

三菱化学生命科学研究所・室長

小 西 史 朗

「抑制性シナプス可塑性の分子機構の解明」

研究期間：平成 10 年12 月 1 日～平成 15 年11 月 30 日

## 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することは、脳機能に関する基礎的な知識を深めるだけでなく、精神神経疾患の理解や治療に向けて著しく寄与すると期待される。これまで興奮性シナプスに関する研究は活発に進められてきているが、抑制性シナプスの研究は主に技術的理由によって遅れていた。しかし、脳の正常な機能および精神神経疾患の発症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ため、抑制シナプスにおけるシグナル伝達を調節している仕組みを解明することは基礎および臨床応用の両面から重要な課題である。このような理由に基づき、中枢神経系における主要な抑制性シナプスであるGABAシナプスを標的にして、その機能および分子的特質を理解する試みを実施することは重要であると想定された。

したがって本研究プロジェクトの中心的課題の一つでは、抑制性シナプスに焦点を合わせてシナプス制御機構の細胞および分子的基盤を明らかにすることを目的として、電気生理学的手法を中心とした研究を進めた。また抑制性GABAシナプスの特徴を理解するため、GABA受容体の主なサブタイプであるGABA<sub>A</sub>受容体が抑制性シナプス部位へ正確に配送される仕組みを明らかにすることを目的として、分子生物学的実験に取り組んだ。また第三の課題として、シナプスのレベルで明らかにされた情報伝達の制御機構と動物行動への出力の間の関連性を理解するための研究課題も立ち上げた。この目的のために、連合学習パラダイムの一つである恐怖条件づけを導入して、情動記憶の獲得維持に関与する分子機構を探索する試みを実施した。これら三方向からのアプローチに大別される研究課題を実施して、以下に要約するような研究成果を挙げるに至った。

第一の抑制性GABAシナプス制御機構に関する課題では、中心的な実験系の一つとしてラットおよびマウス小脳スライスを用いて、パッチクランプ記録法によってシナプス伝達を解析した。その結果、小脳皮質のGABAシナプスにおいて三種類の新しい

シナプス機構が働いていることを明らかにし、これらの機構に関与している分子基盤の一部を明らかにした。第一は、小脳皮質へ投射するモノアミン含有神経から放出されたノルアドレナリンおよびセロトニン、抑制性介在ニューロンからのGABA遊離を増強することを示した。とくにノルアドレナリンによって引き起こされるGABA遊離増強を仲介する作用機序の詳細を追求した。ノルアドレナリンは二つの独立した機序、すなわち介在ニューロンの興奮性増加および神経終末のGABA遊離装置の刺激によって小脳GABAシナプスの伝達を促進することが明らかとなった。

第二に、登上線維から放出される興奮性伝達物質（おそらくグルタミン酸）は、よく知られたプルキンエ細胞の興奮作用を引き起こすと同時に、プルキンエ細胞に結合する介在ニューロンの神経終末に働きシナプス前抑制を誘発してGABA放出を阻害することを見出した。このシナプス前抑制を仲介する受容体は、グルタミン酸受容体のうちAMPA型サブタイプであることを示した。さらに興味深い点として、このAMPA型受容体はイオン透過型ではなく、代謝刺激型の性質を示し、GTP結合蛋白を活性化して神経終末の電位依存性カルシウムチャネルを阻害することによってGABA放出を阻害することを示す証拠を得た。これは、これまでもっぱらイオン透過型と考えられてきたAMPA型受容体が、代謝刺激型受容体の性質も合わせ持つことを明瞭に示した最初の例である。

第三に、介在ニューロンから放出されたGABAは、平行線維—プルキンエ細胞間のシナプスの周辺部に存在するGABA<sub>B</sub>受容体を刺激すると、GABA<sub>B</sub>受容体はその近くに存在する代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1) と相互作用して、受容体間のクロストークによって mGluR1 で仲介されるシナプス応答を増強することが示された。これまでGABA<sub>B</sub>受容体は抑制を仲介すると考えられてきたが、この場合のように興奮性シナプス応答を促進して興奮的に働くこともあることを示したものである。

また、グループI型の代謝型グルタミン酸受容体の刺激によって、小脳GABAシナプスの伝達が抑制的な調節を受けることを明らかにして、この作用機構にチロシンキナーゼが関与することを示す証拠を得た。

これらの実験結果から、小脳GABAシナプスの伝達効率、複数の神経伝達物質によ

る異シナプス性 (heterosynaptic) 調節機構の働きによってプラスおよびマイナスの方向へ多重に制御されていることが示された。これらの異シナプス性制御機構は、小脳抑制性GABAシナプスの短期および長期的なシナプス可塑性に重要な役割を果たすことが強く示唆された。

抑制性GABAシナプスに関連して、分子生物学的解析も実施した。その第一は、GABA<sub>A</sub>受容体が抑制性シナプス部位へ配送される分子機構の解明を目指したものである。この目的のため、yeast-two-hybrid法を用いてGABA<sub>A</sub>受容体サブユニット  $\alpha 1$  および  $\alpha 6$  の細胞内ドメインをベイトにして、マウス脳cDNAライブラリーをスクリーニングした。その結果、GABA<sub>A</sub>受容体の細胞内ドメインと相互作用する幾つかのクローンを明らかにした。このような陽性クローンの中から、Snapinおよびdynein intermediate chain (Dy-IC) に焦点をあわせて、この二種類の分子が実際にGABA<sub>A</sub>受容体と結合することを免疫沈降法およびその他の結合実験によって検証した。またこれらの結合にあずかる分子内アミノ酸配列を明らかにした。その結果に基づき、GABA<sub>A</sub>受容体とSnapinあるいはDy-ICとの間の結合を、それぞれ特異的に阻害するペプチドを合成した。これらの結合阻害ペプチドを用いて、SnapinおよびDy-ICがGABA<sub>A</sub>受容体の配送過程にどのような影響をおよぼすかを、生理学的実験により検討中である。

また脳内における情動記憶の獲得・維持に関与する分子群を明らかにすることを試みた。このため、恐怖条件づけしたラットの扁桃体について、二種類のアプローチによって分子解析を実施した。一つは、二次元ゲル電気泳動とマススペクトル分析を組み合わせたプロテオミク分析によって、恐怖条件づけ刺激によって扁桃体で発現が増加する蛋白分子を同定した。その結果、情動記憶の獲得に伴って少なくとも35種類の蛋白が扁桃体で増加して、その中にはシナプス機能に関連する多数の分子が含まれることを明らかにした。また、恐怖条件づけの有無による扁桃体の遺伝子発現変動を差分 cDNA クローニングにより解析した。その結果、酵母で同定された細胞内物質移動を調節する VPS16 ホモログがラット扁桃体で情動記憶の獲得によって発現増加することを明らかにした。現在 VPS16 遺伝子改変動物を作成中であり、これによ

てVPS16の脳機能における生理的役割を追究しようとしている。

本研究の分子解析から明らかにされてきたSnapin, Dy-ICおよびVPS16などの分子群とシナプス機構との関連が今後さらに解明されれば、脳機能の分子基盤を理解するうえで新たな展望が開かれ、精神神経疾患の治療に向けた薬物療法の新しい標的が開拓されることが強く期待される。

## 2. 研究構想

脳の働きに重要な役割を果たす抑制性シナプスにおける情報伝達の制御機構を解明することを第一の狙いとして、本研究を実施した。また、本研究から得られた成果に基づいて、抑制性シナプスの伝達効率を修飾する薬物を探索して不安・抑鬱などの神経疾患薬物療法への可能性も探ろうとした。しかし、応用探索に関する研究は、基礎研究と両立させることが予想以上に困難なため、研究開始2年目からは、抑制性GABAシナプスの性質を明らかにするための基礎的研究に焦点を絞って努力を集中することに方針を変更した。

これまで小脳のGABA作動性抑制性シナプスにおいて、セロトニンやノルアドレナリン（モノアミンと総称される）を含む神経が活動すると、GABAシナプスの伝達効率が長期間にわたって増強されることを発見した。この成果は、モノアミン系の働きを薬物によって選択的に修飾できれば、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シナプスに作用する薬（ベンゾジアゼピン類など）によって緩和することが知られているので、脳の抑制性シナプスの活動変化は不安症状を引起す要因となる。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開発は、神経疾患の薬物療法に多大な貢献をもたらす。そこで動物の不安モデルを用いて、不安刺激によって引起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解析することを試みた。また、モノアミンが働く受容体分子に影響する選択的な薬物を探索するため

の研究も並行して進めようとした。このような研究の成果は、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でも寄与が大きいものと期待した。

このような構想で研究を開始して、抑制性GABAシナプスの伝達効率を調節する複数のシナプス制御機構を明らかにした。モノアミンによるGABA伝達の増強に加えて、抑制性AMPA型グルタミン酸受容体を介するGABAシナプス前抑制の存在を発見した。また、GABA<sub>B</sub>受容体と代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1) の間で受容体クロストークが起こり、mGluR1で仲介されるシナプス応答が増強される機構を見出した。これら新規シナプス機構の分子的基盤の一部も明らかにした。また、mGluR1活性化によってGABAシナプスの伝達効率が低下する機構にチロシンキナーゼが関与する証拠も得られた。

本研究によって新たに開始した分子解析からは、GABA<sub>A</sub>受容体の抑制性シナプス部位への配送機構を支配すると予想される複数の分子 (SnapinとDy-IC) を発見する段階まで研究が著しく展開された。また、シナプス機構と動物行動表出型（行動フェノタイプ）の因果関係を明らかにするための試みとして採用した動物モデル（恐怖条件づけによる情動行動の表出）の解析から、情動記憶の成立・維持に伴って発現が増加する遺伝子および蛋白分子を同定するに至った。とくに、細胞内物質輸送に関わるVPS16が、情動刺激によって脳内扁桃体において増加することは興味深く、目下この遺伝子のノックアウトマウスを作成にまで漕ぎ着けたことの進展は、研究開始時の期待を大きく上回るものである。



### 3. 研究成果

#### 3. 1 生理・分子生物研究グループ（代表・小西史朗）

三菱化学生命科学研究所・分子神経生物

##### (1) 研究内容及び成果

この研究グループでは、主に脳スライス-パッチクランプ法を用いて、抑制性GABAシナプスの周辺における神経伝達の制御機構を明らかにすることを試みた。取り組んだシナプス機構は、AからCの三種類とその他に分類され、以下に詳述するような成果を得た。

##### (A) 小脳GABAシナプスの増強的制御機構

先に我々が見出したモノアミン作動性神経で仲介される小脳GABAシナプスの増強現象に関与する分子機構を解明するため、平成10年度には、以下のような三つの試みを実施した。

- a) モノアミン作動性GABAシナプス増強の作用部位を特定するため、二回刺激で誘発されるGABA作動性抑制性シナプス電流 (IPSC) の振幅のペアード・パルス比 (PPR) に着目した。PPR分散の変化は、シナプス伝達効率の調節部位を特定する極めて有効な指標となることを見出した。伝達効率が前シナプス性に変化すると、IPSCのPPR分散は減少し、逆に伝達が後シナプス性に影響を受けてもPPR分散は変化しなかった。ノルアドレナリン (NA) およびイソプロテレノール (ISP:  $\beta$  アドレナリン受容体アゴニスト) さらにcyclic AMP上昇薬forskolinは、PPR分散の減少を伴うGABAシナプス伝達の増強を引起した。このような事実に基づき、モノアミンは前シナプス要素に作用してGABAシナプスの伝達効率を増強させると結論した。
- b) 抑制性GABAシナプスにおける伝達機構を研究するため、新しい統計学的手法を導入してシナプス伝達の量子的解析を試みた (3.2を参照)。
- c) GABAシナプス前要素であるバスケット細胞から直接的な記録を行い、作用機構を解析した。NAとISPが、バスケット細胞を脱分極させることを見出した。この脱

分極作用は、過分極活性化カチオンチャネル電流 ( $I_h$ ) の刺激によって引起されることを明らかにした。 $I_h$  電流はcyclic AMPで刺激され、 $I_h$  電流の活性化はモノアミンによるGABAシナプス増強作用の少なくとも一部を仲介することが示された。

さらにNAによるGABAシナプス伝達の増強に関与する作用機構を明らかにするため、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クランプ記録を行いモノアミンの効果を検討した。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、前シナプス性に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 $\beta 2$ -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、forskolin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 $\beta$ -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 $\beta$ -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 (図1A)。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 (図1B)。

平成13年度には、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のNAで仲介される長期増強には、少なくとも2種類の異なった機構が関与することを明らかにした。第一は、NAによる $\beta 2$ 受容体刺激に伴い、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ネルに直接的に働いて、このチャネル



## $\beta$ -Adrenergic Agonist ISP Increases the Frequencies of BC-Spikes and PC-Spontaneous IPSCs

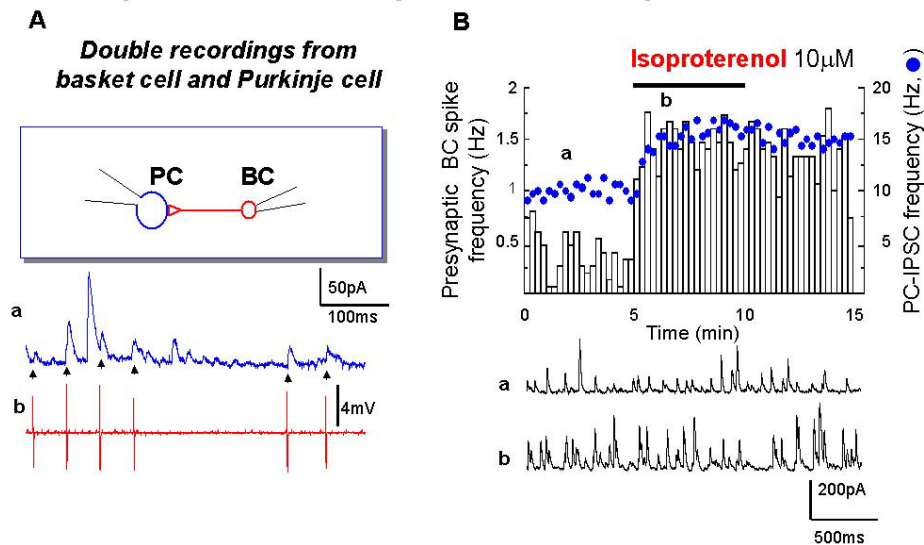


図1A ラット小脳スライスのプルキンエ細胞 (PC) とバスケット細胞 (BC) から二重パッチクランプ記録を行った。A : a, PCから記録される自発的GABAシナプス応答。b, BCから記録される自発的スパイク活動。各スパイクに対応して (▲)、PCにIPSCが駆動されている。B: 前シナプスBCのスパイク頻度と後シナプスPCの自発的IPSC頻度に対するISPの増強効果。グラフのaとbの時点で得られた自発的IPSCのサンプル記録 (ISPによってIPSC頻度が増している)。

## Facilitation by the $\beta$ -Agonist ISP of GABAergic BC-PC Inhibitory Synaptic Responses

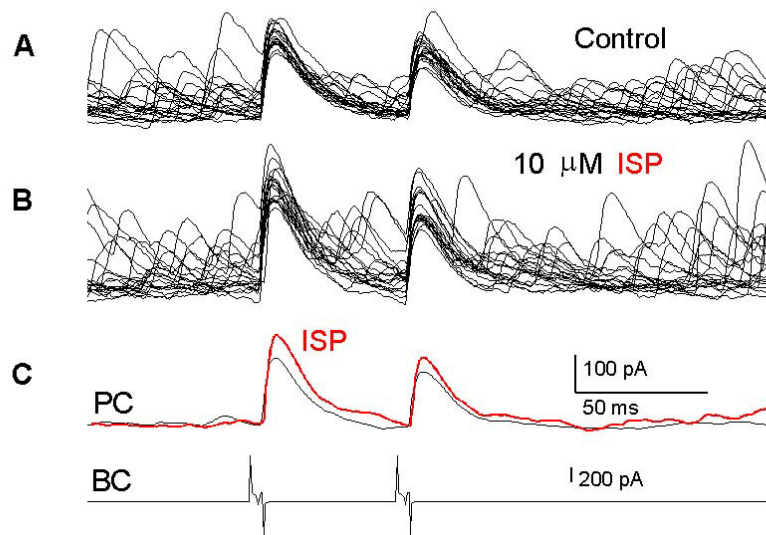


図1B BCとPCから同時パッチクランプ記録し、BCを脱分極パルスで刺激して誘発されるIPSCをPCから記録した (A)。 $\beta$ -アゴニストISP投与によりIPSC振幅は増大した (B)。AとBの平均波形を重ね合わせて表示 (黒が対照、赤がISP投与後のPCから記録されたIPSCの加算平均トレース (C)。下は、脱分極パルスでBCに引き起こされる活動電流を示す。

