

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19390055

研究課題名（和文）抑制性伝達物質スイッチングの機能的意義の解明

研究課題名（英文）Functional implication of transmitter switching of inhibitory Circuits.

研究代表者

鍋倉 淳一（NABEKURA JUNICHI）

生理学研究所・発達生理学研究室・教授

研究者番号：50237583

研究成果の概要：

聴覚中継路である内側台形体核（NMTB）から外側上オリブ核（LSO）への入力は発達とともにGABAからグリシンへスイッチする。今回、この伝達物質自体のスイッチングの生理学的意義を解明するために、未熟期におけるGABA受容体の回路機能発達に対する役割を検討した。未熟期には神経終末から放出されるGABAによって終末に存在するGABA受容体が活性化されるが、発達とともにLSO核からGABA受容体の発現が消失した。GABA受容体ノックアウト動物も用いて未熟期のみ発現するGABA受容体の意義の解明を行った。生後3週目のGABAノックアウトマウスにおいては、NMTB LSOシナプスにおいて、細胞間に入力様式のばらつきが確認された。この原因はノックアウトマウスではシナプス小胞の伝達放出効率のばらつきに起因することが示唆された。この結果から、幼若期にGABAである生理的な意義として、GABAによるGABA受容体の活性化、これによる長期的な抑制性伝達回路の入力の細胞間の均一化に寄与していることが示唆される。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2008年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
年度			
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：GABA, スイッチング, GABA受容体

## 1. 研究開始当初の背景

脳の発達の最終段階において神経回路の再編成が観察される。これは既に機能している神経回路の変化であるため、しばしば感覚、行動、

リズムなどの脳機能の発達に伴う大きな変化として表現される。発達期における神経回路機能の可塑的变化に関する研究は、その殆どが中枢神経系におけるグルタミン酸作動性、末梢にお

けるアセチルコリン作動性に代表させる興奮性シナプスにおいて行われてきた。しかし、脳において半数近くをしめる抑制性回路の発達期における remodeling については、多くの抑制性回路が介在ニューロンで形成されているため、回路が複雑で選択的な活動制御が困難であるため、興奮性に比較し報告は非常に少ない。また、GABA やグリシンの放出によってシナプス後細胞の活動を抑制すると考えられてきたため、抑制性回路可塑性に関しては興奮性回路における可塑性の論理は受け入れにくく、抑制性回路の発達再編成の形、およびそのメカニズムについて未解決な部分が多い。

成熟期外側上オリーブ核 (LSO) 細胞は同側および対側耳からの音情報をそれぞれグルタミン酸入力およびグリシン入力としてうけており、生体において、抑制性回路活動を選択的にコントロールすることができる。そのため、近年、抑制性回路の remodeling の研究の最適モデル回路として注目されている (Kandler Nature Neurosci 2005、申請者 J, Neurosci, 1999, Nature Neurosci 2004 など)。

近年、申請者は LSO への抑制性 (GABA/グリシン) シナプスの発達再編成において、未熟 LSO への主な入力が GABA 作動性であり生後 2 週間でグリシン作動性へスイッチすることを見出した。そのメカニズムが、興奮性回路での一般的に起こる余剰神経終末の除去 (synapse elimination) とは異なり、同一終末内の伝達物質が GABA から GABA+グリシンの co-release の時期を経てグリシンへ単一終末内でスイッチすることを報告した。(Nature Neurosci 2004)。発達期におけるシナプス機能の再編成のなかで、伝達物質のスイッチングは末梢で汗腺に入力する交感神経においてのみ報告があるが (Landis, 1988) が、中枢神経系では報告がなく、伝達物質自体の変化という新しい概念の発達期における中枢神経回路の可塑的变化と考えられる。

## 2. 研究の目的

本申請では、LSO から NMTB への抑制性回路の伝達物質が GABA からグリシンにスイッチするという結果を受けて、未熟期における主要伝達物質 GABA が、なぜ同様に Cl<sup>-</sup>チャンネル (GABA-A 受容体とグリシン受容体) を活性化するグリシンへスイッチするのか、なぜ、未熟期には GABA を情報をする回路が必要なのか、その意義について GABA とグリシンの作用の相違をもとに考察する。特に、GABA のみに存在する代謝型受容体 (GABA B 受容体) の発達変化による伝達物質 GABA グリシン発達期スイッチへの関連について検討する。

現在までの予備実験により、GABA-B 受容体が未熟期の LSO には強く発現しているが、その発現は伝達物質が GABA からグリシンへスイッチする時期と一致して、発達とともに消失するという結果が得られた。さらに、GABA B 受容体ノックアウトマウスにおいて、幼若期の機能を有する入力が存在するという予備実験結果を得ている。さらに、未熟期には抑制性入力の低頻度刺激により、シナプス後膜 GABA-B 受容体を介する抑制性 (GABA/グリシン) 入力応答の長期抑圧 (LTD) の存在が報告され (Sanes et al 2002)、発達期における GABA B 受容体が神経回路機能発達可塑性に強く関与している可能性が示唆される。

