

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500357

研究課題名（和文） カンナビノイド依存性シナプス可塑性のメカニズム

研究課題名（英文） Mechanisms of endocannabinoid-mediated synaptic plasticity

研究代表者

少作 隆子 (OHNO-SHOSAKU TAKAKO)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：60179025

研究成果の概要（和文）：本研究では、カンナビノイド依存性シナプス可塑性の誘導に必要な、内因性カンナビノイドの持続的放出をもたらす条件について検討した。protease-activated receptor-1 (PAR1)は、その活性化によりカンナビノイドの放出を誘導しうるということが証明された。また、I型代謝型グルタミン酸受容体やM1/M3受容体の活性化によりカンナビノイドが持続的に放出される場合があるが、受容体-G_q-PLCβ までのステップの持続的活性化の関与は低いことが、明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we investigated the conditions inducing long-lasting endocannabinoid release, which is required for endocannabinoid-mediated long-term depression. We demonstrated that protease-activated receptor-1 (PAR1), which can be activated persistently by proteases, can induce endocannabinoid release when activated. We observed that the activation of group 1 metabotropic glutamate receptors or M₁/M₃ muscarinic receptors occasionally induced long-lasting endocannabinoid release, which could not be attributed to long-lasting enhancement of PLCβ.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経細胞生理学

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：ニューロン・シナプス・神経回路、シナプス可塑性

1. 研究開始当初の背景

シナプス伝達調節に関与する逆行性シグナル（シナプス後ニューロンから前ニューロンへのシグナル）の実体は長い間不明であったが、2001年に、我々および他の二つの研究グループがほぼ同時に、内因性カンナビノイドがその実体であることを明らかにし、世界の研究者の注目を集めた。その後、脳のさま

ざまな領域のさまざまなシナプスにおいて、内因性カンナビノイドが逆行性シグナルとして働いていることが次々と報告され、この機構が脳に広く見られる普遍的なものであることが明らかとなった。

その後の数年間の研究により、内因性カンナビノイドがどのような刺激により、どのような酵素反応により生成され、逆行性シグナルとして働いた後には、どのような酵素反応

により除去されるのか、の分子機構の大半が明らかとなった。これらの研究の発展には我々の研究グループも大いに貢献してきた。

内因性カンナビノイドが一過性に生成・放出され、シナプス伝達が一過性に抑圧される現象、すなわち、endocannabinoid-mediated short-term depression (eCB-STD) のメカニズムに関しては、全貌がほぼ解明されたのに対し、シナプス伝達が長期的に抑圧される現象、eCB-LTD (long-term depression) のメカニズムに関しては依然不明な点が多かった。そこで、そのメカニズムの解明をめざし、本研究を計画した。

2. 研究の目的

当初の研究計画では、シナプス後ニューロンで起こること、シナプス前終末で起こること、の両方を調べる予定であったが、シナプス前終末での分子メカニズムを報告する論文が相次いで発表 (Heifets et al. 2008, Mato et al. 2008, Yasuda et al. 2008) されたため、シナプス後ニューロンでのメカニズムに焦点を絞ることにした。

eCB-LTD の誘導にはカンナビノイド受容体 CB1 が数分間持続的に活性化される必要があることが報告されている。しかし、これまでのモデルでは、秒のオーダーの誘導刺激により CB1 受容体の活性化が数分以上持続することは説明できず、何らかの別のメカニズムを加える必要がある。そこで、本研究では、内因性カンナビノイドの持続的放出を誘導する条件、およびそのメカニズムの解明をめざした。

3. 研究の方法

実験にはラットまたはマウス (遺伝子改変マウスを含む) の培養海馬ニューロンを用い、パッチクランプ法のホール・セル記録にて、膜電流を測定した。

内因性カンナビノイドの放出は、カンナビノイド依存性の抑制性シナプス後電流 (IPSC) の振幅の変化を指標にして推定した。培養海馬ニューロンには興奮性ニューロンと抑制性ニューロンが混在している。したがって、シナプス前・後の両ニューロンを共にパッチ電極でホール・セル記録し、一方を刺激し他方より記録されるシナプス後電流には、興奮性シナプス後電流 (EPSC) と IPSC の 2 種類が混在する。また、IPSC にはカンナビノイド感受性のものと、非感受性のものがある (Fig. 1)。カンナビノイドの放出を調べる実験においては、このうちのカンナビノイド感受性 IPSC のみを用いた。カンナビ