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ることを示した。第二は、 $\beta 2$ 受容体刺激で生成されたcAMPはcAMP依存性キナーゼ (PKA) を活性化し、BC神経終末におけるGABA放出プールを増大させることによってGABA伝達を促進することが示唆された。また $\beta 2$ 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。

平成14年度以降には、 $I_h$  チャンネルは上述したNAの第二の作用に関与するかどうかを検討した。この点を詳細に検討した背景として、海馬CA3領域の興奮性シナプスにおいて、長期増強LTPにcAMP-PKA依存性の $I_h$  チャンネル活性化が主要な仲介経路として関与することを示す重要な仮説が提出されたことがあった。その結果、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ISPは、PKA阻害薬H-89で処理した後も $I_h$  電流を増大した。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ZD7288で影響されなかった。したがって小脳GABAシナプスの $\beta$ -受容体を介するGABA放出の増強には $I_h$  チャンネルは関与しておらず、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。

またバスケット細胞終末のGABA遊離装置を高張 $\text{Ca}^{2+}$ 糖液で直接刺激して誘発されるGABA反応に対する $\beta 2$ アゴニストISPの効果を調べ、 $\beta$ 受容体刺激によってGABA放出装置の働きが促進されることを明らかにした。この効果も、 $I_h$  チャンネル阻害薬ZD7288で影響を受けず、PKA阻害薬H-89で抑制されることが示された。さらに、ISPによる $\beta 2$ 受容体刺激は、GABA遊離装置の $\text{Ca}^{2+}$ 感受性を増すことが示された。スライス灌流液中の $\text{Ca}^{2+}$ イオンを $\text{Sr}^{2+}$ イオンに置換すると、前シナプスBC刺激によって非同期の持続的なGABA放出が起こり、神経伝達物質の遊離機構は同期および非同期の二相性成分から構成されていることが観察された。このような $\text{Sr}^{2+}$ 存在下にISPで $\beta 2$ 受容体を刺激すると、同期および非同期のGABA遊離機構の両方が促進されることが示された。神経伝達物質の同期的な放出にのみシナプス小胞蛋白synaptotaminが関与することが証明されているので、 $\beta$ -受容体を介する非同期性GABA放出の増強には

### Noradrenergic enhancement of GABAergic synapses in the cerebellar cortex

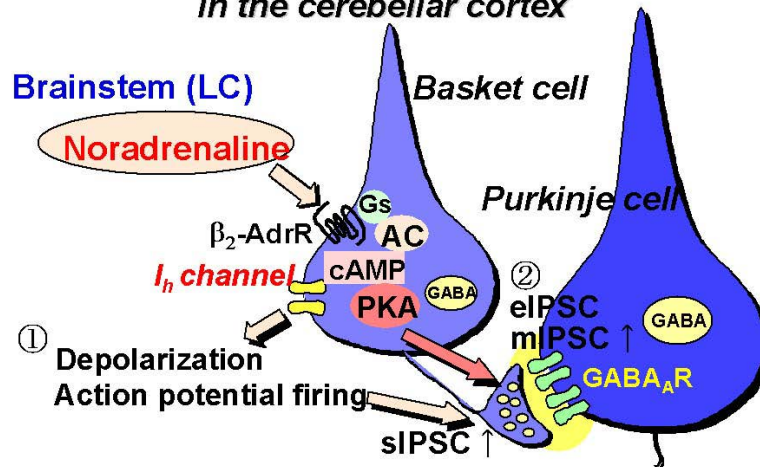


図2 脳幹に由来し小脳皮質へ投射するノルアドレナリン作動線維から放出されたNAは①と②の二種類の作用機序によって、バスケット細胞とプルキンエ細胞の間のGABA伝達を促進する。①の作用では、cAMPを介する $I_h$ チャンネルの直接的活性化に続く興奮作用により、自発的IPSCの頻度が高まる。②の作用では、cAMP-PKAシグナルカスケードが活性化されてGABA遊離装置が刺激され誘発IPSC振幅が増大する。

### Repetitive Activation of Climbing Fibers Inhibits GABAergic Transmission on Purkinje Cells

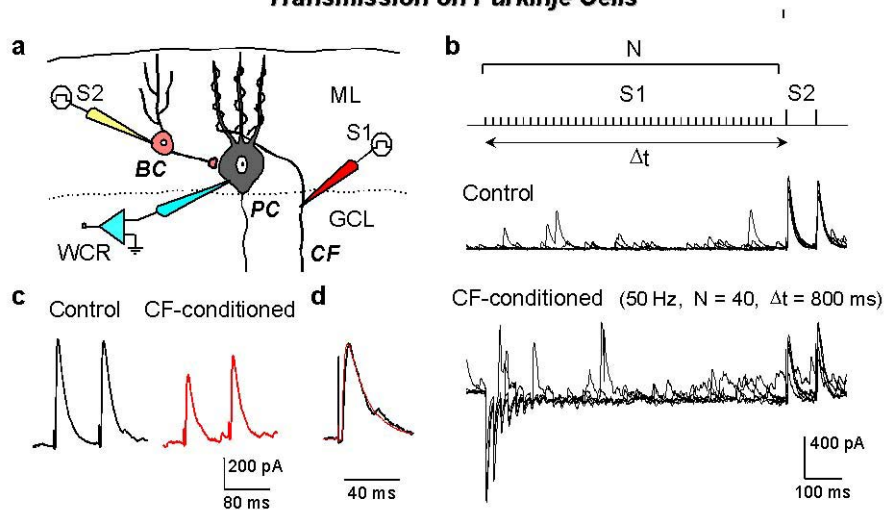


図3 登上線維の反復条件刺激によって引き起こされるBC-PC間GABA伝達の前シナプス抑制。  
a: 刺激および記録電極の配置を示す模式図。b: 上、パルス・プロトコル。中、ダブルパルス試験刺激（S2電極から）によって引き起こされるIPSCをPCから記録。下、試験刺激に先行して登上線維に反復条件刺激（S1電極から）を加えると、試験刺激によるIPSCの振幅は抑制された。c: IPSCの加算平均したトレース（左）、条件刺激後のIPSCトレース（中、赤）。1発目のIPSCの振幅を同じ大きさにして重ね合わせたトレース（IPSCの時間経過に変化がないので、GABA受容体のキネティクスは変化していないことを示す）。

synaptotagmin以外の要因が関与すると推定される。

以上の結果から、NAの第二の作用には $I_h$  チャンネルは関与せず、cAMP - PKA依存性経路によるGABA遊離プールの増加とGABA遊離装置の $Ca^{2+}$ 感受性の増大からなる二種類の作用が介在すると結論した。神経伝達物質の遊離に関与するシナプス小胞蛋白の遺伝子ノックアウト動物を用いた実験から、NAによる $\beta_2$  アドレナリン受容体を介するGABAシナプスの増強機構には、synapsin、RIM、rab3などの関与は否定されたが、現在まだPKAのリン酸化標的蛋白を特定することに成功していない。これまでに明らかにしたNAによるGABAシナプスの伝達効率の促進に関与する分子機構を図2に示した。

#### (B) 小脳GABAシナプスのAMPA受容体を介する前シナプス抑制

小脳プルキンエ細胞へ入力する登上線維の刺激によって放出される興奮性神経伝達物質（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効果を持つことを発見し、その作用機序の詳細を検討した。

精力的な薬理学的ツールを活用した実験から、この登上線維伝達物質によるGABAシナプス抑制作用は、AMPA型グルタミン酸受容体サブタイプによって仲介されることを示す有力な証拠を得た。すなわちAMPA型グルタミン酸受容体サブタイプは、後シナプス性の直接的興奮作用のみならず前シナプス性抑制作用を持ち、二重機能によってプルキンエ細胞からの小脳出力を強化することを初めて明らかにした（図3参照）。

このAMPA受容体で仲介されるGABAシナプス抑制の作用機序をさらに解析し、登上線維から放出される神経伝達物質がバスケット細胞の終末からのGABA放出を阻害するシナプス前抑制の様式によってGABA作動性伝達を抑制することを示す明瞭な証拠を得た。さらに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、この抑制過程を仲介する分子機構の検討も行った。その結果、バスケット細



胞のAMPA受容体が刺激されことによって引き起こされるGABA放出の障害は、GTP結合蛋白 (Gi/Go) 阻害薬であるN-ethylmaleimide (NEM) の前処置で著しく抑制された。またG蛋白 (Gi/Go) 共役型受容体の典型的なアゴストであるbaclofenおよびDCG-IVは小脳GABAシナプス伝達を抑制すると同時に、occlusion（反応経路の共有衝突）によってAMPA受容体を介するGABAシナプス抑制を顕著に障害した。さらに神経終末に存在し、神経伝達物質の放出を制御している電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネル遮断薬の効果を検討し、AMPA受容体を介するGABAシナプス抑制はP型Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害薬である $\omega$ -agatotoxin IVによって消失し、N型Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害薬 $\omega$ -conotoxin GVIAや細胞内Ca<sup>2+</sup>ストア遮断薬ryanodineでは影響を受けないことを示した。

以上の結果に基づき、AMPA受容体を介するGABA伝達のシナプス前抑制は以下の反応経路で仲介されると結論した。すなわち、バスケット細胞神経終末のAMPA受容体活性化→GTP結合蛋白 (Gi/Go) の活性化→終末の電位依存性P/Q型Ca<sup>2+</sup>チャネル活性の低下→GABA放出の障害のシグナルカスケードによってGABA放出のシナプス前抑制が起こると推定された。このような反応経路の関与は、バスケット細胞の終末ボタンで計測したCa<sup>2+</sup>信号のイメージングの光学的実験によっても支持された。Ca<sup>2+</sup>蛍光指示薬をパッチクランプ電極からバスケット細胞へ注入して標識した終末ボタンで、細胞体の脱分極パルス刺激によって誘発される細胞内Ca<sup>2+</sup>信号の上昇（神経終末への活動電位依存性Ca<sup>2+</sup>流入）は、AMPA投与によって障害されることが示された。この結果は、上記のシグナルカスケードの妥当性を強力に支持している。

また、このような抑制性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た。この目的のため脳のGABAニューロンが自家蛍光で標識されたGAD67-GFPノックインマウス（生理研・柳川らにより作出）を用いた。その結果、GFP蛍光を示し小脳プルキンエ細胞を取り囲むバスケット細胞の終末部位に、AMPA型グルタミン酸受容体を認識するGluR2抗体の陽性反応が共存することを示す形態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。

さらに最近、このAMPA受容体で仲介されるシナプス前抑制は、cdk5特異的阻害薬

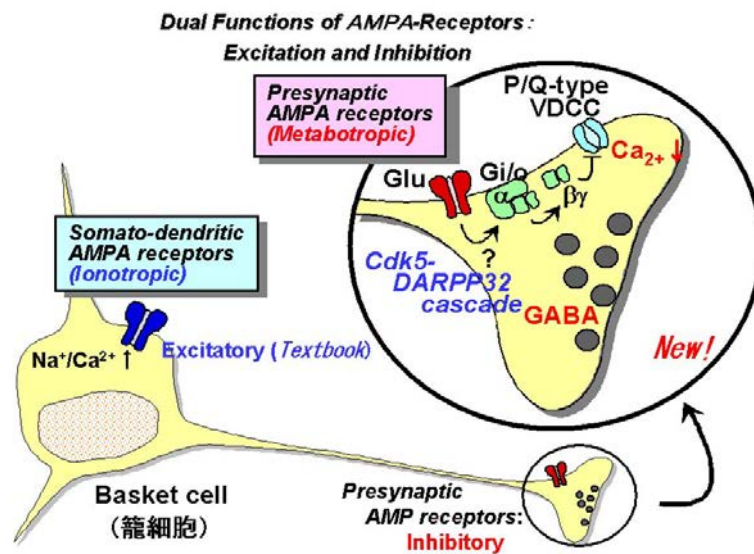


図4 バスケット細胞の神経終末に存在すると想定される抑制性AMPA型グルタミン酸受容体とその活性化に伴うGABA放出阻害の反応機構の模式図。

である roscovitine で完全に消失することを見出した。これはAMPA受容体に共役した信号伝達経路に cdk5 や DARPP-32 などの調節蛋白が関与する可能性を示している。この可能性は、DARPP-32 遺伝子ノックアウトマウスの小脳ではAMPAによるGABAシナプス伝達の抑制効果が消失していることを示した我々の最近の結果とよく合致するものである。しかし、DARPP-32 がAMPA受容体の機能を直接的に制御するか、AMPA受容体の下流カスケードに影響しているか、今のところ不明である。以上の成果に基づき、図4に示す模式図のようなAMPA受容体を介する小脳GABA伝達のシナプス前抑制の様式を提唱した。

#### (C) GABA<sub>B</sub>受容体および代謝型グルタミン酸受容体mGluR1の間のクロストーク

小脳皮質のGABA<sub>B</sub>受容体はシナプス周辺部に局在することが知られており、その分布様式はグループI代謝型グルタミン酸受容体mGluR1の局在と類似している。しかしながら、このようなシナプス近傍に存在する受容体 (perisynaptic receptors) のシナプス機能における生理的意義は不明であった。この点に着目して、シナプス近傍受容体の役割を明らかにすることを試みた。その結果、小脳皮質の抑制性介在ニューロンから放出されたGABAは、平行線維-プルキンエ細胞間の興奮性シナプスに近接して



局在すると想定されるGABA<sub>B</sub>受容体へ作用しmGluR1と受容体間クロストークを起こすことが示された。その結果、平行線維から放出される興奮性伝達物質によってプルキンエ細胞へ仲介されるmGluR1シナプス応答（時間経過の遅い興奮性シナプス応答 slow EPSP）が著明に増強される事実を発見した。

mGluR1アゴニストである1S,3R-ACPDによってプルキンエ細胞に誘発される内向き電流反応の振幅は、GABA自身あるいはGABA<sub>B</sub>受容体アゴニストのbaclofenによって著しく増加することを見出した。GABA<sub>B</sub>受容体アゴニストの効果は、代謝型グルタミン酸受容体にのみ特異的であり、イオン透過型グルタミン酸受容体アゴニストであるAMPAで引き起こされる内向き電流反応はbaclofenで全く変化しなかった（図5）。

このようなmGluR1応答のGABA<sub>B</sub>受容体を介する選択的増強は、GABA<sub>B</sub>受容体拮抗薬CGP62349で消失した。またGABA<sub>B</sub>受容体以外のG蛋白共役型受容体アゴニストであるserotonin, carbacholやadenosineは、mGluR1シナプス応答に無効であった。これらの事実から、小脳皮質ではGABA<sub>B</sub>受容体とmGluR1の間でのみ特異的に受容体クロストークが起こって、シナプス間のシグナル伝達の相互作用が出現することが示された。

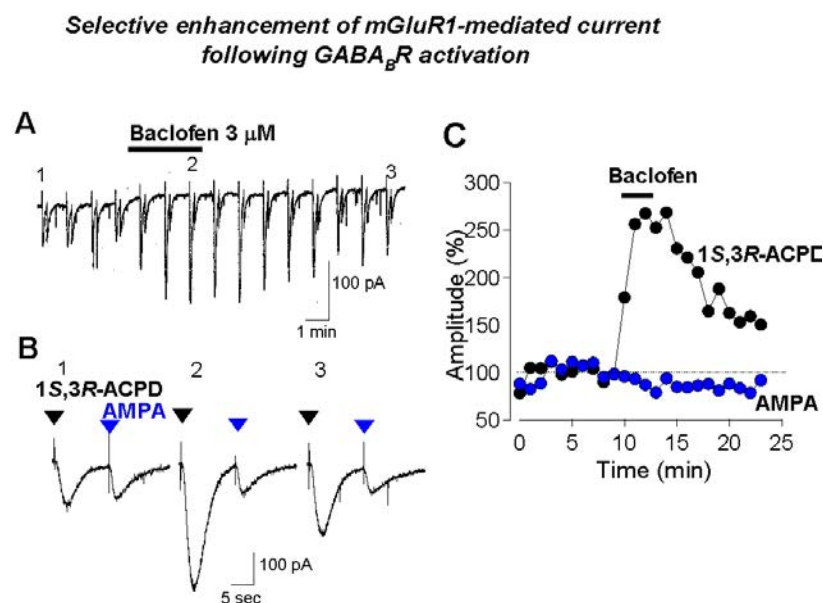


図5 GABA<sub>B</sub>受容体アゴニストbaclofenは、選択的にmGluR1受容体アゴニスト1S,3R-ACPDで誘発される内向き電流応答を増強し、イオン透過型グルタミン酸受容体アゴニストAMPAによる内向き電流反応には影響しなかった。

