

シナプス伝達調節における逆行性シグナルおよびグリアの関与

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2001-02-21 キーワード: 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00056873

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



シナプス伝達調節における
逆行性シグナルおよびグリアの関与

(研究課題番号11670036)

平成11年度～12年度 科学研究費補助金(基盤研究C)

研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 少作隆子

(金沢大学 医学部 生理学第二講座)

金沢大学附属図書館



8000-96481-3

目次

1. はしがき	1
2. 研究組織・研究発表	2
3. 研究成果	
(1) 研究の背景	4
(2) 研究目的	4
(3) 研究方法	4
(4) 研究結果	7
(5) 今後の展開	21
4. 添付抄録（学会発表）	
(1) 第22回日本神経科学大会発表演題抄録	24
(2) 同上演題英文抄録	24
(3) 第77回日本生理学会大会発表演題抄録	25
(4) 同上演題英文抄録	25
5. 添付論文（発表論文）	
(1) Slow Synaptic Responses and Modulation (2000) 436-437	27
(2) Neuroscience Research 36 (2000) 67-71	31
(3) Neuron 29 (2001)（印刷中）	37

1. はしがき

この冊子は、平成11年度および12年度の科学研究費補助金・基盤研究（C）「シナプス伝達調節における逆行性シグナルおよびグリアの関与」（研究課題番号11670036）に基づいて行われた研究の成果をまとめたものである。

研究意図

中枢ニューロン間のシナプス伝達は神経活動依存的に調節されており、そのことは脳の記憶・学習など様々な機能において重要な役割を担っている。この活動依存的なシナプス伝達調節に、シナプス後ニューロンからシナプス前ニューロンへの逆行性シグナルが関与する可能性が示唆されている。近年、脳切片標本を用いて、小脳および海馬の抑制性シナプス伝達が、シナプス後ニューロンの脱分極により一過性に抑制される現象（depolarization-induced suppression of inhibition, DSI）が報告され、このDSIの発現に逆行性シグナルが関与していることが判明した。しかし、その詳しいメカニズムについては不明であった。

我々は、DSIのメカニズムを解明する目的で研究を始め、すでに、培養海馬ニューロン・ペアという極めてシンプルな実験系でDSIを再現することに成功し、その再現されたDSIに、逆行性シグナルが関与していることを確かめた。

本研究では、培養系で再現されたDSIを詳細に解析することにより、逆行性シグナルの実体を明らかにすることを試みた。

2. 研究組織・研究発表

研究組織

研究代表者：少作隆子（金沢大学医学部第二生理）

この研究を遂行するにあたり、下記の人々のご協力およびご指導を頂きました。ここに、その氏名を記して厚く感謝致します。

澤田さつき（金沢大学医学部第二生理・技官）

狩野方伸（金沢大学医学部第二生理・教授）

研究経費

平成11年度	2500千円
平成10年度	1100千円
計	3600千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. Ohno-Shosaku, T., Sawade, S. and Kano, M., Effects of CaM kinase II inhibitors on DSI in rat hippocampal culture. *Neurosci. Res.* 23S (1999) S85
2. Ohno-Shosaku, T., Sawada, S. and Kano, M., Heterosynaptic expression of depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) in rat hippocampal culture. *Neurosci. Res.* 36 (2000) 67-71

3. Ohno-Shosaku, T., Maejima, T and Kano, M., Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron* 29 (2001) (in press)

(2) 口頭発表

1. 少作隆子、澤田さつき、狩野方伸。培養海馬ニューロンの DSI における CaM kinase II の関与。第22回日本神経科学大会、1999年7月6-8日
2. 少作隆子、狩野方伸。抑制性シナプス伝達の短期可塑性 (DSI) における代謝型グルタミン酸受容体の関与の可能性。第77回日本生理学会大会、2000年3月27-29日

(3) 出版物

1. Ohno-Shosaku, T., Sawada, S. and Nakanishi, C., Propagation of depolarization-induced suppression of inhibition in cultured rat hippocampal neurons, In "Slow Synaptic Responses and Modulation," Springer-Verlag, Tokyo (2000) 436-437

3. 研究成果

(1) 研究の背景

中枢ニューロン間のシナプス伝達は神経活動依存的に調節されている。この活動依存的なシナプス伝達調節機構は、記憶・学習などさまざまな脳機能において重要な役割を担っており、そのメカニズムについて精力的に研究されてきた。その研究過程において、シナプス後ニューロンから放出され、シナプス前ニューロンに作用する因子、いわゆる逆行性伝達物質 (retrograde messenger) が、活動依存的なシナプス伝達調節に重要な働きをしている可能性が指摘され、注目を集めている。

近年、脳切片標本を用いて、小脳および海馬の抑制性シナプス伝達が、シナプス後ニューロンの脱分極により一過性に抑制される現象 (depolarization-induced suppression of inhibition, DSI) が報告され、このDSIの発現に逆行性伝達物質が関与していることが判明した。我々は、DSIのメカニズム、特に逆行性伝達物質の実体を明らかにする目的で研究を始め、すでに、培養海馬ニューロン・ペアという極めてシンプルな実験系でDSIを再現することに成功し、その再現されたDSIに、逆行性伝達物質が関与していることを確かめた。

(2) 研究目的

本研究の目的は、神経活動依存的なシナプス伝達の調節において逆行性シグナルがどのような役割を担っているのかを明らかにすることである。具体的には、培養海馬ニューロン・ペアを用いて、抑制性シナプス伝達がシナプス後ニューロンの活動により一過性に抑制される「DSI」という現象について詳細に解析し、関与する逆行性シグナルの実体を明らかにし、DSIメカニズムの全貌の解明を目指す。

(3) 研究方法

実験材料としては、新生仔ラットの海馬ニューロンを単離培養したものを用いた。生後1日目のラットの海馬を取り出し、細かく刻んだ後にピペッティングにより細胞をバラバラにし、ポリオルニチンなどでコーティングした培養皿に移し、1

ー2週間培養し実験に用いた。

シナプス伝達の変化を調べる方法としては、シナプス前・後の2個のニューロンを共にホール・セル・クランプする「double whole-cell clamp 法」を用い、シナプス前ニューロンを刺激し、シナプス後ニューロンよりシナプス電流を記録した(図1)。この方法では、単シナプス性 (monosynaptic) の単一ニューロン由来のシナプス電流 (unitary synaptic current) を測定することができ、シナプス伝達効率がどのように変化するかをより直接的に観測することができる。記録される