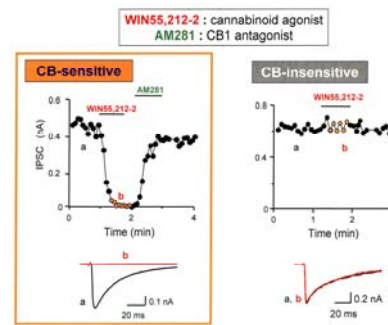


Fig. 1 IPSCのカンナビノイド感受性

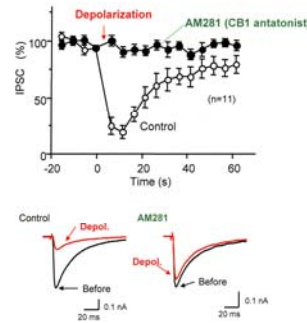


Fig. 2 DSI

ノイド感受性は、eCB-STDの1つであるDSI (depolarization-induced suppression of inhibition) の有無で判定した (Fig. 2)。

K⁺コンダクタンスの変化は、-40mVに膜電位を固定し、外向きK⁺電流の変化として測定した。

4. 研究成果

(1) PAR1を介するカンナビノイド放出

I型代謝型グルタミン酸受容体 (I-mGluR) や M1/M3 ムスカリン性受容体などの Gq 共役型受容体を刺激すると、カンナビノイドが一過性に生成・放出されることはすでに知られている。そこで、Gq 共役型であり、かつ、活性化が持続するというユニークな性質を有する protease-activated receptor-1 (PAR1) に注目し、そのカンナビノイド誘導能について調べることにした。この受容体は、細胞外に露出している N 末端ペプチド鎖がプロテアーゼにより切断されると新しく作りだされた N 末端構造がリガントとして働くため、受容体は持続的に活性化されることになる。

PAR1 アゴニスト (TFLLR) を投与すると、IPSC の振幅が低下した (Fig. 3)。この効果は CB1 受容体アンタゴニスト (AM251)、あるいは、内因性カンナビノイド 2-AG の合成酵素である diacylglycerol lipase (DGL) の阻害剤 (THL) で消失した (Fig. 3)。また、PAR1 アゴニスト投与による IPSC の抑制は、DGL α

