

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19700350
 研究課題名（和文）：拡散を介した小脳異種シナプス抑制においてペリシナプス性制御機構が担う役割
 研究課題名（英文）：Role of perisynaptic control mechanisms in transmitter diffusion-mediated heterosynaptic inhibition in the cerebellar cortex
 研究代表者：
 佐竹 伸一郎（SATAKE SHIN'ICHIRO）
 生理学研究所・生体情報研究系・助教
 研究者番号：30360340

研究成果の概要：脳幹の下オリーブ核から小脳への登上線維から放出された興奮性神経伝達物質（グルタミン酸と推定）は、シナプス外に拡散して介在ニューロンの AMPA 型グルタミン酸受容体を活性化することにより、介在ニューロン-プルキンエ細胞間 GABA 作動性伝達にシナプス前抑制を引き起こすことを報告した。本研究では、スライスパッチクランプ法と免疫組織染色法を組み合わせ、拡散を介した小脳異種シナプス抑制においてグルタミン酸輸送体が担う役割について検討した。その過程で、①ニューロン型輸送体 EAAT4 とグリア型輸送体 GLAST は、登上線維伝達物質がシナプス間隙から介在ニューロンの軸索終末に拡散していく過程をそれぞれ独立に制御できること、ならびに②異種シナプス抑制には、プルキンエ細胞のグルタミン酸輸送体発現量や輸送機能の変化（長期増強）に依存した逆行性制御メカニズムが存在することを示唆する結果を得た。グルタミン酸輸送体は、神経伝達物質の拡散動態に影響をおよぼすことにより、シナプス可塑性制御因子として機能すると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：プルキンエ細胞、バークマングリア、介在ニューロン、登上線維、
 グルタミン酸輸送体、免疫組織化学、スライスパッチクランプ法、長期増強

1. 研究開始当初の背景

中枢神経ネットワークにおいて、神経情報は、化学シナプスを介して、シナプス前細胞からシナプス後細胞への順行性のみならず、拡散性（シナプス間隙から細胞外領域への漏

出）や逆行性にも伝達される可能性が指摘されている。これまでに、脳幹の下オリーブ核から小脳への登上線維（climbing fiber, CF）からシナプス間隙外に拡散した興奮性神経伝達物質（グルタミン酸と推定）が、分子層

介在ニューロン（籠細胞、basket cell） - プルキンエ細胞（Purkinje cell）間の GABA 作動性シナプス伝達を抑制することを発見し、この GABA 伝達抑制が AMPA 型グルタミン酸受容体で仲介されるシナプス前抑制の様式で惹起されることを報告した（Satake et al., *Nat. Neurosci.* 3, 551–558. 2000.）（図 1）。引き続き、登上線維伝達物質が拡散性にシナプス前抑制を引き起こすメカニズムの解明に取り組み、グルタミン酸輸送体阻害薬（*threo*- β -benzyloxyaspartic acid, TBOA）が異種シナプス間拡散性クロストークを顕著に増強することを見出した（Satake et al., *J. Neurosci.* 26, 2278–2289. 2006.）。こうした背景に基づき、『拡散というユニークな神経伝達経路』に、ペリシナプス構成要素 [グリア細胞によるシナプス被覆、伝達物質回収機構（輸送体）など] を積極的な制御因子として組み込むことにより、新たな視点から脳の情報処理機構を理解できるのではないかと考えた。

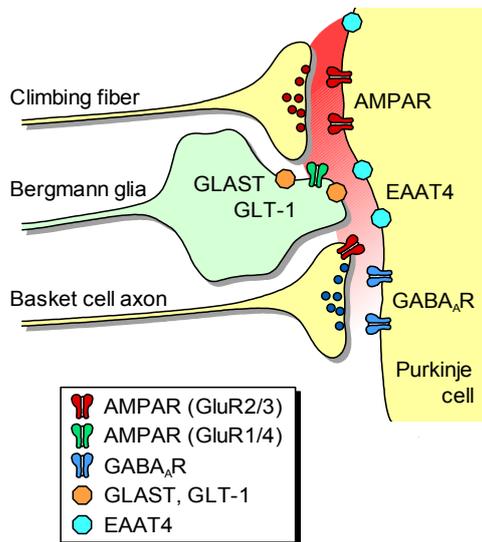


図 1：神経伝達物質の拡散を介した小脳異種シナプス間クロストーク。登上線維から放出されたグルタミン酸は、プルキンエ細胞を強く興奮させると同時に、シナプス間隙から拡散して介在ニューロン軸索終末の AMPA 型グルタミン酸受容体 (GluR2/3) を活性化することにより、介在ニューロンの GABA 放出を抑制する（即ち、脱抑制）。細胞外のグルタミン酸濃度は、バグマンングリアやプルキンエ細胞に発現するグルタミン酸輸送体 (EAAT4/GLAST/GLT-1) によって厳密にコントロールされている。