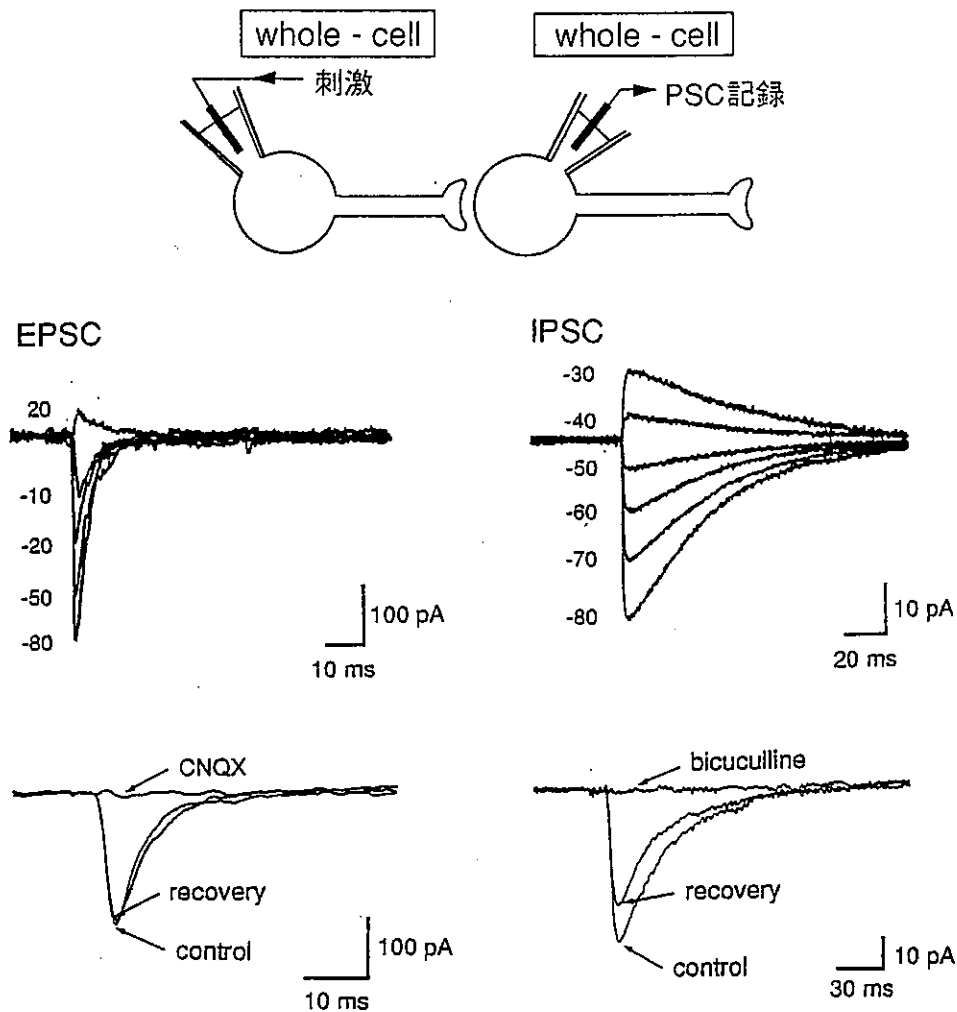


図1 興奮性シナプス後電流 (EPSC) と抑制性シナプス後電流 (IPSC) の同定。2個の培養海馬ニューロンを2本のパッチ電極で共にホールセル・クランプし、一方のニューロンを刺激し、他方のニューロンよりシナプス後電流を測定する。EPSCとIPSCは、その decay の速さ、逆転電位、阻害剤の効果の違いにより容易に区別することができる。

シナプス電流には、グルタミン酸作動性の興奮性シナプス電流 (EPSC) とGABA作動性の抑制性シナプス電流 (IPSC) の2種類があるが、両者は、時間経過、逆転電位、阻害剤の効果の違いにより容易に区別することができる (図1)。

DSIは、シナプス後ニューロンの膜電位を -80 mV から 0 mV に5秒間脱分極させることで誘導する (図2A)。DSIの発現は抑制性シナプスの約4~5割でのみ見られる (図2B)。以下の文章では、DSIの起こるシナプスをDSI(+)シナプス、DSIの起こらないシナプスをDSI(-)シナプスと表現している。

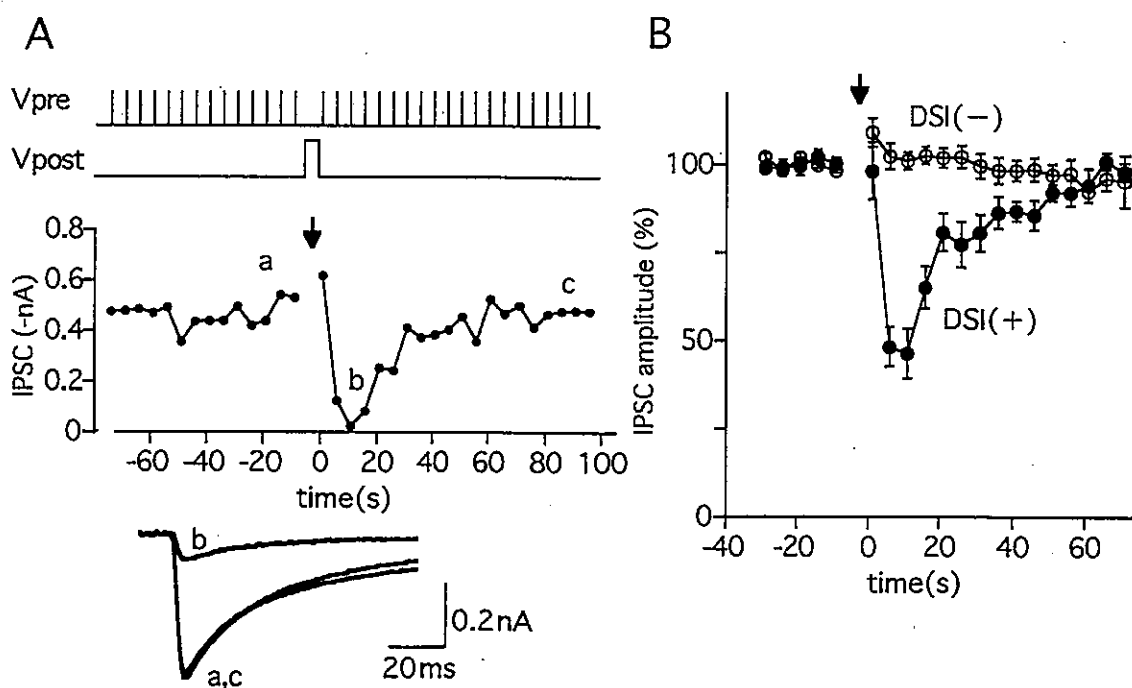


図2 DSIの時間経過。A: 海馬培養ニューロンで観察されたDSIの一例。縦軸はIPSCの振幅、横軸は時間。VpreおよびVpostはそれぞれシナプス前ニューロンとシナプス後ニューロンの膜電位を示している。↓の時点で、シナプス後ニューロンの膜電位を5秒間 0 mV まで脱分極させた。a-cの時点でのIPSCの波形を下に示す。B: 約5割の抑制性シナプスではDSIが起こり (DSI(+))、残りのシナプスではDSIは起こらなかった (DSI(-))。グラフは各群のIPSC振幅の時間経過を平均したもの。

(4) 研究結果

シナプス後ニューロンの脱分極による細胞内 Ca 濃度上昇が DSI を誘導する

DSI の誘導にはシナプス後ニューロンの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が必要であることは、すでに海馬スライス標本を用いた研究により報告されている。そこで、それを確かめるために、まず、脱分極による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の時間経過を調べた。細胞内 Ca^{2+} 濃度は Ca^{2+} 蛍光指示薬である Fura-2 を用い、光学的方法を用いて測定した。ニューロンを 5 秒間脱分極させると、細胞内 Ca^{2+} 濃度は一過性に上昇し、それとほぼ同じ時間経過で DSI が発生した (図 3)。また、細胞内に高濃度の