本申請では、未熟期のみ GABA が伝達物質として使われ、その後グリシンへスイッチする機能的な意義の解明を目的として、1) 幼若期における GABA の役割、特に GABA B 受容体のシナプス可塑性、特に、シナプス機能発達への関与、2) この回路におこる抑制性シナプスの除去 (synapse elimination) に対する役割の解明 3) 幼若期の GABA 放出 GABA-B 受容体を介する GABA-A 受容体の抑制 放出される GABA の fast transmitter としての無力化 グリシンへのスイッチングという無力化した終末機能の除去

の仮説(興奮性回路における回路再編と類似のメカニズム(申請者、Science 1997))が成り立つのか検証する。

### 3. 研究の方法

NMTBからLSOの回路では生後2週間までに一旦形成された余剰な幼若回路の除去(synapse elimination)が観察される(Sanes et al 1996)。GABA-B受容体ノックアウトでは、成熟後にも機能的未熟入力が存在することから、未熟期に一旦作られた未熟回路の除去が障害されている可能性について、以下の2つの方法で検討を行う。

(1)GABA-B受容体発現/機能の発達変化(減少)の検索。

(2)GABA-B受容体ノックアウトマウスにおける抑制性回路発達の解析、を免疫組織法および電気生理学的手法を用いる。

### 4. 研究成果

発達期の脳では、神経回路の再編成が起こり成熟回路が形成されていく。この過程で神経伝達物質受容体は活動依存的な役割を持つと考えられている。しかしこれらの分子は通常成熟後も発現・機能しているため、発達期に限定した機能を検討することは難しい。聴覚中継路核である外側上オリーブ核(LSO)は同側耳からの音情報をグルタミン酸作動性入力として、対側耳からの音情報を内側台形体核(MNTB)を介するGABA/グリシン作動性として受ける。後者は、GABA作動性からグリシン作動性に発達スイッチすることから、発達期における代謝型GABA-B受容体の機能的意義を解析できると予想される。

そこで先ずLSO入力の代謝型GABA-B受容体の発達変化について検討した。NMTBの頻回刺激によりLSOの抑制性後シナプス電流(IPSC)は減弱し、この減弱はGABA-B受容体アンタゴ

ニストによって有意に低下した。これは、幼若期では内因性GABAにより神経終末GABA-B受容体が活性化されることを示す。GABA-B受容体アゴニスト(baclofen)投与により、IPSCの大きさはP5までは顕著に抑制されたが、その効果はP16以降では消失した。一方、MNTBのGABA-B受容体R1サブユニットの発現はP2で高く、その後発達減少することがin situ hybridization法を用いた実験で示された。

以上の基礎的データを踏まえて、GABA-B受容体R1サブユニットノックアウトマウス(KOマウス)の解析を行った。その結果、P2-3ではWTマウスでも観察されるNMTBの頻回刺激によるIPSC減弱のばらつきがP14-18においても残存していることが示された。シナプスでの放出のキネティックを詳細に解析したところ、KOマウスではWTマウスと比較して、随時放出可能な神経終末小胞プール(Readily releasable pool: RRP)が大きく、放出確率(release probability: PP)は有意に小さい、またPPのばらつきが大きかった。

以上の結果から、幼若期におけるGABA伝達の生理学的意義として、GABA放出によるGABA-B受容体の活性化を介してNMTB-LSO入力の細胞間の機能的な均一化を引き起こしている可能性が示唆された。

### 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)

[雑誌論文](計12件)

Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J (2009) Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* 29:3974-3980. (査読有)

Ishibashi H, Hirao K, Yamaguchi J, Nabekura

J (2009) Inhibition of chloride outward transport by gadolinium in cultured rat spinal cord. *Neurotoxicology* 30: 155-159. (査読有)

Kitamura A, Ishibashi H, Watanabe M, Takatsuru Y, Brodwick M, Nabekura J (2008) Sustained depolarizing shift of the GABA reversal potential by glutamate receptor activation in hippocampal neurons. *Neurosci Res* 62: 270-277. (査読有)

Iohara K, Zheng L, Wake H, Ito M, Nabekura J, Wakita H, Nakamura H, Into T, Matsushita K, Nakashima M (2008) A Novel Stem Cell Source for Vasculogenesis in Ischemia: Subfraction of Side Population Cells from Dental Pulp. *Stem Cell* 26: 2408-2418. (査読有)

Eto K, Arimura Y, Nabekura J, Noda M, Ishibashi H (2007) The effect of zinc on glycinergic inhibitory postsynaptic currents in rat spinal dorsal horn neurons. *Brain Res* 1161, 11-20. (査読有)

Shimada H, Uta D, Nabekura J, Yoshimura M (2007) Involvement of Kv channel subtypes on GABA release in mechanically dissociated neurons from the rat substantia nigra. *Brain Res* 1141: 74-83. (査読有)

Nishimaki T, Jang IS, Ishibashi H, Yamaguchi J, Nabekura J (2007). Reduction of metabotropic glutamate receptor-mediated heterosynaptic inhibition of developing MNTB-LSO inhibitory synapses. *Eur J Neurosci* 26:323-330. (査読有)