ノックアウトマウスでは見られなかった (Fig. 4)。以上より、PAR1 の活性化は内因性カンナビノイドの生成・放出を誘導しうるということが証明された。

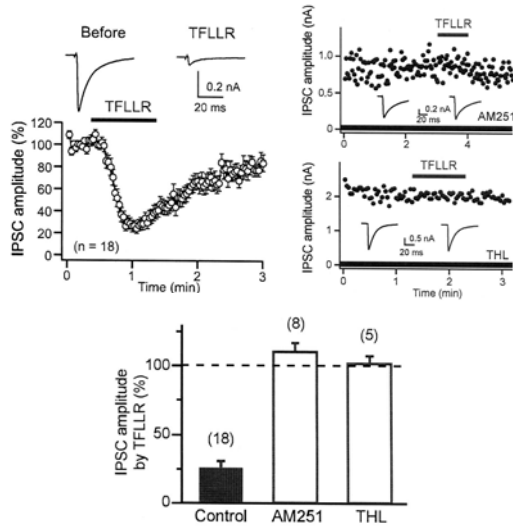


Fig. 3 PAR1 を介するカンナビノイド放出

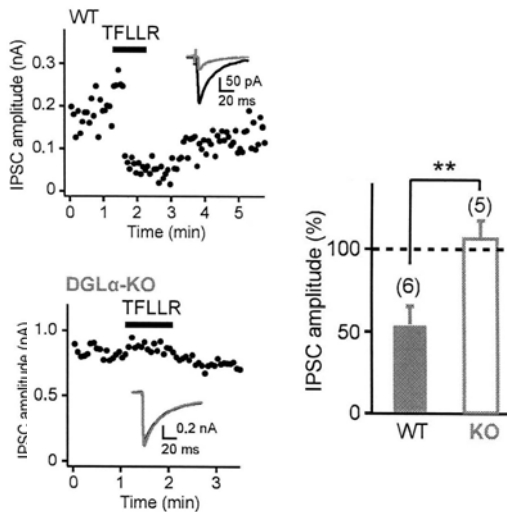


Fig. 4 DGL α -KO マウスでの消失

次に、関与する PAR1 受容体の部位を調べた。PAR1 はニューロンのみならず、グリア細胞にも発現していることが知られている。よって、上記の IPSC の抑制を担う内因性カンナビノイドは周りのグリア細胞から放出された可能性を否定することができない。そこで、DGL 阻害剤 (THL) をシナプス後ニューロンにのみ作用させ、その効果を調べたところ、PAR1 アゴニスト投与による IPSC の低下が阻害された (Fig. 5)。よって、内因性カンナビノイドはシナプス後ニューロンで生成・放出されることが証明された。

神経活動により、さまざまなプロテアーゼ

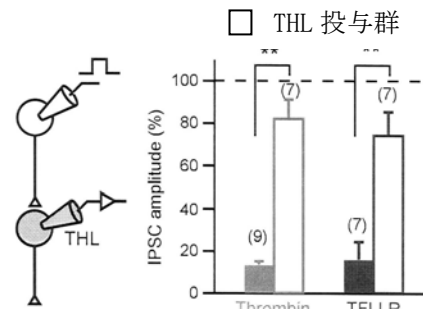


Fig. 5 シナプス後ニューロンから放出

が活性化されることが報告されている。よって、ニューロンの PAR1 が神経活動依存性に活性化されるなら、カンナビノイド依存性 LTD が誘導される可能性のあることが示唆された。

(2) 受容体活性化によるカンナビノイド合成系の持続的亢進

我々はすでに、培養海馬ニューロンのカンナビノイド感受性シナプスを用いて、I-mGluR や M1/M3 受容体を活性化させると、シナプス伝達が一過性に抑制される場合と、持続的に抑制される場合とがあることを見出し、この持続的抑制が CB1 受容体の持続的活性化によることを確認していた。そこで、この現象のメカニズムを調べるため、内因性カンナビノイド 2-AG の合成酵素 DGL の阻害剤 (THL) を投与したところ、シナプス伝達が持続的抑制から回復することを見出した。したがって、CB1 受容体の持続的活性化は、内因性カンナビノイドの持続的放出によるものであり、カンナビノイド合成系が持続的に亢進している可能性が示唆された。

そこで次に、カンナビノイド 2-AG の合成経路 (受容体-Gq-PLC β -DGL) の中のどのステップが亢進するのかを調べるために、「受容体-Gq-PLC β 」までのステップを定量化するアッセイ系を探した。

ムスカリン性受容体アゴニスト (oxo-M) を投与すると、-40 mV で測定される外向き K⁺電流が減少し、その時に膜のコンダクタンスは低下した (Fig. 6)。また、その効果は PLC 阻害剤 (U73122) で抑制された (Fig. 6)。さらに、oxo-M による外向き K⁺電流の変化の大きさは M 電流阻害剤 (XE991) 処理により小さくなった (Fig. 7)。したがって、M1/M3 受容体の活性化により PLC 依存的に M 電流を含む K⁺チャネルが抑制されると考えられた。また、oxo-M の代わりに I-mGluR アゴニスト (DHPG) を用いても、同様の結果が得られた。以上より、I-mGluR および M1/M3 受容体については、K⁺コンダクタンスの変化の大きさを指標として、受容体-Gq-PLC β の経路をモニターすることが可能であることが示された。