代謝型グルタミン酸受容体mGluR1が刺激されると細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が引き起こされるが、GABA<sub>B</sub>受容体の活性化によりmGluR1誘発Ca<sup>2+</sup>濃度上昇の効果も促進された。そこで、このような受容体クロストークを仲介する分子機構を検討するため、各種の阻害薬の効果調べた。Gi/Go蛋白阻害薬NEMの前処置によって、GABA<sub>B</sub>受容体活性化に伴うmGluR1内向き電流応答の増強は消失した。ホスホリパーゼC (PLC) 特異的阻害薬U73122やheparinさらにはCa<sup>2+</sup>キレートBAPTAをパッチ電極からプルキンエ細胞へ細胞内注入すると、GABA<sub>B</sub>受容体活性化によるmGluR1応答の増強反応は顕著に阻害された。またbaclofenによってプルキンエ細胞の後シナプス性GABA<sub>B</sub>受容体が刺激されることによって発生する外向き電流反応は、K<sup>+</sup>チャネル阻害薬のBa<sup>2+</sup>イオン処理によって消失したが、その時Ba<sup>2+</sup>処理はbaclofenによるmGluR1応答の増強効果には影響しなかった。

以上の結果から、baclofenによるGABA<sub>B</sub>受容体活性化に伴って細胞内ストアに由来する細胞内Ca<sup>2+</sup>上昇が原因となり、mGluR1応答の増強が引き起こされることが示された。通常の後シナプス性GABA<sub>B</sub>受容体で仲介されるK<sup>+</sup>チャネル透過性の上昇は、GABA<sub>B</sub>受容体-mGluR1クロストークには関与しないことも結論された。

つぎに、神経刺激で放出された興奮性伝達物質で引き起こされるmGluR1シナプス応答が、GABA<sub>B</sub>受容体活性化によって増強される可能性を調べた。低濃度のGABA<sub>B</sub>受容体アゴニストbaclofenは、平行線維の反復刺激で誘発されるmGluR1シナプス応答slow EPSCの振幅を増加し、高濃度では逆に抑制した。これは、GABA<sub>B</sub>受容体活性化は二相性の効果を持ち、振幅の増加は後シナプス性GABA<sub>B</sub>受容体の刺激で起こり、アゴニスト濃度が増すと前シナプス性GABA<sub>B</sub>受容体の活性化によって興奮性伝達物質の放出が阻害され、slow EPSC振幅を減少させることを示している。この点の確証を得るためには、前および後シナプス性GABA<sub>B</sub>受容体をそれぞれ特異的に刺激するアゴニストが必要になるが、これまで調べた化合物の中にはこのような特異性を示すものは見出せなかった。

さらに、小脳皮質の介在ニューロンから神経刺激によって放出されたGABAが、実際にmGluR1シナプス応答を増強するかどうかを検討した。この点を調べるため

GABA<sub>B</sub>受容体拮抗薬CGP62349を利用した。CGP62349処理によって、平行線維の反復刺激で誘発されるmGluR1シナプス応答slow EPSCの振幅は低下した。この時、同じ刺激で誘発される時間経過の速いEPSC（イオン透過型グルタミン酸受容体のシナプス応答）の振幅は、逆に増加した。この結果は、神経刺激で放出されたGABAが、先に述べた前および後シナプス性GABA<sub>B</sub>受容体を刺激したと想定することによく解釈できる。すなわち、刺激で放出されたGABAが後シナプス性GABA<sub>B</sub>受容体を刺激すると選択的にプルキンエ細胞のmGluR1シナプス応答 (slow EPSC) を増強し（したがって、GABA<sub>B</sub>受容体拮抗薬の存在下では振幅が低下する）、前シナプス性GABA<sub>B</sub>受容体を刺激すると前シナプス終末からの興奮性伝達物質の放出を阻害する（したがって、GABA<sub>B</sub>受容体拮抗薬の存在下にはfast EPSC振幅を増加する）と結論された。

これらの実験的証拠に基づき、GABA<sub>B</sub>受容体-mGluR1クロストークは薬理学的な現象だけではなく、生理学的条件下でも観察できるシナプス機構であることが証明されたと結論できる。これまでGABA<sub>B</sub>受容体は、もっぱら抑制性受容体に分類されてきたが、ここで見出されたように興奮性mGluR1応答を増強する興奮性作用も持っている。したがって、この事実はGABA<sub>B</sub>受容体に関する概念を変更する必要があることを示している。また、小脳皮質における平行線維 - プルキンエ細胞間の興奮性シナプスの伝達効率は、平行線維と登上線維の同時刺激によって長期抑圧 (LTD) を受け、このLTDの誘発はmGluR1の活性化で仲介されることがよく知られている。したがって、我々の見出したGABA<sub>B</sub>受容体-mGluR1クロストーク現象はLTDのようなシナプス可塑性を制御する重要な役割を担っていると推定される（図6参照）。

#### (D) その他のシナプス機構

小脳で見出したGABAシナプス制御機構の普遍性を探求するためと、情動反応におけるGABAシナプスの役割に着目して、情動の神経機構に重要な役割を果たす扁桃体のスライスを用いた研究も実施した。最初に、手始めとしてGABA<sub>B</sub>受容体の関与するシナプス機構を明らかにすることを試みた。外来投与したGABA<sub>B</sub>受容体アゴニストのbaclofenは、扁桃体ニューロンへの興奮性および抑制性シナプス入力を前シナプ

ス性に抑制することが明らかになった。高濃度アゴニストは、後シナプス性に外向き電流（過分極）も発生した。さらには神経刺激によって放出された内在性GABAは、baclofenの作用を模倣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明らかにした。

この作用機序をさらに解析して、以下の成果を得た。①GABA<sub>B</sub>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GABA<sub>B</sub>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（3.3を参照）。

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、最近見出した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さらに解析している。

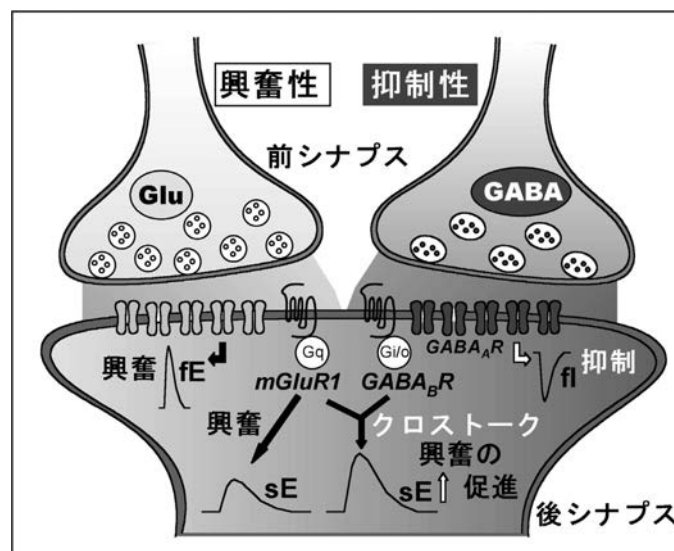


図6 小脳プルキンエ細胞の興奮性シナプスに近接して存在するGABA<sub>B</sub>受容体はmGluR1と受容体クロストークを起こし、mGluR1で仲介される遅い興奮性シナプス応答 (sE) を促進することが示された。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

本グループが小脳皮質で見出した三種類の新しい神経機構は、いずれも抑制性ニューロンから放出される神経伝達物質GABAが関与するシナプス過程である。第一は、モノアミン作動性神経系の活動に伴ってGABAシナプスの伝達が増強を受ける機構である。第二に、従来は興奮性受容体と考えられていたAMPA型グルタミン酸受容体が、抑制性伝達物質の放出を阻害する脱抑制現象によって興奮性シナプス信号の促通を可能にするような巧妙な分子装置としても機能していることがうかがわれる。したがって、少なくとも小脳皮質のGABAシナプスの信号伝達は多様な神経伝達物質系によって相反的に制御されていることが示された。さらに、第三のシナプス機構として異なる受容体系の間で信号のクロストークが起こり、シナプスにおける情報処理が顕著に影響されることも例示された（図7参照）。

このような本研究の成果は、シナプスの神経伝達は形態学的に強固なシナプス結合を伴う従来からよく明らかにされた点と点を連絡する情報伝達だけではなく、シナプス間隙を越えて近接した別のシナプス入力へも著しい影響（異シナプス性hetero-

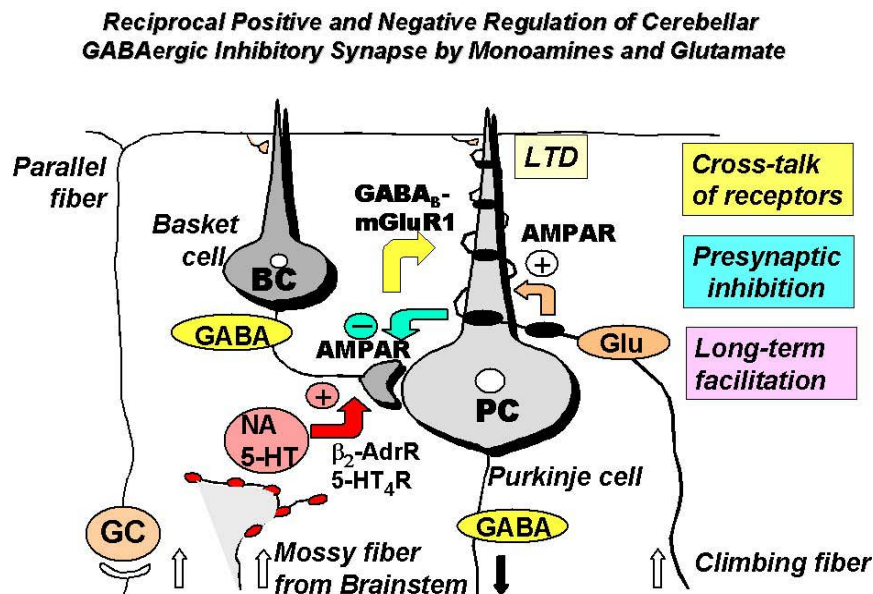


図7 本研究から明らかにされた小脳皮質における三種類の新しいシナプス機構。NAや5-HTのようなモノアミンによるBC-PC間GABA伝達の増強。登上線維の神経伝達物質（おそらくグルタミン酸）によるAMPA型受容体で仲介されるGABA伝達の前シナプス抑制。介在ニューロンBCから放出されるGABAによるGABA<sub>A</sub>受容体-mGluR1の間の受容体クロストークによるmGluR1シナプス応答の増強機構。



synaptic相互作用)をおよぼしていることを明瞭に示すものである。異シナプス性相互作用は、同シナプス性の信号伝達と同様に、シナプス制御機構として重要な役割を果たしていることが推定される。小脳皮質だけでなく、他の脳部位でも類似の異シナプス性相互作用は最近注目されるようになってきて、とくに海馬シナプスなどでは研究が急速に展開されてきている。我々が見出した新規のシナプス機構は、脳内に普遍的に存在して働いている可能性を検証することは、今後の重要な課題であろう。

最近、後シナプスニューロンから逆行性に化学信号が放出され、前シナプス終末からの神経伝達物質の放出を制御する逆行性伝達が目されてきている。小脳皮質のAMPA受容体で仲介される前シナプス抑制も、逆行性伝達と類似の性質を示すが、これまで我々が検討した結果は内在性カナビノイド (endocannabinoids) のような逆行性化学信号の介入する可能性を強く否定している。しかし、最近ではシナプス近傍のアストロサイトのようなグリア細胞に発現するグルタミン酸受容体が刺激されると、抑制性物質が遊離されることを示す証拠が提出されてきている。したがって、このような可能性はAMPA受容体を介するGABAシナプスの抑制的制御の場合にも今後検討すべき課題であろう。

また、GABA<sub>B</sub>受容体-mGluR1クロストークについては、mGluR1はシナプス可塑性の誘導に重要な役割を果たすことが証明されているので、GABA<sub>B</sub>受容体の刺激もシナプス可塑性の制御に強く影響することは十分に期待される。この可能性を検証することは、今後のシナプス制御機構に関する研究において重要な課題の一つであると考えられる。

今回の研究から明らかにされたGABAシナプスに関連した新規のシナプス機構は、GABAシナプスは精神神経機能に密接に関わっているので、脳神経系の疾患に対する薬物療法の様々な標的を内包していると推定される。たとえば、抑制性AMPA受容体は脊髄後角でも報告されたので、痛み信号の伝達を阻害する鎮痛薬の探索へと発展する可能性は高いと考えられる。またGABA<sub>B</sub>受容体-mGluR1クロストークからは、認知機能増強薬 (cognitive enhancers) のような領域への展開が想定される。このような観点から、本研究の成果を近い将来に治療応用に結実させる努力を払うことは、社会的にも強く要請されるであろう。

### 3. 2 神経薬理研究グループ（代表・吉岡耕一）東京医歯大・院・分子生命情報解析

この研究グループでは二つの課題について研究を実施した。第一は抑制性シナプスにおける伝達効率の制御機構に関する作用点や作用機序を明らかにするため、新しい統計学的理論を導入して、シナプス伝達過程の量子解析を試みた。第二に、GABAシナプスの制御機構における代謝調節型グルタミン酸受容体の役割を明らかにすることを試みた。

#### 課題1 抑制性シナプス伝達の制御機構の量子解析

シナプス伝達の修飾作用や可塑的変化の機構を調べるうえで、量子解析は重要な解析法である。量子仮説によれば、伝達物質は同様の大きさの単位（量子）としてシナプス前終末から放出され、その放出過程は一定の確率的法則に従うと考えられる。量子仮説は神経筋接合部の研究により提唱され、そこではそれを支持する多くの証拠があるが、中枢のシナプスにおいてはまだ不明な問題が多い。特に、興奮性シナプスに比べて、抑制性シナプスに関する量子解析の研究は少ない。シナプス伝達の確率的変動を解析するために、記録したシナプス反応の頻度ヒストグラムを作り、それを放出過程の確率分布の推定値として、それをもとに解析することが従来なされてきた。しかし、ヒストグラムは確率密度の推定値としては、以下のような欠点をもつことが知られている。(1) ヒストグラムはデータの変動範囲を一定の幅（ビン）で区切り、各ビンを定数で推定する、すなわち、区分的定数関数の推定値である。したがって、真の分布が本来滑らかな分布であるときは、それからの隔たり（バイアス）が大きくなる。(2) 漸近平均積分二乗誤差などの推定効率の指標によると、ヒストグラムは後述の新しい推定法に比べて効率が悪い。すなわち、一定の信頼性をもつ推定値を得るために、非常に多くのサンプルを必要とする。(3) 各量子による反応の大きさ (quantal size) が揃っていれば、quantal sizeの整数倍の間隔でヒストグラムに複数のピークが見られることが期待されるが、ヒストグラムの分布の形はビンの幅に依存し、しばしば幅の取り方によって見かけのピークの位置がさまざまに変わってしまい、quantal sizeの推定が困難である。(4) ヒストグラムの分布の形はさらにビンの基点の取り方

によっても変わる。

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すれば、必ずしもヒストグラムに依存せずに放出の確率的性質を推定できる。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、中枢のシナプスにそれが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。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は、ノンパラメトリックな推定法と呼ばれる。この分野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。そこで、それらの新しい方法を量子解析に応用することにより、従来の方法では得られなかった新しい知見を得ることを試みた。

#### A. ノンパラメトリック密度推定法による量子解析

ノンパラメトリック密度推定法として、(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つの推定法と用いて、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た。

- 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小脳スライス-パッチクランプ法により解析したところ、図1の例のように、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た。