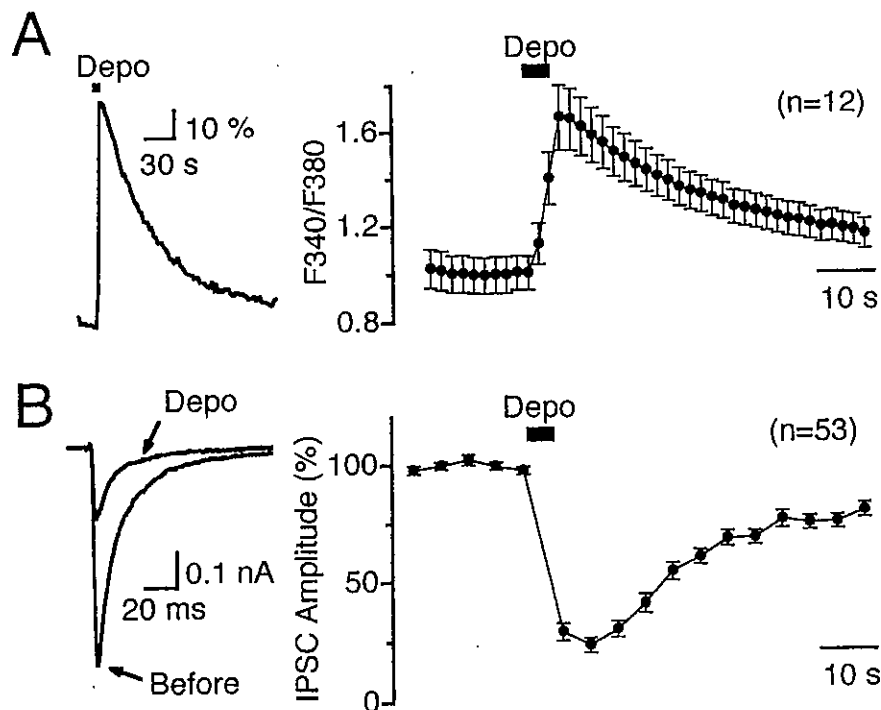


図 3 シナプス後ニューロンの脱分極により生ずる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇 (A) および DSI (B) の時間経過の比較。A : 5 秒間の脱分極 (0 mV) により引き起こされる細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を Fura-2 の蛍光強度の変化として測定したもの。縦軸は 2 波長 (340 nm と 380 nm) の励起光による蛍光強度の比を表している。左は 1 例、右は 12 例の平均。B : 左は、DSI の一例を示す脱分極前後の IPSC 波形を重ね合わせたもの。右は、DSI の起こったもの 53 例について IPSC 振幅の変化を平均したもの。

BAPTA (Ca²⁺ キレート剤) を注入すると、DSI は完全に阻害された (図 4)。したがって、シナプス後ニューロンの脱分極はそのニューロン内の Ca²⁺ 濃度上昇をもたらし、それが DSI の誘導に必須であることが確かめられた。

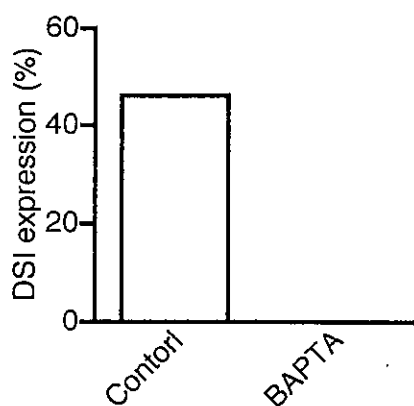


図 4
細胞内 BAPTA による DSI の阻害。シナプス後ニューロン側のパッチ電極内液として 5 mM EGTA を含む液を用いた場合 (control) と 30 mM BAPTA を含む液を用いた場合 (BAPTA) の DSI の発生頻度。細胞内に高濃度の BAPTA が存在する場合は DSI は全く生じなかった。

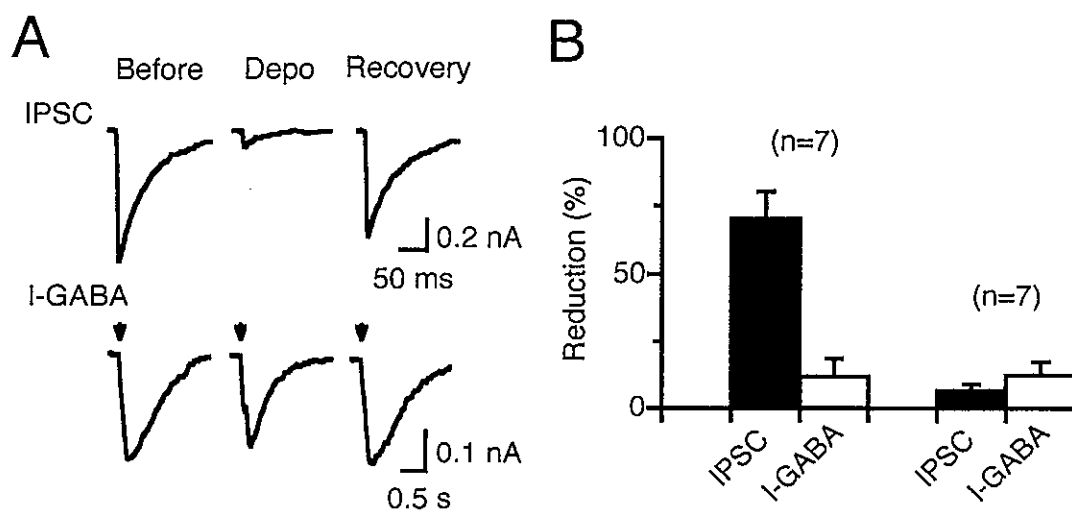


図 5 DSI発生中のGABA応答性の変化。A: DSI(+)-シナプスを用い、DSI発生中にシナプス後ニューロンのGABA応答性 (I-GABA) が変化するかどうか調べた。IPSC の顕著な減少に対し、GABA応答性はわずかしか低下しなかった。B: 脱分極によるIPSC およびGABA応答性の低下の度合いを、DSI(+)-シナプス (左) とDSI(-)-シナプスで調べた結果をまとめたもの。

DSIはシナプス前終末からの伝達物質の放出による

IPSCの抑制には二つの原因が考えられる。一つはシナプス前終末からの伝達物質放出の抑制であり、他方はシナプス後ニューロンのGABA応答性の低下である。そこで、それを確かめるために、シナプス後ニューロンのGABA応答性がDSI発生時にどのように変化するかを調べた。

7個のDSI(+)ペアと7個のDSI(-)ペアを用いて、シナプス後ニューロンにGABAを電気泳動的に投与し、そのニューロンより記録されるGABA電流を測定した。DSI(+)ペアでは、シナプス後ニューロンの脱分極によりIPSCの振幅は約70%低下するのに対し、GABA電流は約10%しか低下しなかった(図5A、図5B左)。一方、DSI(-)ペアでは、シナプス後ニューロンの脱分極によりIPSCの振幅はほとんど変化せず、GABA電流は約10%低下した(図5B右)。

以上の結果は、DSIで見られるIPSCの抑制は、シナプス後ニューロンのGABA応答性の低下によるのではなく、シナプス前終末からの伝達物質放出の抑制によることを示す。したがって、DSIではシナプス後ニューロンから何らかの因子が放出され、それがシナプス前終末に作用し、そこからの伝達物質の放出を抑制すると考えられる。

DSIは周りのシナプスにも伝播する

DSIの発現に、シナプス後ニューロンより放出されシナプス前終末に作用する何らかの因子(逆行性伝達物質)が介在するならば、その逆行性伝達物質が拡散し、周りのシナプスに作用する可能性が考えられる。そこでその可能性を検証するために、図6に示されているようなシナプス前ニューロンが自分自身にシナプス(オートプス)を形成しているニューロン・ペアを用いて実験を行った。後ニューロンで記録されるIPSCとシナプス前ニューロンのオートプスで記録される電流(IAC, inhibitory autaptic current)を同時記録し、それらがシナプス後ニューロンの脱分極によりどのように変化するかを調べた。

IPSCがシナプス後ニューロンの脱分極により一過性に抑制されるペア(DSI(+))ペア、n=38)と抑制されないもの(DSI(-)ペア、n=70)についてIACの振幅の変

