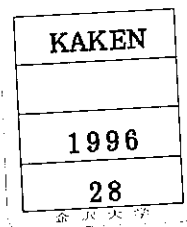


ニューロンの細胞内エネルギーレベル感受性イオンチャンネルの役割

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2020-02-21 キーワード: 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00056874

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





ニューロンの細胞内エネルギーレベル 感受性イオンチャネルの役割

課題番号 07670051

平成7年度～平成8年度科学研究費補助金（基盤研究C）
研究成果報告書

平成9年3月

研究代表者 少作隆子
(金沢大学医学部第二生理)

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	… 5
(4) 研究結果	… 6
(5) 今後の展開	… 2 4
4. 添付抄録 (学会発表)	
(1) 第4回IBRO神経科学国際会議発表演題抄録	… 2 5
(2) 第73回日本生理学会大会発表演題英文抄録	… 2 6
(3) 同上演題予稿集抄録	… 2 7
(4) 第74回日本生理学会大会発表演題予稿集抄録	… 2 7
5. 添付論文 (発表論文)	
(1) Brain Res. 705 (1995) 337-340	… 2 9
(2) Neurosci. Lett. 207 (1996) 195-198	… 3 5

1. はしがき

この冊子は、平成7年度および8年度の科学研究費補助金・基盤研究（C）「ニューロンの細胞内エネルギーレベル感受性イオンチャネルの役割」（研究課題番号07670051）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

細胞内エネルギーレベルにきわめて敏感なKチャネル（ATP感受性Kチャネル）は、膵 β 細胞、血管平滑筋、ニューロンなどに分布しており、膵 β 細胞では、このチャネルは血糖値とインシュリン分泌とを連結させる重要な役割を果たしていることが知られている。しかし、ニューロンにおいては、このチャネルの役割は未だ不明であった。我々は、このチャネルが確かにニューロンにも存在し、ニューロンの活動に影響を及ぼしうることをすでに見い出しており、このチャネルが何らかの役割を担っている可能性はきわめて高いと思われた。

本研究は、ニューロンにおけるATP感受性Kチャネルの役割を明らかにする目的で始められた。我々は、まず、脳虚血時に見られる様々な神経活動変化に、このチャネルがどのように関わっているのかに的をしぼった。in vivo で見られる脳虚血時の神経活動変化をin vitro の培養系で再現し、その過程におけるATP感受性Kチャネルの関与について検討した。また、虚血時の神経活動の変化のメカニズムについても検討を加えた。

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）

山本長三郎（金沢大学医学部第二生理・教授）

研究経費

平成7年度 1800千円

平成8年度 300千円

計 2100千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. Ohno-Shosaku, T. and Yamamoto, C., Effects of metabotropic glutamate receptor agonists on excitatory and inhibitory transmissions in cultured rat hippocampal neurons, Brain Res. 705 (1995) 337-340
2. Ohno-Shosaku, T., Kim, I., Sawada, S. and Yamamoto, C., Presence of the voltage-gated potassium channels sensitive to charybdotoxin in inhibitory presynaptic terminals of cultured rat hippocampal neurons, Neurosci. Lett. 207 (1996) 195-198
3. Ohno-Shosaku, T. and Yamamoto, C., Presence of voltage-gated potassium channels sensitive to charybdotoxin in excitatory and inhibitory presynaptic terminals of cultured rat hippocampal neurons, Jpn. J. Physiol. 46S (1996) S87

(2) 口頭発表

1. Ohno-Shosaku, T., Sawada, S. and Yamamoto, C., Presynaptic modulations of glutamatergic and GABAergic transmissions in rat cultured hippocampal neurons, Fourth IBRO world congress of neuroscience, 1995年7月9-14日
2. 少作隆子、山本長三郎。培養海馬ニューロンのシナプス伝達に対するCa依存性Kチャンネル阻害剤の効果。第73回日本生理学会大会1996年4月3-5日
3. 少作隆子、澤田さつき。培養海馬ニューロンのDSIIにおける逆行性伝達物質の関与。第74回日本生理学会大会1997年3月26-28日

3. 研究成果

(1) 研究の背景

ATP感受性Kチャンネルは、膵β細胞、血管平滑筋、ニューロンなどに分布している。膵β細胞では、このチャンネルは血糖値とインシュリン分泌とを連結させる重要な役割を果たしている。血管平滑筋では、このチャンネルは低酸素による血管拡張に関与している。しかし、ニューロンにおいては、このチャンネルの役割は未だ不明である。

我々はこれまでに、膵β細胞のものと同様のATP感受性Kチャンネルがニューロンにも存在することを single-channel レベルで証明し、さらに、このチャンネルが細胞体のみならずシナプス終末部にも存在し、シナプス伝達を調節しうることを示してきた。これらの結果は、ニューロンのATP感受性Kチャンネルが、ニューロンの興奮性およびシナプス伝達効率の調節に関与している可能性を強く示唆している。モルヒネ様物質による鎮痛作用がATP感受性Kチャンネルの阻害剤により抑制されるという報告は、この可能性を支持する。

このチャンネルの役割のもう一つの可能性は、脳虚血に関したものである。脳は虚血にきわめて弱い組織であり、脳虚血により、シナプス伝達の低下からニューロンの死に至るまでの様々な変化が引き起こされる。ATP感受性Kチャンネルに作用する薬剤が、これらの過程の少なくとも一部に影響を及ぼすことが見い出され、脳虚血の一連の変化にこのチャンネルが関与している可能性は高い。

(2) 研究目的

本研究の目的は、脳虚血時に見られる様々な神経活動変化に、ATP感受性Kチャンネルがどのように関わっているのかを明らかにすることである。そのため、我々はまず、in vivo で見られる脳虚血時の神経活動変化をin vitro の培養系で再現することを試みた。次に、この系を用いて、虚血時の変化の過程でATP感受性Kチャンネルがどのような役割を担っているのかを調べた。さらに、虚血時の神経活動の変化のメカニズム全体についても検討を加えた。

(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したものをを用いた。海馬ニューロンを用いたのは、海馬が虚血による変化の顕著な部位であることがよく知られていたからである。生後1-3日目のラットの海馬を取り出し、細かく刻んだ後にトリプシン処理をし、ろ過により組織塊を除いた後に、ポリリジン処理された培養皿に単離細胞を移し、ダルベッコ変法MEM液中で培養し、培養1-2週間のニューロンを実験に用いた。

ニューロンの神経活動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 whole-cell clamp する” double whole-cell clamp” 法 (図1) を用いた。この方法では、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。シナプス伝達効率の指標としては、シナプス後電流の振幅を用いた。また、グルタミン酸作動性興奮性シナプス後電流 (EPSC_{Glu}) と GABA 作動性抑制性シナプス後電流 (IPSC_{GABA}) は、その波形、逆転電位、および薬剤感受性の違いにより、容易に同定することができた (図2)。

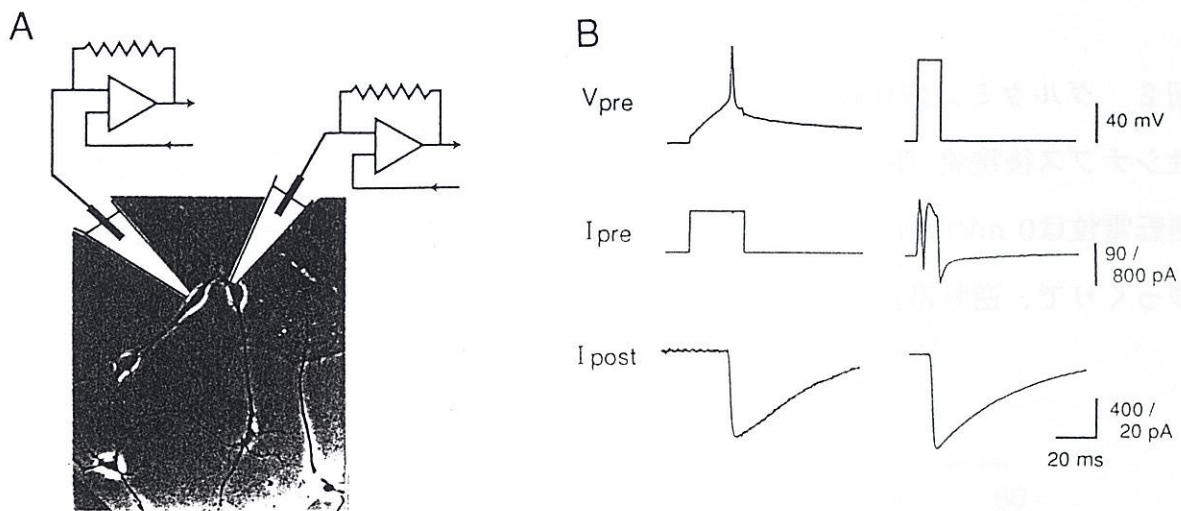


図1 double whole-cell clamp 法。 2個のニューロンをパッチ電極で whole-cell clamp し、一方のニューロンに電流パルスあるいは電圧パルスをかけ活動電位を発生させ、他方のニューロンからシナプス後電流を測定する。