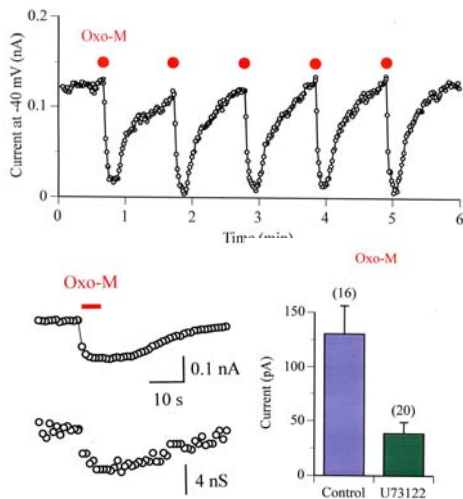


Fig. 6 Oxo-Mによる外向き K⁺電流の変化

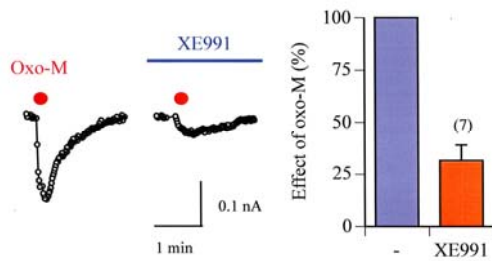


Fig. 7 M電流阻害剤の効果

そこで、このコンダクタンス変化の時間経過を指標とし、受容体-Gq-PLC β 系の持続的亢進の可能性について検討した。I-mGluRおよびM1/M3受容体アゴニスト投与によるK⁺コンダクタンスの変化を種々条件下で調べたところ、どの実験条件においても、K⁺コンダクタンスの減少は多くの場合一過性であり、内因性カンナビノイド放出量の変化の時間経過とは一致しなかった。よって、カンナビノイド合成の持続的亢進は、DGLの持続的亢進、あるいは、他の合成系路の賦活、などのPLC β 以外の要因によるものである可能性が高いと考えられた。

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3件)

- ① Ohno-Shosaku, T., Tanimura, A., Hashimoto-dani, Y., Kano, M., Endocannabinoids and retrograde modulation of synaptic transmission, *Neuroscientist*, in press, 査読有
- ② Hashimoto-dani, Y., Ohno-Shosaku, T.,

Yamazaki, M., Sakimura, K., Kano, M., Neuronal protease-activated receptor 1 drives synaptic retrograde signaling mediated by the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol, *J. Neurosci.*, 31 (2011), 3104-3109, 査読有

- ③ Kano M., Ohno-Shosaku T., Hashimoto-dani Y., Uchigashima M., Watanabe M., Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission, *Physiol. Rev.*, 89 (2009), 309-380, 査読有

[学会発表] (計3件)

- ① 少作隆子, 長澤圭祐, 村西千穂, 菅原優翔, 米田貢, 向精神薬クロザピンの活性代謝物 N-desmethyloclozapine の海馬興奮性ニューロンに対するM1アゴニスト作用, 第88回日本生理学会大会, 2011年3月28日, パシフィコ横浜(神奈川県)(震災のため誌上開催となり大会は中止)
- ② Hashimoto-dani, Y., Ohno-Shosaku, T., Kano, M., Modulation of hippocampal inhibitory synaptic transmission through protease-activated receptor 1, 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, 2009. 7. 28, Kyoto International Conference Center (Kyoto)
- ③ Ohno-Shosaku, T., Echigo, R., Kashima, K., Minami, H., Muranishi, M., Nishikawa, Y., Taguchi, H., Watanabe, M., Effects of intracellular Ca²⁺ level on channel modulation induced by activation of muscarinic receptors in rat cultured hippocampal neurons, 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, 2009. 7. 28, Kyoto International Conference Center (Kyoto)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

少作 隆子 (OHNO-SHOSAKU TAKAKO)
金沢大学・保健学系・教授
研究者番号: 60179025

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

越後 亮介 (ECHIGO RYOUSUKE)
金沢大学・大学院医学系研究科保健学専攻・博士後期課程2年