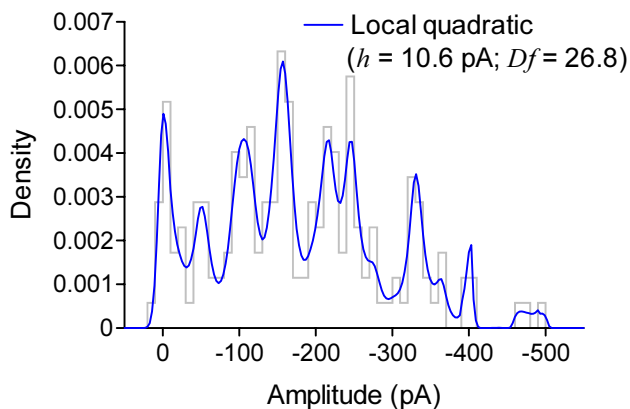
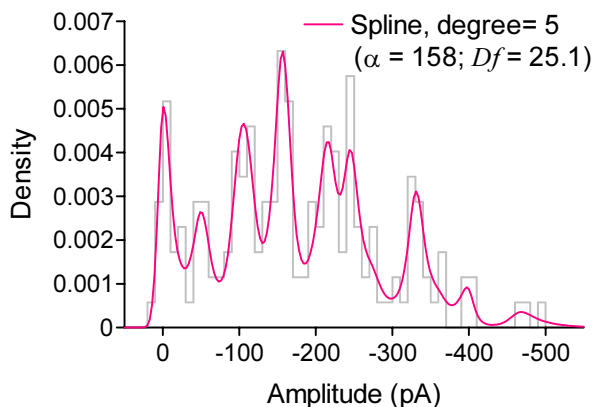
**A Local likelihood estimator****B Penalized likelihood estimator**

図1 局所尤度推定法 (A) と罰則付き尤度推定 (B) による抑制性シナプス電流の振幅の密度推定。

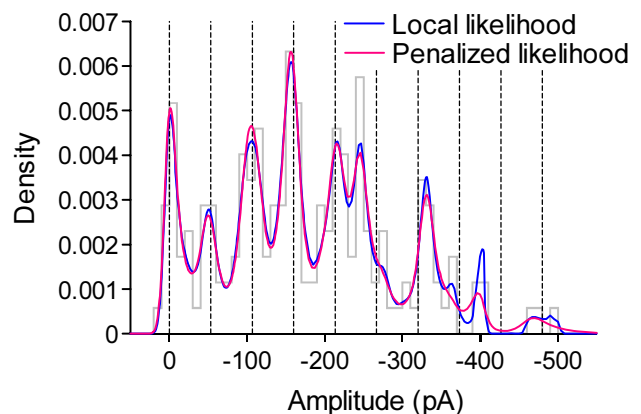
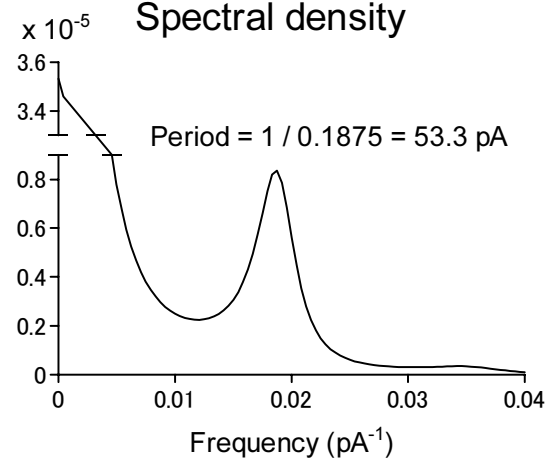
**A Density estimators****B Spectral density**

図2 罰則付き尤度推定による密度推定 (A) より求めたスペクトル密度 (B)。スペクトル密度のピークよりquantal sizeが53.3 pAとさ推定された。Aの縦線はこの値を整数倍して示したもの。

- 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 (図2)。
- 3)  $\beta$  アゴニストである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 (図3)。このことから、イソプロテレノールの作用点はシナプス前部であることが示唆された。

## B. 有限混合モデルを用いた新しい密度推定法の開発と応用

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、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た。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、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

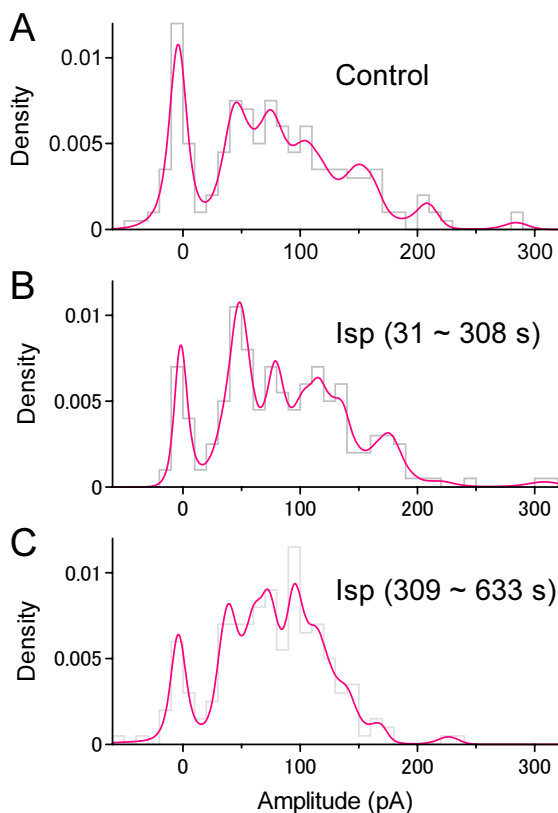
Effect of Isoproterenol (Isp; 20  $\mu$ M)

図3 イソプロテレノールの投与前 (A)、投与後 31~308秒間 (B)、309~633秒間 (C) の反応の密度推定値。

## Application of quantal MPLE to the IPSC data set

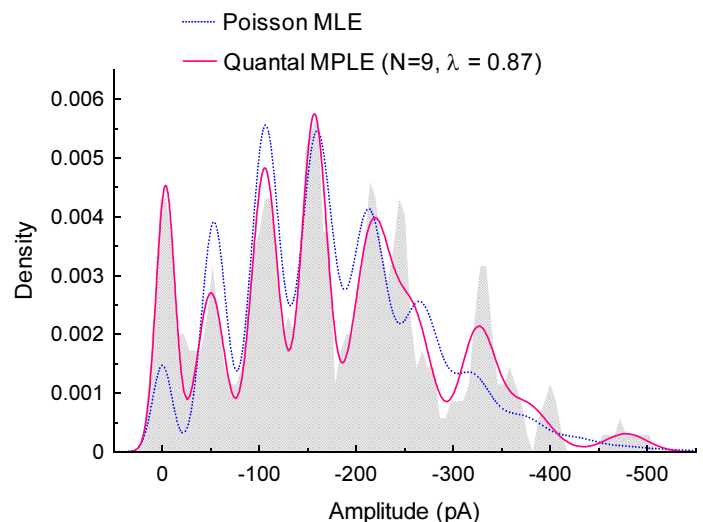


図4 図1と同じデータに関して、混合分布モデルの罰則付き最尤法によって推定した密度 (Quantal MPLE)。Poisson MLEは、従来の方法で、量子の放出がポアソン分布に従うと仮定し、最尤法で推定したもの。



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(図4)。

## 課題2 GABAシナプスの制御における代謝調節型グルタミン酸受容体 (mGluR) の役割

小脳ではmGluRが興奮性シナプス伝達に対して重要な働きをすることが多く報告されているが、抑制性GABA作動性シナプス伝達に対する作用についてはまだほとんど解明されていない。そこで本研究では小脳介在ニューロン-プルキンエ細胞間におけるGABA作動性シナプス伝達に対するグループI mGluRのアゴニストの作用に着目し検討した。

小脳スライス-パッチクランプ法により、GABAシナプスの制御におけるmGluRの役割を明らかにすることを試みた。グループI mGluRのアゴニストDHPGをスライスに適用したところ、プルキンエ細胞において、DHPGは自発的GABAシナプス応答の発生頻度を上昇させるが(図5)、電気刺激により誘発されるGABAシナプス応答の振幅はむしろを抑制することを見出した(図6)。グループIIおよびグループIII mGluRの

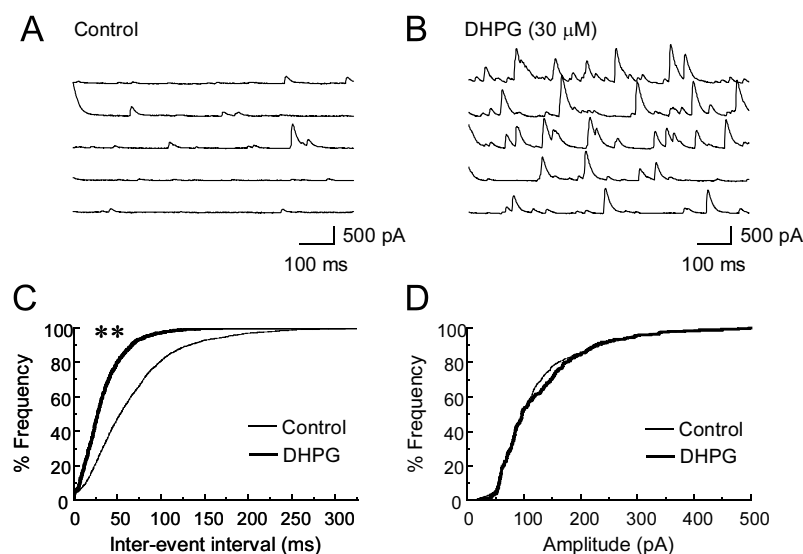


図5 自発性IPSCに対するDHPGの効果。Aは通常灌流液中で、BはDHPGを灌流投与した後に、記録した自発性IPSCのトレースを並べたもの。CはIPSCの発生間隔の累積分布。Dは自発性IPSCの振幅の累積分布。

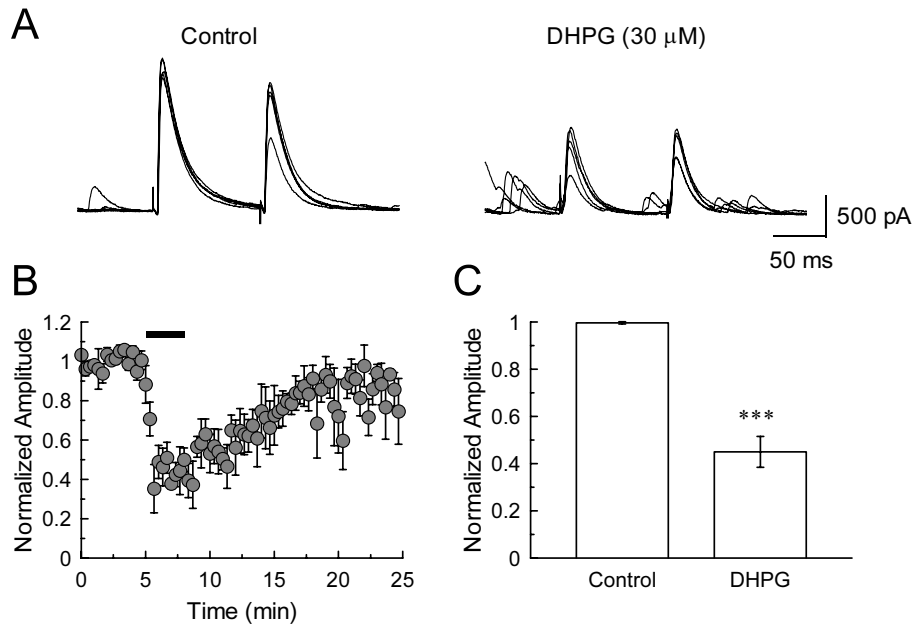


図6 電気刺激により誘発されるIPSCに対するDHPGの効果。A. 左は正常灌流液中で、右はDHPG投与後に、観察される誘発性IPSCのトレースを重ね合わせたもの。B. 誘発性IPSCの振幅の平均値を時間軸に沿ってプロットしたもの。C. 正常灌流液中で記録した誘発性IPSCの振幅を基準とし、DHPGを投与後に記録される誘発性IPSCの基準化した振幅を棒グラフにしたもの。

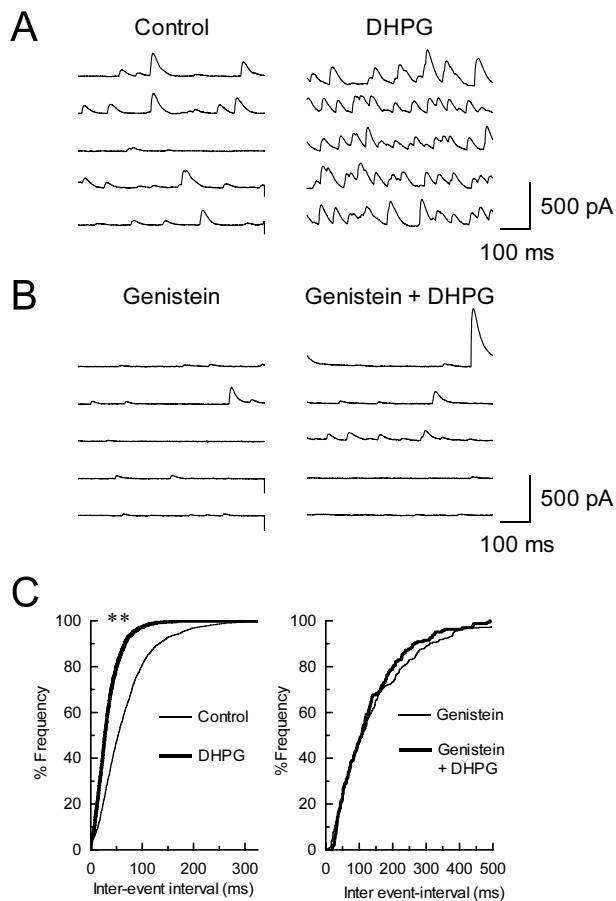


図7 自発性IPSCに対するgenisteinの効果。Aは正常灌流液中で、Bはgenistein存在下で、DHPG投与前後に観察される自発性IPSCのトレースを表示したもの。C. 左は正常灌流液中で、右はgenistein存在下で、計測した自発性IPSCの発生間隔を累積分布表示したもの。

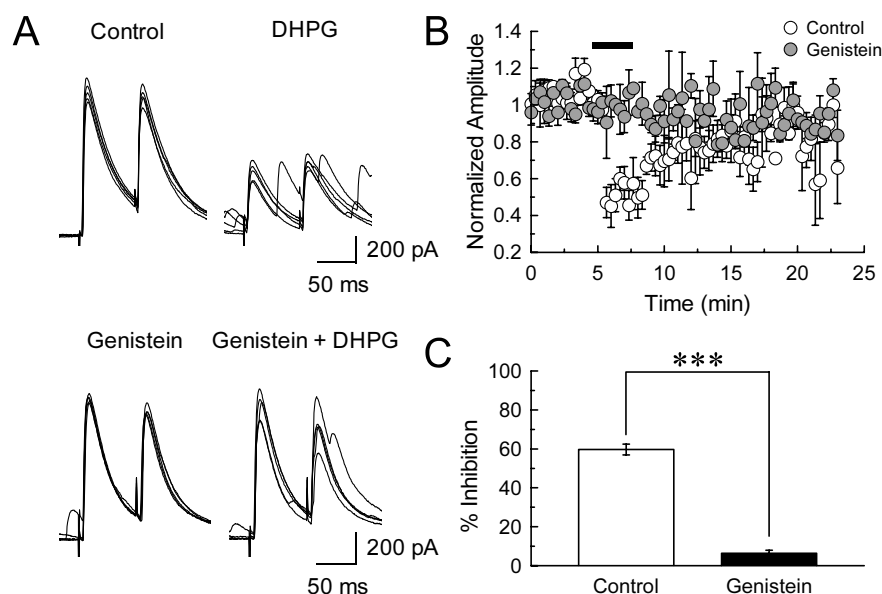


図8 DHPGによる誘発性IPSCの抑制作用に対するgenisteinの効果。A.上は正常灌流液中で、下はgenistein存在下で、DHPGの投与前後に観察される誘発性IPSCのトレースを重ね合わせたもの。B.時間軸に沿って正常灌流液中およびgenistein存在下での誘発性IPSCの基準化した振幅をプロットしたもの。C.正常灌流液中で記録した誘発性IPSCのDHPGによる振幅の抑制率とgenistein存在下で記録される誘発性IPSCの振幅の抑制率を棒グラフにしたもの。

アゴニストも刺激で誘発される抑制性シナプス後電流を抑制したが、自発的な抑制性シナプス後電流の頻度は上昇させなかった。薬理的な解析により、各アゴニストの作用はグループ特異的な受容体に作用することが示された。従って、DHPGはグループI mGluR受容体を選択的に刺激して、GABA作動性シナプス伝達に対して興奮性と抑制性の2つの作用を引起こすことがわかった。