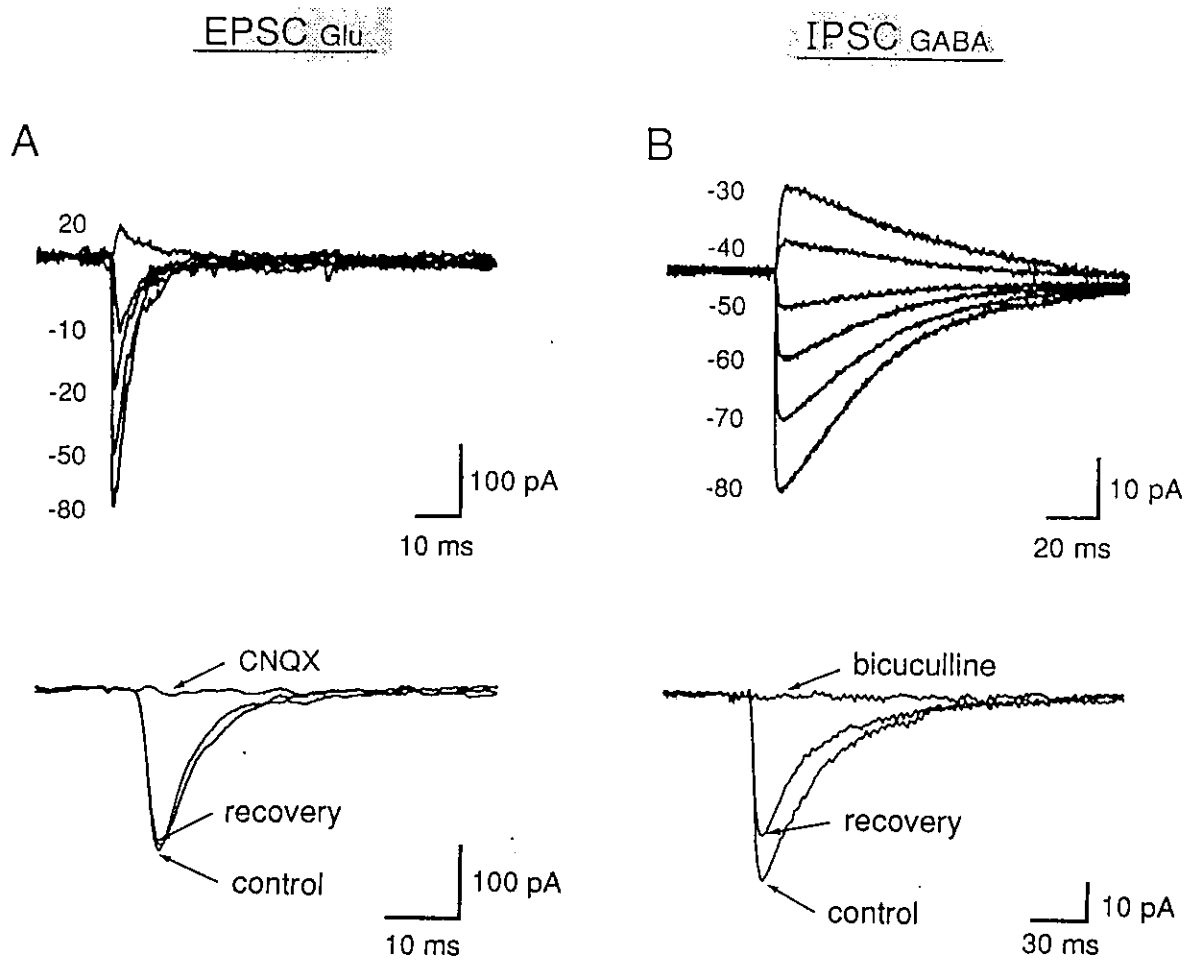


図2 グルタミン酸作動性興奮性シナプス後電流 (EPSC_{Glu}) とGABA作動性抑制性シナプス後電流 (IPSC_{GABA}) の同定。A: EPSC_{Glu}の一例。電流のdecayが速く、逆転電位は0 mV付近で、CNQXで阻害される。B: IPSC_{GABA}の一例。電流のdecayがゆっくりで、逆転電位は-45 mV付近で、bicucullineで阻害される。

(4) 研究結果

無酸素・無グルコース処理によるシナプス伝達の低下

虚血の代わりとして無酸素・無グルコース液を灌流すると、10-20分後にシナプス後電流の急激な低下が起こった(図3)。この変化は、ある程度は可逆的で

あり、また繰り返し起こすことが可能であった。無酸素・無グルコース処理によるシナプス伝達の低下は、興奮性シナプスに比べ、抑制性シナプスにおいてより顕著であった。シナプス後電流の振幅が約半分になるのに必要な時間は、抑制性シナプスでは約17分である(図4)のに対し、興奮性シナプスでは約30分であった

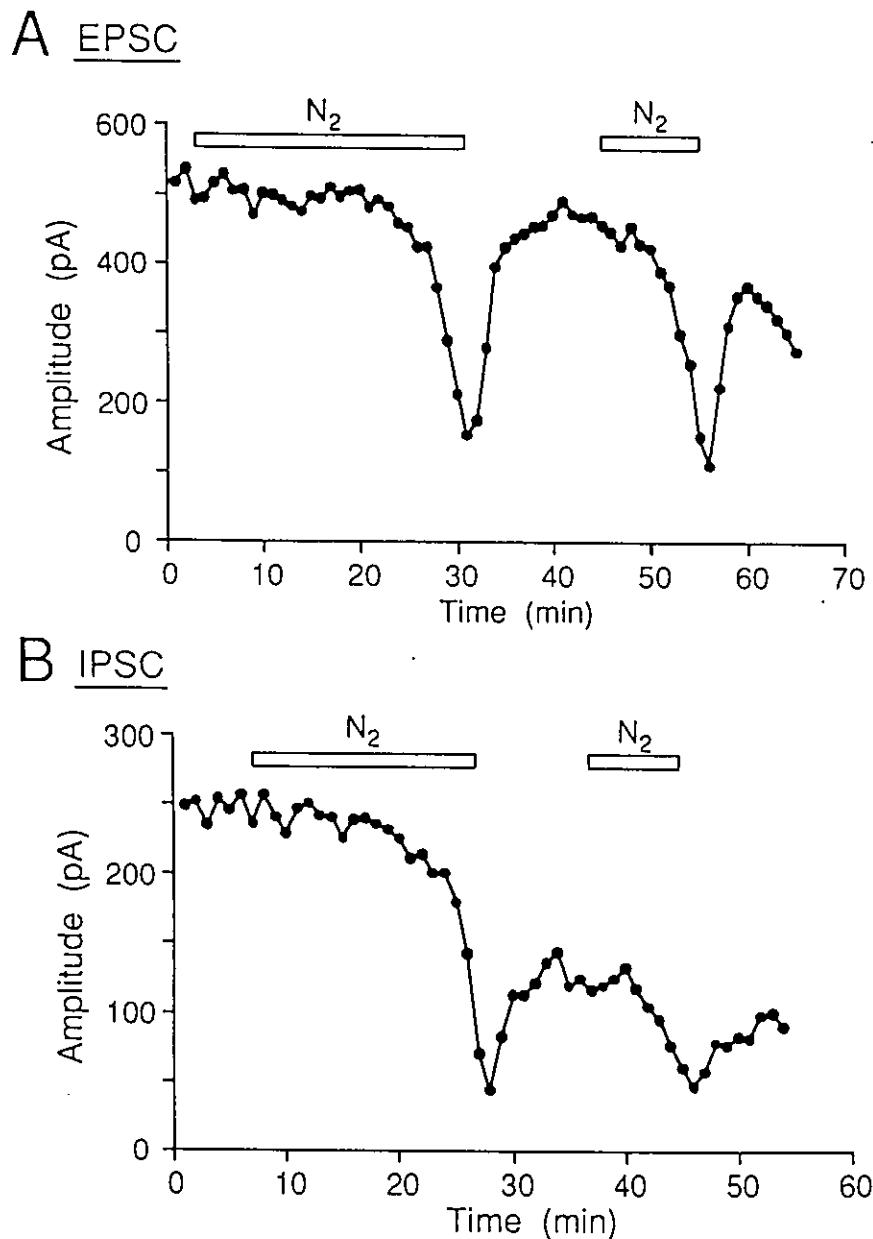


図3 無酸素・無グルコース処理によるシナプス後電流の低下。EPSC (A) および IPSC (B) の振幅の変化の一例。無酸素・無グルコース処理の期間をN₂で示している。

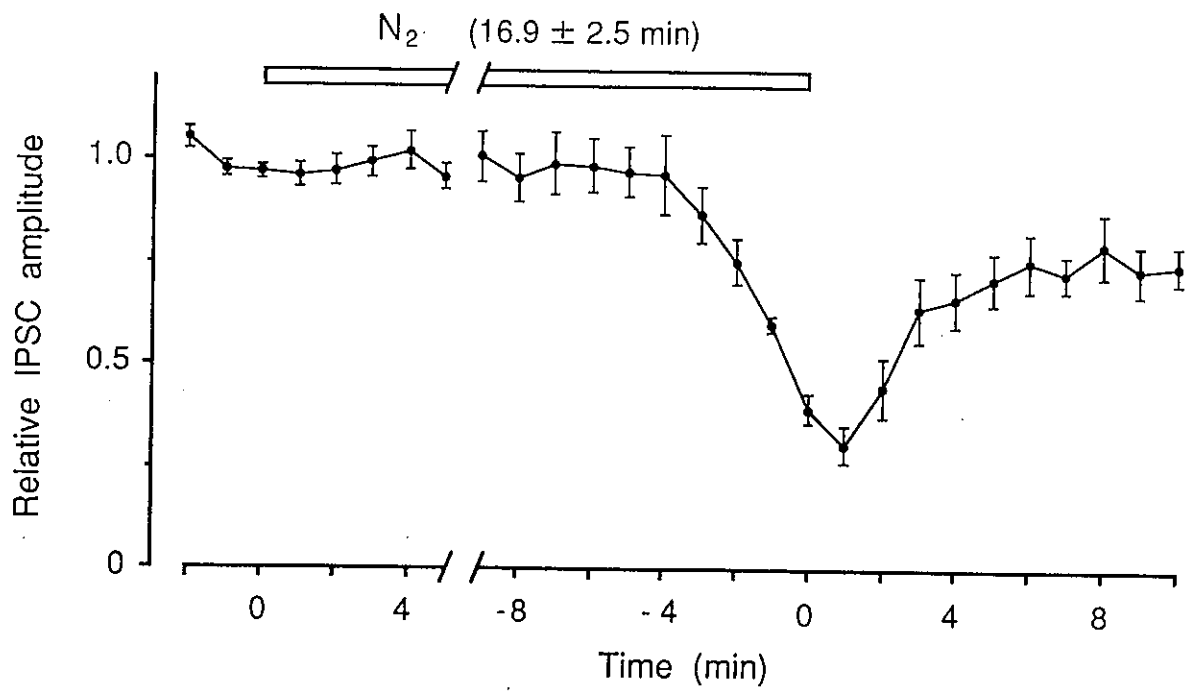


図4 IPSCに対する無酸素・無グルコース処理の影響。無酸素・無グルコース処理の期間をN₂で示している。IPSC振幅が半分以下に減少した時に、無酸素・無グルコース処理を終了し、各実験での処理開始時点と終了時点とを揃えて表示している。

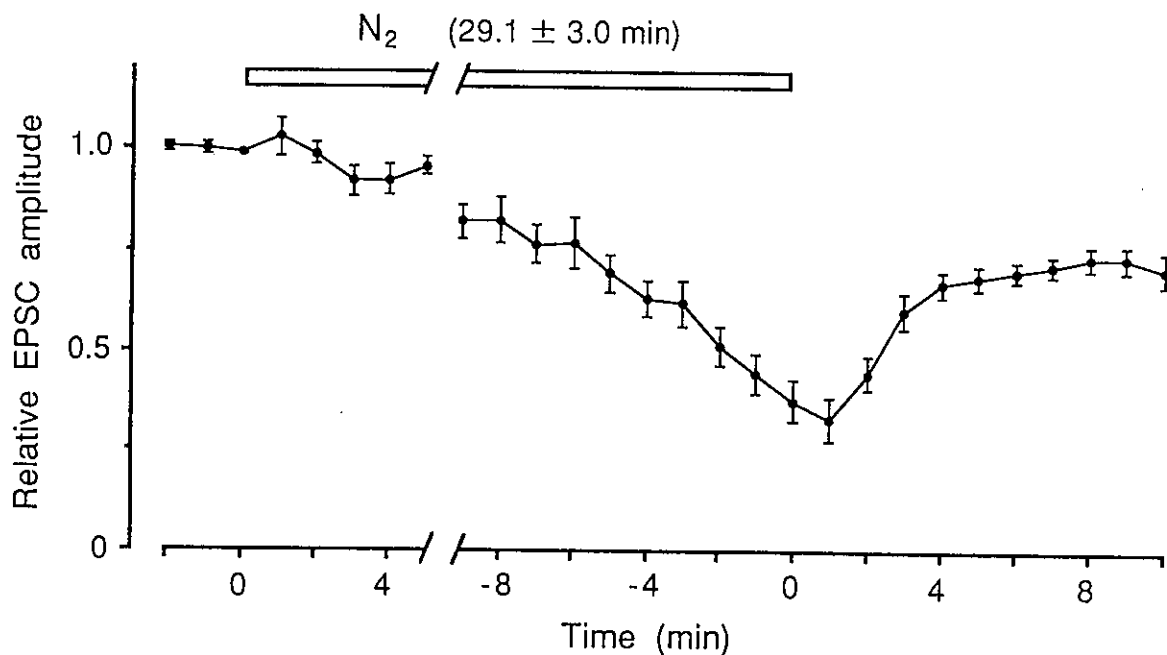


図5 EPSCに対する無酸素・無グルコース処理の影響。無酸素・無グルコース処理の期間をN₂で示している。EPSC振幅が半分以下に減少した時に、無酸素・無グルコース処理を終了した。各実験での処理開始時点と終了時点とを揃えて表示している。