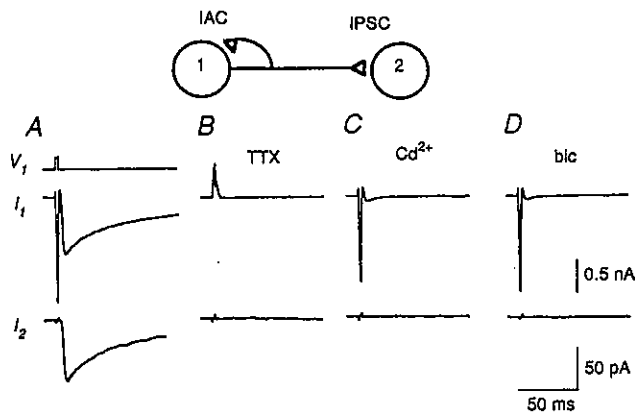


図 6

DSIの伝播を調べる実験に用いたニューロン・ペアの結合様式。シナプス前ニューロン (1) は、シナプス後ニューロン (2) 上に抑制性シナプスを形成し、さらに、自分自身の上にもシナプスを形成している。シナプス前ニューロンを刺激し、そのニューロンより抑制性オータプス電流 (IAC) を、そして、シナプス後ニューロンより抑制性シナプス後電流 (IPSC) をそれぞれ記録する。両者は、テトロドトキシン (TTX)、カルシウムチャネル阻害剤 (Cd^{2+})、GABA受容体阻害剤 (bic) で阻害される。

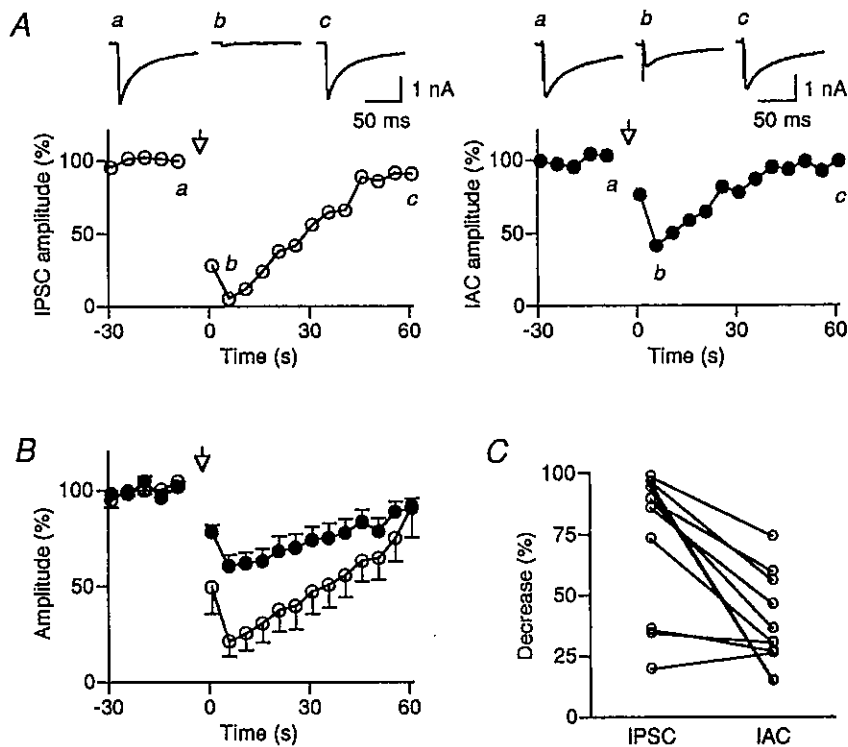


図 7 DSI の伝播。A : IAC に一過性抑制 (DSI の伝播) の見られた一例。シナプス後ニューロンの脱分極は、そのニューロン上のシナプス電流 (IPSC) を抑制するのみならず、脱分極していないニューロン上のシナプス電流 (IAC) をも抑制させた。B : IPSC の一過性抑制 (DSI) および IAC の一過性抑制 (DSI の伝播) の時間経過の比較。C : IPSC および IAC の脱分極による抑制の大きさの比較。

化を観察した。その結果、DSI (+) ペアの約 3 割 (n=11) において IAC の一過性抑制が観察された (図 7)。DSI (+) ペアの残りの約 7 割では IAC の振幅は変化しなかった (図 8 A)。一方、DSI (-) ペアでは、すべての場合において IAC 振幅に変化は見られなかった (図 8 B)。IAC の一過性抑制の見られたニューロン・ペアを用いて、さらに、脱分極持続時間依存性およびホルボールエステル (PK-C 活性化薬) の効果について調べた。その結果、IAC の一過性抑制と IPSC の一過性抑制 (DSI) とは同じ脱分極持続時間依存性を示し (図 9)、また両者ともホルボール

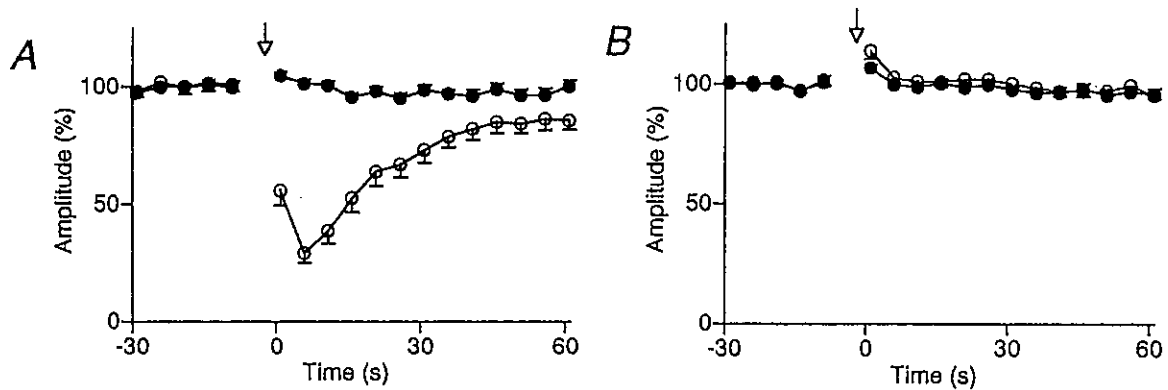


図 8 DSI および DSI 伝播の見られなかった例。A : DSI(+)シナプスの約 7 割では DSI の伝播は見られなかった。脱分極による IPSC (白丸) および IAC (黒丸) の振幅の変化を 27 例について平均したもの。B : DSI(-)シナプスでは IAC の一過性抑制は全く見られなかった。脱分極による IPSC (白丸) および IAC (黒丸) の振幅の変化を 15 例について平均したもの。

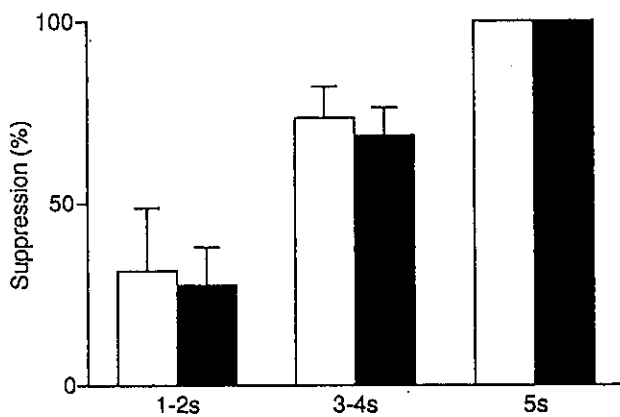


図 9 DSI および DSI 伝播の脱分極持続時間依存性。シナプス後ニューロンの脱分極による IPSC および IAC の抑制の大きさを脱分極持続時間を変えて調べた。5 秒間脱分極させた時の抑制の大きさを 100% として表わしている。

エステルにより阻害された (図 10)。したがって、両者は同様のメカニズムによる可能性が高いと結論された。

DSIの伝播を説明するいくつかのモデルを図 11 に示す。最もシンプルなモデルは、DSI に関与する逆行性伝達物質が拡散し、周りのシナプスにも作用し、そこでのシナプス伝達を抑制するというものである (図 11A)。

