

シナプス前グルタミン酸受容体による中枢シナプス伝達 制御機構の解析

Presynaptic glutamate receptors in the central nervous system

研究代表者 群馬大学医学部生理学第二講座 講師 神谷温之
Lecturer, Dept. of Physiology, Gunma Univ. Sch. of Medicine,
Haruyuki Kamiya

To study the mechanisms of presynaptic modulation, I developed a novel optical method to detect presynaptic Ca^{2+} influx in brain slice preparations. Using this method, I investigated functional roles of the presynaptic glutamate receptors in the hippocampal synapses. Two classes of glutamate receptors, i.e. metabotropic glutamate receptors (mGluR) and kainate receptors (KAR), were shown to have the presynaptic inhibitory actions in CA1 synapse. Furthermore, inhibition of presynaptic Ca^{2+} influx was shown to play a major role in mGluR- and KAR-mediated inhibition of transmitter release.

1. 研究目的

神経伝達物質の機能とその作用機序を明らかにすることは、複雑な脳の神経回路における情報処理機構を理解する上で不可欠であると考えられる。脳内における主な興奮性伝達物質であるグルタミン酸はシナプス後部に存在する種々のグルタミン酸受容体を介して作用を示すことが知られているが、近年、同様な受容体がシナプス前部にも存在し伝達物質放出量を調節しうることが示され注目されている。

そこで本研究では、学習・記憶との関連で注目される海馬のスライス標本を用い、シナプス前グルタミン酸受容体の作用機構について申請者の開発したシナプス前終末内カルシウム測定法を用いて解析した。

2. 研究経過

2. 1. 方法

ラットの海馬スライス標本を作製し、シャーファー側枝入力の走行する CA1 野放線層に細胞膜透過型蛍光カルシウム指示薬 (rhod-2 AM) を注入すると (図 1 A)、軸索内を輸送されてシャーファー側枝のシナプス前終末だけに選択的に蛍光カルシウム指示薬を負荷することができる (図 1 B)。このような標本においてシャーファー側枝入力に単一電気刺激を与えるとシナプス前終末へのカルシウム流入を反映する一過性の蛍光強度の増加を測定することが可能である。この蛍光強度変化を指標としてシナプス前終末へのカルシウム流入を定量化し、種々のグルタミン酸受容体作動薬の効果を調べた。

同時に通常の電気生理学的手法により興奮性シナプス後電位 (EPSP) も測定した。

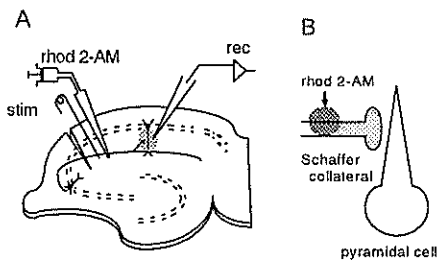


図1 海馬スライス標本を用いたシナプス前カルシウム測定法 A.実験法の模式図。シャーフアー側枝の走行する CA1 野放線層に細胞膜透過型蛍光カルシウム指示薬 (rhod-2-AM) を注入すると、軸索内を輸送されてシナプス前終末に選択的に負荷される (B)。このような標本で興奮性シナプス後電位 (EPSP) と蛍光シグナルをシナプス部から同時測定する。(Kamiya & Ozawa, 1998 より改変)

3. 研究成果

3. 1. シナプス前代謝調節型グルタミン酸受容体

CA1 野シャーフアー側枝シナプスでは代謝調節型グルタミン酸受容体 (metabotropic glutamate receptor; mGluR) を介してグルタミン酸放出の抑制が起こるが、この作用はシナプス前終末へのカルシウム流入の低下によることを上述のシナプス前カルシウム測定法により明らかにした (Yoshino & Kamiya, 1995)。

3. 2. シナプス前カイニン酸型受容体

次に、同様の手法により CA1 野シナプスでのシナプス前カイニン酸型受容体の作用機序について検討を行った。カイニン酸受容体を活性化する低濃度のカイニン酸 (1 μM) 投与により CA1 野シナプスでの EPSP は可逆的に抑制された (図 2 A、下段)。同時に計測したシナプス前終末へのカルシウム流入を反映する蛍光強度変化もカイニン酸により EPSP と同様の時間経過で抑制された (図 2 A、上段)。このとき EPSP とカルシウム流入の抑制の程度は、同様にシナプス前性にシナプス伝達を抑制すると考えられる低カルシウム液中で測定されたものとほぼ等しかった (図 2 B)。このことからカイニン酸は主にシナプス前終末へのカルシウム流入を抑制することにより CA1 野シナプス伝達を抑制するものと考えられた (Kamiya & Ozawa, 1998)。

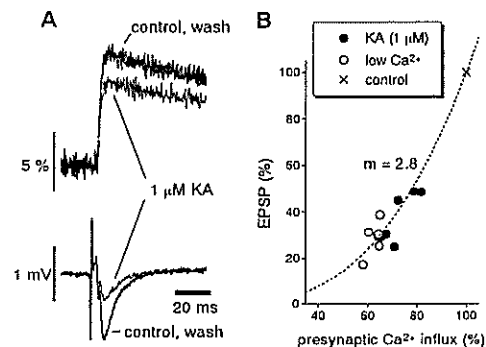


図2 カイニン酸による海馬 CA1 野シナプス前カルシウム流入の抑制 A. シャーフアー側枝の単一電気刺激に応じた EPSP(下段)とシナプス前終末へのカルシウム流入を反映する蛍光シグナルの増加(上段)。カイニン酸(KA, 1 μM) はシナプス前部へのカルシウム流入を可逆的に抑制した。 B.カイニン酸投与時のシナプス前カルシウム流入と EPSP の量的

