

平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書

◆記入に当たっては、「平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書記入要領」を参照してください。

ローマ字		KANO MASANOBU				
①研究代表者名氏		狩野 方伸			②所属研究機関・部局・職 大阪大学・医学系研究科・教授	
③研究課題名	和文	シナプスにおける逆行性伝達物質としての内因性カンナビノイドの作用機構と生理的意義				
	英文	Mode of action and physiological significance of endogenous cannabinoids as a retrograde messenger at central synapses				
④研究経費 金額単位：千円	平成13年度	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	総合計
	32,200	19,000	14,600	14,600		80,400
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者） *平成18年3月31日現在						
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
狩野 方伸	大阪大学・医学系研究科・教授	神経科学	電気生理学的解析（スライス） 研究の統括			
少作 隆子	金沢大学・医学系研究科・教授	神経科学	電気生理学的、生化学的、分子生物学的解析 （海馬培養神経細胞）			
田端 俊英	大阪大学・医学系研究科・助手	神経科学	電気生理学的、生化学的、形態学的解析 （小脳培養神経細胞）			
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）						
<p>マリファナの活性成分であるΔ^9-テトラヒドロカンナビノールは特異的受容体（カンナビノイド受容体）を介して作用を発現する。これらは、7回膜貫通型のG蛋白結合型受容体で、CB1とCB2の2種類がある。CB1は中枢神経系に広く分布し、マリファナの多様な精神神経作用はCB1受容体を介すると考えられる。これに対する内因性のリガンド（内因性カンナビノイド）の候補として、アナンダミドと2-アラキドノイルグリセロール(2-AG)があり、<i>in vitro</i>の実験からその生合成経路が明らかにされつつある。CB1は中枢ニューロンのシナプス前線維に局在し、シナプス前終末からの伝達物質放出の減少が起こることが知られている。しかし、内因性カンナビノイドがどのような刺激によって生成され、どのような生理機能を果たすかという最も重要な点についてはほとんど明らかにされていない。最近の私たちの研究から、内因性カンナビノイドが、シナプス後部からシナプス前終末に向けて、逆行性にシグナルを伝達することが明らかになった。すなわち、海馬ニューロンを脱分極させて細胞内カルシウム濃度上昇を起こすと、抑制性シナプス終末からの伝達物質放出の一過性減少が起こり、これがCB1の特異的アンタゴニストによってブロックされた。さらに申請者らは小脳プルキンエ細胞の興奮性シナプスにおいても、内因性カンナビノイドを介するシナプス前抑制がおこることを発見した。これらの実績を基盤にして、本研究では、海馬および小脳のニューロンを対象にして内因性カンナビノイドのシナプス伝達および機能的神経回路形成における役割を詳細に調べることにより、その作用機構と生理的役割の解明をめざす。</p>						

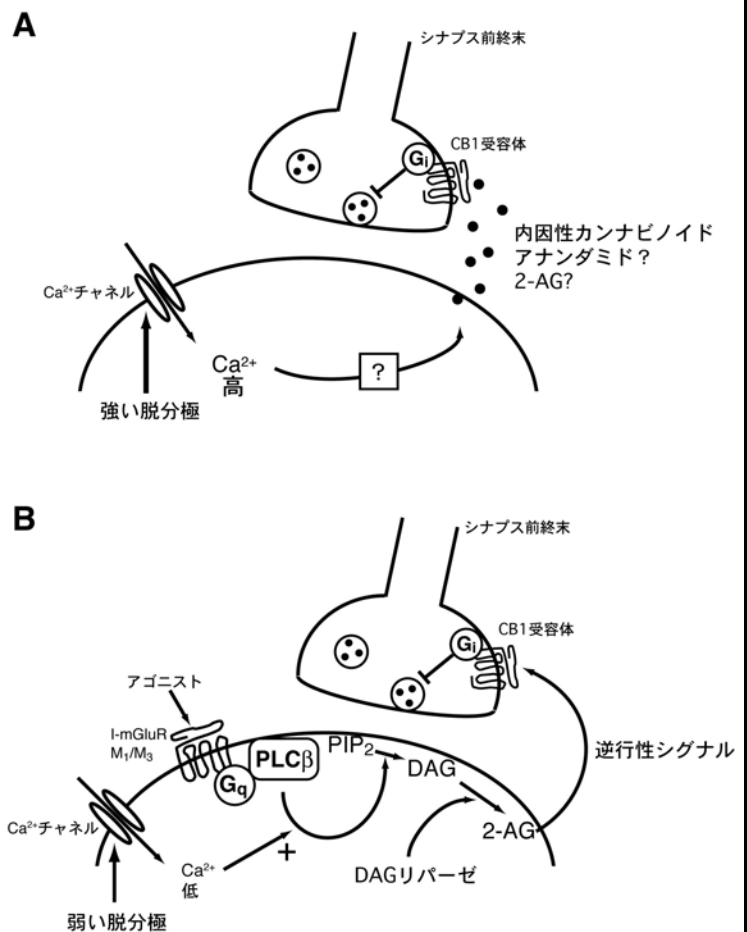
⑦ 研究成果の概要 (研究目的に対する研究成果を必要に応じて図表等を用いながら、簡潔に記入してください。)