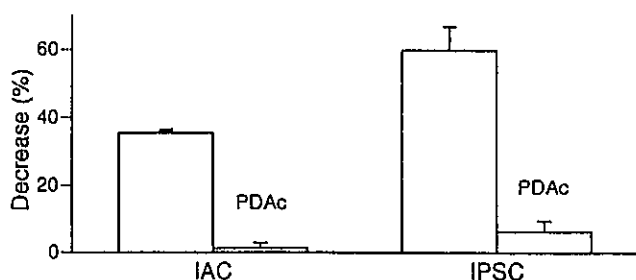


図 10 DSI および DSI 伝播のホルボールエステルによる抑制。脱分極による IPSC および IAC の抑制の大きさを、ホルボールエステル (PDAc) 投与の前後で比較したもの。

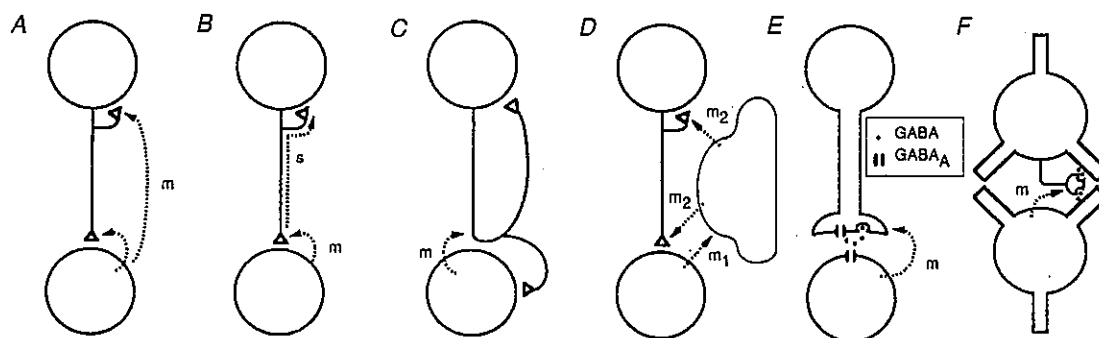


図 11 DSI の伝播の仮説。DSI の伝播を説明する 6 つの仮説。A: 逆行性伝達物質が拡散する。B: シナプス前終末部で受け取った抑制シグナルが軸索を伝播する。C: 逆行性伝達物質が軸索に作用し conduction block を起こす。D: シナプス後ニューロンより放出された因子 (m1) がグリアに作用し、グリアより第二の因子 (m2) が放出される。E: 測定している IAC にシナプス前終末部の GABA_A 受容体による autoreceptor current が含まれている。F: IPSC と IAC が同じシナプス前終末部 (multiple-synapse bouton) からの伝達物質の放出により発生する。

カンナビノイド受容体アゴニストはGABA放出を抑制する

近年、内在性カンナビノイドが神経調節因子として働いている可能性を示唆する報告が相次いだ。カンナビノイド受容体（CB1受容体）は脳内に広く分布しており、特に海馬の抑制性シナプス前終末部に密に存在していることが知られている。また、細胞内Ca濃度上昇により、内在性カンナビノイドがニューロン内で合成され、細胞外に放出されることが報告された。したがって、DSIに関与する逆行性伝達物質が内在性カンナビノイドである可能性は十分に高く、その可能性について検討した。

まず、CB1受容体の活性化によりGABAの放出が抑制されるかどうか調べた。実験には抑制性シナプスを形成しているニューロン・ペアを用い、IPSCに対するCB1受容体アゴニストであるWIN55,212-2（WIN）の効果を調べた。その結果、WINは約6割のペアにおいてIPSCを抑制し（図12A）、残りのペアでは無効である（図12B）ことが判明した。一方、GABAB受容体アゴニストであるバクロフェンは、すべてのペアにおいてIPSCを抑制した（図12）。

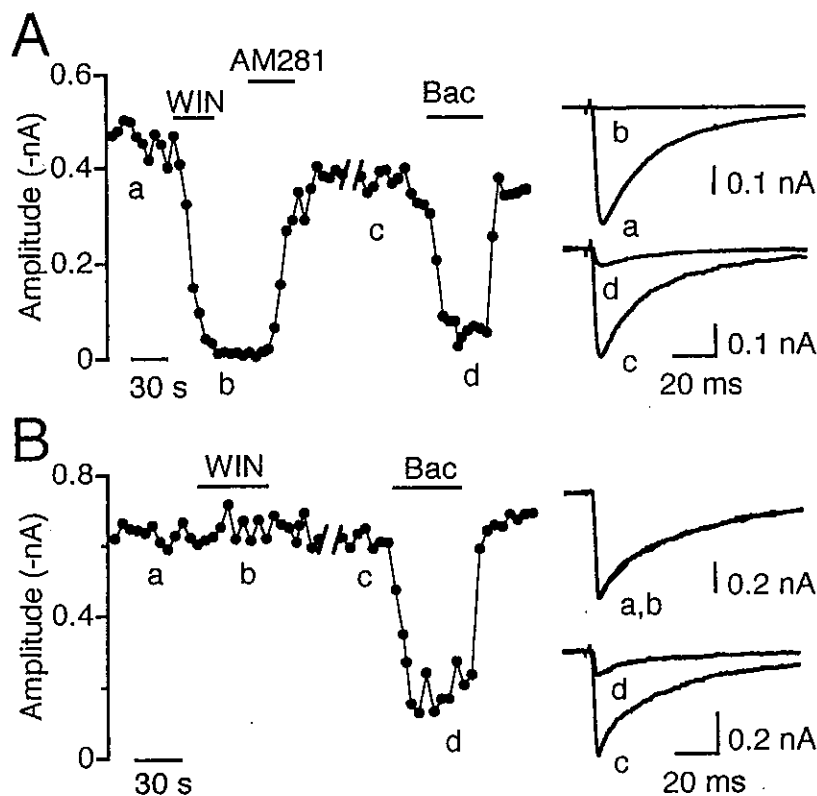


図12
IPSCに対するWINの効果。左は、IPSC振幅を時間に対してプロットしたものの。右は、各時点でのIPSC波形。A：約6割の抑制性シナプスでは、WINによるIPSCの抑制が見られた。B：残りの約4割の抑制性シナプスでは、WINによるIPSCの抑制は見られなかった。

このWINによるIPSCの抑制がシナプス前終末部からのGABAの放出の抑制によることは、以下の3つの実験により確かめられた。第一に、WINに対する感受性がシナプス前ニューロンに依存していることが、図9に示されているようなペアを用いた実験により示された。個々のニューロン・ペアについて、IPSCとIACに対するWINの効果を調べたところ、IPSCがWIN感受性であった場合は常にIACもWIN感受性であり、逆にIPSCがWIN非感受性であった場合は常にIACもWIN非感受性であった(図13)。第二に、シナプス前終末からの伝達物質放出の変化の指標として一般に用いられている paired-pulse ratio (PP比) が、WINによるIPSC抑制時に上昇することが示された(図14)。第三に、シナプス後ニューロンのGABA応答性はWINにより影響されないことが確かめられた(図15)。以上の結果より、WINはシナプス前終末部からのGABA放出を抑制すると考えられた。

