストグラムではピークの位置の推定が難しい場合でも、新しい推定法では明らかに一定間隔でピークが認められる場合があった。
- 2) さらにこれらの例について、推定した確率密度の自己相関およびスペク

トル密度をとると、ピークの間隔に一致して周期性が見られた。その周期から、quantal sizeを推定できた。

- 3) イソプロテレノールを小脳に適用すると、抑制性シナプス電流が長期間増強されるが、その作用をノンパラメトリック密度推定法によって調べると、イソプロテレノールはquantal sizeを変えずに、分布を右方にシフトさせることがわかった。

② 有限混合モデルによる密度推定法の応用

ノンパラメトリック密度推定法は特定の分布を仮定しないため、それを用いて推定された密度に等間隔のピークがあれば、それはシナプス伝達が量子的に行われていることの強い証拠となる。一方で、分布を仮定しないため、量子的モデルのパラメタを直接推定することができないという問題がある。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、有限混合モデル (finite mixture models) による密度推定法を適用することを試みている。このモデルは密度分布が基本分布(たとえば正規分布)の複数の混合からなっていることを仮定したモデルであり、量子的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問題があるため、直接にはシナプス伝達に適用できない。そこで、シナプス伝達に適合した新しい有限混合モデルの推定法の開発をめざしている。具体的には、モデルに罰則付き制約を導入する方法を試みており、シミュレーションによってシナプス伝達の分布を適切に表現できることがわかった。その成果を統計数理研究所共同研究集会において発表した。その理論を完成させ、実際のデータに適用することが今後の課題である。

II) GABAシナプス可塑性の分子機構

1) 恐怖条件付け刺激で発現が変動する遺伝子産物の検索

新しいシナプス可塑性調節因子を探索する試みを実施している。音刺激に続く床電気ショックを加えて恐怖条件付けしたラットを作製し、このような動物の扁桃体から抽出したmRNAおよび蛋白質を差分cDNAクローニングおよび二次元電気泳動によって解析した。条件刺激に対応して変化するcDNAおよび蛋白スポットを特定して、その分子の同定を行っている。

2) ヒト由来5-HT₄型受容体遺伝子を導入した細胞株の確立

抗不安作用を持つ化合物をスクリーニングするための細胞株を樹立した。またこの実験系を利用して、モノアミン受容体で仲介されるGABAシナプス増強反応を試験管内で再構築することを試みている。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

- Mitoma, H. and Konishi, S. Monoaminergic long-term facilitation of GABA-mediated inhibitory transmission at cerebellar synapses. *Neuroscience* 88, 871-883 (1999)
- Yamada, J., Saitow, F., Satake, S., Kiyohara T. and Konishi, S. GABAB receptor-mediated presynaptic inhibition of glutamatergic and GABAergic transmission in the basolateral amygdala. *Neuropharmacology* 38, 1743-1753 (1999)
- Washio, H., Takiguchi-Hayashi, K. and Konishi, S. Early postnatal development of substantia nigra neurons in rat midbrain slices: hyperpolarization activated inward current and dopamine-activated current. *Neuroscience Research* 34, 91-101 (1999)
- Satake, S., Saitow, F., Yamada, J. and Konishi, S. Synaptic activation of AMPA receptors inhibits GABA release from cerebellar interneurons. *Nature Neuroscience* 3, 551-558 (2000)
- Hase, A., Suzuki, H., Arahata, K. and Akazawa, C. Expression of human GFR α -1(GDNF receptor) at the neuromuscular junction and myelinated nerves. *Neuroscience Letters*, 269, 55-57 (1999)
- Suzuki, H. and Konishi, S. Roles of tachykinins in the synaptic mechanisms in the rat amygdala. *Brain Research*, 848, A34. (1999)
- 長谷麻子、鈴木秀典、赤澤智宏（1999） ヒト骨格筋におけるGDNF（グリア細胞株由来神経栄養因子）の発現 脳の科学 21, 883-886.
- 高橋直樹、鈴木秀典 (2000) 痛覚伝達に関わる一次ニューロンの栄養因子依存性とその発達変化 *Clinical Neuroscience* 18, 351
- 吉岡耕一 神経伝達物質の非量子的放出機構. 編集(財)ブレインサイエンス振興財団 伊藤正男 川合述史 「ブレインサイエンスレビュー」 p68-80, 1999.