海馬、小脳および大脳基底核を用いて、内因性カンナビノイドのシナプス伝達および機能的神経回路形成における役割を調べ、以下のような研究成果を得た。

1. シナプス後細胞の脱分極と細胞内カルシウム濃度上昇により内因性カンナビノイドが放出され、逆行性に抑制性および興奮性シナプス終末に作用して伝達物質放出の一過性減少 (Depolarization-induced Suppression of Inhibition or Excitation: DSI or DSE) を起こすことを明らかにした (*Neuron* 29: 729-738, 2001; *J. Neurosci.* 22: 3864-3872, 2002; *J. Neurosci.* 22: 1690-1697, 2002)。内因性カンナビノイドの候補としては、アナンダミドと2アラキドノイルグリセロール(2-AG)があるが、どちらがDSI/DSEに関与するかは決着がつかない (図A)。
2. 小脳プルキンエ細胞のシナプス後部に存在するグルーブI代謝型グルタミン酸受容体(I-mGluR)の活性化により、興奮性シナプス前終末からの伝達物質放出の減少が起こり、内因性カンナビノイドがその逆行性シグナルを伝達することを発見した。I-mGluR活性化による内因性カンナビノイド合成・放出はカルシウム非依存性であり、脱分極による合成・放出とは独立の細胞内機構によることが考えられた (*Neuron* 31: 463-475, 2001)。
3. 単離培養海馬ニューロンにおいて、内因性カンナビノイドによる逆行性シナプス伝達調節は抑制性シナプスだけでなく興奮性シナプスにおいても見られるが、抑制性シナプスに比べ、カンナビノイド感受性がかなり低いことが判明した (*J. Neurosci.* 22: 3864-3872, 2002)。
4. 単離培養海馬ニューロンにおいて、I-mGluRの活性化は、(1) 単独で内因性カンナビノイドの合成・放出を引き起こすだけでなく、(2) 脱分極による内因性カンナビノイドの合成・放出を促進すること、が判明した (*Eur. J. Neurosci.* 15: 953-961, 2002)。 (図B)
5. 内因性カンナビノイドの機能的神経回路形成における役割を調べるため、CB1受容体ノックアウトマウスの小脳プルキンエ細胞を電気生理学的に解析した。しかし、調べた限りにおいて、2種類の興奮性シナプス (平行線維、登上線維) および抑制性シナプスの生後発達に特に顕著な異常は認められなかった。

6. 海馬培養細胞において、M₁ および M₃ムスカリニックアセチルコリン受容体の活性化が、(1) 単独で内因性カンナビノイドの合成・放出を引き起こすだけでなく、(2) 脱分極による内因性カンナビノイドの合成・放出を著明に促進すること、を明らかにした (*Eur. J. Neurosci.* 18: 109-116, 2003) (図B)。 (3) 一方、M₂受容体は一部の抑制性シナプス終末に存在し、カンナビノイドを介さずに直接伝達物質放出を抑制した (*Eur. J. Neurosci.* 19: 2682-2692, 2004)。

