

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 抑制性シナプス可塑性の分子機構の解明

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名

研究代表者： 小西 史朗（三菱化学生命科学研究所 室長）

主たる研究参加者： 吉岡 耕一（東京医科歯科大学・医学部 助教授）

鈴木 秀典（日本医科大学・医学部 教授）

3. 研究内容及び成果：

研究は、GABA 作動性抑制性シナプスの制御機構に関する電気生理学的解析と、GABA_A 受容体サブユニットの配送及び、恐怖条件付けによって扁桃体に発現する分子の解析に大別される。

抑制性シナプスの制御はラット小脳において検討し、3種の新たな調節機構の存在することを見いだした。第一は、モノアミン（セロトニン、ノルアドレナリン）作動性線維の刺戟による、バスケット細胞(BC)とプルキンエ細胞(PC)間のGABAシナプス伝達効率の増強である。この効果はシナプス前機構に依存し、ノルアドレナリン(NA)の場合は β_2 レセプターの活性化を媒介とする。その結果、cAMPが上昇し、I_hチャンネルが活性化されBC終末端の脱分極によりGABA放出が促進されると同時に、protein kinase A(PKA)カスケードを刺戟してGABA放出が増強されることが示された。

第二のシナプス制御として見いだされたのは、PCのAMPA型グルタミン酸受容体に対する入力線維のシグナルによるBC/PCGABAシナプス伝達効率の減弱である。この効果は、climbing fiber(CF; 登上線維)から放出されるグルタミン酸がBC終末端のAMPAレセプターを介してGABA放出を抑制する機構に依存する。このAMPAレセプターは単に、ionotropic 応答を示すだけでなく、G_i、G_oタイプのGタンパクを介するmetabotropic経路をも共有していると考えられる結果が得られた。この特殊なAMPA型レセプターの活性化はBC終末端のCa²⁺チャンネルを阻害することが局所のCa²⁺シグナル記録によって示された。さらに、BC終末端のAMPAレセプターの存在は、GAD(glutamate decarboxylase)ノックアウトマウスにGFP-linkedGADをノックインすることによってラベルしたBCとAMPAレセプターの免疫組織化学染色の併用によって確認した。

第三のシナプス制御は、parallel fiber(PF; 平行線維)によってPCに形成される興奮性シナプスに見いだされたもので、このシナプス周辺部にはGABA_BレセプターとmGluR1受容体が近接して存在する。ここでは、近傍の細胞から放出されたGABAがGABA_Bレセプターを活性化し、このレセプターの活性化により、PF-PCのmGluR1の興奮性シナプス伝達を促進することを見いだした。現在、GABAによる、GABA_BレセプターとmGluR1レセプターのcross-talkに寄与する分子機構を検討中である。

GABA_A受容体の配送機構の解析は、未開発の分野で、これまでの興奮性シナプスにおける解析を参考として実施した。Yeast-two-hybrid法を用い、receptor subunitsの細胞内ド

メインを検索系としてマウス脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。これによって得た陽性クローンの中から、dynein と snapin に注目して解析した。この両者は共に、GABA_A 受容体と結合し、その結合部位を特定して、アミノ酸配列に基づき相互作用を阻害する抑制ペプチドの合成に成功した。PC の脱分極に伴い mIPSCs の発生頻度と大きさは増加したが、この効果は snapin 結合抑制ペプチドにより低下した。したがって、snapin はシナプス直下への GABA 配送を制御していることが示唆された。dynein の効果は現在、検討中である。

情動・不安の神経機構には扁桃体が関与することが示唆されている。この機構の解析のために、ラットに恐怖条件付け(fear conditioning) を与え、プロテオーム分析（二次元電気泳動法とマススペクトル法の併用）と差分 cDNA クローニングを実施した。恐怖条件付けを与えたラットの扁桃体では、35種類のタンパク質の発現量が増加していることがプロテオーム分析により見いだされた。これらの分子にはシナプスに関連するタンパク質も含まれていた。また、差分クローニングでは、細胞内タンパク輸送を仲介する VPS16 のホモログが同定され、扁桃体のこの遺伝子の発現は恐怖条件付けにより増加した。現在、VPS16 の機能を解析するために、そのノックアウト動物を作成中である。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

小脳の GABA 作動性抑制シナプスにおいて3種類の新規の制御機構が存在するという結果はユニークな発見である。これらの機構の発見は綿密な電気生理学的解析に基づいている。モノアミン作動性線維による BC、PC 間の GABA 伝達効率の上昇は、ノルアドレナリン(NA)と同様に、セロトニン(5HT)によっても効果が見られるが、5HT の作用は解析されなかった。NA と 5HT の効果は異なった機構に依存していることを示唆する結果が得られているので、5HT の作用の検討によって新たな制御機構を発見する可能性が残されている。また、これらの制御機構の解析において、モノアミン受容体の分布部位の同定が実施されていない。さらに、PF 線維刺激による制御では GABA_B レセプターと mGluR1 レセプターの cross-talk が key issue であるにも拘わらず、その機構はまだ不明である。詳細に関しては、このように重要な解析が残されているが、これらのシナプス制御機構に関する一連の研究は極めて順調に進んだ成果と高く評価できる。但し、中間評価以降では進展がやや遅いという批判も寄せられた。

GABA_A 受容体の配送機構と恐怖条件付けによる分子動態の可塑的変化に関する研究は、シナプス制御機構の研究と比較して明らかに遅れている。しかし、今回、dynein、snapin、VPS16 などの関連分子候補が具体的に示唆されたことは大きな進展である。ただ、現段階では、これらの候補分子が、事実、研究対象としている機構に密接に関与しているか否かの証明は得られていない。したがって、この研究に関して得られた成果が目標達成にどの程度近づいているかを判定することは困難である。今後、この研究の続行には明確な計画プログラムが必要と思われる。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

本研究グループは脳機能の電気生理的解析と分子生物的解析を実施してきた。電気生理的アプローチにおける目標は、中枢の抑制性シナプスの解析であり、この線に沿った研究は、初年度から順調に進行し、究極的に、3種類の新規のシナプス制御機構の発見という成果を挙げた。分子生物的アプローチにおける目標は、扁桃体の情動記憶とGABA受容体の配送機構に関する研究であるが、これらの研究における成果には目覚しい進展は見られなかった。抑制シナプス機構の解析において得られた成果は高く評価できるが、情動記憶とGABA受容体に関する研究では検討すべき問題点自身も明確でなく、今後、十分な再計画が必要と思われる。

4-3. その他の特記事項（受賞歴など）

なし