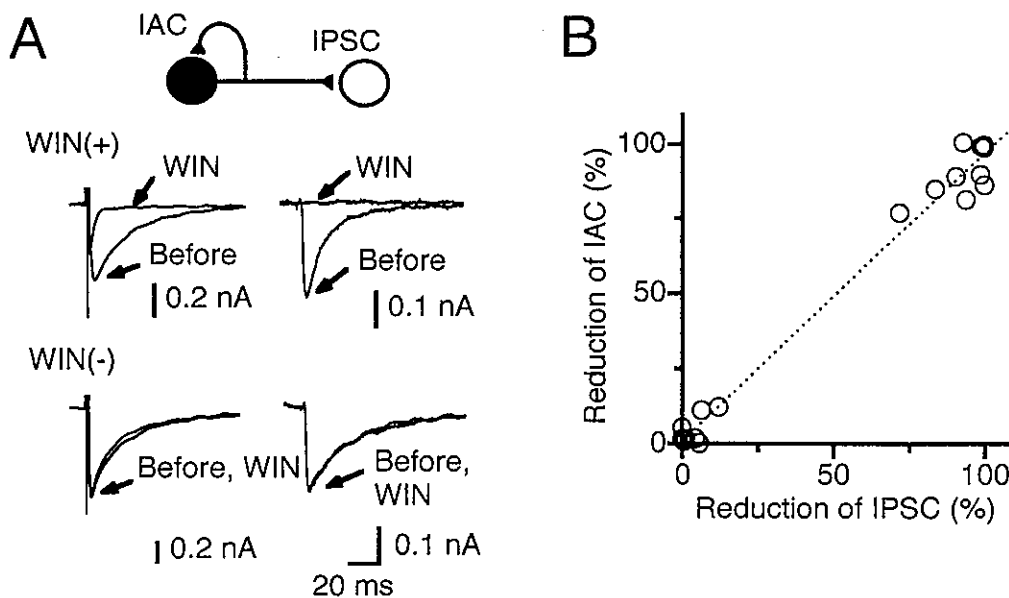


図13 IPSC および IAC に対する WIN の効果。A : WIN による IPSC の抑制の見られたペアでは常に IAC も抑制された(上)。一方、WIN による IPSC の抑制の見られなかったペアでは常に IAC も抑制されなかった(上)。B : WIN による IPSC (横軸) および IAC (縦軸) の抑制の大きさをプロットしたもの。

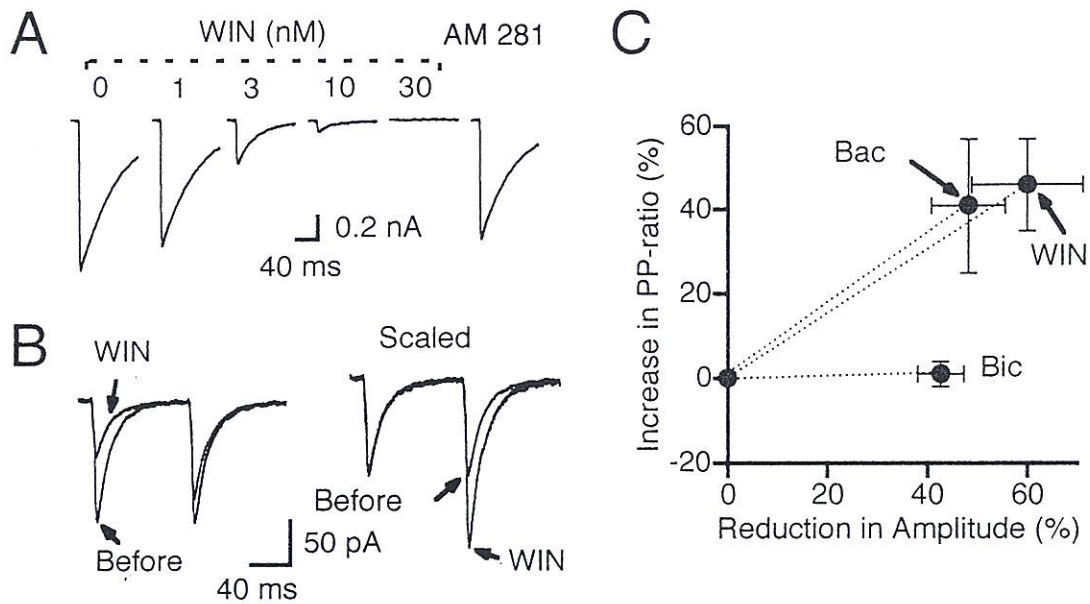


図 1 4 WIN による IPSC の抑制に伴う paired-pulse ratio (PP比) の変化。A : WIN の IPSC 抑制効果の濃度依存性。1-3 nM WIN により IPSC の振幅は半減した。したがって、PP比の変化を調べる以下の実験 (B, C) では1-3 nM WIN を使用した。B : WIN による PP比の上昇の見られた一例。WIN 投与前後の IPSC 波形を重ね合わせている。右側のトレースは、1 発目の IPSC の大きさを揃えて表示している。C : WIN、baclofen (GABA_Bアゴニスト)、bicuculline (GABA_Aアンタゴニスト) による IPSC 振幅の減少と PP比の上昇の大きさをプロットしたもの。伝達物質の放出を抑制する baclofen では PP比は上昇し、シナプス後ニューロンの GABA 応答性を低下させる bicuculline では PP比は変化していないことに注意。

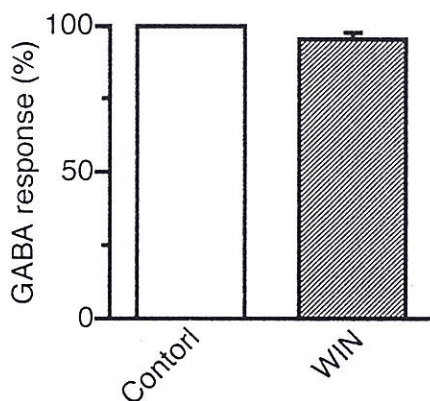


図 1 5 WIN はシナプス後ニューロンの GABA 応答性には影響しない。シナプス後ニューロンの GABA 応答性を WIN 投与前後で比較したもの。

DSI 発現の有無とWIN感受性の有無との間に相関が見られる

抑制性シナプスにはDSIの起こるもの (DSI(+)) と起こらないもの (DSI(-)) とが存在し、また、WINによるIPSCの抑制の見られるもの (WIN感受性(+)) と見られないもの (WIN感受性(-)) とが存在することはすでに述べた。そこで、今度は両者の間に相関がみられるかどうか検討した。抑制性シナプスを形成しているニューロン・ペア26個について、DSIが起こるかどうか、およびWINによりIPSCが抑制されるかどうかを調べた。その結果、DSI(+)ペア12個のすべてがWIN感受性(+)であった (図16A)。また、DSI(-)ペア14個の大半 (10個) がWIN感受性(-)であり (図16C)、WIN感受性(+)であるもの (図16B) はわずか4ペアであった。WIN感受性(-)ペア、すなわちそのシナプス前終末部にカンナビノイド受容体が発現していないと思われるシナプスでは、DSIは起こらないという結果は、DSIの逆行性伝達物質が内因性カンナビノイドであるという仮説に合致している。