2. 研究の目的

登上線維と介在ニューロンの間で観察される拡散性クロストークはグルタミン酸回収機構によって常に阻害されているものの、反復刺激に伴い大量に放出された登上線維

伝達物質は、回収機構の能力を超えて AMPA 受容体を活性化できると考えている（Satake et al., 2006）。本研究は、①拡散性伝達物質供給源としての登上線維 - プルキンエ細胞シナプス、②抑制対象としての介在ニューロン - プルキンエ細胞シナプス、そして③各領域を密に被覆するグリア細胞（Bergmann glia）の動的変化が、異種シナプス間拡散性クロストークに影響する可能性について検討することを目的とした。特に、ニューロンやグリア細胞に存在するグルタミン酸輸送体が、発現量や輸送機能の変化に伴い、登上線維伝達物質の拡散動態におよぼす影響について解析を行った（図 1 参照）。

3. 研究の方法

スライスパッチクランプ法と免疫組織染色法を組み合わせ、拡散を介した小脳異種シナプス抑制においてグルタミン酸輸送体が担う役割を検討した。

（1）異種シナプス抑制におけるグルタミン酸輸送体の役割の検索：ニューロン型とグリア型の比較

ニューロン型輸送体 (EAAT4) とグリア型輸送体 (GLAST/GLT-1) が伝達物質拡散過程において担う役割を識別するため、サブタイプ選択的なグルタミン酸輸送体阻害薬が異種シナプス抑制におよぼす影響を観察した。なお、異種シナプス抑制は、登上線維を 5 Hz で 1 秒間条件刺激すること（固定）により誘発した。

（2）グルタミン酸輸送体タンパク質発現量と異種シナプス抑制の相関性の検討

異種シナプス抑制には、EAAT4 発現量に依存した領域特異性があると推定している。電気生理学的手法に二重免疫蛍光染色を組み合わせ、グルタミン酸輸送体発現量と異種シナプス抑制の関連性について検討した。

（3）ニューロン型グルタミン酸輸送体の機能変化が異種シナプス抑制におよぼす影響の観察

登上線維 - プルキンエ細胞間シナプスにおいて記録されるグルタミン酸輸送体電流は、登上線維の活動に依存した様式で長期増強を示すと報告された（Shen and Linden, *Neuron* 46, 715–722. 2005.）。プルキンエ細胞で誘発したグルタミン酸輸送体長期増強が、異種シナプス抑制におよぼす影響を観察した。発現量や回収機能の変化が伝達物質の拡散過程におよぼす影響を解析することにより、ニューロン型グルタミン酸輸送体がシナプス可塑性制御因子として機能する分子的基盤を明らかにしようと試みた。

4. 研究成果

(1) ニューロン型輸送体とグリア型輸送体の比較：サブタイプ別機能検索

ニューロンとグリア細胞では、異なるサブタイプのグルタミン酸輸送体が機能している（例えば、EAAT4 はプルキンエ細胞特異的に発現し、GLAST と GLT-1 はバークマングリアに発現する）。伝達物質の拡散過程における各輸送体サブタイプの役割を検討するため、サブタイプ選択的阻害薬が登上線維刺激に伴う異種シナプス抑制におよぼす影響を観察した（図2）。EAAT4/GLT-1 阻害薬 *threo*-3-methylglutamic acid (T3MG, $IC_{50} \sim 100 \mu\text{M}$) は、低濃度 (30 μM) で異種シナプス抑制を増強した。GLAST/GLT-1 阻害薬 (2*S*,3*S*)-3-[3-(4-methoxybenzoylamino)benzyloxy]aspartic acid (PMB-TBOA) も同様に、極めて低い濃度 (0.1 μM) で異種シナプス抑制を増強した。しかし、GLT-1 阻害薬 dihydrokainic acid (DHK, $IC_{50} \sim 20 \mu\text{M}$) は、高濃度 (300 μM) で投与しても異種シナプス抑制に無効であった ($P > 0.99$)。こうした結果に基づき、ニューロン型輸送体 EAAT4 とグリア型輸送体 GLAST は、登上線維伝達物質がシナプス間隙から介在ニューロン終末に拡散していく過程をそれぞれ独立に制御できると結論した（図1参照）。