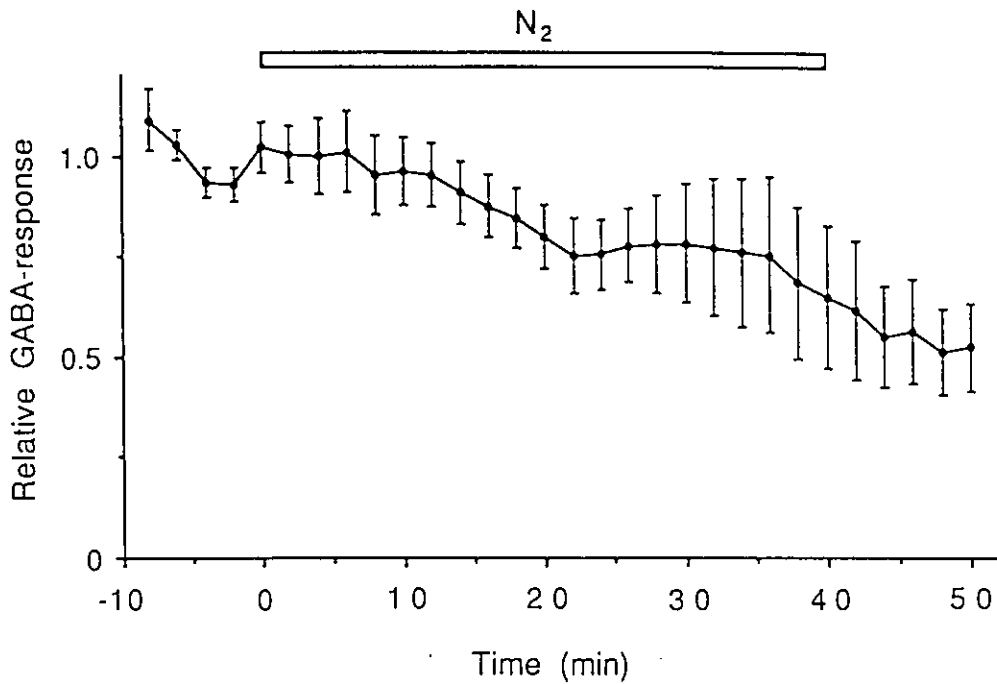


図6 シナプス後ニューロンのGABA応答性に対する無酸素・無グルコース処理の影響。無酸素・無グルコース処理の期間をN₂で示している。IPSC振幅は約17分で半分以上に低下しているのに対し、GABA投与により生ずるGABA応答電流は、40分間の処理によっても半分以上に低下することはなかった。

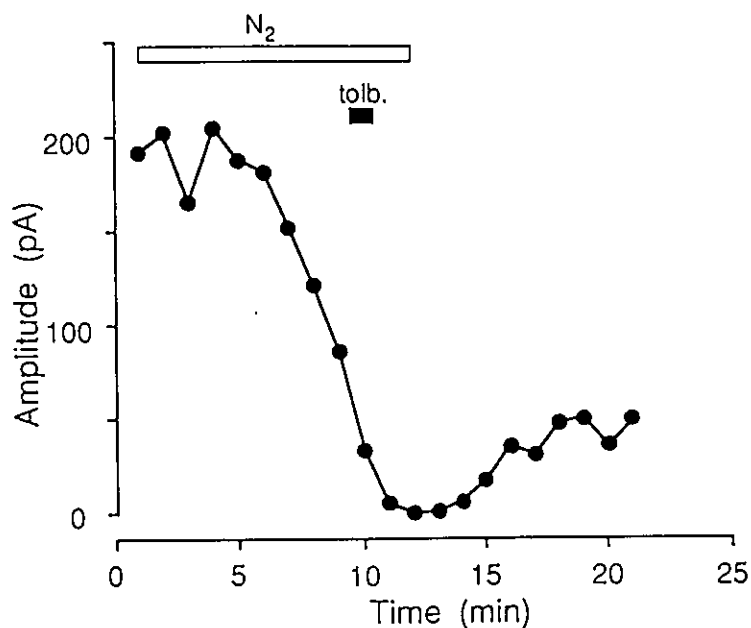


図7 無酸素・無グルコース処理によるIPSC振幅低下に対するtolbutamideの効果。無酸素・無グルコース処理の期間をN₂で示している。tolbutamideはIPSC振幅の低下を防ぐことはできなかった。

(図5)。一方、シナプス後ニューロンの伝達物質感受性はあまり低下していない(図6)ことより、このシナプス伝達の低下は、シナプス前終末からの伝達物質の放出量の減少によると考えられた。脳切片で観察される興奮性シナプス伝達の早期抑制は、我々の結果と矛盾するようではあるが、すでに指摘されているように、興奮性シナプス伝達の早期抑制が回りの細胞から放出されたアデノシンなどの物質によるシナプス前抑制の機構によると考えると説明できる。

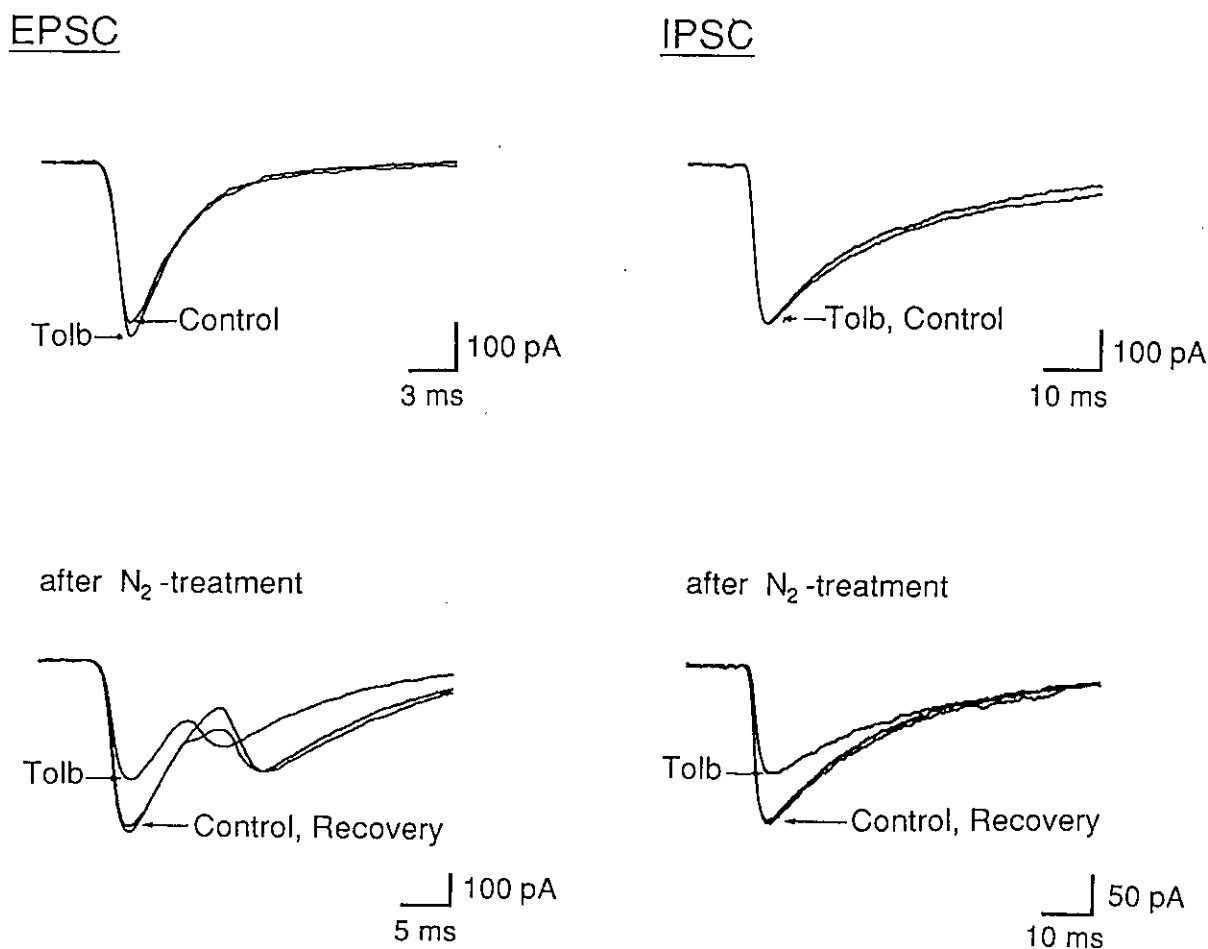


図8 無酸素・無グルコース処理後のシナプス後電流の回復期における tolbutamide の効果。無酸素・無グルコース処理前(上)と処理後の回復期(下)の、EPSC(左)およびIPSC(右)の波形を、tolbutamide投与前と投与後で比較している。無酸素・無グルコース処理前はtolbutamideの効果は見られないが、処理後の回復期にはtolbutamideのEPSCおよびIPSCを抑制する効果が見られるようになった。

我々は、シナプス前終末部にATP感受性Kチャンネルが存在し、そのチャンネルの活性化により伝達物質の放出量が減少することをすでに見い出している。そこで、無酸素・無グルコース液中でのシナプス伝達低下に、終末部のATP感受性Kチャンネルが関