7. 海馬培養細胞において、単独では内因性カンナビノイド放出を起こさない程度の弱いM₁ / M₃受容体の活性化と弱い脱分極を同時に与えると、内因性カンナビノイドが効率よく産生された。これは、海馬神経細胞に存在するフォスホオリパーゼCβ1 (PLCβ1)の酵素活性が、M₁ / M₃受容体の活性化と細胞内Ca²⁺の両方に依存することが原因である。したがって、PLCβ1はコリナージック入力 (シナプス前活動) と細胞内Ca²⁺濃度上昇 (シナプス後神経活動) の同期性検出分子として機能することが明らかになった (*Neuron* 45: 257-268, 2005)。また、この場合に産生される内因性カンナビノイドは、2-AGであると考えられる (図B)。



(橋本谷ら、生化学 78: 126-130, 2006 より引用)

⑧特記事項 (この研究において得られた独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、当該研究分野及び関連研究分野への影響等、特記すべき事項があれば記入してください。)

1. シナプス後細胞の脱分極と細胞内カルシウム濃度上昇により何らかの逆行性シグナルが生じ、抑制性シナプス終末からの伝達物質放出の一過性減少 (**DSI**) を起こすことは以前より知られていたが、そのシグナルの実体は長い間不明であって、研究者は 10 年来それを捜し求めていた。私たちと米国の 2 グループが、全く独立に、内因性カンナビノイドが逆行性伝達物質として働くことを明確に示し、これが Nature 誌の News & Views や Science 誌の News として取り上げられ、大きな反響を引き起こした。これまで、シナプスにおける逆行性シナプス伝達物質としては、グルタミン酸、一酸化窒素、一酸化炭素、アラキドン酸など、多くの物質が候補に挙げられてきたが、いずれも当初の実験データに不備があったり、その後の追試実験が伴わなかったりして、短期間のうちに研究者に顧みられなくなったという経緯がある。**内因性カンナビノイドは、逆行性シナプス伝達物質として広く認められた最初のものであり、これを発見したことは神経科学の進歩に格段の貢献をしたといえることができる。**
2. また、私たちは、シナプス後部に存在する I 型代謝型グルタミン酸受容体の活性化により、内因性カンナビノイドが産生され、興奮性および抑制性シナプス前終末からの伝達物質放出の減少を引き起こすことを発見した。これは、**上記の細胞内カルシウム濃度上昇による内因性カンナビノイド産生とは独立の機構で、私たちの独創的な発見**である。その正しさは、別の複数の研究者の追従実験によってすでに確認されている。さらに私たちは、I 型代謝型グルタミン酸受容体の活性化は、単独で内因性カンナビノイドの合成・放出を引き起こすだけでなく、脱分極による内因性カンナビノイドの合成・放出を著明に促進することを発見した。この事実は、**細胞内カルシウム濃度上昇と I 型代謝型グルタミン酸受容体活性化という 2 つの独立した内因性カンナビノイド産生機構の間にポジティブな相互作用がある**ことを意味しており、動物の脳の中で実際にどのような活動によっての内因性カンナビノイドが産生されるかを理解するうえで重要な知見である。
3. また、ムスカリニックアセチルコリン受容体の活性化が、I 型代謝型グルタミン酸受容体活性化と同様の作用を示すことを明らかにした。すなわち、ムスカリニックアゴニストが、単独で内因性カンナビノイドの合成・放出を引き起こすだけでなく、脱分極による内因性カンナビノイドの合成・放出を著明に促進すること、が明らかになった。この事実は、**内因性カンナビノイドの産生が複数の伝達物質の作用によって巧妙に調節されていることを示唆する点で重要である**。また、ムスカリニックアセチルコリン系は記憶・学習などの脳高次機能との関連で以前より注目されてきたが、その機構を追及するうえで、内因性カンナビノイド系の活性化と調節、という新たな観点加わった点が今後の研究にとって重要である。
4. さらに、海馬において、PLC β 1 はコリナージック入力 (シナプス前活動) と細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇 (シナプス後神経活動) の同期性検出分子として機能することを明らかにした。すべての神経細胞には、PLC β 1 またはそのアイソザイムの PLC β 4 が存在しており、これを駆動する Gq 結合型受容体 (I-mGluR や M_1 / M_3 受容体など) も存在する。したがって、**PLC β を同期性検出分子とする内因性カンナビノイド産生は、ほとんどすべての神経細胞で起こりうる現象**であると考えられる。本研究によって、**中枢神経系における普遍的なシナプス伝達調節機構が新たに発見されたことになり**、神経科学の進展に大きく寄与したことになる。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