関係 (●) は低カルシウム液 (1.2 mM) 中で測定したもの (○) とほぼ等しかった。(Kamiya & Ozawa, 1998 より改変)

以上より、海馬 CA1 野シナプスには代謝調節型グルタミン酸受容体 (mGluR) とカイニン酸型受容体 (KAR) の少なくとも二種類のシナプス前グルタミン酸受容体 (自己受容体) が存在し、ともにシナプス前部へのカルシウム流入を抑制することでグルタミン酸の放出を調節している可能性が示された (図3)。G 蛋白共役型の代謝調節型グルタミン酸受容体は特異的にカルシウムチャンネルを抑制しうることが示されており、シナプス前終末でも同様の分子機構が働いているものと推定された。また、イオンチャンネル型受容体であるカイニン酸型受容体とカルシウムチャンネルの分子間相互作用は報告されていないが、カイニン酸受容体チャンネルの開口による局所的な電気的短絡効果により活動電位に伴うカルシウム流入が低下したものと考えられた。

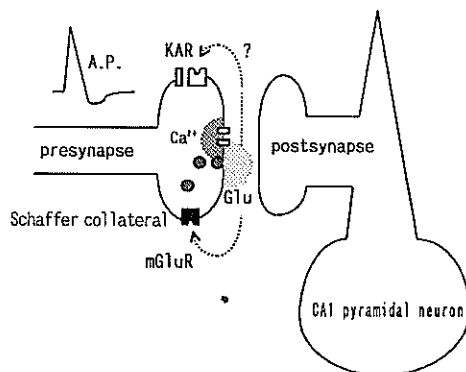


図3 海馬 CA1 野シナプスにおける二種類の自己受容体: 代謝調節型グルタミン酸受容体 (mGluR) とカイニン酸型受容体 (KAR)

4. 今後の課題と発展

今後は、これらのグルタミン自己受容体がどのような生理的条件下で作動し海馬神経回路の活動を調節しているかを明らかにしていくことが課題である。CA1 野シャーファー側枝シナプスはグルタミン酸を伝達物質とし、そのシナプス前部に存在する自己受容体はシナプス伝達をフィードバック的に調節するものと考えられる。このような視点から記憶の基礎過程と考えられている長期増強現象 (long-term potentiation: LTP) や長期抑制現象 (long-term depression: LTD) などの活動依存的なシナプス可塑性における自己受容体の役割を検討していくことが重要である。また、脳虚血などの病態では CA1 野で大量のグルタミン酸が放出され、選択的な神経細胞死を引き起こし前向性健忘などの症状を起こすことが知られている。これらの自己受容体が脳虚血時の病態に関与する可能性を検討するとともに、グルタミン酸放出のフィードバック抑制を強める条件および作動薬を見つけることで細胞死を防ぐ治療法開発の一助となることが期待される。

さらに、同様の手法を海馬 CA3 野シナプスに応用する。CA1 野シナプスにおける LTP や LTD の誘発にはシナプス後細胞内での分子機構が重要であるのに対し、CA3 野苔状線維シナプスではシナプス前終末での変化が重要であると想定されている。そこでこのシナプス前性の長期増強 (LTP) および長期抑制 (LTD) にシナプス前終末でのカルシウム動態の変化が関与するか否かを前述のシナプス

前カルシウム測定法を用いて検討する。CA3 野苔状線維シナプスにおける LTP や LTD は NMDA 型受容体の活性化を必要としないユニークなシナプス可塑性として知られており、シナプス前部でのカルシウム動態を直接測定することで得られる知見は、その分子機構を理解する上で重要であると考えられる。

5. 発表論文リスト

- Yoshino, M., & Kamiya, H. (1995) Suppression of presynaptic calcium influx by metabotropic glutamate receptor agonists in neonatal rat hippocampus. *Brain Research* 695, 179-185.
- Kamiya, H., Shinozaki, H., & Yamamoto, C. (1996) Activation of metabotropic glutamate receptor type 2/3 suppresses transmission at rat hippocampal mossy fibre synapses. *Journal of Physiology* 493, 447-455.
- Yoshino, M., Sawada, S., Yamamoto, C., & Kamiya, H. (1996) A metabotropic glutamate receptor agonist DCG-IV suppress synaptic transmission at mossy fiber pathway of the guinea pig hippocampus. *Neuroscience Letters* 207, 70-72.
- Kamiya, H., & Yamamoto, C. (1997) Phorbol ester and forskolin suppress the presynaptic inhibitory action of group-II metabotropic glutamate receptor at rat hippocampal mossy fibre synapse. *Neuroscience* 80, 89-94.
- Obokata, K., Kamiya, H., & Ozawa, S. (1997) Differential effects of phorbol ester on AMPA and NMDA components of excitatory postsynaptic currents in dentate neurons of rat hippocampal slices. *Neuroscience Research* 29, 171-179.
- 神谷温之 (1997) Ca イオンと可塑性. *Clinical Neuroscience* 15, 1108-1110.
- Kamiya, H., & Ozawa, S. (1998) Kainate receptor-mediated inhibition of presynaptic Ca²⁺ influx and EPSP in area CA1 of the rat hippocampus. *Journal of Physiology* 509, 833-845.
- Ozawa, S., Kamiya, H., & Tsuzuki, K. (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology* 54, 581-618.
- Kamiya, H. (1998) Presynaptic glutamate receptors in the hippocampus. In: Slow synaptic responses and modulation (Kuba, K., Higashida, H., Brown, D. A., & Yoshioka, T., eds). Tokyo: Springer-Verlag, in press.
- 神谷温之 (1998) シナプス可塑性の電気生理学的解析. 「脳神経研究の進めかた」片山正寛, 真鍋俊也編, 東京: 羊土社, 印刷中.