

## 論文の内容の要旨

論文題目 Roles of GABA<sub>A</sub> receptors on hippocampal mossy fibers  
during development

(発達期における海馬苔状神経上 GABA<sub>A</sub> 受容体の役割)

指導教員 真鍋俊也 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

中村美智子

### 【背景・目的】

海馬苔状線維シナプスは、著しく大きな活動依存的なシナプス伝達の増強を示すことが知られており、この特性が機能的にも重要な役割を果たしていると考えられている。このシナプス伝達増強作用は、シナプス前性カイニン酸受容体などのイオン透過性受容体によって一部調節されていると報告されているが、その詳しいシナプス前性調節機構は明らかではない。当研究では、発達期 (<P30) にのみ、活動依存的にシナプス伝達だけでなく、苔状線維の興奮性が増大する現象を新しく発見したため、この現象に焦点を当てその機構を詳細に電気生理学的に検討することによって、シナプス伝達増強を修飾するシナプス前性

調節機構とその生理学的役割の解明を目指した。

#### 【方法】

C57BL/6J マウスの海馬脳スライスを作製し、25Hz、5 発の連続電気刺激を 30 秒間隔に海馬苔状線維束に与えた。このときに誘発される興奮性シナプス後電位 (fEPSP) を、CA3 領域透明層から細胞外電位記録法により測定、記録した。また、苔状線維のみを電位依存性蛍光色素・di-8-ANEPPS で染色し、その電位変化を測定することが出来るプレシナプスイメージング法を用い、苔状線維の電位変化を直接的に観察した。薬物は還流投与し、局所投与を行った実験に関しては U チューブ法を用い投与した。

#### 【結果】

生後 10 日齢 (P10) のマウス海馬において、25Hz、5 発の連続電気刺激を苔状線維に与えると、約 10 倍の大きな活動依存的シナプス伝達 (EPSP) の増強が観察された。これは以前から広く知られている苔状線維の特性の 1 つであるが、EPSP だけでなく、同時に fiber volley も 1.6 倍近い増強を示すことが観察された。この fiber volley 増強は、発達に伴い徐々に減少し P30 までに消失した。

幼若期にのみ観察される fiber volley 増強のメカニズムを薬理的に検討した。活動依存的に増強を示すため、内因性の神経伝達物質が関与しているのではないかと考え、まず電位

依存性カルシウムチャネルブロッカーであるカドミウムを投与したところ、fiber volley 増強は完全に抑制された。次に、苔状線維から放出される glutamate を選択的に抑制する DCG-IV を投与したところ、全く効果が無かった。近年、苔状線維には機能的な GABA<sub>A</sub> 受容体が発現していると報告されており、苔状線維自体からも GABA が放出されていると報告するグループもある。そこで、GABA の関与を調べるため、GABA<sub>A</sub> 受容体ブロッカー SR95531、bicuculline、picrotoxin をそれぞれ投与したところ、いずれにおいても fiber volley 増強を大きく抑制した。

GABA が苔状線維の興奮性を増大させるかどうかを調べるため、GABA<sub>A</sub> 受容体アゴニストのムシモルを投与したところ、fiber volley と EPSP の同程度の増大が観察された。このことから GABA<sub>A</sub> 受容体が活性化されると苔状線維の興奮性が増大することが確認され、またこの現象は発達とともに減弱傾向を示した。

GABA がどの部分に作用するのか、その部位を同定するため、GABA<sub>A</sub> ブロッカー SR95531 を、刺激部位付近の hilus 領域と、記録部位付近の CA3 領域、それぞれに局所投与した。すると、CA3 領域に投与しても全く効果は無いが、hilus 領域に投与すると fiber volley 増強が大きく抑制された。このことから、幼若期に観察される fiber volley 増強は、苔状線維終末部ではなく、線維上の GABA<sub>A</sub> 受容体が活性化されることによると示唆される。これを確認するために、GABA<sub>A</sub> 受容体アゴニスト、ムシモルを同様に局所投与してみたが、この実験においても苔状線維終末部付近の GABA<sub>A</sub> 受容体を活性化させても苔状線維の興奮性

を調節することは無く、一方、苔状線維上の GABA<sub>A</sub> 受容体を活性化させると苔状線維の興奮性もシナプス伝達も増強を示した。

Fiber volley が見かけ上大きく観察されているのではなく、GABA<sub>A</sub> 受容体の活性化による脱分極による事を証明するために、プレシナプスイメージング法を用い、苔状線維の電位変化を電位依存性蛍光色素を用いて測定した。電気生理学的検討と一致して、活動電位の大きさが連続刺激中大きくなり、連続刺激中の膜電位変化も増大していることから、確かに GABA<sub>A</sub> 受容体の活性化は脱分極を引き起こしていることが確認された。

最後に、どこから放出された GABA によって苔状線維上 GABA<sub>A</sub> 受容体が活性化されるかを検討した。抑制性介在ニューロンから放出される GABA と、苔状線維自体から放出される GABA の 2 つの可能性がある。海馬の抑制性介在ニューロンの興奮性を抑制することが知られているエンケファリンを投与したところ、fiber volley 増強が大きく抑制されたため、少なくとも部分的には抑制性介在ニューロンから放出された GABA によって、幼若期に観察される fiber volley 増強が引き起こされると考えられる。

#### 【結論】

幼若期には、抑制性介在ニューロンから放出された GABA が海馬苔状線維上 GABA<sub>A</sub> 受容体を活性化し脱分極を引き起こすため、苔状線維の興奮性が増大し、活動電位を発生する軸索本数の増加とシナプス伝達増強を引き起こす。しかし、この GABA による脱分極性作

用は発達とともに徐々に減少し、最終的には P30 までに消失する。

シナプス伝達増強は、主に、シナプス終末部における累積カルシウム濃度が増大することによって引き起こされると説明されてきたが、本研究により、幼若期には軸索の興奮性調節も部分的にはシナプス伝達増強に寄与するという新しいメカニズムが明らかとなった。

また、あまりその役割が解明されていなかった苔状線維上 GABA<sub>A</sub> 受容体の新しい機能を明らかにした。

GABA<sub>A</sub> 受容体の発現がどのように発達変化しているのか、GABA<sub>A</sub> 受容体の活性化が海馬全体の神経活動にどのような影響を与えているのか、GABA<sub>A</sub> 受容体を介した活動依存的 fiber volley 増強作用が苔状線維-CA3 シナプスの機能的・形態学的成熟に役割を果たしているのかなどが今後の検討課題である。