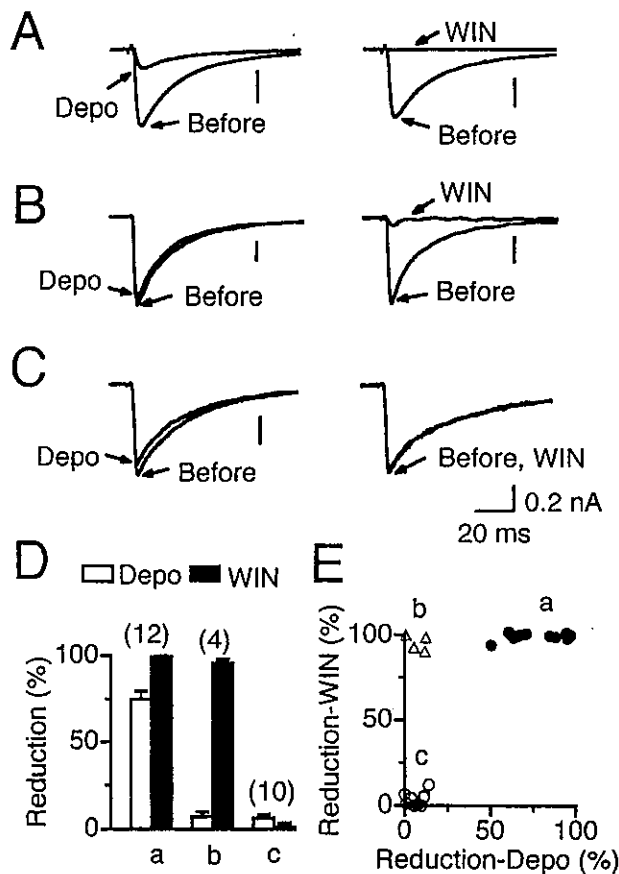


図16
各抑制性シナプスのDSI発現能とWIN感受性との間の相関。A: DSI(+)かつWIN感受性(+)シナプスの例。シナプス後ニューロンの脱分極前後(左)およびWIN投与前後(右)のIPSC波形を重ね合わせたもの。B: DSI(-)でWIN感受性(+)シナプスの例。C: DSI(-)かつWIN感受性(-)シナプスの例。D: 各群のDSIおよびWINによるIPSC抑制の大きさの平均。E: 各抑制性シナプスでのDSIの大きさ(横軸)とWINによるIPSC抑制の大きさ(縦軸)をプロットしたもの。

DSIの逆行性伝達物質は内因性カンナビノイドである

DSIの逆行性伝達物質が内因性カンナビノイドであるかどうかをより直接的に検証するために、カンナビノイド受容体アンタゴニスト（AM281およびSR141716A）の効果を調べた。DSI(+)ペアを用い、まずDSIがくり返し誘導可能であることを確かめた（図17A）。次に、DSIが起こることを確認した後に、AM281（図17B）あるいはSR141716A（図17C）を投与すると、DSIは完全に阻害された。以上の結果より、DSIの逆行性伝達物質が内因性カンナビノイドであることが証明された。

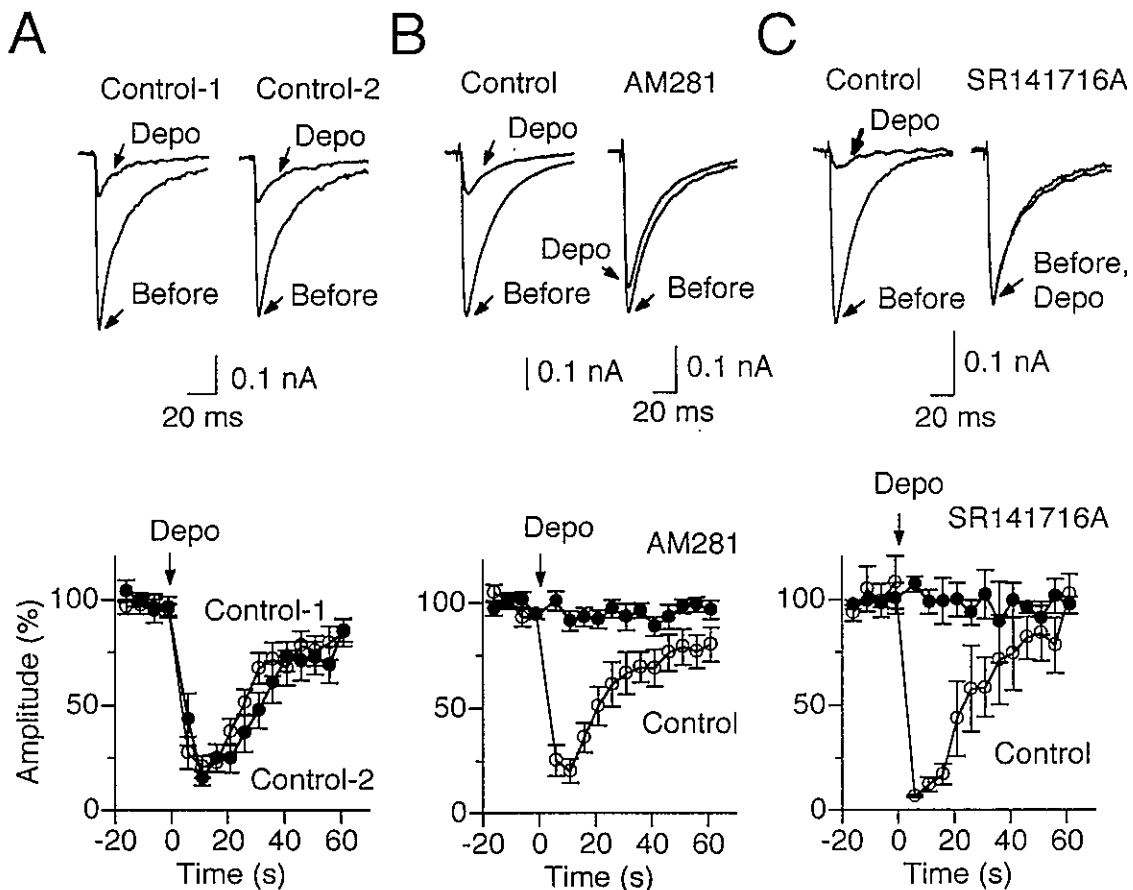


図17 カンナビノイド受容体アンタゴニスト（AM281、SR141716）によるDSIの阻害。A：DSIを2回連続して発生させた例（左）および1回目と2回目のDSIの時間経過を10例について平均したもの（右）。B：AM281投与前後のDSIの例（左）およびそれぞれのDSIの時間経過を11例について平均したもの（右）。C：SR141716投与前後のDSIの例（左）およびそれぞれのDSIの時間経過を3例について平均したもの（右）。

代謝型グルタミン酸受容体およびGABA_B受容体はDSIに関与しない

スライス標本を用いたDSIの研究により、DSIに関与する逆行性伝達物質がグルタミン酸である可能性が示唆されている。そこで、その可能性を検討するために、DSIに対する代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) アンタゴニストの効果を調べた。その結果、group I/II-mGluRのアンタゴニストであるMCPG、mGluR5選択的アンタゴニストであるMPEP、group III-mGluRのアンタゴニストであるCPPGはいずれもDSIを阻害しなかった (図18)。また、GABA_B受容体アンタゴニストであるCGP55845Aも無効であった (図18)。