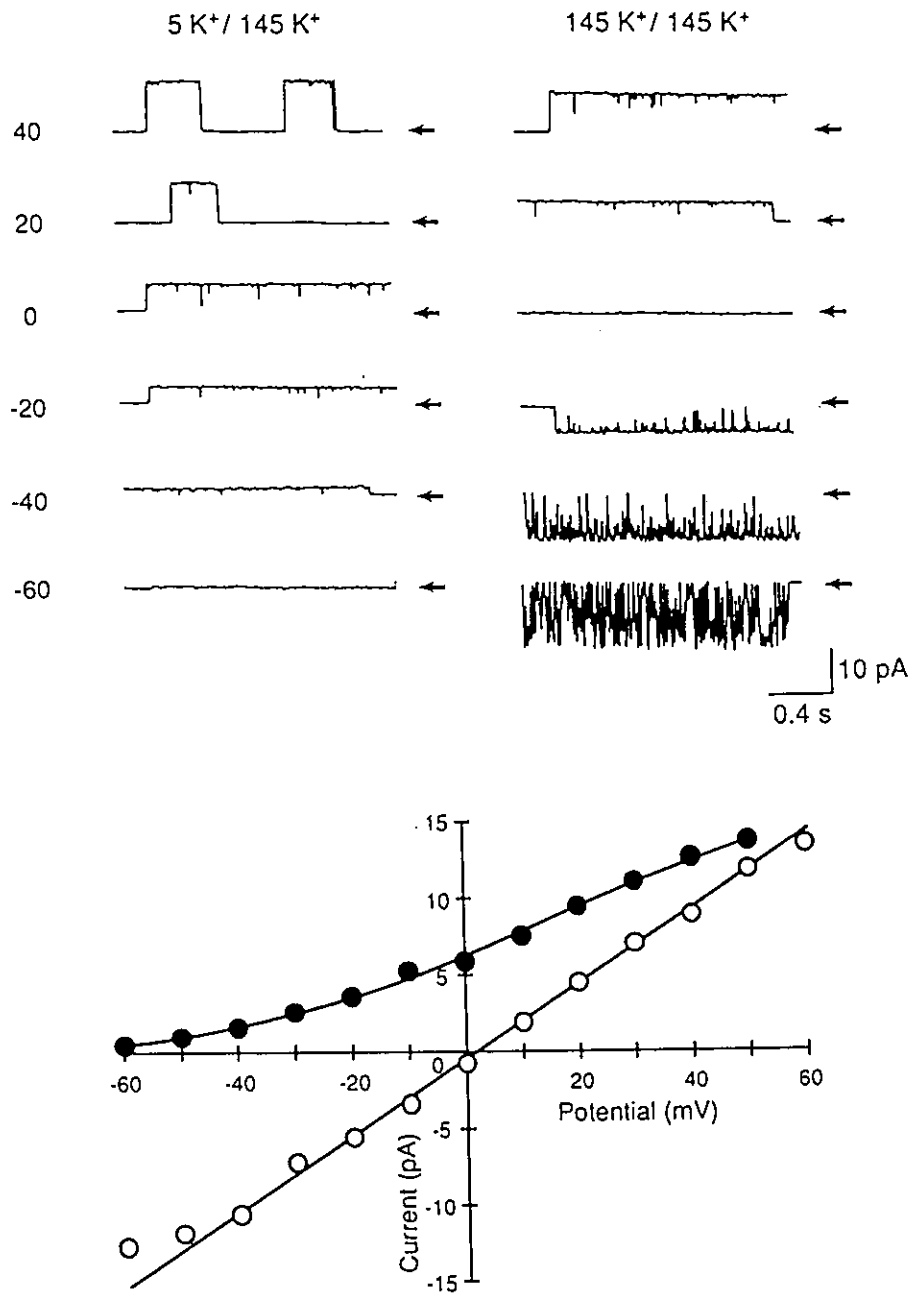


図9 海馬ニューロンのCa依存性Kチャンネル。outside-out patchで得られた単一チャンネル電流（上）と電流-電圧曲線（下）の一例を示す。生理的K勾配の条件（上の左、下の黒丸）および両側高カリウムの条件（上の右、下の白丸）で、膜電位を-60 mVから+60 mVの間で変化させ、単一チャンネル電流を記録した。

与している可能性を考え、それについて検討した。結果は、シナプス伝達が低下した時にこのチャンネルの阻害剤である tolbutamide を投与しても、シナプス伝達の回復は認められず（図7）、この可能性は否定された。しかし、シナプス伝達低下後に、酸素およびグルコースを含む液に戻し、シナプス伝達が回復して行く時期に、再び tolbutamide を作用させると、数例において、シナプス伝達の抑制が見られた（図8）。したがって、ATP感受性Kチャンネルは、虚血時のシナプス伝達の抑制には関与していないが、虚血後のシナプス伝達の回復過程において、その回復を早める役割を果たしている可能性が考えられた。

終末部にCa依存性Kチャンネルは存在するか？

シナプス前終末部にATP感受性Kチャンネルが存在し、虚血時のように細胞内ATP濃度が低下する時に活性化されることが予想されるにも関わらず、我々の実験結果

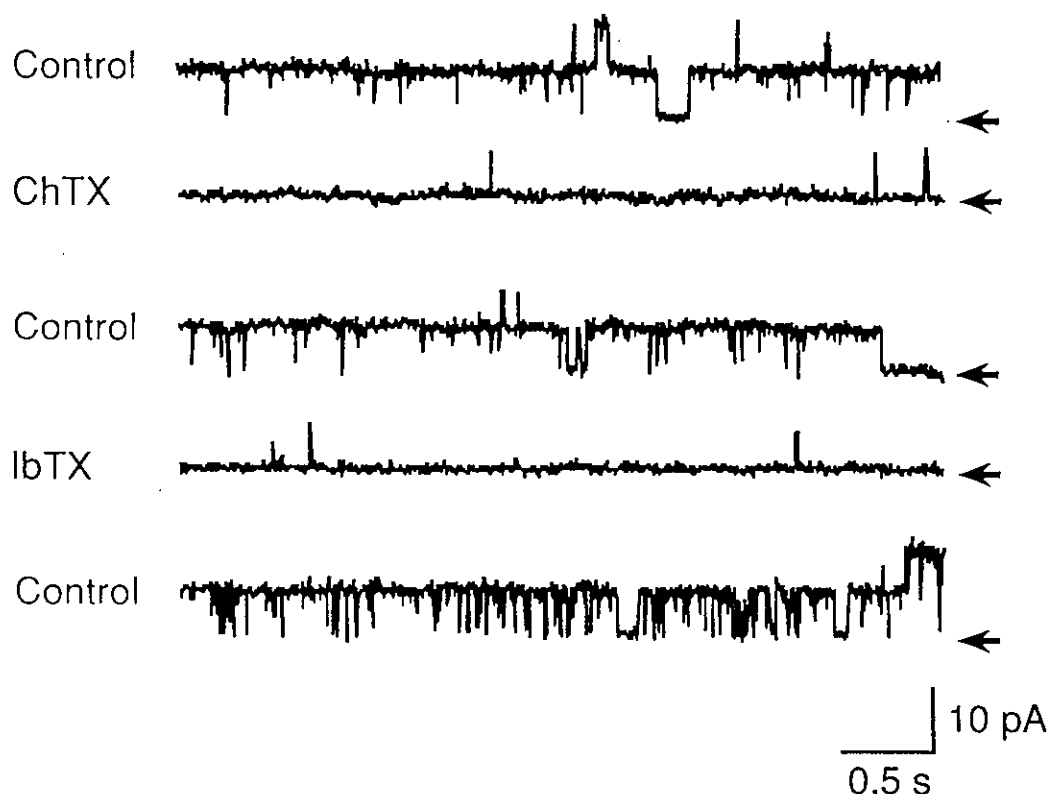


図10 Ca依存性Kチャンネルに対するcharybdotoxinおよびiberiotoxinの阻害作用。単一チャンネル電流波形の右側の矢印は、チャンネルが閉じたときの電流レベルを示している。

は、虚血時のシナプス伝達の低下にこのチャンネルは大きな関与はしていないことを示した。そこで、次に、ATP感受性Kチャンネルと同様に、虚血時に活性化されることが予想されるCa依存性Kチャンネルの関与について調べることにした。まず、海馬ニューロンのCa依存性Kチャンネルの性質を、細胞体膜からのoutside-out patchを用いて調べた。海馬ニューロンのCa依存性Kチャンネルは、これまでに多くの他の細胞から見い出されているものと同様に、コンダクタンスは両側高カリウム条件下で約200 pSと大きく、電位依存性を示し（図9）、charybdotoxinおよびiberiotoxinで阻害された（図10）。このCa依存性Kチャンネルがシナプス前終末部に存在するかどうかを、シナプス後電流に対するCa依存性Kチャンネル阻害剤の効果を指標にして調べた。charybdotoxinはEPSCとIPSCの振幅を増大させたが、iberiotoxinは無効で

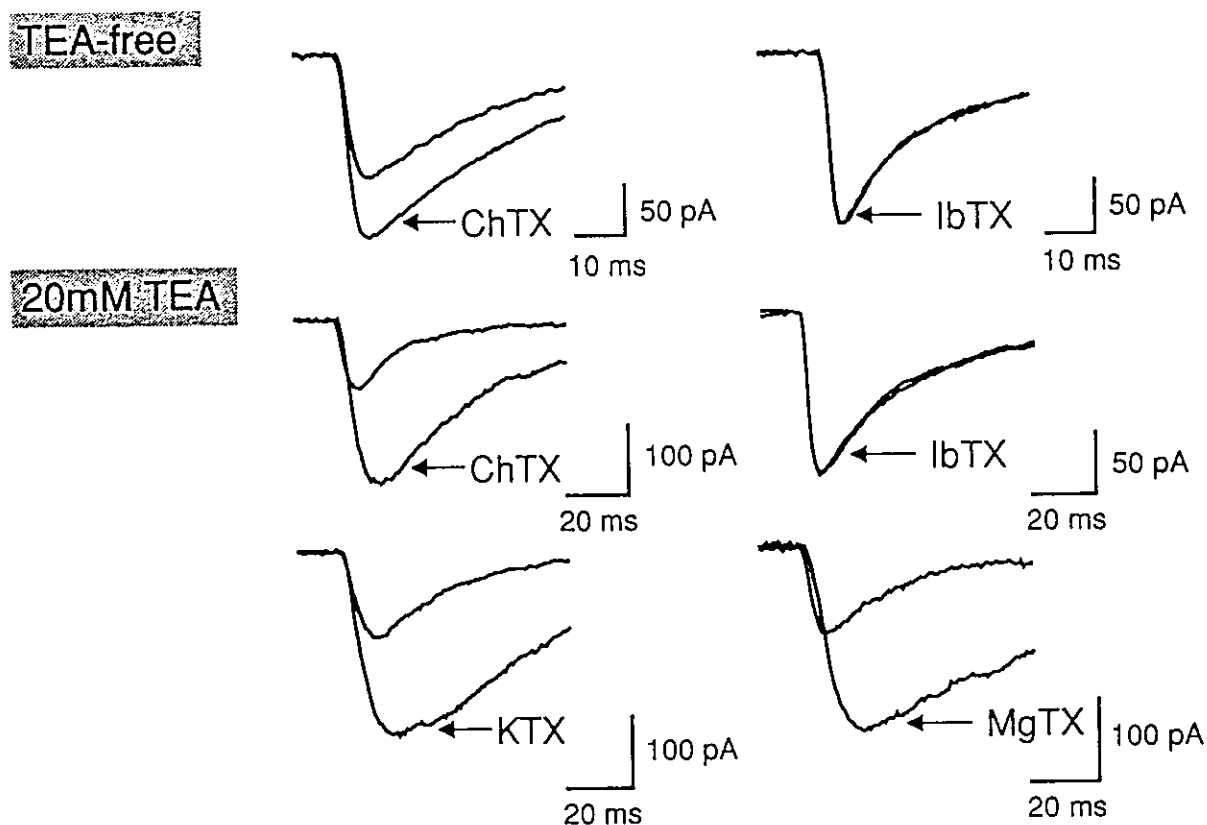


図11 IPSCに対する種々Kチャンネル阻害剤の効果。charybdotoxin (CgTX)、iberiotoxin (IbTX)、kaliotoxin (KTX) margatotoxin (MgTX) を浴液に投与。