さらに、チロシンキナーゼ抑制薬であるAG490およびgenisteinはDHPGによる自発性IPSCの発生頻度増加作用及び誘発性IPSCの振幅抑制作用を共に阻害することを見出した（図7、図8）。従って、GABAシナプス応答に対するmGluR1受容体を介するこれらの二つの作用には、グループI mGluRの下流にチロシンキナーゼの関与するシグナルカスケードが介在することを示す証拠が得られた。

以上をまとめると、グループI mGluRがシナプス伝達に対して2つの異なる修飾作用、すなわち、GABA作動性シナプス伝達の自発的な活動を増強する作用と、電気刺激により誘発されるGABA放出を抑制する作用を仲介することを見出した。また、グ

ループI mGluRを介するこれら2つの作用にチロシンキナーゼが関与していることが示唆された。今後さらに、本研究で示したGABA作動性シナプス伝達に対するグループI mGluRを介した修飾作用にチロシンキナーゼのどのタイプが関与し、また、リン酸化の対象が何であるかなど、検討することが必要である。

### 3. 3 神経化学研究グループ（代表・鈴木秀典）

日本医科大学・薬理学および三菱化学生命科学研究所・分子神経生物

#### (1) 研究内容及び成果

##### (1) タキキニンによる扁桃体GABA作動性伝達の増強機構の解明

タキキニンは構造と作用が類似した一群の神経ペプチドの総称であり、哺乳類では substance P (SP), neurokinin A (NKA) および neurokinin B (NKB) の三種類を含んでいる。SPとNKBの2種類のタキキニンは上位中枢に存在し、それぞれの受容体であるNK-1とNK-3も特異的な分布を示すので、異なる生理機能を仲介すると推定される。とくに、恐怖反応に関わっている中隔野、海馬、扁桃体、視床下部、あるいは中心灰白質などの脳部位にタキキニン受容体が顕著な分布を示すことから、不安、恐怖などの情動反応の神経機構にタキキニン作動性神経系が役割を果たす可能性が推定されてきた。この可能性は、いくつかの実験事実によって裏付けられている。例えばSPを中心灰白質あるいは脳室内へ投与すると、不安行動や心血管系の反応が誘発される。新生仔期にストレスを与えると扁桃体においてSP放出が増加し、一方、抗不安薬や抗うつ薬をラットに投与すると海馬においてSPの合成が減少することが報告されている。さらに最近では、NK-1受容体拮抗薬が新たな抗不安・抗うつ薬として応用できる可能性が注目されてきている。しかしながら、タキキニン受容体拮抗薬の脳内における作用部位や細胞・シナプスレベルでの作用機序などは、ほとんど不明である。扁桃体は不安や恐怖などの情動に関する情報処理において中心的な位置を占め、さまざまな脳部位からの入力を受けて情動神経機構の統合に重要な役割を果たすと考えられている。扁桃体垂核のなかで、外側核/基底外側核 (LA/BLA) の主細胞は皮質や視床からの入力を受け、その出力を中心核 (CE) へ送っている。また扁桃体に内在し

GABAを含有する介在ニューロンは、扁桃体の外部からシナプス入力を受けるのみならず、主細胞と抑制性シナプスを形成し、扁桃体における情動反応に関連した神経情報の処理を修飾する重要な役割を担っていることは容易に推定できる。さらには、GABA作動性介在ニューロンには、モノアミンや神経ペプチドの受容体が存在しており、これらのGABAニューロンの働きは、モノアミンやペプチドなどの伝達物質により制御を受けていることが予想される。したがって本計画では、扁桃体におけるタキキニンによるGABA作動性神経伝達の修飾機構の性質を明らかにすることを目的として、分子生物学および電気生理学的手法を用いて以下のような検討を実施した。

#### 1) タキキニンmRNA定量 (図1)

免疫組織化学的手法によって、扁桃体にNK-1およびNK-3が存在することは知られていたが、受容体発現の定量的な解析はなされていなかった。そこでTaqman RT-PCR分析法を用いて、両受容体mRNA発現量の定量法を確立した。NK-1はCEで $1.2 \times 10^5$  molecules/ $\mu$ g total RNA, LA/BLAで $0.5 \times 10^5$  molecules/ $\mu$ g total RNA, NK-3はCEで $1.5 \times 10^5$  molecules/ $\mu$ g total RNA, LA/BLAで $1.5 \times 10^5$  molecules/ $\mu$ g total RNAであった。すなわち、両受容体はともに扁桃体に十分量存在し、LA/BLAではNK-3がNK-1より発現量が高いことが分かった。このタキキニン受容体mRNA定量の結果から、NK-3システムも扁桃体に十分存在することが示されたので、NK-1およびNK-3の両システムの扁桃体における機構的な役割を明らかにするため電気生理学の実験を行った。

図1

#### *Expression of tachykinin receptor mRNAs in the rat amygdala*

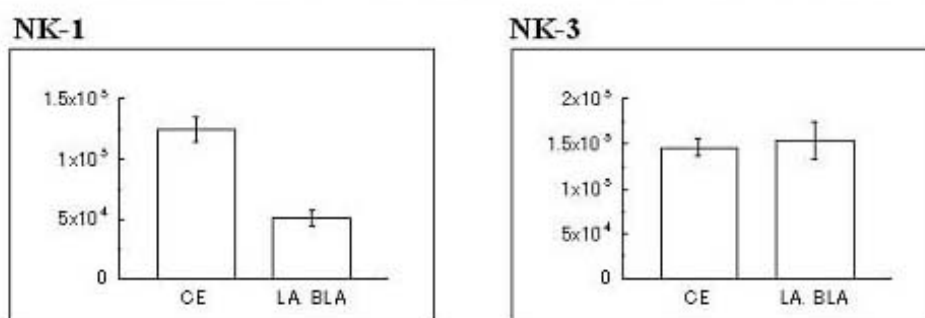
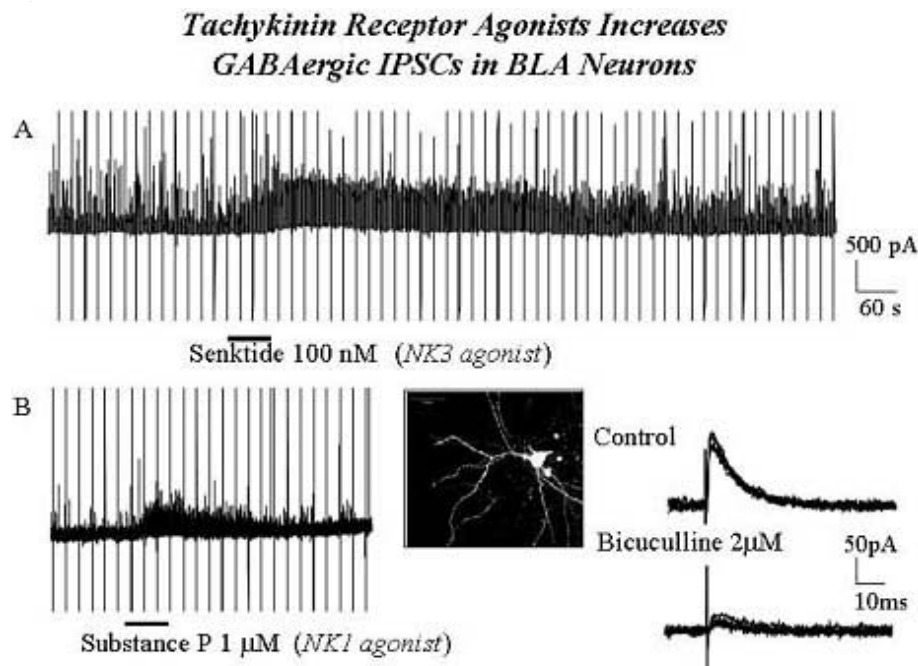




図2



## 2) 電気生理学実験 (図2)

ラット扁桃体スライス標本を用いてwhole-cell電流をLA/BLAの主細胞から記録した。これらの細胞は-70 mV前後の静止膜電位を持ち、規則的なスパイクを示した。-60から-40 mVに細胞内電位を固定すると、自発性の外向き抑制性後シナプス電流 (IPSCs) が観察された。この電流はGABA<sub>A</sub>受容体拮抗薬bicucullineで抑制されることから、GABA<sub>A</sub>受容体を介したシナプス応答IPSCsと同定された。

NK-1受容体の内在性アゴニストであるSPを灌流適用すると、この自発性IPSCsの発生頻度が著しく増加した。一方、SPは興奮性シナプス後電流 (EPSCs) に対してはなんら影響を与えなかった。合成ペプチドであるSar9-SPも同様にIPSCsの頻度を上昇させた。これらの効果はNK-1受容体拮抗薬で消失した。続いて、NK-3作用薬であるsenktideについて観察した。SenktideはSPと同様に、自発性IPSCsの頻度を増加させた。興味深いことに、振幅ヒストグラムの解析から、senktideはより振幅の大きいIPSCsの頻度を増加させることが示された。これらの結果はNK-1とNK-3の両システムは、異

なったGABAシナプス入力へ独立して促進的な修飾作用を発揮することを示唆している。

さらに、 $0.3 \mu\text{M}$  tetrodotoxin存在下に記録される抑制性シナプス応答に対するタキキニン作用薬の効果を調べた。この条件下ではminiature IPSCsが観察されるが、NK-1あるいはNK-3作用薬ともにminiature IPSCsの頻度および振幅に影響を与えなかった。この結果から、タキキニンはGABAニューロンのシナプス前終末の放出機構には直接的な効果はないと結論された。

以上の結果から、タキキニンは扁桃体においてGABA作動性神経伝達を増強することが明らかになり、この増強機構には2種類のタキキニンシステムが独立して関与することが示された。一方、NK-1拮抗薬が抗不安薬として応用できることが期待されている。またGABAシナプスを増強するベンゾジアゼピン化合物は、抗不安効果を持っている。これらの事実は、一見矛盾するように見える。しかしながら、モルモット扁桃体でも最近NK-1に関して今回と同様の結果が示され、またNK-1発現細胞の選択的欠損を起すと不安が減少することが報告されている。したがって、タキキニンシステムの不安情動の神経機構における役割は多様であると考えられ、今後その詳細をさらに検討することが必要であろう。

## (2) 恐怖条件付け刺激で発現が変動する遺伝子産物の探索

長期記憶の獲得には新規のmRNAおよびprotein合成が必要であり、多くの分子の新生が学習の成立に必須であると想定されている。不安などの情動反応に関する記憶獲得においても同様の機構によって仲介されると考えられており、不安や恐怖などの情動に関する研究には、連合学習パラダイムの一つである恐怖条件づけ (fear conditioning) がよく用いられている。この恐怖条件づけによる情動記憶の成立には、扁桃体の興奮性シナプスにおける伝達効率の長期増強が寄与する可能性が提唱されている。したがって、情動記憶の獲得にはシナプス再構築を含む長期的な物質変化が誘導される可能性が強く推定される。一方、情動記憶の成立と抑制性シナプスの関係はほとんど明らかにされていない。このような過程に関与して変動する分子群を同定し、その機

能的役割を解析することは、抑制性シナプスの可塑性に関する理解を進めるのみならず、情動記憶の分子的基盤の解明にも繋がることとが期待される。そこで本研究では、恐怖条件づけに伴って増加する遺伝子のスクリーニングを実施した。ラットに、音による条件刺激 (CS) とケージ床金網への電気ショックの無条件刺激 (US) を組み合わせて2日間恐怖条件づけ刺激をくわえた (図3)。

この組み合わせ刺激の1日後に、CSだけで恐怖反応freezing (連合学習の成立) を示すことを試験した (図4)。この試験の1日後、恐怖条件づけ成立群とUSを与えなかった対照群のラット脳から扁桃体を摘出しtotal RNAを抽出した。

これら2群のRNA試料の間でsuppression subtractive hybridization (差分クローニング) を実施した結果、恐怖条件づけ群においてのみ発現の増加している未知遺伝子断片を見出した。ラット脳cDNAライブラリーから3' および5' RACE法を用いて、コーディング領域全長を含む遺伝子を単離した。データベースの相同性検索を行い、この遺伝子の産物は酵母でリソゾーム/エンドゾーム輸送に関わることが報告されている蛋白のラット型VPS16分子 (rVPS16) ホモログであると同定された。この遺伝子の発現が、恐怖条件づけに伴って実際に増加するかどうかを、ノーザンハイブリダイゼーションによって検討した。

図3

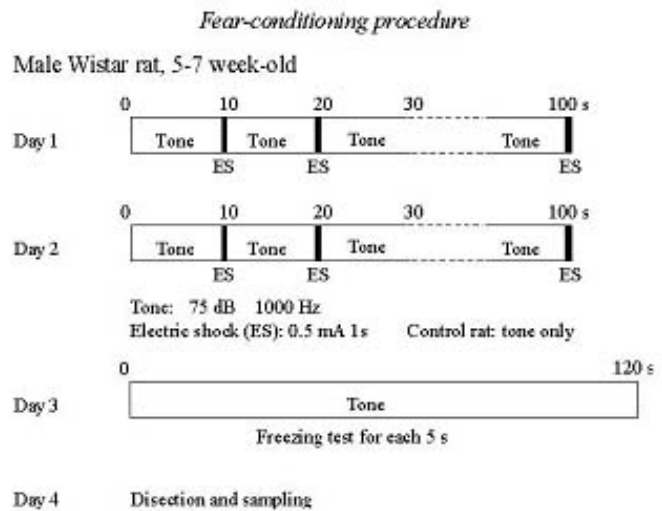


図4

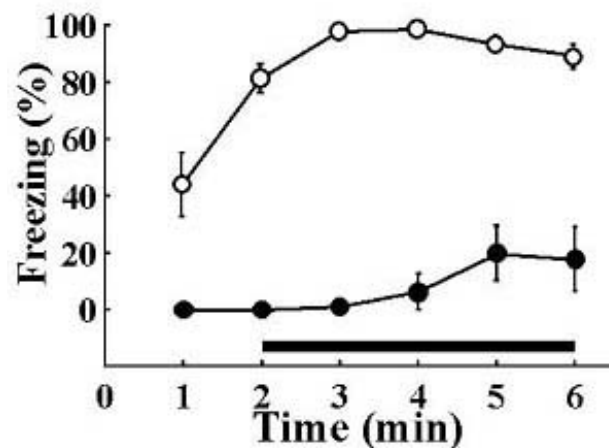
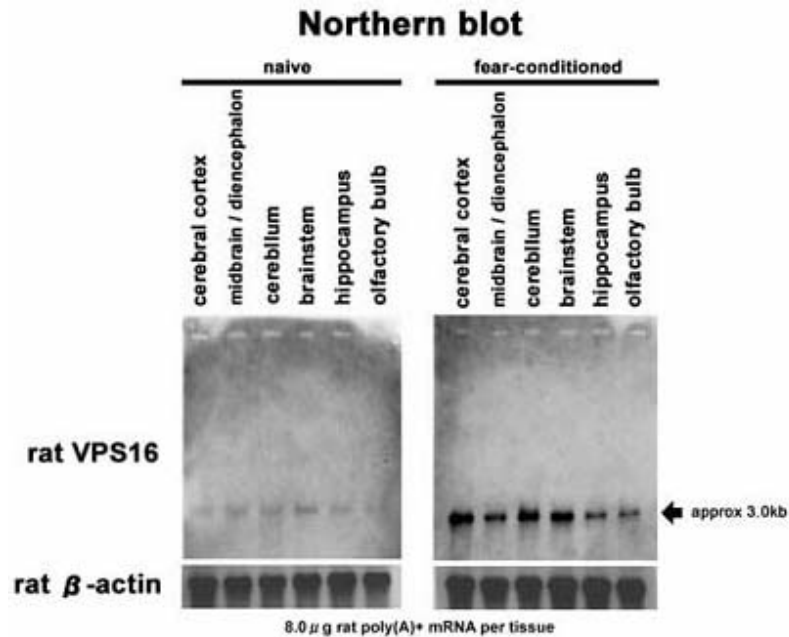