以上の結果より、DSIに関与する逆行性伝達物質はグルタミン酸でもGABAでもないと結論した。

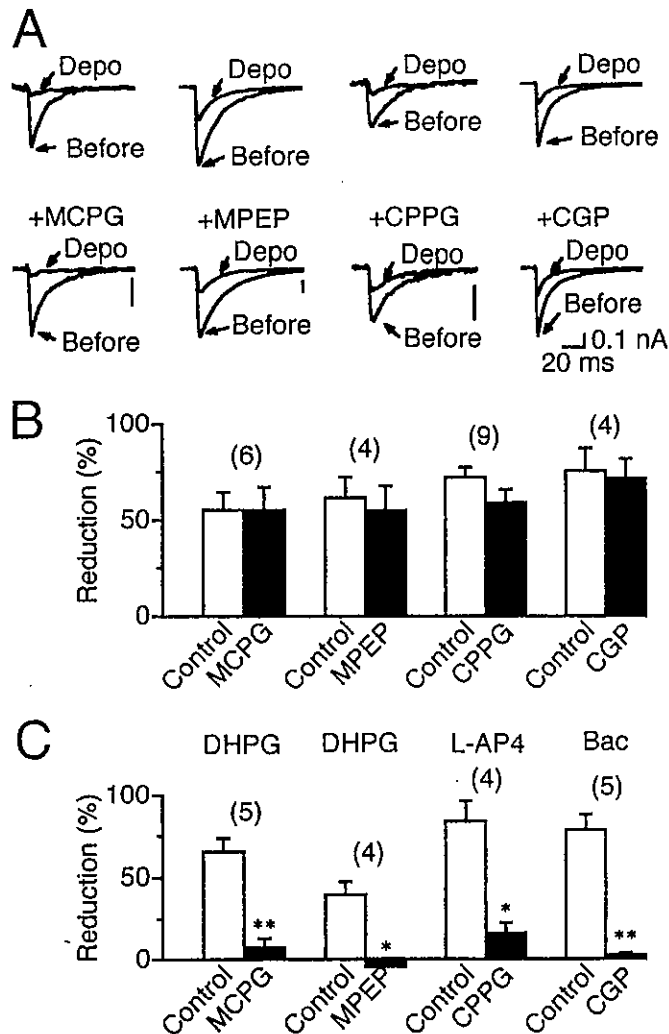


図18 DSIはmGluRおよびGABA_Bアンタゴニストでは阻害されない。A、B:mGluRアンタゴニスト(MCPG、MPEP、CPPG)およびGABA_Bアンタゴニスト(CG55845A)投与前後のDSIの例(A)およびDSIの大きさの平均値(B)。C:各受容体アンタゴニストは対応する受容体アゴニスト(DHPG、L-AP4、baclofen)の作用を阻害する。

シナプス後ニューロンの活動電位の連発はDSIを誘導する

これまでの実験では、シナプス後ニューロンを5秒間0 mV に脱分極させDSIを誘導させた。しかし、生理的条件下では、シナプス後ニューロンが数秒間0 mV まで脱分極することはまず起こり得ない。そこで、より生理的な条件でDSIを誘導することを試みた。その結果、シナプス後ニューロンに活動電位を連続的に発生させるとDSIが誘導されることが判明した（図19A）。また、この活動電位の連発で誘導されるDSIも、カンナビノイド受容体アンタゴニストによりそがいされることから、同じメカニズムによることが確かめられた（図19B）。

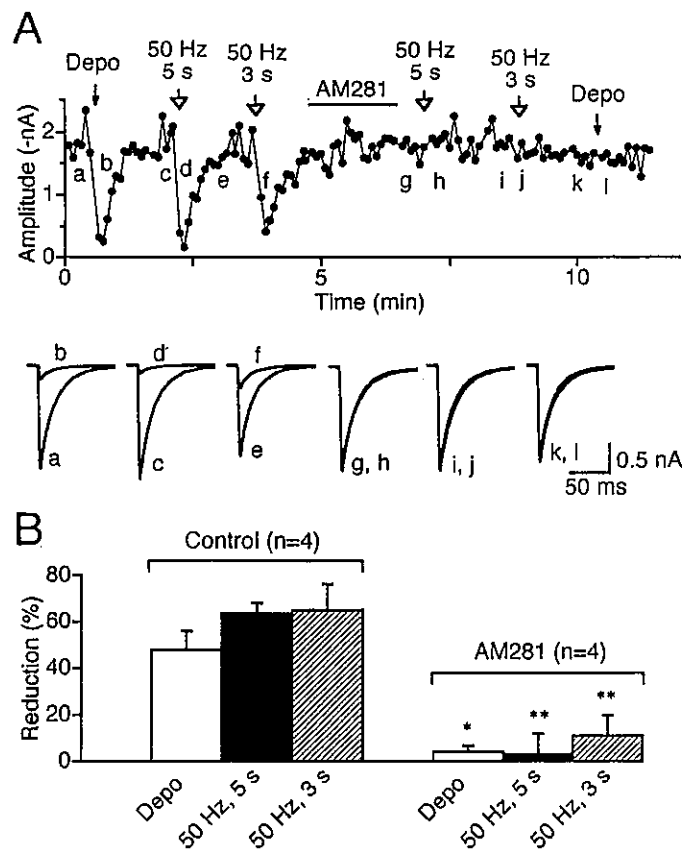


図19 DSIはシナプス後ニューロンの活動電位の連発により誘導される。A：シナプス後ニューロンの持続的脱分極（Depo）および活動電位の連発（50 Hz, 5 s および 3 s）により誘導されたDSIの例。下のトレースは各時点で得られたIPSCの波形。B：AM281投与前後の各条件で誘導されたDSIの大きさ。

DSIメカニズムのモデル

以上の結果より、脱分極によりGABAの放出が抑制されるというDSIのメカニズムとして次のようなモデルが考えられる（図20）。

- (1) 海馬ニューロンを脱分極させると、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが開き、細胞外の Ca^{2+} が細胞内に流入し、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇する。
- (2) 細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇により内因性カンナビノイドの合成が促進され、それがシナプス後ニューロンより放出される。
- (3) 放出された内因性カンナビノイドはすぐ近くの、あるいは周囲の抑制性シナプス前終末部のカンナビノイド受容体を活性化し、おそらく電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを抑制することにより、そこからの伝達物質GABAの放出を抑制する。

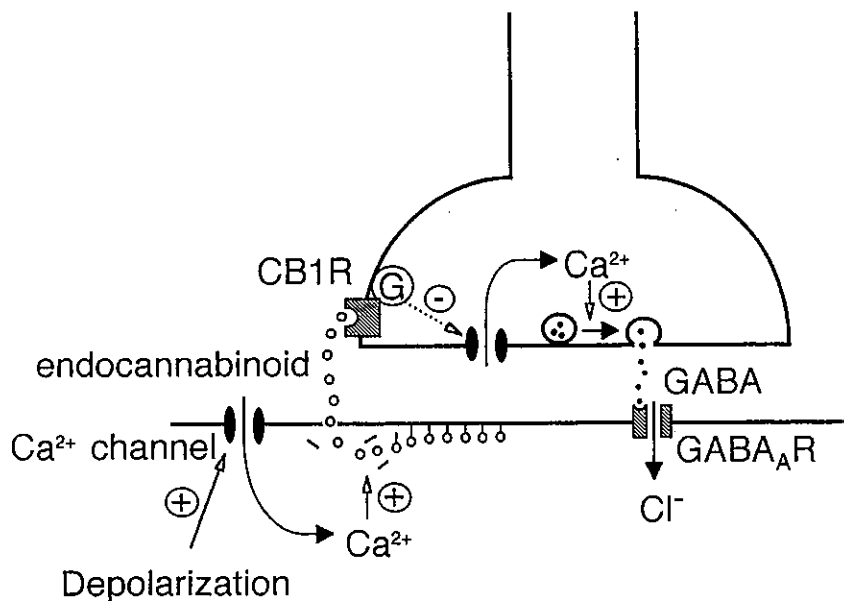


図20 DSIメカニズムのモデル。ニューロンの脱分極により電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが活性化し、それにより生ずる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は次に内因性カンナビノイドの合成および放出を促進する。放出された内因性カンナビノイドはシナプス前終末部のカンナビノイド受容体を活性化し、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの抑制を介してGABAの放出を抑制する。

(5) 今後の展開

本研究では、海馬の抑制性シナプスを用い、シナプス後ニューロンの活動に依存したシナプス伝達の調節に、内因性カンナビノイドを介した逆行性シグナルが重要な役割を担っていることを明らかにした。しかし、カンナビノイド受容体は脳に広く分布し、また、そのアゴニストは様々な伝達物質の放出を抑制することが知られている。したがって、内因性カンナビノイドによる活動依存的な伝達調節は、脳のさまざまな領域のさまざまなシナプスにおいて見られる一般的な現象である可能性がある。今後は、海馬の興奮性シナプスや脳の他の領域の興奮性および抑制性シナプスについても同様の現象が見られるかどうかを明らかにする。また、内因性カンナビノイドはどのような生理的条件において放出されるのか検討し、その生理的意義を解明する。