Ishibashi H, Jang IS, Nabekura J (2007) High potassium-induced facilitation of glycine release from presynaptic terminals on mechanically dissociated rat spinal dorsal horn neurons in the absence of extracellular calcium. *Neuroscience*. 146:190-201. (査読有)

Munakata M, Watanabe M, Otsuki T, Nakama H, Arima K, Itoh M, Nabekura J, Iinuma K,

Tsuchiya S (2007) Altered distribution of KCC2 in cortical dysplasia in patients with intractable epilepsy. *Epilepsia*. 48:837-844, 2007. (査読有)

Kanematsu T, Fujii M, Mizokami A, Kittler JT, Nabekura J, Moss SJ, Hirata M (2007) Phospholipase C-related inactive protein is implicated in the constitutive internalization of GABA<sub>A</sub> receptors mediated by clathrin and AP2 adaptor complex. *J Neurochem* 101: 898-905. (査読有)

Mizokami A, Kanematsu T, Ishibashi H, Yamaguchi T, Tanida I, Takenaka K, Nakayama K, Fukami K, Takenawa T, Kominami E, Moss S, Yamamoto T, Nabekura J, Hirata H (2007) Phospholipase C - Related Inactive Protein is involved in Trafficking of gamma2 Subunit Containing GABAA Receptor to Cell Surface. *J Neurosci* 27:1692-1701. (査読有)

Wake H, Watanabe M, Moorhouse AJ, Kanematsu T, Horibe S, Matsukawa N, Asai K, Ojika K, Hirata M, Nabekura J (2007). Early changes in KCC2 phosphorylation in response to neuronal stress results in functional downregulation. *J Neurosci* 27:1642-1650. (査読有)

[学会発表] (計 65 件)

山口純弥, 石橋 仁, 鍋倉淳一 (2008.10.17) 抑制性伝達物質スイッチングの機能的意義の解明. 第55回中部日本生理学会(長久手町)

渡部美穂, 和氣弘明, 鍋倉淳一 (2008.7.11) カリウム-クロライド共役担体KCC2の機能発現制御. The role of tyrosine phosphorylation in regulation of neuron-specific K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter, KCC2 in mature hippocampal neurons. 第31回日本神経科学大会 (東京)

石橋 仁, 北村明彦, 渡部美穂, Brodwick M,

鍋倉淳一 (2008.7.11) グルタミン酸刺激による GABA 応答の変化. 第 31 回日本神経科学大会 (東京)

山口純弥, 石橋 仁, 鍋倉淳一 (2008.7.10) 抑制性シナプスにおける GABA / グリシンのスイッチングのメカニズム. Mechanisms underlying the switch from GABA to glycine release at inhibitory nerve terminals. 第31回日本神経科学大会 (東京)

Nishimaki T, Jang IS, Ohno K, Nabekura J (2008.3.30) Physiological role of GABA<sub>B</sub> receptor at inhibitory synapses in developing LSO neurons. The 38th Seiriken/Sokendai International Conference "Stock and flow of functional molecules in synapse" (Okazaki)

山口純弥, 石橋 仁, 鍋倉淳一 (2008.3.26) 抑制性シナプスにおける GABA / グリシンのスイッチングメカニズム. 第 85 回生理学会大会 (東京)

鍋倉淳一 (2008.3.20) 発達期および障害回復期における神経回路再編成. 自然科学研究機構シンポジウム(東京)

石橋 仁, 山口純弥, 西巻拓也, 鍋倉淳一 (2008.3.18) 抑制性シナプスにおける GABA からグリシンへのスイッチングに関する電気生理学的研究. 第 81 回日本薬理学会年会 (横浜)  
らグリシンへのスイッチングに関する電気生理学的研究. 第 81 回日本薬理学会年会 (横浜)

Kitamura A, Ishibashi H, Brodwick M, Nabekura J (2007.11.6) On the modulation of the chloride equilibrium potential following glutamate stimulation in hippocampal neurons. The 37th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (ポスター発表) (San Diego, California, USA)

石橋 仁, 張 一成, 鍋倉淳一 (2007.9.11) 高 K<sup>+</sup> による神経終末部の脱分極は細胞外 Ca<sup>2+</sup> に依存せずに神経伝達物質放出を増強

する. 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、合同大会 (Neuro 2007) (ポスター発表) (横浜)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

鍋倉 淳一 (NABEKURA JUNICHI)

生理学研究所・発達生理学研究室・教授

研究者番号:50237583

### (2)研究分担者

石橋 仁 (ISHIBASHI HITOSHI)

生理学研究所・発達生理学研究室・准教授

研究者番号:50311874

### (3)連携研究者

渡部 美穂 (WATANABE MIHO)

生理学研究所・発達生理学研究室・特任助教

研究者番号:10399321

高鶴 裕介 (TAKATSURU YUSUKE)

生理学研究所・発達生理学研究室・特別協力  
研究員

研究者番号:30446265