1. 学術雑誌等に発表した論文:

- Ohno-Shosaku, T., Maejima, T. and Kano, M.: Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron* 29: 729-738, (2001).
- Maejima, T., Hashimoto, K., Yoshida, T., Aiba, A. and Kano, M.: Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors. *Neuron* 31: 463-475, (2001).
- Miyata, M., Kim, H-T., Hashimoto, K., Lee, T-K., Cho, S-Y., Jiang, H., Wu, Y., Jun, K., Wu, D., Kano, M. and Shin, H-S.: Deficient long-term synaptic depression in the rostral cerebellum correlated with impaired motor learning in phospholipase C β 4 mutant mice. *Eur. J. Neurosci.* 13: 1945-1954, (2001).
- McGee, A.W., Topinka, J.R., Hashimoto, K., Petralia, R.S., Kakizawa, S., Kauer, F., Aguilera-Moreno, A., Wenthold, R.J., Kano, M. and Brecht, D.S.: PSD-93 knock-out mice reveal that neuronal MAGUKs are not required for development or function of parallel fiber synapses in cerebellum. *J. Neurosci.* 21: 3085-3091, (2001).
- Hashimoto, K., Ichikawa, R., Takechi, H., Inoue, Y., Aiba, A., Sakimura, K., Mishina, M., Hashikawa, T., Konnerth, A., Watanabe, M. and Kano, M.: Roles of GluR δ 2 and mGluR1 in climbing fiber synapse elimination during postnatal cerebellar development. *J. Neurosci.* 21: 9701-9712, (2001).
- Maejima, T., Ohno-Shosaku, T. and Kano, M.: Endogenous cannabinoid as a retrograde messenger from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neurosci. Res.* 40: 205-210, (2001).
- Yoshida, T., Hashimoto, K., Zimmer, A., Maejima, T., Araishi, K. and Kano, M.: The cannabinoid CB1 receptor mediates retrograde signals for depolarization-induced suppression of inhibition in cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* 22: 1690-1697, (2002).
- Ohno-Shosaku, T., Shosaku, J., Tsubokawa, H. and Kano, M.: Cooperative endocannabinoid production by neuronal depolarization and group I metabotropic glutamate receptor activation. *Eur. J. Neurosci.* 15: 953-961, (2002).
- Ohno-Shosaku, T., Tsubokawa, H., Mizushima, I., Yoneda, N., Zimmer, A. and Kano, M.: Presynaptic cannabinoid sensitivity is a major determinant of depolarization-induced retrograde suppression at hippocampal synapses. *J. Neurosci.* 22: 3864-3872, (2002).
- Tabata, T. and Kano, M.: Heterogeneous intrinsic firing properties of vertebrate retinal ganglion cells. *J. Neurophysiol.* 87: 30-41, (2002).
- Tabata, T., Aiba, A. and Kano, M.: Extracellular calcium controls the dynamic range of neuronal metabotropic glutamate receptor responses. *Mol. Cell. Neurosci.* 20: 56-68, (2002).
- Miura, M., Watanabe, M., Offermanns, S., Simon, M.I. and Kano, M.: Group I metabotropic glutamate receptor signaling via G α q/G α 11 secures the induction of long-term potentiation in the hippocampal area CA1. *J. Neurosci.* 22: 8379-8390, (2002).
- Ichikawa, R., Miyazaki, T., Kano, M., Hashikawa, T., Tatsumi, H., Sakimura, K., Mishina, M., Inoue, Y. and Watanabe, M.: Distal extension of climbing fiber territory and multiple innervation caused by aberrant wiring to adjacent spiny branchlets in cerebellar Purkinje cells lacking glutamate receptor GluR δ 2. *J. Neurosci.* 22: 8487-8503, (2002).
- Kishimoto, Y., Fujimichi, R., Araishi, K., Kawahara, S., Kano, M., Aiba, A. and Kirino, Y.: mGluR1 in cerebellar Purkinje cells is required for normal association of temporally contiguous stimuli in classical conditioning. *Eur. J. Neurosci.* 16: 2416-2424, (2002).