図5



その結果、本遺伝子の発現は、脳内の扁桃体を含む複数の部位で増加していることが示された（図5）。

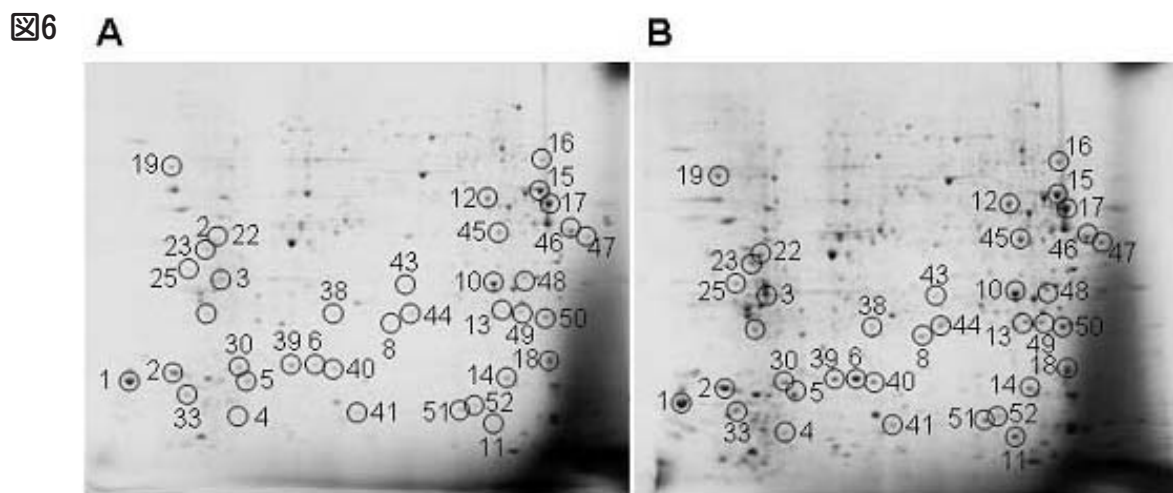
本遺伝子産物を含む1群のvacuolar protein sorting protein (VPS) はyeastにおいてlate-Golgiからvacuoleへの物質輸送に関与する分子である。この中でclass C Vps complexはVps11, Vps16, Vps18およびVps33から成っており、Golgi-to-endosomeおよびendosome-to-vacuole輸送に重要であると考えられている。Vps16が細胞骨格蛋白質と相互作用している可能性も報告されている。したがって、これらの事実と我々の結果を考え合わせると、恐怖条件づけに伴う情動の学習過程には、扁桃体のシナプス結合に再構築が起こり、この過程にはrVPS16を介する分子輸送が関与している可能性が強く示唆された。しかしながら、現時点ではシナプス機構におけるrVPS16の生理的役割はほとんど理解されていない。それ故に、rVPS16遺伝子ノックアウトマウスの作製に着手し、その機能解析をさらに進めようとしている。

### (3) 恐怖条件づけ刺激で発現が変動する蛋白質産物の探索

すでに述べたように、長期記憶の獲得にはmRNAと共に蛋白分子の新たな合成が必要であると考えられている。しかも情動記憶の獲得にはシナプスの再構築を含むダイ

ナミックな変化が起きている可能性を考えると、情動記憶に伴って多くの蛋白分子の発現が著明に変化する可能性が考えられる。このような蛋白分子を明らかにするためには、シナプス周辺の分子群について情動刺激に伴うダイナミックな変化を網羅的に捉える必要がある。近年技術的な改良が進んだ2次元電気泳動とマスマスプロトメトリーを組み合わせたプロテオーム解析法は、このような網羅的な分析によく適している。そこで、遺伝子発現変化では捉えられなかった蛋白質レベルでの変化を追求するために、プロテオーム解析法を導入して情動記憶の成立に伴って変化する分子群の網羅的な探索・同定を試みた。

ラットに、音による条件刺激 (CS) とケージ床金網への電気ショックの無条件刺激 (US) を組み合わせて2日間の恐怖条件づけ連合学習パラダイムを実施した。恐怖刺激1日後にCSのみでfreezingを示すことを確認し、さらに検査1日後、恐怖条件づけ成立群とUSを与えなかった対照群のラット脳から扁桃体を摘出した。組織は可溶化後、immobilized nonlinear gradient strip (pH3-10) を用いて1次元等電点電気泳動に供した。2次元目は8-15% linear gradient polyacrylamide gelsを用いて分離した。分離した各スポットはCoomassie blue (CBB) で染色した。染色されたゲルをスキャナーを介してデジタル画像化し、各スポットの強度をイメージアナライザーで分析した。本条件下で、pI 4から9、分子量15から55 kDaの分子が分離分析可能であった。コントロールと条件づけしたラットの扁桃体に由来する両方の抽出物を同時に分析し、独立した7組の実験のうち4組以上で増加しているスポットを陽性スポットと判定した。その





## 図7

## Identification of proteins increased in the amygdala of fear-conditioned rats

| <u>Synapse-related proteins</u>          |                  | ratio (post/pre-conditioning, n=7) |
|------------------------------------------|------------------|------------------------------------|
| Calmodulin                               |                  | 1.55 ± 0.29                        |
| Synuclein β                              |                  | 2.12 ± 0.62                        |
| Calretinin                               |                  | 2.55 ± 0.66                        |
| Complexin I                              |                  | 1.51 ± 0.23                        |
| Stathmin                                 | phosphorylated   | 2.72 ± 0.66                        |
|                                          | unphosphorylated | 3.70 ± 1.37                        |
| Profilin IIa                             |                  | 3.41 ± 1.02                        |
| <u>Cell-signaling-related proteins</u>   |                  |                                    |
| Phosphatidylethanolamine-binding protein |                  | 5.38 ± 1.72                        |
| Protein kinase C-interacting protein 1   |                  | 1.98 ± 0.23                        |
| <u>Cytoskeleton-related proteins</u>     |                  |                                    |
| Cofilin 1                                |                  | 1.91 ± 0.31                        |
| Tubulin β                                |                  | 1.52 ± 0.25                        |
| Tropomyosin 5                            |                  | 5.77 ± 2.55                        |
| Tropomyosin α                            |                  | 14.15 ± 9.87                       |

結果、約50スポットがこの基準に当てはまり、これらのスポットから蛋白を抽出して、マスマスプロトメトリーを用いた同定に進めた（図6）。

マスマスプロトメトリーによる分析はmatrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometerあるいはquadrupole time-of-flight mass spectrometerを用いて行い、データベース検索によってたんぱく質を同定した。その結果、恐怖条件づけ学習後にラット脳内の扁桃体で、少なくとも35種類の蛋白分子の発現量が増加することを同定できた（図7）。これらの蛋白群の中には、複数の前シナプス制御蛋白（神経伝達物質の遊離を制御するシナプス小胞関連分子）や、細胞骨格の制御蛋白が含まれていた。たとえばシナプス小胞の融合過程直前において伝達物質放出に関っているcomplexin, calretininやcalmodulinなどが含まれていた。StathminはLAおよび皮質に多く存在し、神経軸索の発芽などの現象に関連して発現が増加する分子として知られている。この分子のリン酸化型および非リン酸化型が共にその発現の上昇がみられた。

またGABA受容体との関連で興味深いのは、profilinの発現が増加していた点である。Profilinはactin-binding proteinであるが、GABA<sub>A</sub>受容体サブユニットと局在を共にする gephyrinと相互作用することが知られている。この結果は、情動記憶の成立に伴って抑制性シナプスにも形態あるいは機能的な変化が起こることを示唆している。

以上の結果から、情動記憶の成立過程では扁桃体のシナプス結合に著明な再編成が起こっていると推定された。これら分子の動態を検討していくことで、不安関連疾患の新しい治療薬開発のターゲットが見出される可能性が期待される。

#### (4) GABA作動性神経細胞を可視化するためのGFP-VGATトランスジェニックマウス作製

Vesicular GABA/glycine transporter (VGAT) はGABA/glycine神経細胞の神経終末に特異的に局在し、GABA/glycineをシナプス小胞に取り込む機構にかかわるタンパク分子である。すなわちVGATの発現は、その神経細胞および神経終末がGABA/glycine作動性の抑制性ニューロンに由来するかどうかを決定するための特異的細胞マーカーとなりうる数少ない分子である。抑制性シナプスにおける神経伝達の機構を解明することは、神経生理学の基礎的知識を深めるのみならず、神経疾患との関連を理解するための医療面に大きく寄与する。しかしながら、脳スライス標本や培養神経細胞において生きた条件下でGABA/glycineを含有する抑制性神経細胞やその神経終末を同定することは技術的に容易ではない。この点を可能にするため、自家蛍光を発する蛋白EGFPの遺伝子を挿入したVGATトランスジーンを作製した。これを遺伝子導入して、脳内の抑制性神経細胞が特異的にEGFP蛍光を発するトランスジェニックマウスを作出することを試みた。

##### 1) トランスジェニックマウスの作成

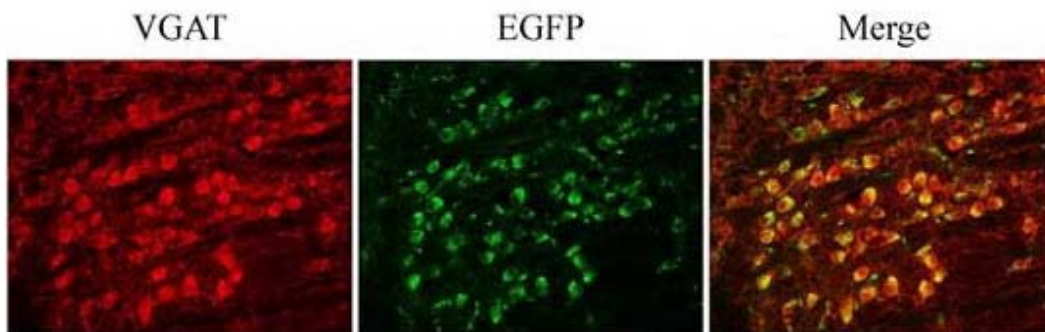
マウスVGAT遺伝子エクソン1より5'上流約8Kbを含む全長約20KbのVGATゲノム遺伝子クローンを単離した。その中からエクソン領域を含むフラグメントを切り出し、pBSKIIベクターにサブクローンした。pEGFP-N1ベクターからEGFP部分を増幅し、上記サブクローニングベクターに挿入した。その結果、VGATのpromoter

領域を含み、コーディング領域の末端にEGFPの配列を組み込んだ、全長約15Kbのフラグメントを持つプラスミドを構築した。完成した上記プラスミドから全長のフラグメントを切り出し、インジェクション用のDNAとして用いた。このDNAを顕微鏡下にガラス毛細管注入針を用いてB6/C3F1マウス受精卵にインジェクションし、受精卵を仮親に移殖、出産させた。出生約1ヶ月後のマウス尾からゲノムDNAを抽出し、EGFP遺伝子配列の一部を増幅させるプライマーを用いてPCRを行い、遺伝子導入されたマウスを確認した。(特許出願済み)

## 2) トランスジェニックマウスにおけるGABA神経細胞でのEGFPの発現

EGFPの蛍光がGABA/glycine神経細胞に発現していることを確認するために免疫組織化学的分析を行った。固定した同一組織において抗VGAT抗体による染色と、EGFP自家蛍光を比較した。Trapezoid bodyで両染色が一致し、EGFPがGABA/glycine神経細胞で発現していることがわかった(図8)。

図8 EGFP fluorescence in the trapezoid body



他の脳組織では両方の発現が一致していない部位もあった。これらの結果から、VGAT遺伝子に挿入したEGFPはGABA/glycine作動性神経細胞の一部に発現していることが確認できた。GABA合成酵素であるglutamic acid decarboxylaseとは異なり、シナプス小胞が存在するシナプス神経終末に蛍光が集積することを期待したが、多くのGABA作動性神経細胞ではこのような神経終末に局限した自家蛍光は見られなかった。

今後正確なVGAT標識のためには、knock-inマウスを作製するような方法論の導入やVGAT promoter領域の解析を含め改善が必要であると判定された。

#### (5) GABA<sub>A</sub>受容体と相互作用する蛋白分子の探索

シナプス伝達が正確に達成されるためには、シナプス下膜へ受容体分子が正しく配送されなければならない。またシナプスの可塑性においても、後シナプス細胞における伝達物質受容体分子の密度が高まることによって伝達効率が上昇する機構が働くことを示す実験事実も報告されている。したがって、受容体のシナプス部位への配送機構を明らかにすることは、抑制性シナプスの可塑性に関する分子機構を理解するために重要な課題である。このような受容体のシナプス部位への配送機構については、興奮性グルタミン酸受容体については研究が急速に進展している一方で、抑制性シナプスについては理解がほとんど進んでいない。近年になって、いくつかの分子が受容体の細胞膜への配送 (exocytosis) や細胞膜からの回収 (endocytosis) を仲介することが興奮性シナプスを中心に明らかにされてきたており、抑制性シナプスでは小数の分子しか知られておらず、個々の分子についても詳細な機能的役割も十分明らかにされていないのが現状である。また、GABA受容体に関連して現在まで同定された分子は、いずれもグルタミン酸受容体と相互作用する分子と重複するものはほとんど無く、抑制性シナプスでGABA<sub>A</sub>受容体の配送を支配する特異的な分子が存在する可能性を示唆している。そこで、GABA<sub>A</sub>受容体のサブユニットと相互作用する分子を同定し、このような分子からGABA作動性シナプスの可塑性の性質を解明するための試みを実施した。

このような目的のため、GABA<sub>A</sub>受容体  $\alpha 1$  および  $\alpha 6$  サブユニットの細胞内ドメイン（第3と第4膜貫通部分をつなぐ部位）に相互作用する蛋白質を探索することを試みた。Yeast-two-hybrid法により、これら二種類の細胞内ループをbaitとして、マウス脳cDNAライブラリーをスクリーニングし、その結果複数の陽性クローンを得た。得られたcDNA断片を用いた再構築系で解析した結果、その中で2つの遺伝子がyeast-two-hybrid法では確実に相互作用することが確認されたので、さらに解析を進めた。cDNA

図9

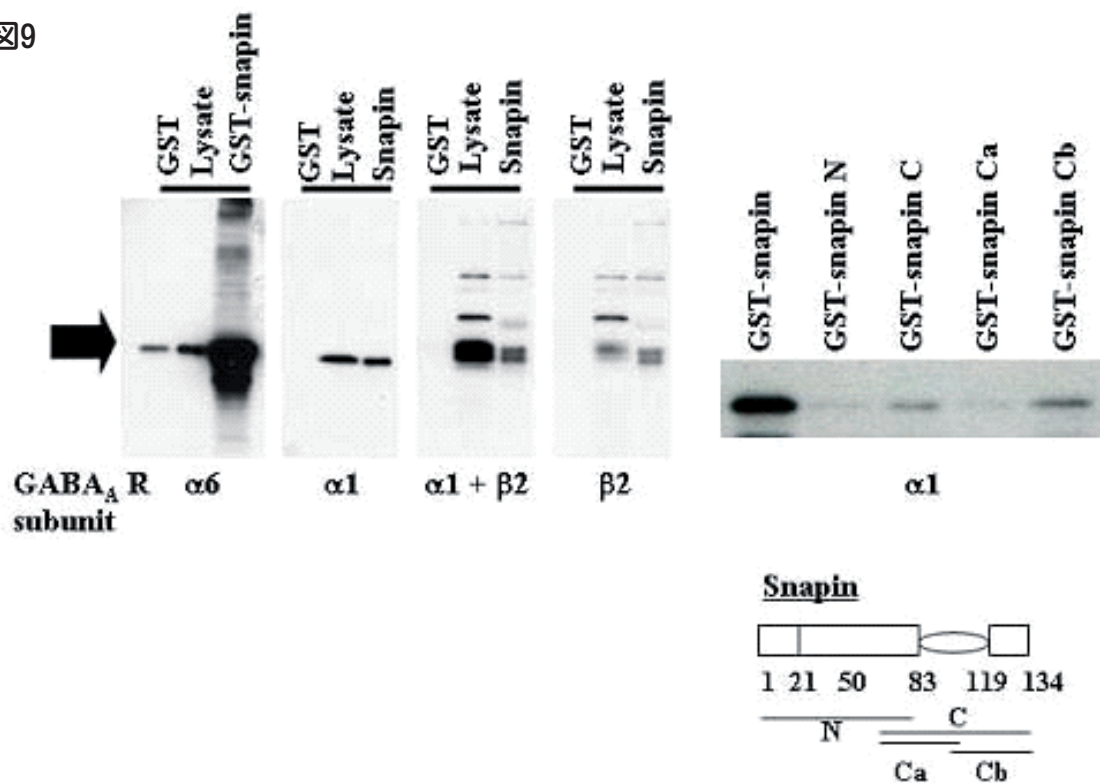
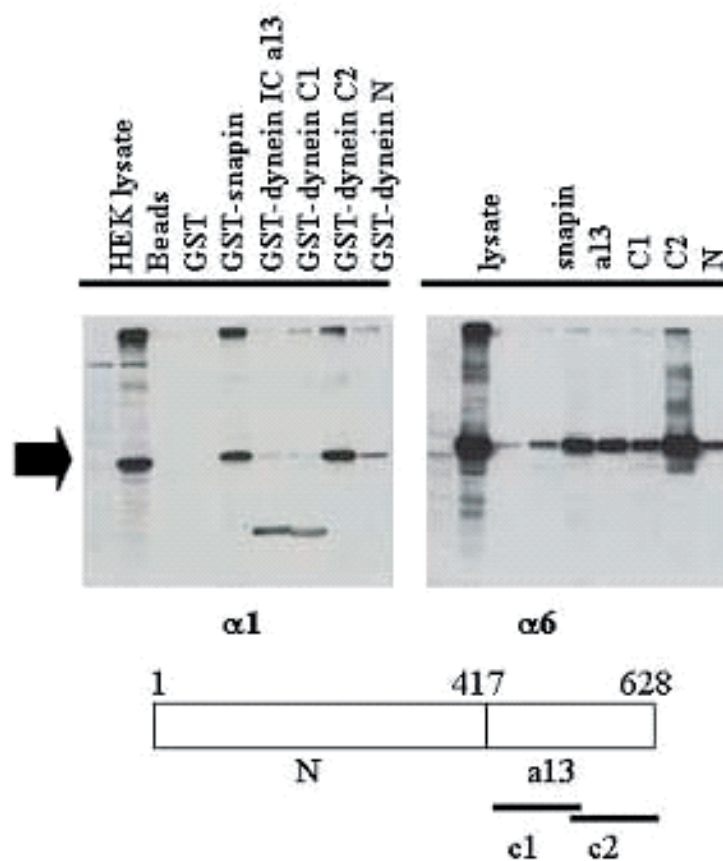


