

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15189

研究課題名（和文）シナプス前部からの直接パッチクランプ記録によるカンナビノイドの作用点の解析

研究課題名（英文）Analysis of cannabinoids-mediated modulation of synaptic transmission by direct patch-clamp recordings

研究代表者

井下 拓真（Inoshita, Takuma）

京都大学・理学研究科・助教

研究者番号：00880337

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：神経細胞間の情報伝達は脳機能の根幹である。中枢神経系の多くのシナプスでは、その伝達効率がカンナビノイドにより負に調節される。カンナビノイドは麻から抽出され、精神作用があるため、その作用機序は盛んに研究されてきたが分かっていない点も多い。本研究では、シナプス前部・後細胞からの直接同時パッチクランプ記録を小脳プルキンエ細胞のシナプスに適用し、2種類のカンナビノイド受容体が独自の情報伝達抑制作用を発揮することを明らかにした。具体的には、CB2がシナプス前Ca²⁺流入を減少させ、一方新規カンナビノイド受容体GPR55は活動電位に応じて膜融合し得るシナプス小胞数を減少させることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は新しく同定されたGPR55について、よく分かっていなかったシナプス修飾メカニズムを詳細に示した。そのメカニズムは従来の理解とは異なる新規性の高いシナプス前部の機能調節である。カンナビノイドは向精神作用や鎮痛作用があるため社会的注目度が高く、本知見はそれらの理解深化に寄与し得る。特に、カンナビジオールというカンナビノイドの一種はてんかん治療や鎮痛薬として期待されており、GPR55にも結合するため、本研究成果が社会的・医学的応用に幅広くつながる可能性もある。

研究成果の概要（英文）：Neuronal communication is the basis of brain function. Synaptic transmission is negatively regulated by cannabinoids at various synapses in the central nervous system. Modulation of transmission by cannabinoids, extracted from cannabis and known for their psychoactive effects, have been extensively studied. However, the mechanisms of cannabinoids-mediated suppression of synaptic transmission remains obscure. In this study, paired patch-clamp recordings were performed from a presynaptic terminal of a Purkinje cell and its postsynaptic cell. We identified two suppressive actions of distinct cannabinoid receptors on presynaptic transmitter release: CB2 reduces presynaptic Ca²⁺ influx, while GPR55, a novel type of cannabinoid receptor, decreases fusion-competent vesicles susceptible to action potentials.

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス 伝達物質放出 カンナビノイド パッチクランプ プルキンエ細胞 シナプス修飾 CB2 GPR55

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

神経細胞間の情報伝達は、軸索終末へ到達した活動電位により神経伝達物質が放出され、それがシナプス後細胞の受容体と結合することで実現する。多くのシナプスにおいて、大麻成分に含まれるカンナビノイドの受容体が活性化すると、伝達物質放出が負に調節される。1型カンナビノイド受容体(CB1)が活性化すると、シナプス前 Ca^{2+} 流入が減弱し、伝達物質放出が弱まる (Kreitzer & Regehr, 2001; Ohno-Shosaku et al., 2001; Wilson & Nicoll, 2001)。また、2型カンナビノイド受容体(CB2)も CB1 と同様に伝達物質放出を弱めることが示されている (Atwood et al., 2012)。しかし、情報伝達効率に影響する主要な要素でシナプス前 Ca^{2+} 流入以外のものがカンナビノイドに影響される可能性についてはほとんど調べられていなかった。また、小脳プルキンエ細胞 (Purkinje cell, PC) は CB2 を発現するにもかかわらず、その出力シナプスはカンナビノイドにより機能変化しないという報告がある (Hirono & Yanagawa, 2020)。さらに、近年 GPR55 が第3のカンナビノイド受容体として同定され、シナプス伝達への影響が示唆されているものの (Sylantsev et al., 2013)、その仕組みはよく分かっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、カンナビノイドによるシナプス修飾のメカニズムを解明することを目指した。そのために、シナプス前部・後部からのパッチクランプ記録を駆使し、カンナビノイドによりシナプス伝達を規定する要素にどのような変化が起こるか詳細に調べる。また、電気生理学実験とイメージング実験を組み合わせることで、シナプス前小胞の動的な変化について詳細に解析して、包括的な理解を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

小脳 PC はシナプス前部・後部から同時にパッチクランプ記録できる稀有な実験系である。PC はアデノ随伴ウイルスを用いて遺伝子導入が比較的簡便に行える。蛍光蛋白質 EGFP により軸索を可視化することで、それを頼りにガラス電極を微小構造に押し当て、PC 出力シナプスからパッチクランプ記録した。神経伝達物質が放出される際、小胞が膜融合して細胞膜の表面積が増加することを膜容量測定で捉えることで、エキソサイトーシスされたシナプス小胞数を推定した。さらに、シナプス後応答から小胞の膜融合速度が算出でき、シナプス前部で記録される Ca^{2+} 電流と伝達物質放出の関係性と対比することで、カンナビノイドによりどのようなシナプス前部機能に変化が起こったか推定した。必要に応じて PC に任意のカンナビノイド受容体を遺伝子導入し、受容体のサブタイプごとにシナプス修飾の仕組みを調べた。