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

Kano, M., Ohno-Shosaku, T. and Maejima, T.: Retrograde signaling at central synapses via endogenous cannabinoids. *Mol. Psychiatry* 7: 234-235, (2002).

Kakizawa, S., Yamada, K., Iino, M., Watanabe, M. and Kano, M.: Effects of insulin-like growth factor I on climbing fiber synapse elimination during cerebellar development. *Eur. J. Neurosci.* 17: 545-554, (2003).

Fukudome, Y., Tabata, T., Miyoshi, T., Haruki, S., Araishi, K., Sawada, S. and Kano, M.: Insulin-like growth factor-I as a promoting factor for cerebellar Purkinje cell development. *Eur. J. Neurosci.* 17: 2006-2016, (2003).

Hashimoto, K. and Kano, M.: Functional differentiation of multiple climbing fiber inputs during synapse elimination in the developing cerebellum. *Neuron* 38: 785-796, (2003).

Ohno-Shosaku, T., Matsui, M., Yuko Fukudome, Y., Shosaku, J., Tsubokawa, H., Taketo, M.M., Manabe, T., and Kano, M.: Postsynaptic M₁ and M₃ receptors are responsible for the muscarinic enhancement of retrograde endocannabinoid signaling in the hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 18: 109-116, (2003).

Takeda, Y., Akasaka, K., Lee, S., Kobayashi, S., Kawano, H., Murayama, S., Takahashi, N., Hashimoto, K., Kano, M., Asano, M., Sudo, K., Iwakura, Y. and Watanabe, K.: Impaired motor coordination in mice lacking neural recognition molecule NB-3 of the contactin/F3 subgroup. *J. Neurobiol.* 56: 252-265, (2003).

Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Maejima, T. and Yoshida, T.: Endocannabinoid-mediated modulation of excitatory and inhibitory synaptic transmission. In: *EXCITATORY-INHIBITORY BALANCE. Synapses, Circuits, Systems.* T.K. Hensch and M. Fagiolini, (eds), Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York/Boston/Dordrecht/London/Moscow, 99-107, (2003).

Kitao, Y., Hashimoto, K., Matsuyama, T., Iso, H., Tamatani, T., Hori, O., Stern, D.M., Kano, M., Ozawa, K. and Ogawa, S.: ORP150/HSP12A regulates Purkinje cell survival: A role for ER stress in cerebellar development. *J. Neurosci.* 24: 1486-1496, (2004).

Miyazaki, T., Hashimoto, K., Shin, H-S., Kano, M. and Watanabe, M.: P/Q-type Ca²⁺ channel α 1A regulates synaptic competition on developing cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* 24: 1734-1743, (2004).

Fukudome, Y., Ohno-Shosaku, T., Matsui, M., Omori, Y., Fukaya, M., Tsubokawa, H., Taketo, M.M., Watanabe, M., Manabe, T. and Kano, M.: Two distinct classes of muscarinic action on hippocampal inhibitory synapses: M₂-mediated direct suppression and M₁/M₃-mediated indirect suppression through endocannabinoid signaling. *Eur. J. Neurosci.* 19: 2682-2692, (2004).

Hartmann, J., Blum, R., Kovalchuk, Y., Adelsberger, H., Kuner, R., Durand, G.M., Miyata, M., Kano, M., Offermanns, S. and Konnerth, A.: Distinct roles of G α_q and G α_{11} for Purkinje cell signaling and motor behavior. *J. Neurosci.* 24: 5119-5130 (2004).

Sato, M., Tabata, T., Hashimoto, K., Nakamura, K., Nakao, K., Katsuki, M., Kitano, J., Moriyoshi, K., Kano, M. and Nakanishi, S.: Altered agonist sensitivity and desensitization of neuronal mGluR1 responses in knock-in mice by a single amino acid substitution at the PKC phosphorylation site. *Eur. J. Neurosci.* 20: 947-955 (2004).

Tabata, T., Araishi, K., Hashimoto, K., