

小脳 GABA 作動性シナプス伝達の修飾作用

齋藤 文仁

日本医科大学大学院医学研究科神経情報科学

Modulation of Cerebellar GABAergic Synaptic Transmission

Fumihito Saitow

Department of Neuropharmacology, Graduate School of Medicine, Nippon Medical School

Abstract

Synapses are the site of connections between various nerve cells to interact, where neural information is processed through the mechanisms of synaptic transmission mediated by chemical messengers, including excitatory and inhibitory neurotransmitters. Whereas signals at excitatory synapses are mediated by the amino acid glutamate, inhibitory signals are mainly mediated by γ -aminobutyric acid (GABA). Exploring the mechanisms underlying the synaptic transmission and changes in its strength is, therefore, essential for our understanding of brain functions. The inhibitory synapse plays a critical role in controlling various functions of the brain. However, the mechanisms that regulate the strength of transmission at inhibitory synapses are poorly understood than those that regulate excitatory synapses. Therefore, I have been interested in the roles of neuromodulators on inhibitory GABAergic synapses in the cerebellum, whose basic neural circuits and synaptic mechanisms have been more thoroughly investigated than have those of other regions of the mammalian central nervous system. This knowledge base would allow results of experiments on cerebellar synapses to be interpreted more easily. Consequently, our studies have revealed that GABAergic synapses in the cerebellum are well modulated by different neuromodulators (monoamines and purines) liberated by different synaptic inputs converging on the same inhibitory synapses.

(日本医科大学医学会雑誌 2009; 5: 152-158)

Key words: cerebellum, GABAergic synapses, modulation, plasticity

はじめに

脳の働きは興奮性および抑制性シナプスにおける化学物質で仲介される情報伝達によって成される。したがってシナプス伝達の仕組みを明らかにできれば脳に関する理解は著しく深まると期待できる。脳内シナプ

ス伝達の効率、すなわち情報処理の素過程は様々な脳内化学物質で仲介される調節機構によって制御されており、柔軟に変化する性質を有しており、この仕組みはシナプス可塑性と呼ばれる。脳の正常な機能および神経疾患において、シナプス伝達およびその可塑性がどのような役割を担い、どういった異常がみられるかという研究が精力的に行われている。一概に比較す

Correspondence to Fumihito Saitow, Department of Pharmacology, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8602, Japan

E-mail: f-saitow@nms.ac.jp

Journal Website (<http://www.nms.ac.jp/jmanms/>)

るものではないが、抑制性シナプスは興奮性シナプスに劣らず重要な役割を果たしていると考えられるが、グルタミン酸を伝達物質とする興奮性シナプスにおける研究に比べると GABA 作動性抑制性シナプスの研究は分子生物学的あるいは薬理学的ツールが少ないなどの理由で立ち遅れている点がある。

これまで著者は小脳の抑制性 GABA 作動性シナプスにおいてモノアミン（セロトニン (5-HT) およびノルアドレナリン (NA)) やプリン化合物 (ATP や ADP など) を含む神経細胞あるいはグリア細胞などの活動により GABA シナプスの伝達効率が短期間あるいは長期間にわたり修飾、変調されることを見出した¹⁻⁵。本稿ではこれら小脳 GABA シナプスにおける修飾作用がどのようなものかを概観し、今後の課題について議論したい。

なぜ小脳なのか

この問いに正直に答えるならば、それは学位取得後に博士研究員として赴任した三菱化学生命科学研究所で小西史朗先生（現：徳島文理大学香川薬学部教授）に師事したことがきっかけである。後付けながらその理由を述べるのなら以下のようなになる。小脳は大きく小脳皮質と深部小脳核（小脳核）によって構成され、運動制御・運動学習を行っている。この小脳のシナプスになんら異常がある場合には、個体レベルで行動などの表現系に異常がみられるかもしれない。シナプスレベルから行動レベルまでボトムアップの研究をするには比較的都合の良い実験系といえる。これが第一の理由である。もう一つの理由は、**図 1A** に示すように小脳皮質は顆粒層・プルキンエ細胞層・分子層と呼ばれる三層構造を示し、構成ニューロンおよび各ニューロン間のシナプス結合パターンは比較的よくわかっている⁶。このことはシナプスレベルで研究を行う際に、明確に細胞同定が可能で解剖学的知見を利用しやすい。小脳皮質において、最も大きい神経細胞であるプルキンエ細胞は非常によく発達させた樹状突起を分子層にのぼして 10 万以上のシナプスを形成している (**図 1B and 1C**)。このプルキンエ細胞は小脳皮質からの唯一の出力細胞であり、小脳核に出力している。なお、プルキンエ細胞は GABA を伝達物質とする抑制性神経細胞であり抑制性神経伝達によりシナプス後細胞を支配するユニークな神経回路を形成している。

研究手法

ラットの小脳を速やかに摘出し、脳切片(スライス)を作製して人工脳脊髄液のなかで神経回路を活かしながら神経細胞の活動やシナプス活動を電気的な信号として計測する。脳スライス標本は作製後、約 1 時間の回復期を経て、その後 7 時間は神経細胞を活かした状態で保持できる。このような脳スライスを用いた実験系ではいくつかの電気生理学的記録方法があるが、著者は主に微小ガラスキャピラリー電極と高利得低雑音増幅器を駆使した全細胞記録 (Whole-cell patch-clamp) 法を用いている。この記録法は細胞膜全体に存在するイオンチャンネルや受容体の平均的な活性を記録する場合や膜容量の測定に用いられ、電気刺激や自発的に放出された神経伝達物質によって引き起こされるシナプス電位あるいはシナプス電流を記録することができる。

NA によるシナプス修飾作用

<アドレナリン受容体>

薬理学的実験に基づき交感神経節後線維から放出された NA が作用する受容体は α および β 型サブタイプに分類されることが提唱されて約 60 年が経過⁷。現在はその実態が分子クローニングによって明らかになっている。アドレナリン受容体はさらに細分化され α_1 、 α_2 および β_{1-3} の 3 種類 β 型サブタイプが同定されている⁸。神経—平滑筋接合部の後膜側には α_1 型受容体が分布しておりこの受容体は IP_3 生成に関連している。 α_2 型受容体は主にシナプス前終末部に存在し自己受容体 autoreceptor として、一般に cAMP 生成を抑制して NA 放出を制御している。一方、 β 受容体はすべて Gs ファミリーの G タンパク質を介してアデニリルシクラーゼを活性化して cAMP 生成を高める。

<小脳皮質 GABA 作動性シナプスの β -アドレナリン受容体を介した増強作用>

小脳には青斑核からの NA 含有線維の投射を受けている。異なったシナプス入力の一つのシナプス標的に収束する場合にシナプス入力間で相互作用が認められることが中枢神経系の様々な部位で明らかにされつつあり、このようなシナプス間相互作用は異シナプス性 (hetero-synaptic) 調節機構と呼ばれる。バスケット細胞—プルキンエ細胞間の GABA シナプス (**図 1 ①**) の伝達効率は NA 作動性神経の活動に伴い長期

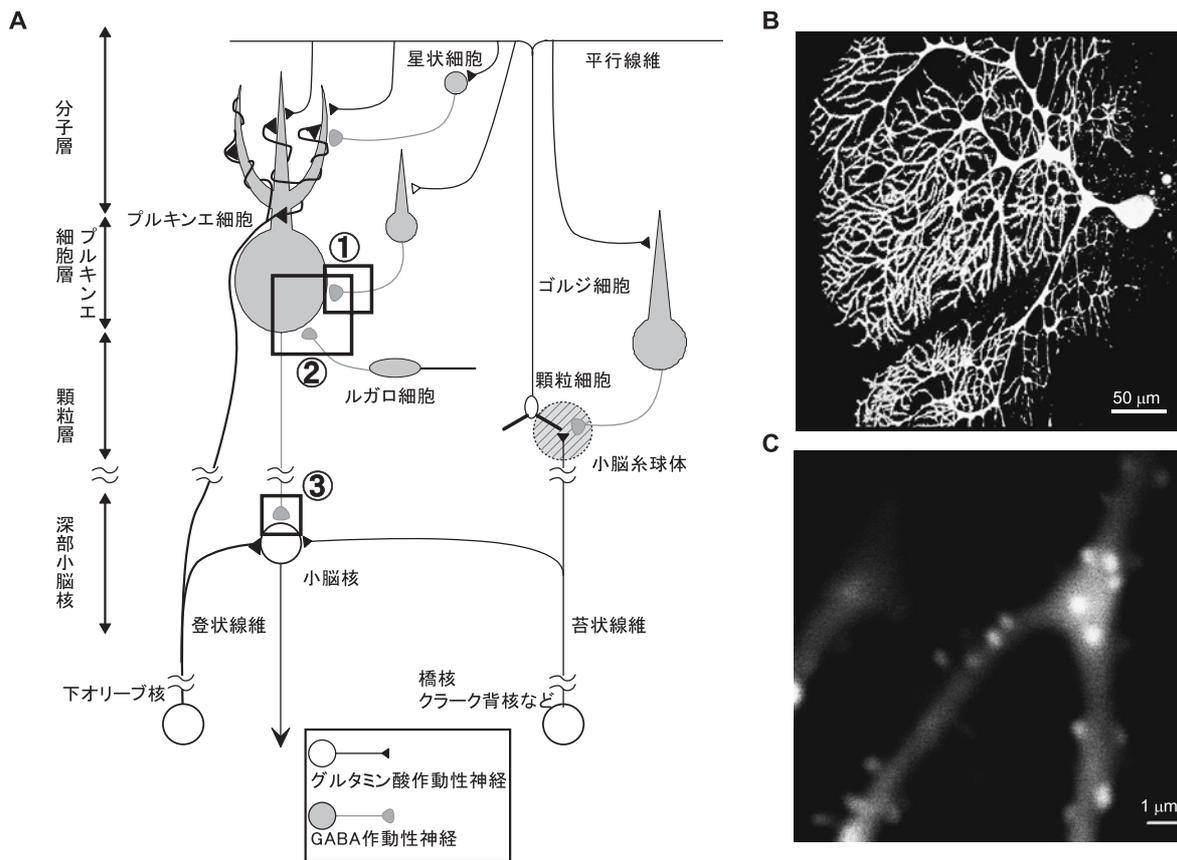


図1 A: 小脳神経回路の模式図 本稿で記載したシナプス部位を四角形の領域①~③で表している。①: β -アドレナリン受容体で仲介されるバスケット細胞—プルキンエ細胞間の GABA 作動性シナプス。②: 代謝調節型プリン受容体で仲介されるプルキンエ細胞における GABA 作動性シナプス。③: セロトニン受容体で仲介される小脳核における GABA 作動性シナプス。 B: 小脳皮質からの唯一の出力細胞であるプルキンエ細胞の形態。パッチクランプ記録用ガラス電極から細胞内に蛍光色素 (Alexa Fluor 488) を拡散させ、共焦点顕微鏡を用いて画像取得した。樹状突起の伸長をみる事ができる。 C: プルキンエ細胞樹上突起の拡大画像。数多くのスパイン (棘突起) が観察される。ここに興奮性シナプスを形成する。

増強を起し、この作用には β_2 -アドレナリン受容体が刺激されると少なくとも 2 種類の異なる情報伝達経路を介して GABA 伝達の増強が起こることを明らかにした。第一は、細胞内 cAMP 生成が高まり、これが過分極活性化型イオンチャネル (HCN チャンネル) の活性化を引き起こして BC に脱分極に続くスパイク発射の増加を起して自発的 GABA シナプス活動を増加させ抑制性シナプス後電流 (IPSC: inhibitory postsynaptic current) の頻度を増大させた (図 2: 作用 1)。第二は、上昇した細胞内 cAMP は cAMP 依存性キナーゼ (PKA) を活性化して BC 神経終末における GABA 放出プールを増大、さらに神経伝達物質の開口放出に関連する Ca^{2+} 感受性を増大することにより GABA 放出量の増大が起こり IPSC の振幅が大きくなった (図 2: 作用 2)。これら修飾作用は数的 (放出頻度) にも量的 (放出量) にも GABA 放出を増大させ PC に対して抑制をかける方向に働いている

(synergic effect) ことがわかった。

プリン化合物によるシナプス修飾作用

<プリン受容体>

アデノシンや ATP などのプリンヌクレオチドに対する受容体は 3 種類のサブタイプに分類することができる。アデノシンに感受性のある P1 受容体、ATP に選択的な P2 受容体に分類され、さらに P2 受容体は陽イオンチャネルと共役する P2X 受容体、そして代謝調節型で G タンパク質に共役する P2Y 受容体に分類される。P2 受容体は ATP をはじめ ATP の代謝物 (ADP や UTP などのヌクレオチド) に対しても親和性があるサブタイプがある⁹⁾。

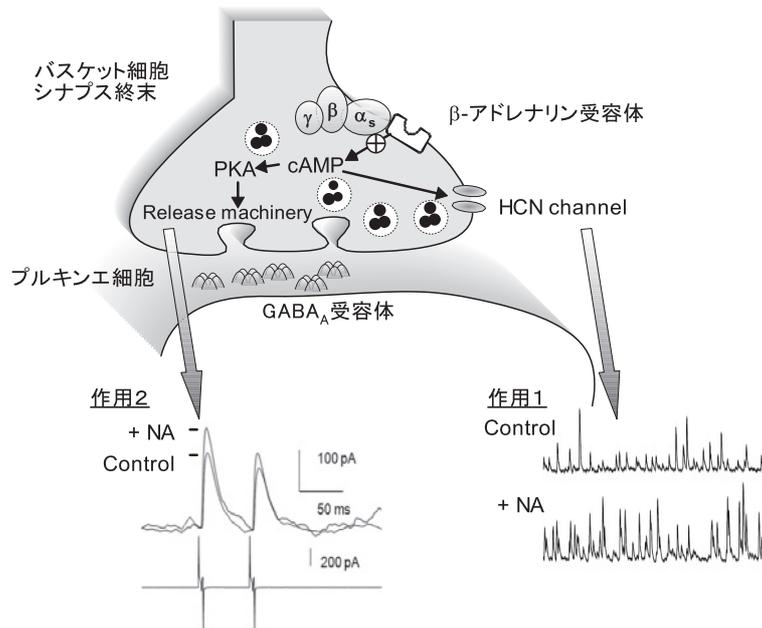


図2 β-アドレナリン受容体活性化に伴う GABA 作動性シナプス修飾の作用と情報伝達経路. バスケット細胞神経終末に存在する β-アドレナリン受容体は細胞内 cAMP を活性化し、その後2つの経路に分かれ、それぞれプルキンエ細胞に対する抑制を増大させる。

＜小脳皮質 GABA 作動性シナプスの P2Y 受容体を介した増強作用＞

免疫組織化学的実験によりプルキンエ細胞 (PC) には P2Y₁ 受容体が多く発現している^{10,11} ことが報告されていたが、その生理的作用を示した研究はなかった。当初、著者は PC 細胞内 Ca²⁺ 上昇と GABA 作動性シナプスの増強作用について研究をしていたことから、P2Y₁ 受容体活性化に伴う Ca²⁺ 上昇も GABA 伝達を増強するかもしれないという期待から着手した。その結果、一部予想以上の増強機構があることがわかった。すなわち小脳皮質の GABA 作動性シナプスに対して P2Y 受容体活性化が2つの異なる時間スケールで、異なる作用部位とともに GABA シナプスの伝達効率を増強することを見出した (図 1A ②; 図 3)。P2Y 受容体アゴニストである ADP および 2-methylthio ATP の灌流投与は、PC から記録される自発的抑制性後シナプス電流 (IPSC) の頻度と平均振幅を急速に増大させた (図 3: 作用 1)。この作用はアゴニストがなくなると急速に元に戻る可逆的な反応である。一方、フグ毒であるテトロドトキシンでシナプス活動を抑えた状態で記録される微小 IPSC および外来 GABA 投与の応答電流の振幅は、P2Y 受容体活性化により、ゆっくりとした立ち上がりで増大したが、微小 IPSC の頻度は変化しなかった (図 3: 作用 2)。図 3 に示すように作用 1 はシナプス前性機構により急速に GABA 放出頻度が上昇しており、小脳皮質において、

ルガロ細胞と一部のバスケット細胞が P2Y 受容体刺激により興奮性増大を引き起こす GABA 作動性介在ニューロンであった。作用 2 はシナプス後細胞である PC にその作用点があり、比較的ゆっくりとした時間経過で GABA_A 受容体感受性が変化したと考えられる。P2Y 受容体は G_q 型 G タンパク質と共役していることが知られているので PC 細胞内 Ca²⁺ 動態を調べると P2Y 受容体アゴニストによって Ca²⁺ 上昇がみられ、この Ca²⁺ 上昇は細胞外 Ca²⁺ をなくした条件でもみられたことから、ホスホリパーゼ C を介した細胞内 Ca²⁺ 動員系が関わっていると考えられる。プリン受容体による修飾作用も β-アドレナリン受容体の修飾作用と同様に、PC に対して抑制をかける方向に働いていた。

セロトニンによる GABA シナプス抑制作用

＜セロトニン受容体＞

5-HT₁ から 5-HT₇ まで 7 種類のサブタイプに分類されており、そのうち 5-HT₃ のみイオンチャネル共役型の受容体である。それ以外は G タンパク質に共役して、少なくとも 14 種類に細分化される神経伝達物質受容体の中でもっとも複雑なファミリーを形成している受容体である¹²。

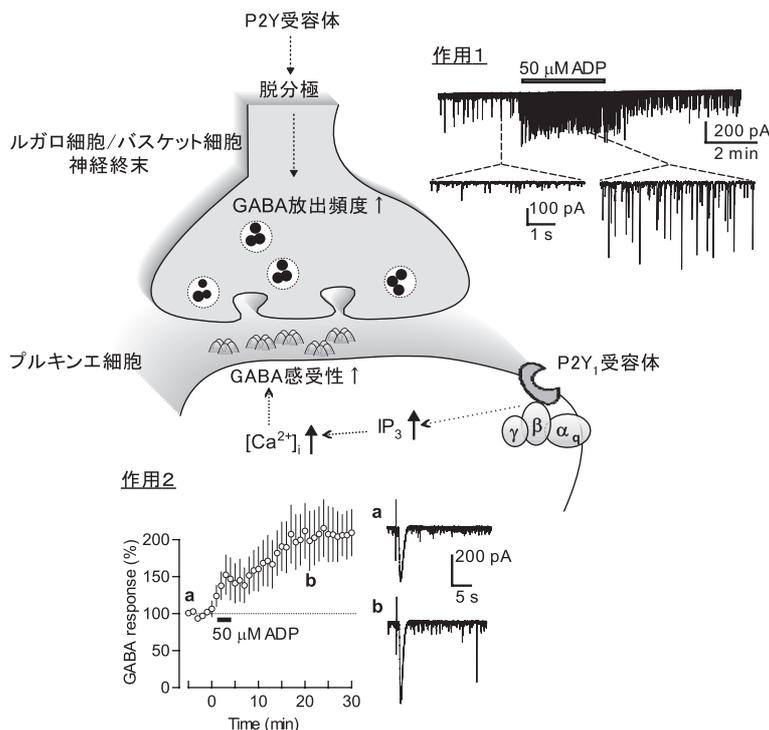


図3 代謝調節型プリン受容体P2Y受容体活性化に伴うGABA作動性シナプス修飾の作用部位とその効果。P2Y受容体アゴニストADPは異なる2つの部位でGABAシナプス修飾作用を引き起こす。作用1：プルキンエ細胞に入力するGABA作動性のルガロ細胞とバスケット細胞（一部）はADPにより脱分極を引き起こし、GABA放出頻度が上昇する。作用2：プルキンエ細胞膜上にあるP2Y₁受容体がADPにより活性化され、細胞内Ca²⁺上昇を起こす。このCa²⁺はGABA_A受容体に作用してGABA感受性を増大してGABAに対する応答を増強する。a：Control b：ADP灌流投与20分後のGABA応答。シナプス性にかかる変化を除外するために、外来性のGABAを投与してGABA応答を記録した。

<小脳核GABA作動性シナプスの5-HT_{1B}受容体を介した修飾作用>

小脳核は図1に示すように、小脳皮質において制御・統合された情報を皮質のプルキンエ細胞からGABA作動性伝達により受けとり、様々な運動野へと転送する小脳の最終出力神経細胞群であり、この情報は運動の出力とタイミングを制御している。また、修飾物質のセロトニンはセロトニン作動性線維が縫線核から入力している。小脳に投射する神経線維の中でグルタミン酸作動性の苔状線維、登状線維に次いで3番目に多く、小脳核にも5-HT含有線維が網目状に神経支配をしている。そこで小脳核神経細胞からGABA作動性シナプス電流を記録し、5-HTによる修飾作用を調べると図4に示すようにシナプス電流の振幅は抑制される（作用1）。この分子機構には5-HT_{1B}受容体が関与しており、GABA放出確率を低下させることにより抑制を引き起こしたと考えられている。また、

PC神経終末からのGABA放出を抑制するだけではなく、5-HTは小脳核神経細胞膜の興奮作用も有していた（図4：作用2）。この分子機構の一部にNAによる修飾作用で述べたHCNチャンネルの活性化が関与していることがわかっている。この膜興奮性を変化させる受容体の種類は薬理学的実験に用いられるツールが不十分であるなど、いまだ明らかでない点が多いが、5-HT₅受容体が関与している可能性が最も高いと考えられている。これら小脳核におけるGABA作動性シナプス伝達の抑制と小脳核神経細胞の膜興奮性増大はどちらも小脳核において脱抑制の方向に働いているといえる。5-HTは小脳皮質からのGABA抑制の程度を制御（gain-control）し、同時に小脳核神経の発火頻度の調節も行っていると考えられる。

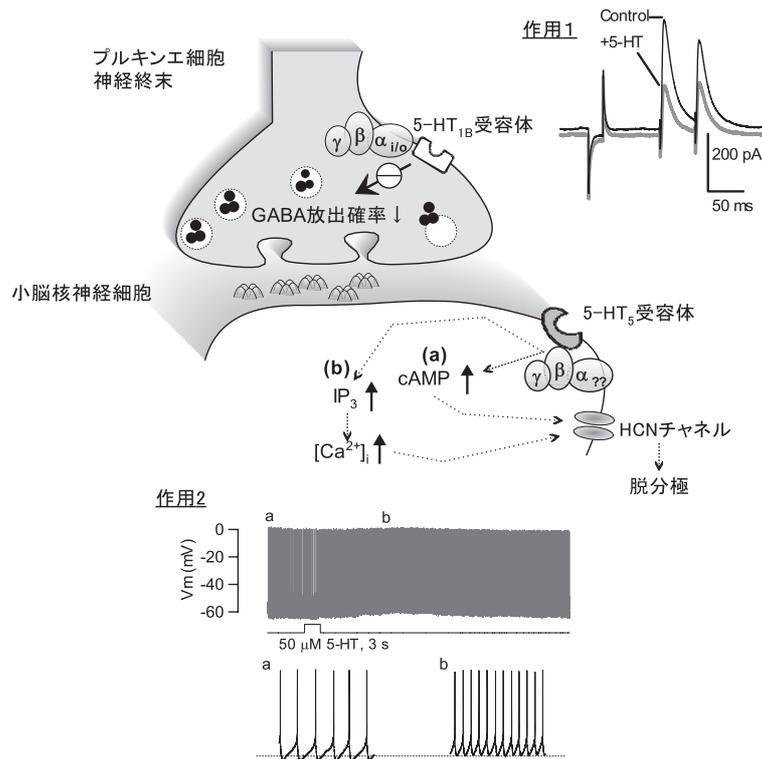


図4 深部小脳核における5-HT受容体活性化に伴うGABA作動性シナプス抑制作用と膜興奮作用. 5-HTは異なる2つの部位でGABA作動性シナプスの抑制作用とシナプス後細胞での膜興奮を引き起こす. 作用1: プルキンエ細胞に由来する神経終末において5-HT_{1B}受容体活性化に伴い, GABA放出確率の抑制が起こりIPSCの振幅が小さくなる. 作用2: シナプス後細胞である小脳核神経細胞では5-HTにより膜が脱分極を起こして興奮性が上がる. a: 静止状態の発火頻度. b: 50 μM 5-HTを投与したときの発火. 情報伝達経路については不明点が多いがHCNチャンネルが脱分極を引き起こしている点は明らかになっている. (文献5を改変)

神経伝達修飾物質の役割

小脳GABAシナプスにおける3種類の修飾作用をごく簡単に記述したが, どの変調・修飾様式も一つの作用にとどまらず, 複数の作用点あるいはシグナル伝達経路をもって生理的な役割を果たしているようだ. ここで明らかになっていることは, ごく限られた方法論で見出されたものであり, 実はもっと大きな変化をもたらしている可能性も否定できない. 実際, β-アドレナリン受容体で仲介されるGABAシナプスの増強にはタンパク質キナーゼAのリン酸化に続き, RNAおよびタンパク質合成に依存する長期増強が存在することを薬理的に明らかにしている(未発表データ). このことは, 記録している時間を大きく超える時間スケールで形態学的あるいは機能的な変化を及ぼす可能性も有している. さて, ここに示された結果からどの

ような医学的応用が考えられるだろうか. 精神疾患の一つに不安障害がある. この症例に対してベンゾジアゼピン系薬物のようにGABAシナプス伝達を増強する薬物が処方される場合がある. もし, GABAシナプス伝達効率の低下がその原因であるならば, ここに述べたようなNAやプリン化合物のような内在性の物質により選択的に抑制性シナプス活動を修飾, 増強することで症状を緩和させたりすることができないだろうか. また修飾物質としてとりあげた5-HTは, 気分障害, 不安障害や統合失調症などに関連があるとされている. 5-HTとシナプス伝達制御の関連性を調べることはグルタミン酸作動性シナプス同様, GABA作動性シナプスについても大変意義深いものであり, 知見の集積は病態解明, 治療法の基盤造りに寄与すると考えられる.

今後の課題

ここで示した実験結果は生体内で営まれている生理的な現象としては即座に受け入れがたい点がある。なぜなら、実験で得られたシナプス伝達の変化はシナプス修飾物質を主に灌流投与することで観察しており、内在性のシステムで動員されたものではない。時間的にも空間的にもこれら実験が生理的なスケールをどの程度まで反映しているのかはわからない。今後、このような研究は比較的大きな系(個体・組織レベル)で、特定の神経活動とそれによって引き起こされるシナプス可塑性をみてゆく必要がある。また、シナプス伝達が増強される場合と抑制される場合を本稿で示したが、これらシナプス修飾作用は個体にとって良い方向に働いているものなのか、何かの病態を反映しているものなのかは不明である。これらの疑問に答えるためにも実験系のボトムアップをはかり個体レベルでの観察が必要になる。それと同時に修飾物質の動態解明も重要な課題である。個体レベルでどのような時にモノアミンやヌクレオチドなどの修飾物質が放出・動員されるのか、神経回路内で興奮性神経伝達とのバランスや時間的な情報や空間的な情報はどのように扱われているのかなど、素朴な問いかけであるがチャレンジングな課題は枚挙にいとまがない。

文 献

1. Saitow F, Konishi S: Excitability increase induced by β -adrenergic receptor-mediated activation of hyperpolarization-activated cation channels in rat cerebellar basket cells. *J Neurophysiol* 2000; 84: 2026-2034.
2. Saitow F, Satake S, Yamada J, Konishi S: β -

Adrenergic receptor-mediated presynaptic facilitation of inhibitory GABAergic transmission at cerebellar interneuron-Purkinje cell synapses. *J Neurophysiol* 2000; 84: 2016-2025.

3. Saitow F, Suzuki H, Konishi S: β -Adrenoceptor-mediated long-term up-regulation of the release machinery at rat cerebellar GABAergic synapses. *J Physiol* 2005; 565: 487-502.
4. Saitow F, Murakoshi T, Suzuki H, Konishi S: Metabotropic P2Y purinoceptor-mediated presynaptic and postsynaptic enhancement of cerebellar GABAergic transmission. *J Neurosci* 2005; 25: 2108-2116.
5. Saitow F, Murano M, Suzuki H: Modulatory Effects of Serotonin on GABAergic Synaptic Transmission and Membrane Properties in the Deep Cerebellar Nuclei. *J Neurophysiol* 2009; 101: 1361-1374.
6. Palay SL, Chan-Palay V: Cerebellar cortex. Cytology and organization, 1974; Springer, Berlin.
7. Ahlquist RP: A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol* 1948; 153: 586-600.
8. Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR Jr, Trendelenburg U: International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev* 1994; 46: 121-136.
9. Ralevic V, Burnstock G: Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 1998; 50: 413-492.
10. Simon J, Webb TE, Barnard EA: Characterization of a P2Y purinoceptor in the brain. *Pharmacol Toxicol* 1995; 76: 302-307.
11. Moore D, Chambers J, Waldvogel H, Faull R, Emson P: Regional and cellular distribution of the P2Y1 purinergic receptor in the human brain: striking neuronal localisation. *J Comp Neurol* 2000; 421: 374-384.
12. Millan MJ, Marin P, Bockaert J, Mannoury la Cour C: Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions. *Trends Pharmacol Sci* 2008; 29: 454-464.

(受付：2009年3月31日)

(受理：2009年4月28日)