あった（興奮性シナプスについては図1 1、抑制性シナプスについては図1 2）。さらに、薬理学的実験により、このcharybdotoxinの効果はCa依存性Kチャンネルではなく、電位依存性KチャンネルのKv1.3に対する作用によることが判明した（図1 3）。したがって、終末部にCa依存性Kチャンネルは存在しないか、または、存在してもシナプス伝達に影響を及ぼす程量的に多くはないという結論に至った（添付論文 Neurosci. Lett. 207: 195-198を参照）。

虚血時に起こる伝達物質放出の低下が、シナプス前終末部のATP濃度低下やCaイオン濃度上昇によるKコンダクタンスの上昇によるという可能性は否定された。そこで次に、虚血時のシナプス伝達の低下が、細胞外の何らかの因子を介して生ずる可能性について検討を加えた。

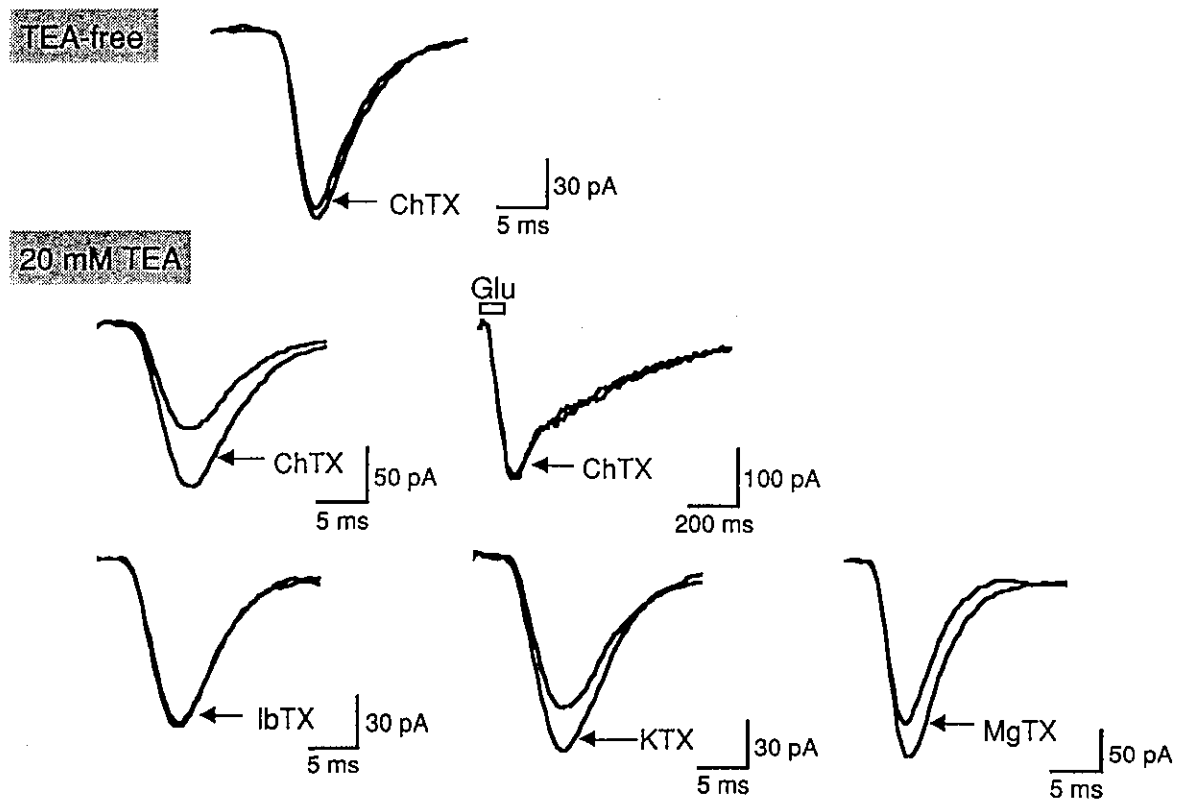


図1 2 EPSCに対する種々Kチャンネル阻害剤の効果。charybdotoxin (CgTX)、iberiotoxin (IbTX)、kaliotoxin (KTX) margatotoxin (MgTX) を浴液に投与。

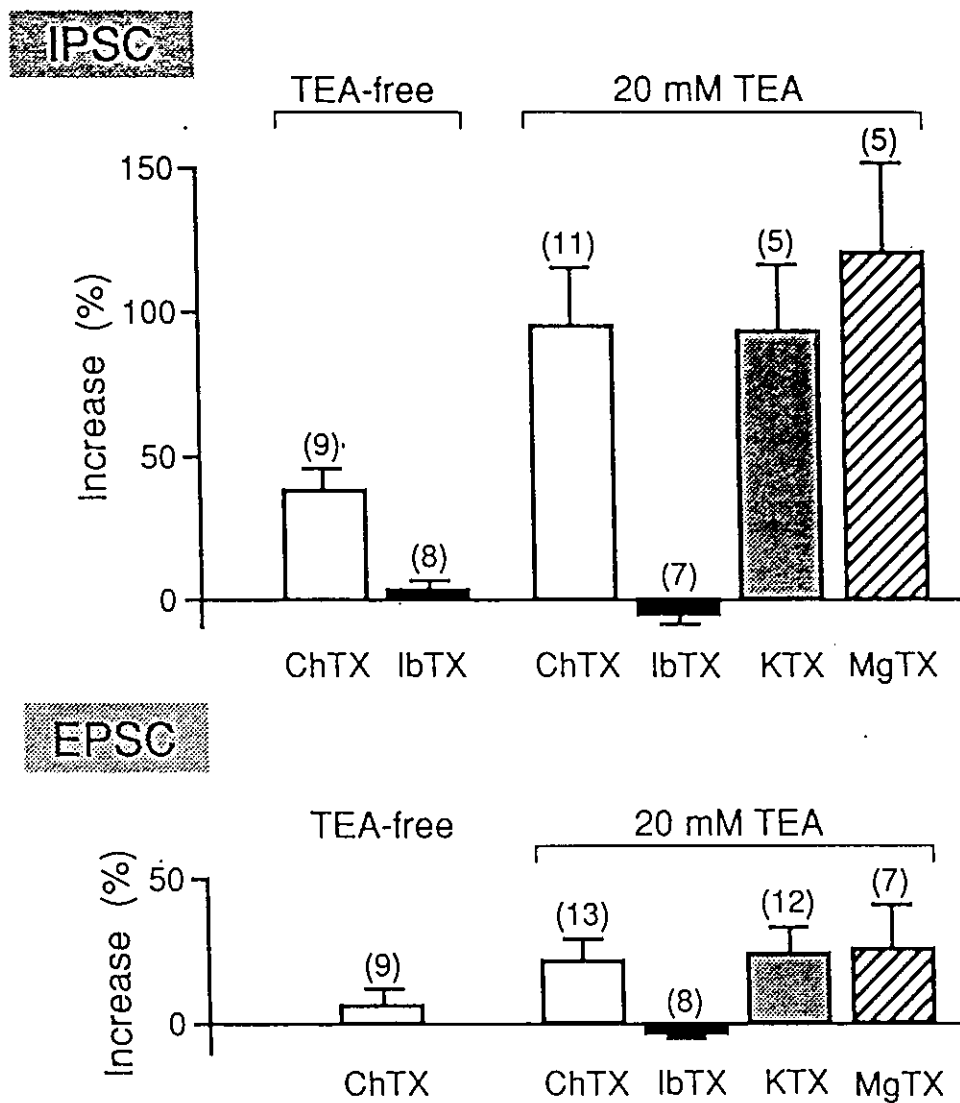


図13 IPSC (上) およびEPSC (下) に対する種々Kチャンネル阻害剤の効果。阻害剤添加後の振幅の増加分を縦軸に示している。20 mM TEA存在下 (右) あるいは非存在下 (左) でcharybdotoxin (CgTX)、iberiotoxin (IbTX)、kaliotoxin (KTX) margatoxin (MgTX) を浴液に投与している。

シナプス前終末のグルタミン酸受容体を介するシナプス伝達の抑制

虚血時に細胞外のグルタミン酸濃度が上昇することはすでに知られている。そこで、細胞外グルタミン酸が、グルタミン酸受容体を介してシナプス伝達にどのような影響を及ぼすのかを、代謝型グルタミン酸受容体アゴニストである t-ACPD を用いて調べた。興奮性シナプスでは t-ACPD は常に伝達を抑制した。抑制性シナプス

では、シナプス毎のバラツキが見られ、t-ACPDは約4分の1のシナプスにおいて伝達を抑制した。一方、シナプス後ニューロンの伝達物質に対する感受性はt-ACPDの影響を受けず、t-ACPDはシナプス前終末部に作用し、伝達物質の放出量を減少させると結論した(添付論文 Brain Res. 705: 337-340)。したがって、虚血時に細胞外グルタミン酸濃度が上昇し、それにより終末部の代謝型グルタミン酸受容体を介して、伝達物質の放出が抑制される可能性は高いと思われる。

シナプス後ニューロンの脱分極による抑制性シナプス伝達の抑制

虚血時にニューロンが脱分極することはよく知られている。近年、海馬の錐体細胞を脱分極させると、そのニューロンへの抑制性インプットが一過性に低下することが報告された。この現象は"depolarization-induced suppression of inhibition"、略

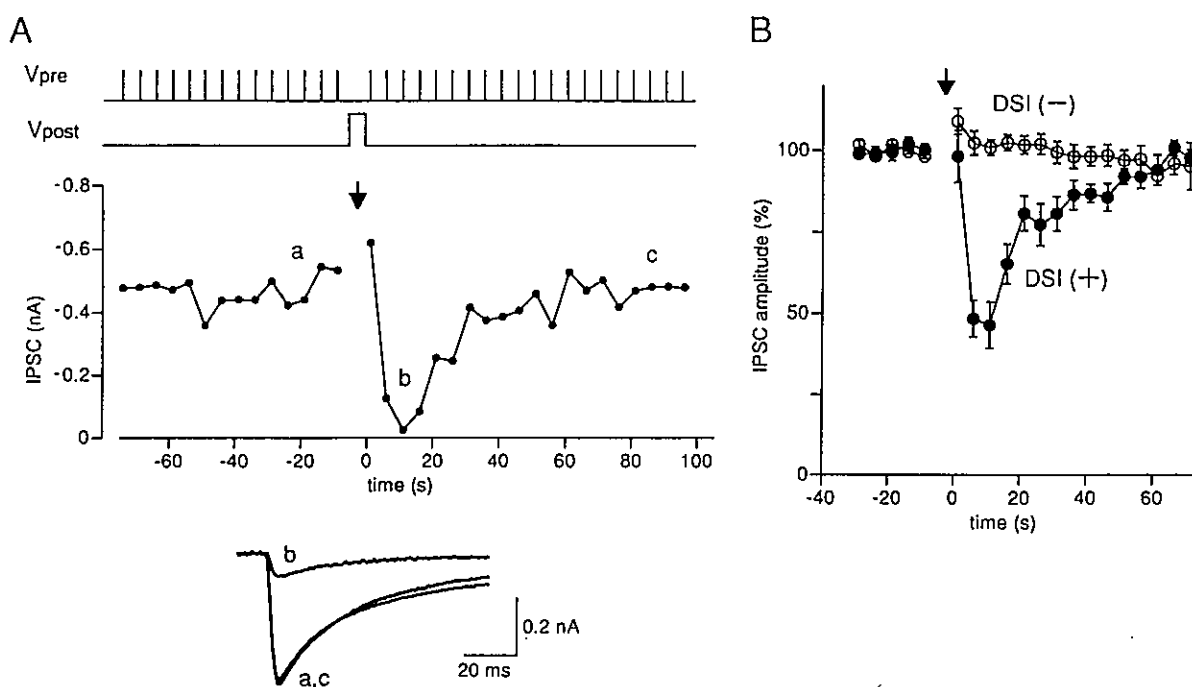


図14 DSIの時間経過。A: DSIの1例を示す。縦軸はIPSCの振幅、横軸は時間。VpreおよびVpostはそれぞれシナプス前ニューロンと後ニューロンの膜電位を示している。矢印の時点で、シナプス後ニューロンの膜電位を5秒間0 mVに固定している(以下の図16、図18-21においても同様)。a-cの時点でのIPSCの波形を下に示す。B: DSIの起こったシナプス(●)とDSIの起こらなかったシナプス(○)でのIPSC振幅の時間経過を示す。