シナプス小胞膜に局在する pH 感受性の蛍光蛋白質 (VAMP2-pHluorin) を用いたイメージング実験も行った。pHluorin は、小胞内腔の酸性環境に暴露されている間は蛍光を発せず、エキソサイトーシスにより細胞外の中性環境に露出すると蛍光が増大する。これを利用して、活動電位によりエキソサイトーシスされる小胞とエキソサイトーシスされない小胞の量比など、電気生理学実験では調べられないシナプス小胞の機能特性を解析した。

4. 研究成果

(1) PC 出力シナプスにおける CB2 の役割

PC が投射する神経細胞からシナプス後応答を記録し、CB2 作動薬を投与したところ、シナプス伝達は変化せず (図 1) 先行研究 (Hirono & Yanagawa, 2020) が支持された。この原因について、シナプスの機能を規定する要素の中で伝達を強めるものと弱めるものが CB2 により並行して起こり、それらが拮抗したために全体として CB2 の影響が表面化しない可能性を考えた。そこで、PC 軸索終末から直接パッチクランプ記録を行い、活動電位の振幅や波形、シナプス前 Ca^{2+} 流入など、シナプス伝達効率に影響する主要な要素はいずれも CB2 作動薬を投与しても変化しないことを示した。一方で、免疫染色により PC の細胞体や樹状突起に CB2 の局在が認められたが、軸索にはほとんど認められなかった。したがって、CB2 がシナプス伝達に影響できないのは、軸索終末に十分に受容体が存在しないことが原因である可

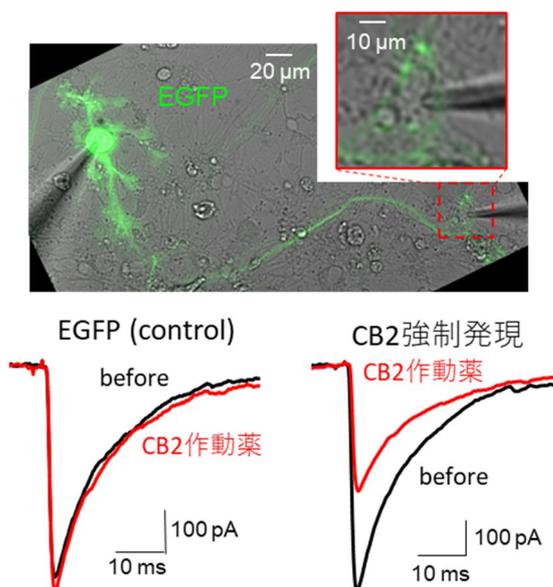


図 1 シナプス応答に対するCB2作動薬の影響

能性を考えた。その可能性を調べるため、蛍光蛋白質(venus)で標識した CB2 を強制発現すると、確かに軸索に CB2 のシグナルが認められ、そのシナプス応答は CB2 の活性化により減弱した(図 1)。脱分極刺激に応じたシナプス前 Ca^{2+} 流入が CB2 の活性化により減弱し、膜容量増加も減少した(図 2)。また、強制発現した CB2 を活性化させても、軸索終末の活動電位の波形や振幅、シナプス後部の応答性は変化しなかった。さらに、シナプス前部における 50ms の脱分極刺激に応じた即時膜融合可能な小胞の数を推定すると、CB2 により変化しないことも分かった。以上の結果により、PC においてカンナビノイドによるシナプス修飾が欠如しているのは、軸索に CB2 が十分に存在しないことに起因すると考えられた。そして、十分な量の CB2 が活性化した場合には、シナプス前 Ca^{2+} 流入が減弱することでシナプス伝達が弱まることを直接的に示し、活動電位や即時膜融合可能な小胞の数は変化しないことを明らかにした。