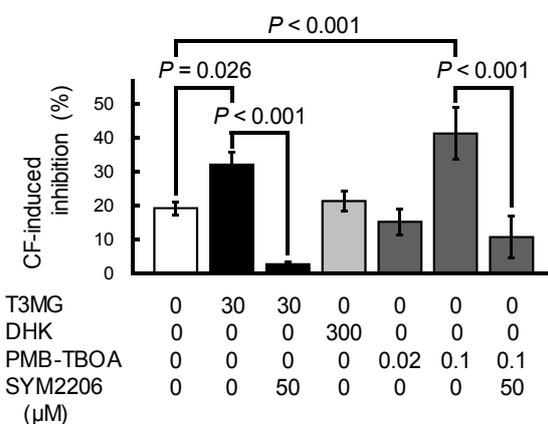


図2：グルタミン酸輸送体阻害薬 (T3MG, DHK, PMB-TBOA) が登上線維刺激に伴う GABA シナプス抑制におよぼす影響（登上線維の条件刺激は 5 Hz で 1 秒間に固定）。異種シナプス抑制は AMPA 受容体阻害薬 (SYM2206) によって強く阻害された。

(2) EAAT4 発現量と異種シナプス抑制の相関性

EAAT4 タンパク質は、zebrin-II (aldolase C) タンパク質と重複した様式でプルキンエ細胞に発現しており、小脳矢状断方向に明瞭な帯状分布パターン（即ち、zebrin band）を示す (Dehnes et al., *J. Neurosci.* 18,

3606–3619. 1998. 参照)。この性質を利用して EAAT4 発現量と異種シナプス抑制の相関性について検討を行い、異種シナプス抑制は EAAT4 発現が低い領域（第 III 小葉）では容易に誘発できるが、高発現領域（第 X 小葉）では誘発されないことを見出した。拡散を介した異種シナプス抑制には、EAAT4 発現量に依存した領域特異性があると推定した (Wadiche and Jahr, *Nat. Neurosci.* 8, 1329–1334. 2005. も参照のこと)。

EAAT4 発現量と異種シナプス抑制の関係性を詳しく検討するため、パッチクランプ記録に二重免疫組織染色を組み合わせた二段階の実験を実施した [①登上線維刺激に伴う異種シナプス抑制を無作為に記録した後、②記録に供したプルキンエ細胞（記録電極から biocytin を導入して同定）の EAAT4 免疫蛍光シグナルを共焦点レーザー顕微鏡により観察]。異種シナプス抑制は、EAAT4 低発現細胞でのみ誘発され、高発現細胞では誘発されなかった（図3）。小脳異種シナプス抑制には、プルキンエ細胞の EAAT4 発現量に依存した『逆行性伝達物質を介することなく機能する逆行性制御機構』が存在すると考えられる。

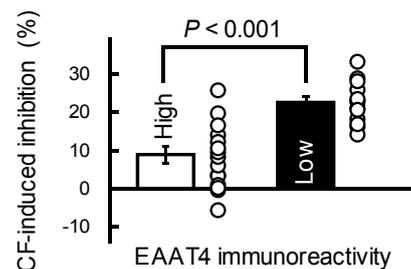


図3：プルキンエ細胞の EAAT4 発現量（免疫蛍光シグナル強度）と登上線維刺激に伴う GABA シナプス抑制の相関性（登上線維の条件刺激は 5 Hz で 1 秒間に固定）。

(3) ニューロン型グルタミン酸輸送体の長期増強が異種シナプス抑制におよぼす影響

上記の通り、小脳異種シナプス抑制には、プルキンエ細胞に発現するグルタミン酸輸送体に依存した逆行性制御機構が存在すると推定される。ニューロン型輸送体による逆行性制御の関与を更に追究するため、プルキンエ細胞で誘発したグルタミン酸輸送体増強が異種シナプス抑制におよぼす影響を観察した。登上線維の反復刺激 (5 Hz, 30秒) に伴い、プルキンエ細胞において①AMPA受容体電流の長期抑圧と②グルタミン酸輸送体電流 (synaptic transporter current, STC) の長期増強が同時に惹起された (Shen and Linden, 2005)。一方、異種シナプス抑制は、