図10

*Dynein IC-1 interacts with GABA<sub>A</sub> receptor α subunits transfected in HEK cells*





断片をベクターにサブクローニングし塩基配列を調べたところ、これらの遺伝子は Snapin (図9) と dynein intermediate chain 1 (図10) をコードすることが明らかになった。

SnapinはSNAP-25と相互作用する蛋白分子として見つかった分子であり、神経伝達物質放出を調節することが電気生理学的にも確認されている。大腸菌に発現させた Snapin-GST fusion蛋白質と、各GABA<sub>A</sub>受容体サブユニットを発現させたHEK培養細胞の組織抽出物を用いてpull down assayを行った結果、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 6$ 、 $\beta 2$ の各サブユニットと相互作用することが示された。さらにSnapinのC末端部分に相互作用する部位が存在すると推定されたが、この部位はSNAP25と相互作用する部位と一致する可能性が高い。

脳内でSnapinがGABA<sub>A</sub>受容体と相互作用するためには、ニューロンのシナプス後部に存在する必要がある。Snapinは前シナプス機能との関連が提唱されているが、その発現はこの予想を超えて広範囲におよんでいて、後シナプス要素にも発現するSNAP-23とも結合することが明らかにされてきた。これらの事実より、Snapinは後シナプス細胞のシナプス部位においてGABA<sub>A</sub>受容体の配送過程に関与している可能性は十分に高いと考えることができる。

Dynein complexはいくつかのサブユニットから構成され、逆行性軸索輸送 (retrograde axonal transport) に関するモーター蛋白 (motor protein) である。Pull down assayによって、この複合体の構成蛋白質の1つであるdynein intermediate chain 1のC末とGABA<sub>A</sub>受容体が相互作用することが示された。さらにdynein intermediate chain 1のC末配列をいくつかのフラグメントに分けて、結合部位を検討したところ、大きく2箇所の30、10アミノ酸が重要であることが分かった。

次に、実際の脳組織においてもdyneinとGABA<sub>A</sub>受容体が相互作用する可能性を免疫共沈降法によって調べたところ、確かに両者は複合体を形成することが証明された。さらに、この結合にあずかると推定される部位のアミノ酸配列に相当するペプチドを合成した。このペプチドは両者の免疫沈降を顕著に阻害することから、相互作用の阻害ペプチドとして働くことが示された。これらの結果に基づき、dyneincomplexは

GABA<sub>A</sub>受容体と相互作用して、受容体配送を制御する可能性が強く示唆された。Gephyrin自身はGABA<sub>A</sub>受容体とは直接結合はしないことが示唆されているので、GABA<sub>A</sub>受容体の周辺に局在していると考えられる。また、gephyrin遺伝子ノックアウトで、シナプス部位におけるGABA受容体の蓄積が低下することが報告されている。このgephyrinが、dynein light chainと相互作用することが最近報告されてきた。さらには、gephyrinはGABARAPと相互作用することがこれまでに示されている。したがって、これら三種類の蛋白 (gephyrin・GABARAP・dynein complex) が連携して、GABA<sub>A</sub>受容体のシナプス部位における出し入れ（移動）を調節している可能性が高いと考えられる。これまで明らかにされてきているdynein complexの役割から類推すると、受容体分子のシナプス膜からの逆行性移動 (endocytosis) の過程においてGABA<sub>A</sub>受容体と複合体を作って、dyneinは受容体の移動を制御する可能性が推定される。

現在、GABA<sub>A</sub>受容体で仲介されるシナプス応答に対して、これらの分子 (dyneinおよびSnapin) が生理学的にどのような影響をおよぼすかを、電気生理学の実験によって検討している。とくに、脳スライスでGABAシナプス応答をパッチクランプ法で記録しながら、dyneinあるいはSnapinとGABA<sub>A</sub>受容体の間の相互作用を特異的に阻害するペプチド（結合阻害ペプチド）をパッチ電極から後シナプス細胞へ注入して、そのGABAシナプス応答に対する効果を明らかにすることを検討している。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

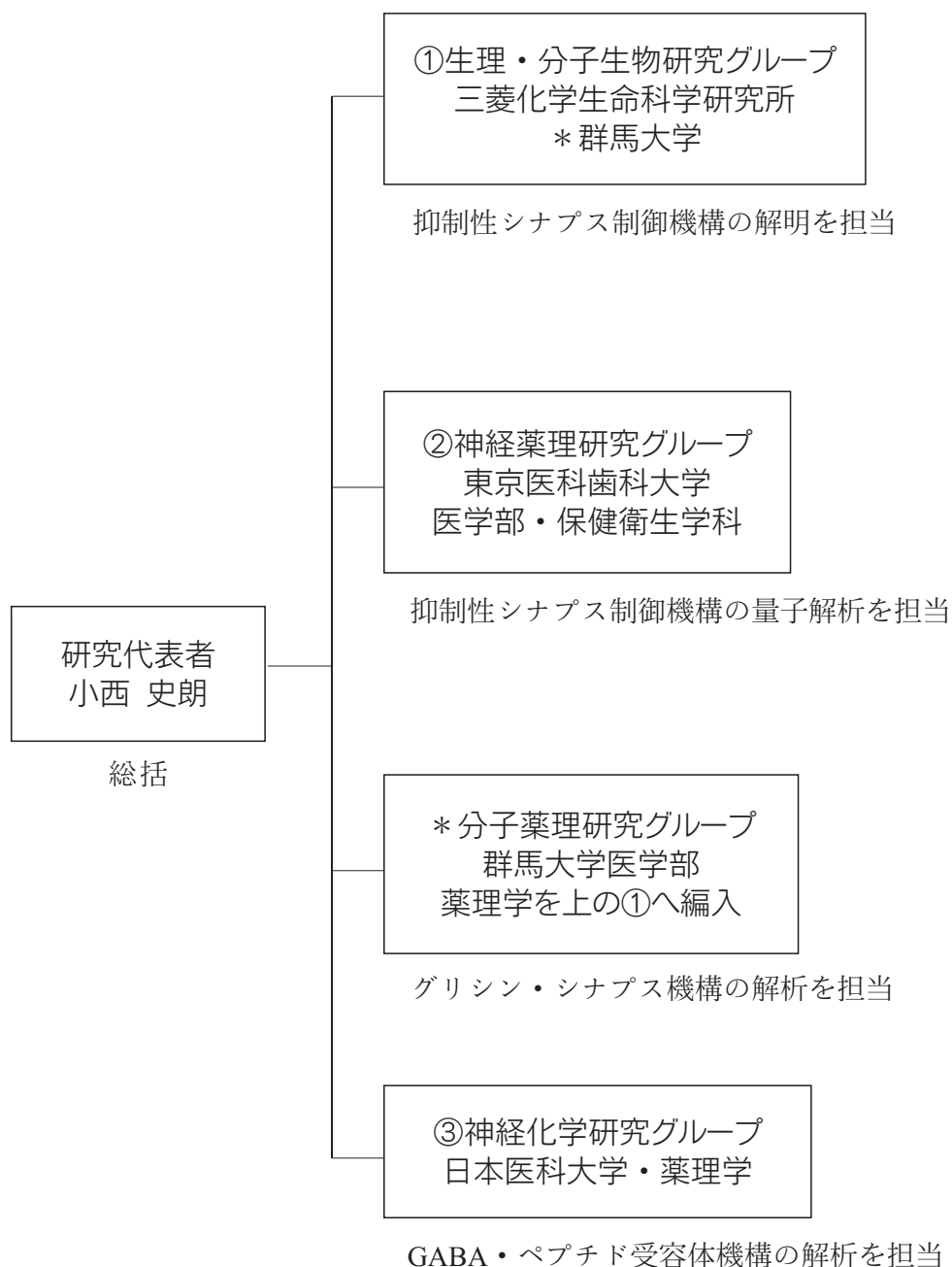
扁桃体におけるタキキニン作動性神経伝達の解析によって、新たな抗不安、抗うつ薬として期待されているタキキニン拮抗薬の作用機構の一端を明らかにできた。この結果から、今後の新たなタキキニン関連化合物の開発においては、NK-1作動系だけでなく、NK-3作動系も考慮に入れることが重要であると指摘される。このような情動神経機構へ複数タキキニン受容体系が関与する可能性については、動物の種差を超えてあてはまるかどうかを今後検討しなければならない。しかし、ここで見出された事実は、タキキニン系に関連した創薬における新たな方向性を示めすものであると考えられる。不安のモデルとして導入した恐怖条件づけ学習パラダイムの実験から、不

安のようなストレスで遺伝子発現が上昇するシナプス関連蛋白群の特定を可能にし、さらには情動神経機構に役割を果たすと推定される新規遺伝子の同定に導いた。これらの結果は、直ちに抗不安薬の開発に繋がらないが重要なヒントを提供し、不安や情動に関連した記憶の形成を仲介する分子機構への神経科学における基礎的知見および創薬シーズの可能性を提供することに貢献するものである。

また今回の分子解析から、GABA受容体の抑制性シナプス部位への配送を支配する分子群を解明する新しい有力な手掛かりが得られたと考えられる。これらの知見に基づいて、今後本研究で同定されてきた分子群の生理学的な役割を明らかにしていくことは重要な課題である。GABA作動性神経伝達およびそれを仲介するGABA受容体は、不安情動の神経機構と密接に結びついていることから、これらの分子群の機能的役割を解明できれば、情動反応を仲介する神経回路やその情報伝達機構の理解に新たな側面を切り開くことが強く期待される。これらの理由から、今回得られた研究成果は、GABA作動性神経伝達に関連した薬物の探索のみならず、抗不安薬や抗うつ薬などの精神神経疾患治療薬の開拓に短期的および長期的観点から著しく寄与するものと期待される。

## 4. 研究実施体制

### (1) 体制



## (2) メンバー表

## ① 小西グループ（抑制性シナプス可塑性の分子機構の解明）

| 氏名    | 所属                          | 役職                         | 研究項目                       | 参加時期                                           |
|-------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------------------------|
| 小西 史朗 | 三菱化学<br>生命科学研究所             | 室長                         | 抑制性GABAシナプスの制御機構           | 平成10年12月～<br>平成15年11月                          |
| 赤木 宏行 | 群馬大学・医学部                    | 助教授                        | グリシン受容体の解析                 | 平成10年12月～<br>平成15年11月                          |
| 岩下新太郎 | 三菱化学<br>生命科学研究所             | 主任研究員                      | 細胞内シグナル伝達                  | 平成10年12月～<br>平成15年11月                          |
| 池上 司郎 | 三菱化学<br>生命科学研究所             | 主任研究員                      | 動物行動の生理解析                  | 平成10年12月～<br>平成15年11月                          |
| 宋 時 栄 | 三菱化学<br>生命科学研究所             | 主任研究員                      | GABA・SP<br>シナプスの形態学        | 平成10年12月～<br>平成15年11月                          |
| 齋藤 文仁 | 科学技術振興事業団<br>日本医科大学・<br>医学部 | CREST研究員<br>講師             | 抑制性GABAシナプスのモノアミン制御機構      | 平成11年 4月～<br>平成15年11月                          |
| 佐竹伸一郎 | 科学技術振興事業団<br>岡崎生理学研究所       | CREST研究員<br>助手             | AMPA受容体による<br>GABAシナプス制御機構 | 平成11年 4月～<br>平成14年 9月<br>平成14年10月～<br>平成15年11月 |
| 山田 順子 | 科学技術振興事業団                   | CREST<br>研究補助員             | 扁桃体のシナプス機構                 | 平成11年 1月～<br>平成13年 3月                          |
| 久保田英雄 | 科学技術振興事業団                   | CREST<br>研究補助員<br>CREST技術員 | 代謝型グルタミン酸受容体によるGABAシナプス制御  | 平成11年 2月～<br>平成13年11月                          |
| 渡辺 雅子 | 科学技術振興事業団                   | CREST<br>研究補助員             | 二次元電気泳動による蛋白分析             | 平成11年 4月～<br>平成12年 3月                          |
| 羽田 栄輔 | 科学技術振興事業団<br>北里大            | CREST<br>研究補助員<br>大学院生     | 恐怖条件づけに伴う<br>遺伝子発現変化       | 平成11年 5月～<br>平成13年 3月                          |



| 氏名    | 所属               | 役職                     | 研究項目                          | 参加時期                  |
|-------|------------------|------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| 蒔苗 浩司 | 科学技術振興事業団        | CREST<br>研究補助員<br>技術員  | 恐怖条件づけに伴う<br>遺伝子発現変化          | 平成12年 2月～<br>平成16年 3月 |
| 池淵 穰  | 科学技術振興事業団<br>北里大 | CREST<br>研究補助員<br>大学院生 | 抑制性GABAシナプ<br>スのモノアミン制御機<br>構 | 平成12年 4月～<br>平成14年 3月 |
| 高嶋 聡  | 科学技術振興事業団        | CREST<br>研究補助員         | 抑制性GABA受容体<br>の性質             | 平成12年 1月～<br>平成13年 3月 |
| 小林 孝則 | 科学技術振興事業団        | CREST<br>研究補助員         | 抑制性GABA受容体<br>の性質             | 平成12年 4月～<br>平成13年 3月 |
| 靄我 英和 | 科学技術振興事業団<br>北里大 | CREST<br>研究補助員<br>大学院生 | 抑制性GABA受容体<br>の性質             | 平成13年 4月～<br>平成15年 3月 |
| 大沢ひとみ | 科学技術振興事業団        | CREST<br>研究補助員         | 抑制性GABA受容体<br>の性質             | 平成14年 4月～<br>平成15年11月 |
| 西崎 糸音 | 科学技術振興事業団        | CREST<br>研究補助員         | Caシグナルのイメー<br>ジングとシナプス機構      | 平成14年 7月～<br>平成15年 3月 |
| 大沢ひとみ | 科学技術振興事業団<br>北里大 | CREST<br>研究補助員<br>大学院生 | 扁桃体のシナプス機<br>構                | 平成15年 6月～<br>平成15年11月 |
| 張 磊   | 三菱化学<br>生命科学研究所  | 研究員                    | 抑制性GABAシナプ<br>スのモノアミン制御機<br>構 | 平成14年 4月～<br>平成15年 1月 |
| 外園 大輔 | 三菱化学<br>生命科学研究所  | 北里大学生                  | 抑制性GABAシナプ<br>スのモノアミン制御機<br>構 | 平成14年 4月～<br>平成15年 3月 |
| 中村 敦子 | 三菱化学<br>生命科学研究所  | 事務員                    |                               | 平成10年12月～<br>平成15年11月 |