(2) PC 出力シナプスにおける新規カンナビノイド受容体 GPR55 の役割

PC 出力シナプスにおけるカンナビノイドの作用について調べる中で、当初予想していなかった意外な変化に気づいた。PC 出力シナプスでは、GPR55 作動薬がシナプス伝達を減弱させた。また、GPR55 を阻害すると、そのシナプス抑制が起こらなくなった。したがって、PC 出力シナプスにおいて、GPR55 の活性化によりシナプス伝達が弱まるという、カンナビノイドによる新しいシナプスの機能調節を見出した。その仕組みについて PC 軸索終末からの直接パッチクランプ記録により検討し、GPR55 を活性化すると脱分極刺激による膜容量増加は減少する一方で、シナプス前 Ca^{2+} 流入は変化しないことが示された(図 2)。また、軸索終末の活動電位の波形や振幅、シナプス後部の応答性は、GPR55 により影響されないことが分かった。さらに、即時膜融合可能な小胞数は GPR55 により減少した。したがって、即時膜融合可能なシナプス小胞の数が GPR55 により減少することが、シナプス抑制の理由であると示唆された。さらに詳細な解析のため、VAMP2-pHluorin を用いたイメージング実験を行った。活動電位によりシナプス小胞はエキソサイトーシスされ、シナプス前部で pHluorin の輝度上昇が起こる。連続した活動電位による pHluorin 蛍光増加は GPR55 活性化で半減した。さらに、bafilomycin(液胞 H^+ -ATPase 阻害剤)により、取り込まれたシナプス小胞内の再酸性化を阻害することで、脱分極により膜融合可能な全シナプス小胞数を推定すると、やはり GPR55 により半減すると考えられた。また、 NH_4Cl 投与により全小胞を中和して、pHluorin 輝度を上昇させると、GPR55 によらず同等の輝度変化が得られた。つまり、GPR55 を活性化しても、軸索内部に存在する全ての小胞の数は変化しないことが分かった。一方で、活動電位により膜融合に動員される小胞が GPR55 により半減することが明示され、膜容量測定における GPR55 の結果と一致していた。以上の結果から、活動電位に応じて膜融合し得るシナプス小胞が GPR55 により膜融合できなくなることで、シナプス伝達が抑制されるという新規のシナプス修飾メカニズムを明らかにした。GPR55 に関する研究展開は課題開始時には想定しておらず、当初目的以上に研究が進化したといえる。

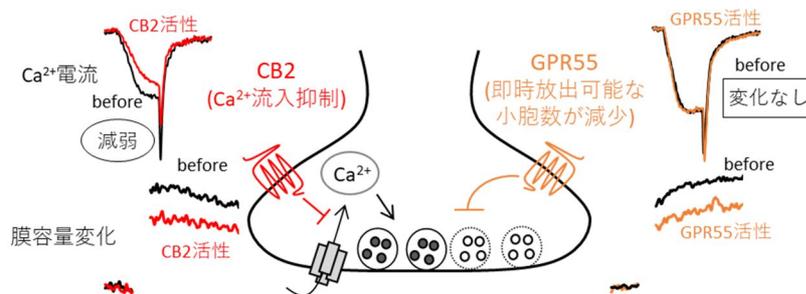


図 2 カンナビノイド受容体サブタイプごとのシナプス抑制の仕組み

以上(1) および(2)

の研究結果について、計 4 回の学会発表を行い、論文公刊の準備を進めている。

<引用論文>

Kreitzer AC, Regehr WG.

Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron*. Mar;29(3):717-27.

Ohno-Shosaku T, Maejima T, Kano M.

Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron*. 2001 Mar;29(3):729-38.

Wilson RI, Nicoll RA.

Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses.

Nature. 2001 Mar 29;410(6828):588-92. Erratum in: *Nature* 2001 Jun 21;411(6840):974.

Atwood BK, Straiker A, Mackie K.

CB₂ cannabinoid receptors inhibit synaptic transmission when expressed in cultured autaptic neurons. *Neuropharmacology*. 2012 Sep;63(4):514-23.

Sylantsev S, Jensen TP, Ross RA, Rusakov DA.

Cannabinoid- and lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55 boosts neurotransmitter release at central synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Mar 26;110(13):5193-8.

Hirono M, Yanagawa Y.

Endocannabinoids regulate cerebellar GABAergic transmission in a synapse type-dependent manner. *J Neurosci Res*. 2021 Mar;99(3):898-913.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井下 拓真、川口 真也
2. 発表標題 小脳プルキンエ細胞のシナプス出力におけるカンナビノイドの調節作用についての軸索終末からの直接記録による解析
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井下 拓真、川口 真也
2. 発表標題 シナプス小胞膜融合のカンナビノイドによる調節の軸索終末パッチクランプ記録による生物物理学的解析
3. 学会等名 NEUR02022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井下 拓真、川口 真也
2. 発表標題 小脳プルキンエ細胞終末におけるCB2によるCa ²⁺ 流入減弱を介したシナプス伝達抑制の量的制御
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井下 拓真、川口 真也
2. 発表標題 異なるカンナビノイド受容体によるプルキンエ細胞シナプスでの対照的な伝達物質放出
3. 学会等名 第46回 日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井下 拓真、川口 真也
2. 発表標題 小脳プルキンエ細胞軸索終末におけるGPR55を介した小胞エキソサイトーシス抑制に関する生物物理学的解析
3. 学会等名 NEURO2024
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------