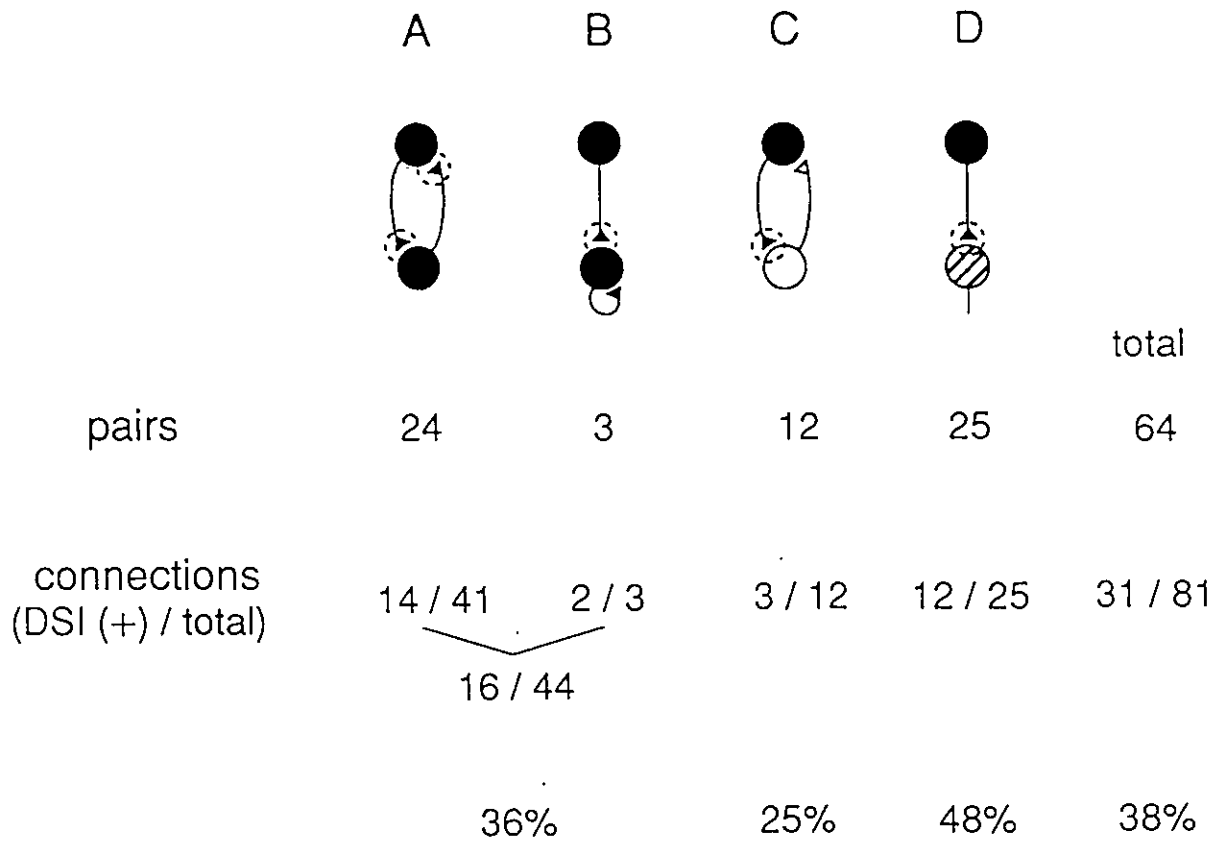


図15 DSIの出現頻度。ニューロン・ペアのタイプを4つ (A-D) に分類し、調べたペアの数、調べた抑制性シナプスの数、その内のDSIの起こったシナプスの数、DSIの出現頻度をタイプ別に示す。黒丸は抑制性ニューロンを、白丸は興奮性ニューロンを、斜線の丸は種類の不明なニューロンを表わしている。破線の丸は、調べた抑制性シナプスを示す。

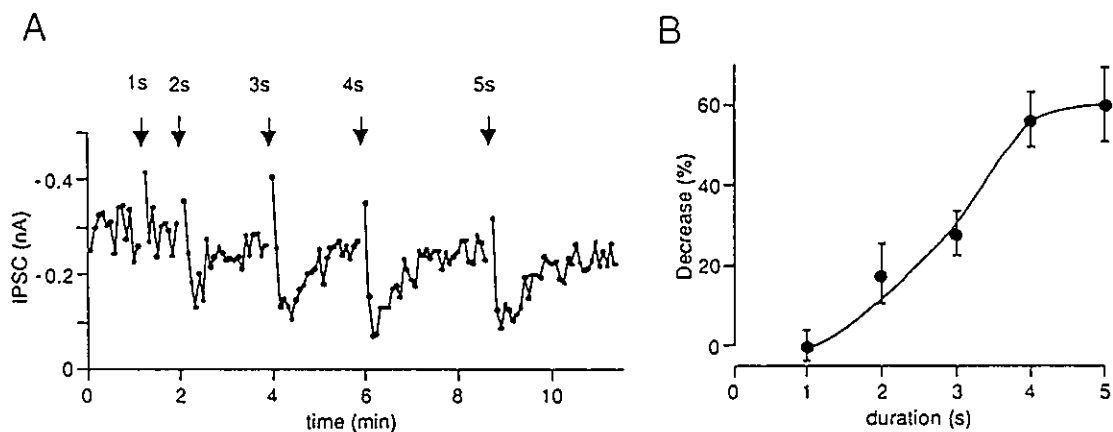


図16 DSIの脱分極持続時間依存性。A: シナプス後ニューロンを1秒間、2秒間、3秒間、4秒間、5秒間脱分極させた時の、IPSC振幅の変化。2秒間以上の脱分極によりDSIが誘導された。B: 脱分極持続時間とDSIの大きさの関係。

してDSIと呼ばれている。我々の実験により得られた、無酸素・無グルコース処理初期のIPSCの選択的抑制（図4と図5を比較）にこの現象が関与している可能性が考えられ、DSIについて詳しく検討することにした。

シナプス後ニューロンを5秒間脱分極させると、約4割の抑制性シナプスにおいて、IPSCの一過性低下、いわゆるDSIが観察された（図14）。DSIの起こる頻度を、用いたニューロン・ペアのタイプ別に調べたところ、シナプス後ニューロンが興奮性ニューロンであっても抑制性ニューロンであっても、DSIは起こりうること

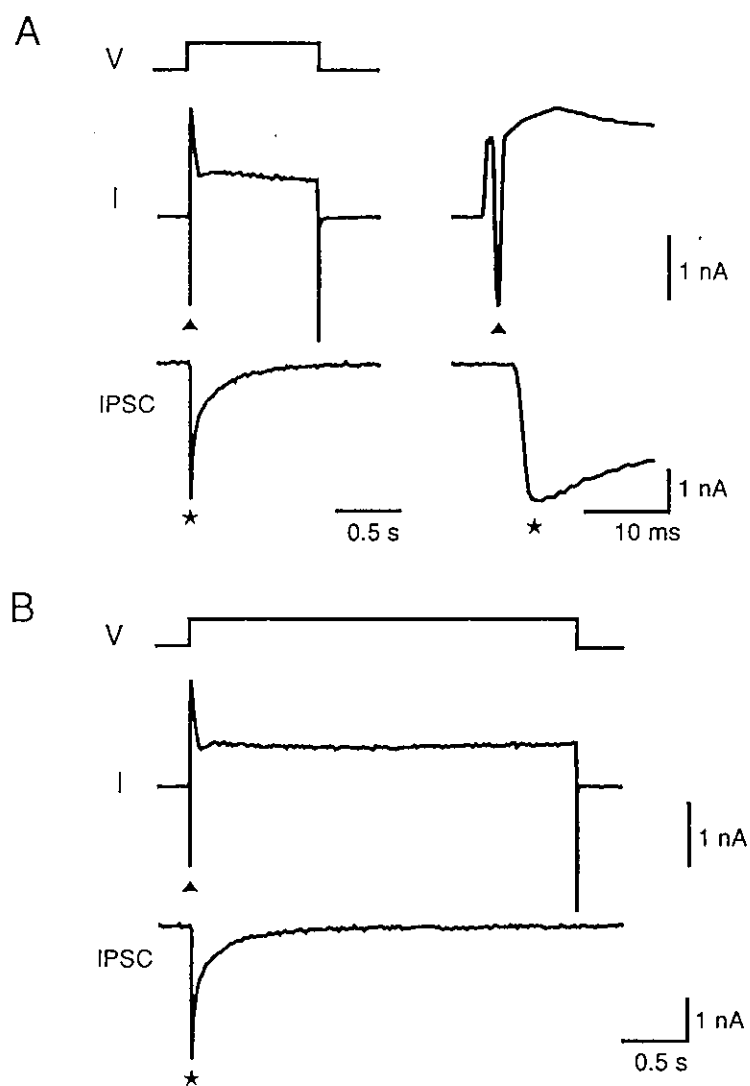


図17 脱分極により発生するニューロンの軸索での活動電位。脱分極 (V) させたニューロンの膜電流 (I) と、そのニューロンからシナプスを受けているニューロンで観察されるシナプス電流 (IPSC) の同時記録。

が判明した (図15)。また、DSIを誘導するのに必要な脱分極の持続時間は約2秒であった (図16)。一方、シナプス後ニューロンの軸索を經由するアウトプットは、DSIを誘導できない1秒間の脱分極の場合も、DSIを誘導しうる2秒以上の脱分極の場合も、共に、脱分極開始時に活動電位を一発発生するのみであることが確かめられた (図17)。したがって、DSIは、脱分極により発生する活動電位とは