## ② 神経薬理研究グループ

| 氏名    | 所属               | 役職                             | 研究項目                              | 参加時期                  |
|-------|------------------|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| 吉岡 耕一 | 東京医科歯科大学・<br>医学部 | 助教授                            | シナプス伝達の量子<br>解析                   | 平成10年12月～<br>平成15年11月 |
| 久保田英雄 | 科学技術振興事業団        | CREST<br>研究補助員<br>CREST<br>技術員 | 代謝型グルタミン酸受<br>容体によるGABAシナ<br>プス制御 | 平成11年 2月～<br>平成15年11月 |

## ③神経化学研究グループ

| 氏名    | 所属                        | 役職  | 研究項目                          | 参加時期                  |
|-------|---------------------------|-----|-------------------------------|-----------------------|
| 鈴木 秀典 | 日本医科大学・<br>医学部            | 教授  | GABA・SP受容体の<br>分子的解析          | 平成10年12月～<br>平成15年11月 |
| 村越 隆之 | 日本医科大学・<br>医学部<br>東京大学大学院 | 助教授 | 扁桃体のシナプス機<br>構                | 平成14年10月～<br>平成15年11月 |
| 永野 昌俊 | 日本医科大学・<br>医学部            | 助手  | 動物行動と遺伝子発<br>現変動              | 平成10年12月～<br>平成15年11月 |
| 齋藤 文仁 | 日本医科大学・<br>医学部            | 講師  | 抑制性GABAシナプ<br>スのモノアミン制御機<br>構 | 平成13年10月～<br>平成15年11月 |

## 5. 研究期間中の主な活動

### (1) ワークショップ・シンポジウム等

| 年月日      | 名称                                                                                                                    | 場所 | 参加人数  | 概要                                       |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|-------|------------------------------------------|
| 1999年11月 | 講演会<br>Synaptic plasticity and<br>Redistribution of glutamate receptors<br>Prof. R.C. Malenka<br>(Stanford Univ, USA) | 東京 | 約50名  | 興奮性シナプス可塑性とグルタミン酸受容体の配送機構の関連を討論した。       |
| 2002年7月  | 中枢神経系シナプス機構の新しい側面                                                                                                     | 東京 | 約500名 | 国際的に最前線で活躍する海外研究者3名を加えて表記のシンポジウムを企画実施した。 |

### (2) 招聘した研究者等

| 氏名（所属・役職）                                                                               | 招聘の目的                                | 滞在先             | 滞在期間                                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------|--------------------------------------|
| Dr. D.A. Rusakov<br>(Neurology Inst. Univ. Coll.<br>London, UK, Principal Investigator) | Ca <sup>2+</sup> イメージングの立ち上げと共同研究の実施 | 三菱化学<br>生命科学研究所 | 2000,8.12～同10.14<br>2001.9.17～同10.27 |

## 6. 主な研究成果、発表等

### (1) 論文発表（国内 0件、海外 14件）

1. Yamada J., Saitow F., Satake S., Kiyohara T. & Konishi S. (1999)  
GABA<sub>B</sub> receptor-mediated presynaptic inhibition of glutamatergic and GABAergic transmission in the basolateral amygdala. *Neuropharmacology* **38**, 1743-1753.
2. Satake S., Saitow F., Yamada J. & Konishi S. (2000)  
Synaptic activation of AMPA receptors inhibits GABA release from cerebellar interneurons. *Nature Neuroscience* **3**, 531-558.
3. Saitow F., Satake S., Yamada J. & Konishi S. (2000)  
 $\beta$ -Adrenergic receptor-mediated presynaptic facilitation of inhibitory GABAergic transmission at cerebellar interneuron-Purkinje cell synapses. *Journal of Neurophysiology* **84**, 2016-2025.
4. Saitow F. & Konishi S. (2000)  
Excitability increase induced by  $\beta$ -adrenergic receptor-mediated activation of hyperpolarization-activated cation channels in rat cerebellar basket cells. *Journal of Neurophysiology* **84**, 2026-2034.
5. Murakoshi T., Song S.-Y., Konishi S. & Tanabe T. (2001)  
G-protein receptors mediate presynaptic inhibition at single excitatory synapses in the rat visual cortex. *Neuroscience Letters* **309**, 117-120.
6. Konishi S., Saitow F., Satake S., Yamada J., Ikebuchi Y. & Suzuki H. (2001)  
Molecular mechanism underlying facilitation of cerebellar GABA-mediated transmission following activation of monoaminergic afferent fibers. *Biogenic Amines* **16**, 115-125.
7. Hirono M., Yoshioka T. & Konishi S. (2001)  
GABA<sub>B</sub> receptor activation enhances mGluR-mediated responses at cerebellar excitatory synapses. *Nature Neuroscience* **4**, 1207-1216.

8. Hirono M., Saitow F., Satake S. and 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)
9. Satake S., Saitow F., Rusakov D. & Konishi S.  
A characterization of AMPA receptor-mediated presynaptic inhibition at cerebellar GABAergic synapses. *European Journal of Neuroscience (in press)*
10. Saitow F., & Konishi S.  
 $\beta$ -Adrenergic LTP of cerebellar GABAergic transmission via protein kinase-dependent and independent mechanisms. *Journal of Neuroscience (in press)*
11. Rusakov D.A., Saitow F., Yanagawa Y., Lehre K.P. & Konishi S.  
Activation of axonal AMPA receptors in cerebellar interneurons inhibits GABA release by reducing fast presynaptic Ca<sup>2+</sup> entry. *(submitted)*
12. Suzuki H., Taoka M., Shinkawa T., Makanae K., Hashimoto N., Ikegami S., Isobe T. & Konishi S.  
Dynamic changes in the profile of proteins in the rat amygdala after fear memory acquisition. *(submitted)*.
13. Kubota H., Yoshioka K. & Konishi S.  
Group I metabotropic glutamate receptor modulates cerebellar GABAergic transmission through tyrosine kinase-dependent signaling cascade. *(submitted)*.
14. Makanae K., Haneda E., Suzuki H. & Konishi S.  
VPS 16 gene expression increases after formation of fear memory. *(submitted)*



(2) 口頭発表

① 招待、口頭講演（国内 4件、海外 6件）

1. Konishi, S.

$\beta$ -Adrenergic receptor mechanism for long-term facilitation of rat cerebellar GABAergic transmission.

73rd Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, Yokohama, Mar., 2000.  
(Jpn. J. Pharmacol., 82, Suppl. I, 42P, 2000.)

2. Suzuki, H., Nakano, A. and Konishi, S.

Tachykinergic modulation of inhibitory GABAergic transmission in the rat amygdala.  
73rd Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, Yokohama, Mar., 2000.  
Jpn. J. Pharmacol., 82, Suppl. I, 74P, 2000.

3. Konishi S.

GABA<sub>B</sub> R-mGluR interaction: enhancement of cerebellar excitatory synapses  
5th International GABA<sub>B</sub> Symposium. Paris, Jul. 2002.

4. Konishi S.

Selective enhancement by tachykinins of GABA synapses in the amygdala. NIPS Symposium: Inhibitory Neurons. Okazaki, Jun. 2001.

5. Saitow F.

Mechanisms underlying  $\beta$ -adrenergic receptor-mediated facilitation of GABAergic synapses in the cerebellar cortex. NIPS Symposium: Inhibitory Neurons. Okazaki, Jun. 2001.

6. Satake S.

AMPA receptor-mediated inhibition of cerebellar GABAergic transmission and its mechanisms. NIPS Symposium: Inhibitory Neurons. Okazaki, Jun. 2001

7. 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.

4th International Meeting on Metabotropic Glutamate Receptors, Taormina, Italy, Sep, 2002.

8. Konishi, S.

Heterosynaptic regulation of cerebellar synaptic transmission.

28th NIPS International Symposium: Inhibitory Neural Transmission in the Brain Structure and Function. Okazaki, Feb. 2002.

9. Satake S., Song S.-Y., Kato C., Konishi S.

Localization of AMPA receptors involved in presynaptic inhibition of cerebellar GABAergic transmission and their activation mechanism.

73rd Japanese Zoology Meeting, Kanazawa, Oct. 2002.

10. Konishi S.

Molecular mechanisms underlying the control of central GABAergic inhibitory synapses and their therapeutic targets.

7th K-JIST Symposium on Life Science: Molecular diseasomics and drug discovery, Korea, 2003

②ポスター発表 (国内 9件、海外 14件)

1. Saitow F. and Konishi S.

Two different mechanisms underlying GABA synapse facilitation following  $\alpha$ -adrenergic activation in cerebellar basket cells.

23rd Annual Meeting of The Japanese Neuroscience Society, Yokohama, Sep., 1999.

Neurosci. Res. Suppl., **24**, S56, 2000.

2. Kubota H., Mori M., Yoshioka K. and Konishi S.

Modulation of GABAergic transmission by metabotropic glutamate receptors in the rat cerebellum.

23rd Annual Meeting of The Japanese Neuroscience Society, Yokohama, Sep., 1999.

Neurosci. Res. Suppl., **24**, S57, 2000.

3. Konishi S. and Saitow F.  
Int. Symposium "Serotonin: From the Molecule to the Clinic" New Orleans (2000)  
"Mechanisms of monoaminergic facilitation of GABAergic transmission in the cerebellum."
4. Saitow F. and Konishi S.  
Mechanisms of noradrenergic facilitation of GABA-mediated transmission at cerebellar basket cell-Purkinje cell synapse. Eur. J. Neurosci., 12 Suppl. 11, 16, 2000
5. Suzuki H. and Konishi S.  
Selective enhancement of GABA-mediated transmission by substance P in the rat amygdala. Eur. J. Neurosci., 12 Suppl. 11, 46, 2000.
6. Yamada J., Saitow J. and Konishi S.  
GABA<sub>B</sub> receptor activation elicits presynaptic inhibition in the basolateral amygdala via Ca<sup>2+</sup>- and K<sup>+</sup>-independent mechanism. Soc. Neurosci., 26, 331. 8, 2000.
7. Satake S., Saitow F. and Konishi S.  
Mechanisms underlying climbing fiber-induced disinhibition in the cerebellar cortex. Soc. Neurosci. 26, 332. 5, 2000.
8. Song S.-Y., Suzuki H., Nakano A. and Konishi S.  
Tachykinins selectively enhance GABA-mediated transmission in the rat amygdala. Soc. Neurosci., 26, 808.10, 2000.
9. Konishi S., Saitow F. and Satake S.  
Reciprocal regulation of GABAergic Basket cell-Purkinje cell synapse in the rat cerebellum. 16th British Neuroscience Association Meeting, Harrogate, UK, Apr. 2001  
BNA Abstracts 16, 59, 2001. (Eur. J. Neurosci., 12 Suppl. 11, 16, 2000)
10. Satake, S., Murakoshi T. and Konishi, S.  
AMPA receptor activation inhibits GABA release from cerebellar interneurons through G protein coupled mechanisms Society for Neuroscience, 31st Annual Meeting, San

- Diego, Nov., 2001. Soc. Neurosci. Abstr., **27**:499.4, 2001.
11. Saitow F. Ikebuchi Y. and Konishi S.  
 $\beta$ -Adrenergic modulation of GABA release at cerebellar basket cell-Purkinje cell synapse. Society for Neuroscience, 31st Annual Meeting, San Diego, Nov., 2001.  
Soc. Neurosci. Abstr., **27**:499.9, 2001.
  12. Ikebuchi Y., Saitow F., Takahashi M. and Konishi S.  
 $\beta$ -Adrenergic long-term facilitation of rat cerebellar GABA synapses depends on RNA and protein syntheses. Society for Neuroscience, 31st Annual Meeting, San Diego, Nov., 2001. Soc. Neurosci. Abstr., **26**:609.14, 2001.
  13. Saitow F., Ikebuchi Y. and Konishi S.  
 $\beta$ -Adrenergic enhancement of GABA release at cerebellar basket cell- Purkinje cell synapses. 28th NIPS International Symposium: Inhibitory Neural Transmission in the Brain Structure and Function. Okazaki, Feb. 2002.
  14. Satake S, and Konishi S.  
Effects of a glutamate uptake blocker on climbing fiber-induced inhibition at cerebellar GABAergic synapses. 28th NIPS International Symposium: Inhibitory Neural Transmission in the Brain Structure and Function. Okazaki, Feb. 2002.
  15. Suzuki H., Taoka M., Makanae K., Nakano A., Ikebuchi Y., Ikegami S., Konishi S.  
Characterization of proteins and mRNAs in the rat amygdala with increased expression following fear conditioning. 28th NIPS International Symposium: Inhibitory Neural Transmission in the Brain Structure and Function. Okazaki, Feb. 2002
  16. Suzuki H., Song S.-Y., Nakano A. and Konishi S.  
Selective enhancement of GABA-mediated inhibitory transmission by tachykinins in the rat amygdala. New York Academy of Science Conference "The Amygdala in Brain Function: Basic and Clinical Approaches" Galveston, Mar. 2002.

17. Satake S., Konishi S.  
A novel property of AMPA receptors underlying climbing fiber-mediated presynaptic inhibition at cerebellar GABAergic synapses.  
3rd Forum of European Neuroscience (FENS), Paris, Jul, 2002
18. Saitow F., Konishi S.  
Roles of  $I_h$  in  $\beta$ -adrenergic receptor-mediated enhancement of inhibitory transmission at cerebellar basket cell-Purkinje cell synapses. Society for Neuroscience, 32nd Annual Meeting, Orlando, Nov, 2002.
19. Satake S., Song S.-Y., Kato C., Konishi S.  
Distribution of AMPA receptors involved in presynaptic inhibition at cerebellar GABA synapses. Society for Neuroscience, 32nd Annual Meeting, Orlando, Nov, 2002.
20. Murakoshi T, Saitow F. Song S.-Y. Suzuki H. Konishi S.  
Stimulation-induced slow oscillation in inhibitory network of the rat amygdala and its tachykinergic modulation. Society for Neuroscience, 32nd Annual Meeting, New Orleans, Nov, 2003.
21. Saitow F. Murakoshi T., Suzuki H., Konishi S.  
Purinerger receptor-mediated enhancement of GABAergic transmission in the cerebellar cortex Society for Neuroscience, 32nd Annual Meeting, New Orleans, Nov, 2003.
22. Satake S., Konishi S.  
Effects of roscovitine, a cyclin-dependent kinase 5 inhibitor, on neurotransmissions in the cerebellar cortex. 6th IBRO World Congress of Neuroscience, Prague, July, 2003
23. Satake S., Imoto K., Konishi S.  
Effects of a cdk5 inhibitor, roscovitine, on synaptic transmission in the cerebellar cortex  
74 Japanese Zoology Meeting, Oct. 2003

③ プレス発表

なし

(3) 特許出願（国内 1件、海外 0件）

① 国内

小西史朗・科学技術振興機構・三菱化学生命科学研究所「非ヒト遺伝子改変動物  
およびその利用」特願2002-151457・2002年5月24日 特開2003-204796・2003年7  
月22日

② 海外

なし

(4) 新聞報道等

なし

(5) その他特記事項

なし



## 7. 結 び

本研究推進事業の研究資金提供を受ける機会に恵まれ、5年間の研究を展開できたことは大きな幸運であった。従来から小規模に実施してきた仕事を拡大し、さらには新たな研究手法や機器などを導入して新分野へ研究を展開することができたので、その成果には研究代表者の力量不足による不足や反省点があるものの、今後のさらなる展開が期待できる萌芽を多く見出せたと判断し、ある程度は満足している。とくに、これまで得意としている分野での成果予測はある程度目算が立ち、期待を十分に満たすには不足であったが、幾つかの顕著な新しい事実を見出すことができたとして自己評価している。しかし、経験の浅い研究領域ではこの点の予測が困難であり、達成度に不満が残った点は今後の教訓としたい。

有期限の研究プロジェクトで最終成果へまで結実させることの困難を痛感した。この点における不足が、最大の反省である。しかしプロジェクト期間に探索を開始して有望な種が幾つか見出されてきているので、これらを具体的な成果へ展開するには、3年程度の期間延長をより広く許容することを本事業に制度化できれば、最終成果は今より格段に拡大するものと想像される。

若手研究者や大学院学生も参画でき支援されることは、本プロジェクトの大きな長所と思われた。また予算の運用についても自由度が大きく好都合であった。しかし、時々には杓子定規の制約や官僚的体質に由来すると思われる窮屈感をもつことがあったが、このような不満は瑣末な点である。全体的には極めて満足して5年間の研究活動が続けることができましたことは、もっぱら関係各位のご尽力よるところであり、この場をかりて深甚の謝意を記します。