AMPA電流抑圧（即ち、輸送体増強）に伴い顕著に減弱した（図4左）。しかし、AMPA灌流投与（0.5 μM）により誘発したGABA伝達抑制には、STC長期増強の確立前後で有意な変化は認められなかった（図4右）。

こうした結果は、グルタミン酸輸送体が、①細胞外のグルタミン酸を速やかに回収してニューロンを余剰グルタミン酸による神経毒性から防御する役割のみならず、②シナプス活動に依存して回収機能を変化させることにより、グルタミン酸の拡散動態に影響をおよぼすシナプス可塑性制御因子としての役割も担っていることを強く示唆している（図1参照）。

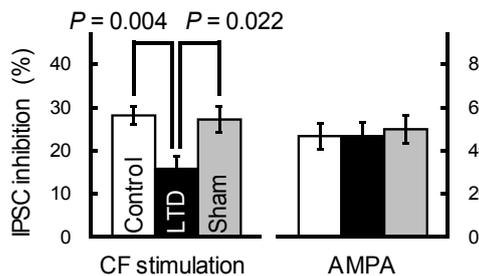


図4：登上線維 - プルキンエ細胞間 EPSC 長期抑圧（STC 長期増強）が、登上線維刺激（5 Hz、1 秒）および AMPA 灌流投与（0.5 μM、5 分）に伴う GABA シナプス抑制におよぼす影響。

（4）エタノールの小脳異種シナプス抑制阻害作用

登上線維刺激に伴う GABA シナプス抑制は、エタノールにより用量依存的（25～100 mM）に阻害されることを発見した。エタノール（50 mM）は、登上線維のシナプス小胞放出確率ならびに放出多重性に有意な影響をおよぼさなかった。また、AMPA 灌流投与に伴う介在ニューロンの GABA 放出抑制にも無効であった。したがって、エタノールの異種シナプス抑制阻害作用は、登上線維の伝達物質放出過程や前シナプス性 AMPA 受容体の阻害などではなく、登上線維伝達物質がシナプス間隙から介在ニューロン終末に拡散していく過程の阻害により惹起されたと考えることができる。こうした作業仮説に基づき、エタノールがグルタミン酸輸送体におよぼす影響などについて引き続き検討を進めている。

（5）結果の考察ならびに今後の展望

本研究では、スライスパッチクランプ法と免疫組織染色法を組み合わせて、拡散を介した小脳異種シナプス抑制においてグルタミン酸輸送体が担う役割について検討した。その過程で、①ニューロン型輸送体 EAAT4 と

グリア型輸送体 GLAST は、登上線維伝達物質がシナプス間隙から介在ニューロン（籠細胞）の軸索終末に拡散していくプロセスをそれぞれ独立に制御できること、ならびに②異種シナプス抑制には、プルキンエ細胞の EAAT4 発現量や輸送機能の変化（長期増強）に依存した逆行性制御機構が存在することを示唆する結果を得た（図1参照）。ニューロン型グルタミン酸輸送体は、余剰グルタミン酸を回収して細胞外グルタミン酸濃度を低く維持するのみならず、伝達物質の拡散動態に影響をおよぼすことにより、シナプス可塑性制御因子としても機能すると考えられる。

下オリブ核（登上線維） - 小脳皮質（プルキンエ細胞） - 小脳核の神経回路は、aldolase C/zebrin-II 発現パターン（即ち、EAAT4/異種シナプス抑制発現パターン）と一致した様式で、入出力経路が形態的に分離（区画化）されている（Sugihara and Shinoda, *J. Neurosci.* 24, 8771–8785. 2004.; Pijpers et al., *J. Comp. Neurol.* 492, 193–213. 2005.）。本研究により明らかになった、ニューロン型グルタミン酸輸送体のシナプス可塑性制御機能は、こうした形態的に分離された神経回路パターンと発現タンパク質（EAAT4）の特異的関係が、小脳における入力依存性情報処理を担う分子的基盤であることを強く予想させる。EAAT4/zebrin-II 低発現領域のプルキンエ細胞が脳虚血に伴う神経毒性に脆弱であること（Welsh et al., *Adv. Neurol.* 89, 331–359. 2002.）を考え合わせると、小脳の形態的区画化に込められた生理的意義の解明は、病理的な観点からも今後の重要な課題であろう。