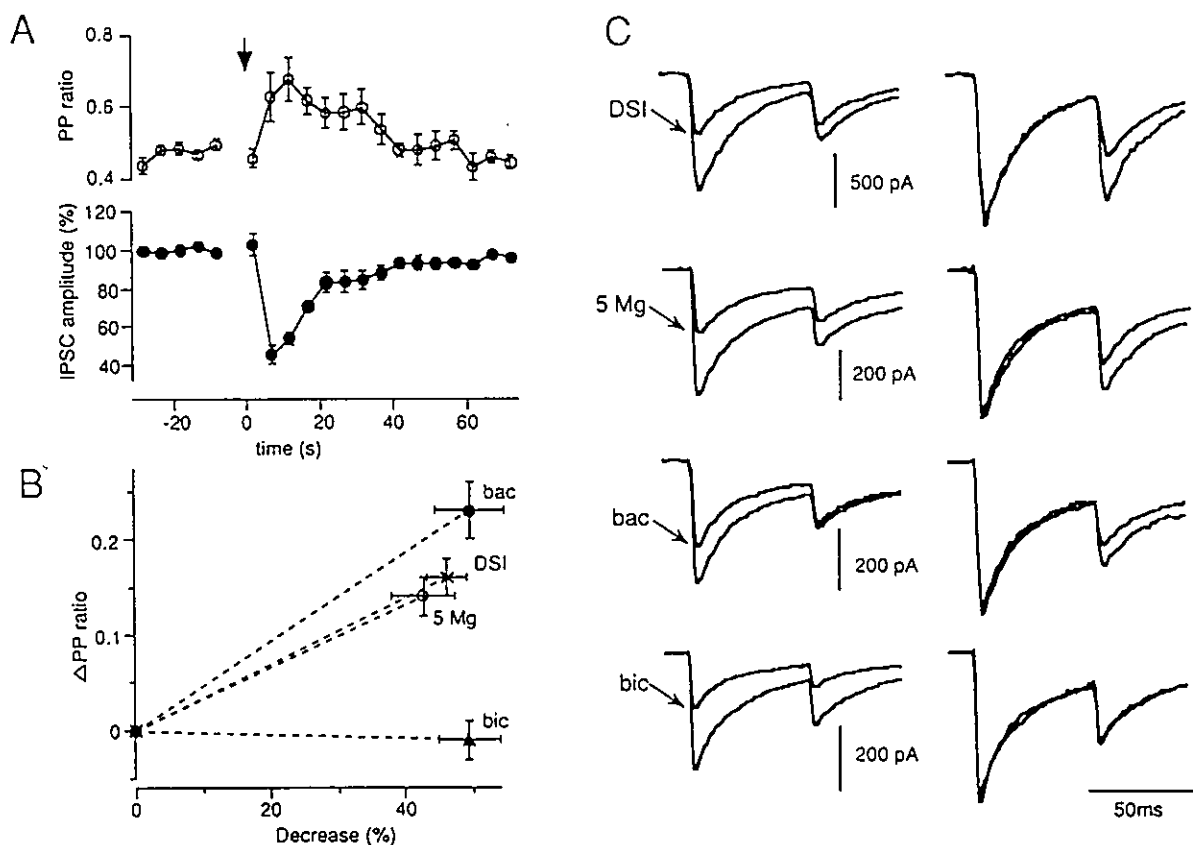


図18 DSI時のpaired-pulse比の変化。A: 脱分極によるIPSC振幅とpaired-pulse比の変化の時間経過。B: 4つの操作によるIPSC振幅の減少とpaired-pulse比の変化との相関。細胞外液中のMg濃度を5 mMに上げた場合 (5 Mg)、外液にbaclofenを加えた場合 (bac)、外液にbicucullineを加えた場合 (bic)、シナプス後ニューロンを脱分極させた場合 (DSI) の4操作。C: IPSC波形の例。60 msec間隔のpaired-pulseにより誘発されるIPSCを、各操作の前後で比較している。右側では、各操作の前後の2つのトレースを、1番目のIPSCピークを揃えて重ねている。

無関係に誘導されることが判明した。

DSI時のIPSCの振幅の減少が、シナプス後ニューロンの伝達物質に対する感受性の低下によるのか、あるいは、シナプス前終末からの伝達物質の放出量の低下によるのかを調べるために、DSI時のpaired-pulse比の変化を調べた。シナプス後ニューロンの脱分極によるIPSC振幅の変化とpaired-pulse比の変化の時間経過を比較すると、IPSC振幅の低下に伴ってpaired-pulse比が増大することが判明した（図18A）。また、paired-pulse比の変化が、伝達物質放出量の変化の指標となりうることを確かめるために、伝達物質放出を減少させることの知られている条件（baclofen

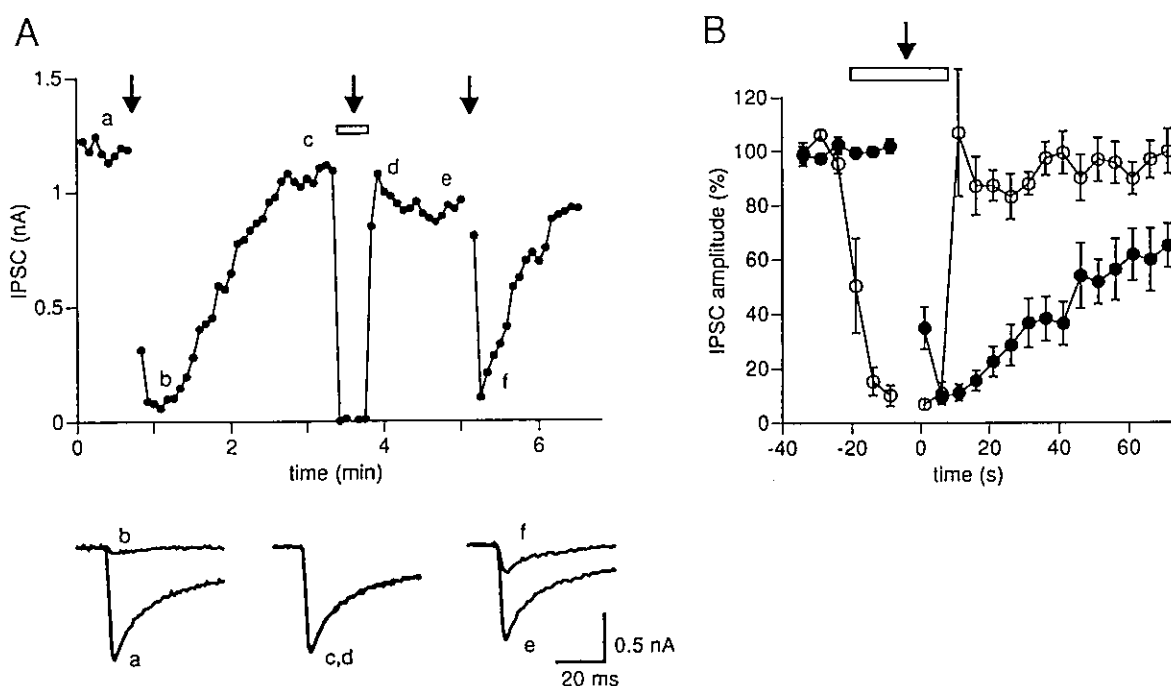


図19 DSIのCa依存性。A: 実験の1例。IPSC振幅の時間経過（上）とa-fの各時点でのIPSCの波形（下）。正常外液中でシナプス後ニューロンを脱分極させるとDSIは起こるが、Ca-free液中（白抜きの横棒）で脱分極させてもDSIは起こらなかった。B: ●は正常外液中で、○はCa-free液中（白抜きの横棒）で脱分極させた場合のIPSC振幅の時間経過を示す。Ca-free液中ではシナプス伝達は抑えられるが、正常外液に戻すと直ちにIPSCは回復し、DSIは起こらなかったことがわかる。

添加、および高Mg液) 下において、paired-pulse比が増大することを確認した (図 18B、C)。

一方、シナプス後ニューロンの伝達物質に対する感受性を低下させる条件 (bicuculline添加) 下では、paired-pulse比は変化しなかった。以上の結果より、

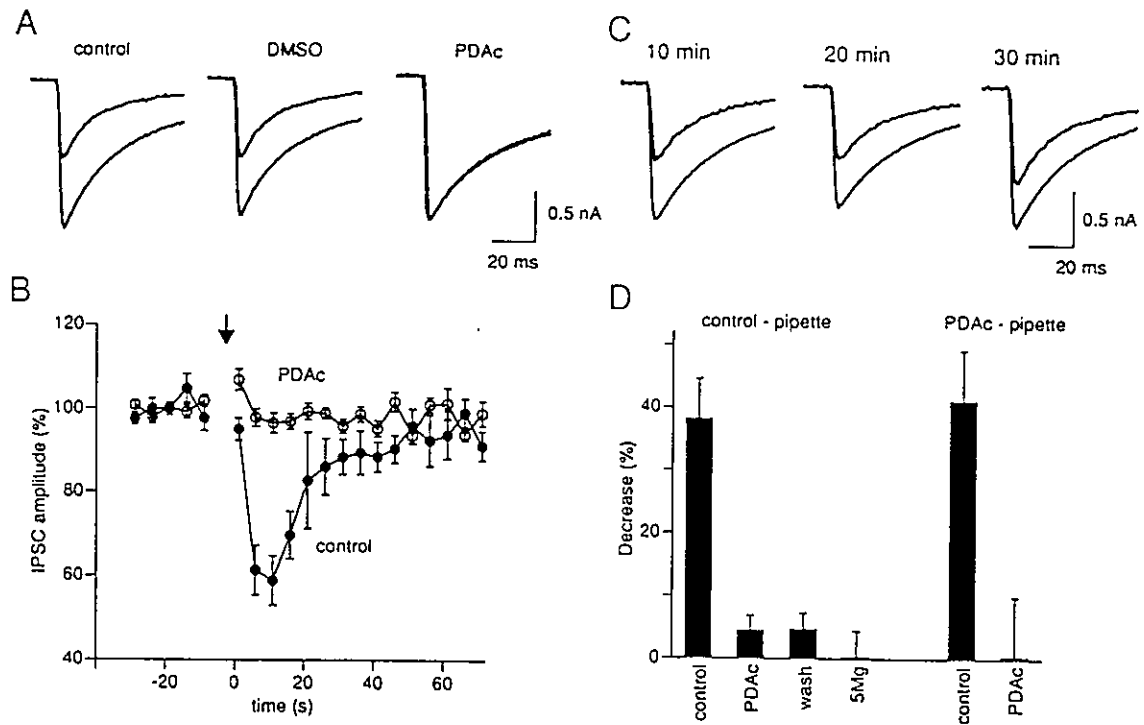


図 20 DSIに対するphorbol ester (PDAc)の効果。A: PDAcによるDSIの抑制の1例。脱分極前後のIPSCの波形を重ねている。細胞外液にPDAcを投与すると、DSIは抑制された。一方、PDAcを溶かすために使用したDMSOは無効であった。B: 脱分極によるIPSC振幅の変化をPDAcの細胞外投与前 (●) と投与後 (○) で比較している。各点は8例の平均値。 C: シナプス後ニューロンへのPDAc投与の1例。PDAcをシナプス後ニューロンのパッチ電極内液に加えても、DSIは抑制されなかった。whole-cell形成後、10分、20分、30分の、脱分極前後のIPSCの波形を重ねている。D: DSIの大きさの比較。正常電極内液を用いた場合 (左側の4つのカラム) は、細胞外液にPDAcを投与するとDSIは抑えられ、その効果はPDAcの除去後 (wash) も持続した。一方、シナプス後ニューロンの電極内液にPDAcを加え、シナプス後ニューロンだけにPDAcを投与 (右側の2つのカラム) してもDSIは抑えられなかった (control)。さらに細胞外液にもPDAcを加えるとDSIは抑制された (PDAc)。

DSIは、シナプス前終末からの伝達物質の放出量の減少によると結論した。

以上のように、DSIのinductionはシナプス後ニューロンの細胞体あるいは樹状突起部位で起こり、一方、DSIのexpressionはシナプス前終末部で起こることが示されたことから、その間をつなぐ何らかの逆行性シグナルがDSIの過程に関与していると考えられた。これまでに、いくつかの系で、逆行性伝達物質の分泌がCa依存性であることが知られている。そこで、DSIのCa依存性を調べた。シナプス伝達そのものがCa依存性であるため、DSIが起こったかどうかを見るためには外液のCaイオンは不可欠である。そこで、シナプス後ニューロンの脱分極時にのみ、Caイオンを含まない液を局所的に投与したところ、DSIは起こらず、Ca依存性を示すことがわかった（図19）。これまでの結果から、シナプス後ニューロンの脱分極により、Ca依存性に何らかの逆行性伝達物質が放出され、それがシナプス終末部に作用し、伝達物質の放出を抑制する、と考えられるが、次に、このDSIに関与する逆行

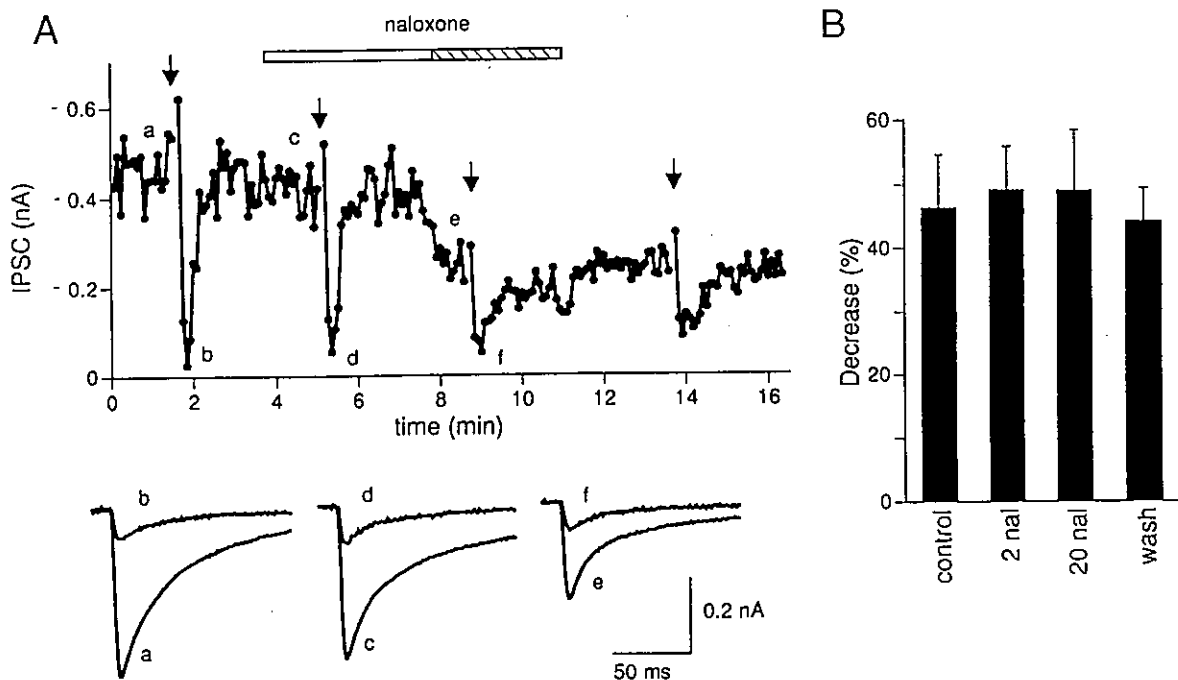


図2-1 DSIに対するnaloxoneの効果。A:実験の1例。naloxone (2 μ Mと20 μ M)を細胞外液に加えてもDSIは抑制されなかった。a-fの各時点でのIPSC波形の例を下に示す。B: DSIの大きさは、naloxoneの投与前後で差は見られなかった。

性物質の同定を試みた。海馬ニューロンのシナプス終末部に作用し、伝達物質の放出を抑制する物質としては、これまでに多くのものが報告されている。そのいくつかについては、そのシナプス前抑制作用がphorbol esterで阻害されることが知られている。そこで、まず、DSIに対するphorbol esterの作用を調べたところ、phorbol esterはシナプス前終末部に作用し、逆行性伝達物質によるシナプス前抑制を阻害することを示唆する結果を得た（図20）。

海馬歯状回の高頻度刺激時に、顆粒細胞の樹状突起からオピオイドの一種のdynorphinが分泌され、そのニューロンへの興奮性シナプス伝達を抑制することが知られている。そこで、DSIの時にも同様のメカニズムが働く可能性を検討するために、オピオイド受容体の阻害剤であるナロキソンの効果を調べた。その結果、ナロ

DSI: 脱分極 → → → 抑制性シナプス伝達 ↓

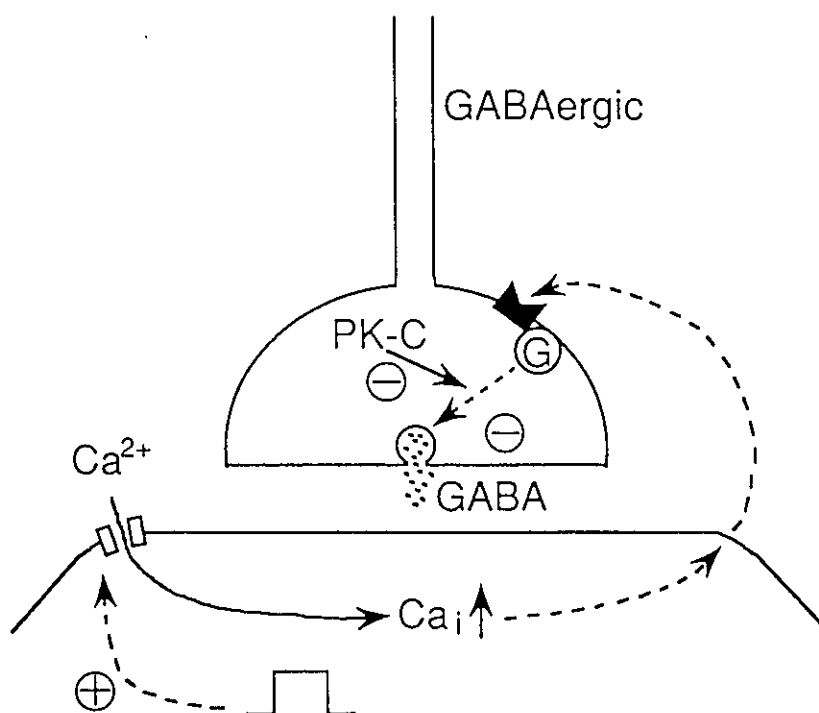


図22 DSIのメカニズムのモデル。シナプス後ニューロンの脱分極により、電位依存性Caチャンネルが開口し、細胞内Ca濃度が上昇し、逆行性伝達物質が分泌され、それがGABA作動性のシナプス前終末部の受容体に結合し、PK-C感受性の過程を介して、GABAの放出を抑制する。

性物質の同定を試みた。海馬ニューロンのシナプス終末部に作用し、伝達物質の放出を抑制する物質としては、これまでに多くのものが報告されている。そのいくつかについては、そのシナプス前抑制作用がphorbol esterで阻害されることが知られている。そこで、まず、DSIに対するphorbol esterの作用を調べたところ、phorbol esterはシナプス前終末に作用し、逆行性伝達物質によるシナプス前抑制を阻害することを示唆する結果を得た（図20）。

海馬歯状回の高頻度刺激時に、顆粒細胞の樹状突起からオピオイドの一種のdynorphinが分泌され、そのニューロンへの興奮性シナプス伝達を抑制することが知られている。そこで、DSIの時にも同様のメカニズムが働く可能性を検討するために、オピオイド受容体の阻害剤であるナロキソンの効果を調べた。その結果、ナロ

DSI: 脱分極 → → → 抑制性シナプス伝達 ↓

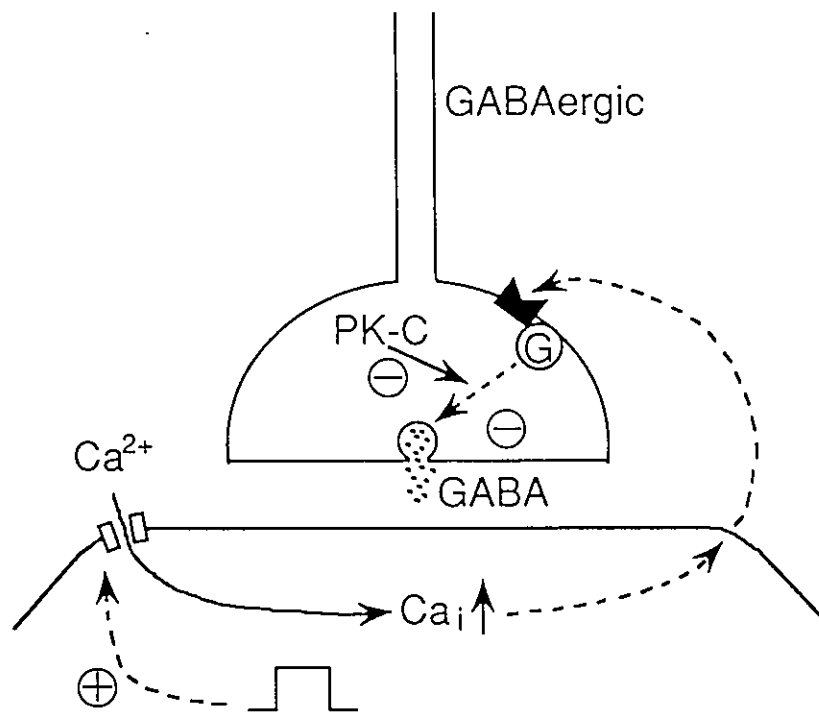


図22 DSIのメカニズムのモデル。シナプス後ニューロンの脱分極により、電位依存性Caチャンネルが開き、細胞内Ca濃度が上昇し、逆行性伝達物質が分泌され、それがGABA作動性のシナプス前終末部の受容体に結合し、PK-C感受性の過程を介して、GABAの放出を抑制する。

キソンはDSIを抑えることができず、DSIに関与する逆行性伝達物質は、少なくとも、オピオイドではないことが判った。

以上の研究により、DSIの性質については明らかとなったが、DSIに関与する逆行性シグナルの実体については、未だ不明であり、今後の課題である。尚、DSIに関する研究結果は、論文にまとめられ、現在投稿中である。

(5) 今後の展開

この研究は、ATP感受性Kチャンネルが脳虚血時の神経活動の変化にどのように関わっているかを調べるために始められた。しかし、研究の結果、ATP感受性Kチャンネルは、虚血後の神経活動の回復過程に一部関与しているが、虚血時のシナプス伝達の低下にはほとんど関与していないことが判明した。そこで、当初の目的からははずれてしまったが、虚血時の神経活動の変化のメカニズムを解明することを試みた。関与する可能性のあるものをいくつか検討した結果、虚血時に見られる細胞外グルタミン酸濃度の上昇、および、ニューロンの脱分極が、さらにその後の神経活動の変化に重要な役割を担っている可能性が示唆された。今後は、この可能性についてさらに検討を加える予定である。