

「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・鬱病などは、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変化を電気生理学的・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

#### 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<sub>B</sub>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。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。このタキキニン作動性のGABAシナプス増強を引き起こす機構と、興奮性シナプス活性化に伴う抑制性ニューロン回路の振動 (oscillation) を誘発する神経機構との関連を検討している。

### 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。①ノルアドレナリンはBC細胞の $\beta$ 2受容体活性化に続き、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を引き起こすことが示された。② $\beta$ 2受容体刺激により、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シナプス電流の振幅増大が起こる。

第2の作用に $I_h$ チャンネルは関与するかどうかを検討した。海馬CA3領域の興奮性シナプスにおける長期増強LTPは、cAMP-PKA依存性の $I_h$ チャンネル活性化で仲介されるとする重要な仮説が提出された。しかし、小脳GABAシナプスでは、 $\beta$ -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で処理した後でも $I_h$ を増大した。また、電気刺激で誘発されるGABAシナプス電流の $\beta$ -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LTPとは異なる分子機構で伝達効率の増強が起こると結論した。これらの結果について論文を作製し、投稿中である。

### 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することを示した。

BCのAMPA受容体活性化→GTP結合蛋白 ( $G_i/G_o$ ) の介在→P/Q型電位依存性カルシウムチャンネル活性の阻害→GABA放出の抑制、このようなシグナル伝達経路によってAMPA受容体で仲介されるシナプス前抑制 (GABA放出阻害) が起こると推定された。また、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、拡散 (spillover) によってBC神経終末のAMPA受容体を刺激し、GABA放出を阻害することが示唆された。

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かどうかを検証した。GAD67-GFP遺伝子ノックインマウスの小脳で、AMPA受容体サブタイプ ( $Glur2$ ) はPCを取り囲むGABA介在ニューロン終末に局在することを、免疫組織化学と共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。これらの成果を二論文にまとめて、投稿中である。現在、さらに免疫電顕によるAMPA受容体局在の観察を進めている。

#### 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た。代謝型グルタミン酸mGluR1を介するGABAシナプスの制御には、逆行性シナプス信号の放出を伴うGABAシナプスLTDの誘発機構が関与する可能性が提唱されているので、この現象とわれわれの結果の矛盾点を慎重に解析し、論文にまとめている途中である。

#### B. 抑制性シナプス可塑性に関与する機能分子・形態的変化の探索

##### ①GABA神経終末の形態的変化（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ので、これらの動物に由来するスライス標本を用いて、GABAニューロン終末から直接的なパッチクランプ法記録を行い、GABAシナプス伝達の性質を解析することを試みている。

##### ②GABA<sub>A</sub>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<sub>A</sub>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。RP発生機構には細胞質で合成されたGABA<sub>A</sub>受容体が細胞膜へ配送される過程が促進されることに由来するとの仮説を立てて、これを検証中である。またRPの発生にはPCから遊離される拡散性因子が関与する可能性も検討している。

また、これまでGABA<sub>A</sub>受容体と相互作用して受容体の細胞膜への配送（trafficking）に関与する蛋白因子の酵母2ハイブリッド法による探索を実施してきた。このような探索から明らかにされた、複数の蛋白について、実際にGABA<sub>A</sub>受容体と相互作用するかどうかを検証している。さらには、これらの蛋白の機能的役割を明らかにするため、培養細胞・ニューロン初代培養系で遺伝子の過剰発現実験を実施し、GABA<sub>A</sub>受容体の発現・移動への影響を検討している。

##### 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クローニングを行い、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の準備が最終段階に入った。二次元電気泳動と質量分析を合わせたプルテオーム解析から同定された、恐怖条件づけに伴う情動記憶の獲得・維持に関与すると想定される蛋白については、論文を投稿中である。

### 3. 研究実施体制

#### (1) 生理・分子生物学グループ

- ① 研究分担グループ長： 小西史朗 （三菱化学生命科学研究所、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

- ① 研究分担グループ長： 吉岡耕一 （東京医科歯科大学医学部保健衛生学科、助教授）
- ② 研究項目：抑制性シナプス制御機構の量子解析と代謝型グルタミン酸受容体の役割

#### (3) 神経化学グループ

- ① 研究分担グループ長： 鈴木秀典 （日本医科大学医学部薬理学、教授）
- ② 研究項目：抑制回路における神経ペプチド受容体機構の解析とGABA<sub>A</sub>受容体の分子生物学

### 4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

#### (1) 論文（原著論文）発表

○ Hirono M, Saitow F, Satake S, Konishi S,

Cross-talk of GABA<sub>B</sub>R and metabotropic glutamate receptor mGluR1 leading to enhancement of mGluR1-mediated synaptic excitation in the cerebellum.

Neuropharmacology 43, 288, 2002

#### (2) 特許出願

H14年度特許出願件数：1件（研究期間累積件数：1件）