プルキンエ細胞のグルタミン酸輸送体長期増強は、登上線維の反復刺激（5 Hz、30 秒間）により誘発される。しかし、下オリブ核ニューロン（登上線維）において、これまでこうした高頻度長期発火活動は報告されておらず、輸送体長期増強（受容体長期抑圧）は生理的な条件で惹起される現象とは考え難いのが実情である。輸送体長期増強の誘発には、登上線維伝達物質による mGluR1/protein kinase C カスケードの活性化が必須であるとされている（Shen and Linden, 2005）。一方、プルキンエ細胞の代謝型グルタミン受容体 mGluR1 の機能は、GABA_B 受容体により複数の過程で正の制御を受ける（Hirono et al., *Nat. Neurosci.* 4, 1207–1216. 2001.; Tabata et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 16952–16957. 2004.）。したがって、mGluR1 と GABA_B 受容体が同時に活性化されるような条件を整えば、輸送体長期増強誘発の閾値が下がる可能性を指摘することができる（即ち、生理的な登上線維活動でも長期増強が誘発される可能性）。

長期増強誘発閾値以下の登上線維刺激と GABA 作動性ニューロン刺激を組み合わせると輸送体長期増強が誘発されるか否かを観察することにより、細胞内（細胞外）シグナル機構とグルタミン酸輸送体可塑性発現メカニズムの関係を明確にできるのではないかと考えている。今後、取り組みたい課題の一つである。

ニューロン型グルタミン酸輸送体は、グルタミン酸輸送と共役しない陰イオンチャネルとしての機能も有している。また、EAAT4 サブタイプは、細胞外グルタミン酸濃度と細胞電位に依存した様式で、陰イオンチャネルから陽イオンチャネルに機能を変換する (Melzer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 19214–19218, 2005.)。こうした特徴から、登上線維刺激に伴う異種シナプス抑制が EAAT4 チャネル透過イオンの“陰→陽変換”と結びつくことにより、プルキンエ細胞のアウトプットを強化する作用が現れるのではないかと予想される。現在、グルタミン酸輸送体がイオンチャネルとして担う役割について検討する準備を進めている。

プルキンエ細胞は小脳皮質で唯一の出力ニューロンであることから、グルタミン酸輸送体が登上線維と介在ニューロン間で起こる拡散性クロストークを支配する分子的基盤を解明することは、小脳の情報処理機構を分子レベルで理解することにも繋がると期待できる。こうした作業仮説に基づき、中枢神経ネットワークの情報処理過程において神経伝達物質輸送体が担う普遍的役割や、その生物学的意義を総括的に理解することを長期目標に据えて研究を継続したいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計5件)

- ① 佐竹 伸一郎、井本 敬二「ラット小脳顆粒細胞のシナプス小胞放出におけるカルシウムチャネルサブタイプ依存性」(社)日本動物学会第 79 回大会、2008 年 9 月 7 日、福岡
- ② 佐竹 伸一郎、井本 敬二「シナプス小胞放出過程(確率・多重性・時機)のカルシウムチャネルサブタイプ別制御」*Neuroscience 2008* (第 31 回日本神経科学大会)、2008 年 7 月 9 日、東京
- ③ 佐竹 伸一郎「神経伝達物質の拡散により仲介される異種シナプス間クロストーク」分子科学研究所研究会『分子情報通

信 (Molecular communication) のサイエンス基盤』、2007 年 9 月 29 日、岡崎

- ④ 佐竹 伸一郎、井本 敬二「ラット小脳介在ニューロンから記録される顆粒細胞由来興奮性シナプス後電流の性質」(社)日本動物学会第 78 回大会、2007 年 9 月 20 日、弘前
- ⑤ 佐竹 伸一郎、井本 敬二「ラット小脳顆粒細胞 - 介在ニューロン間興奮性シナプス伝達の性質」*Neuro2007* (第 30 回日本神経科学大会・第 50 回日本神経化学学会大会・第 17 回日本神経回路学会大会合同学会)、2007 年 9 月 11 日、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐竹 伸一郎 (SATAKE SHIN'ICHIRO)
生理学研究所・生体情報研究系・助教
研究者番号：30360340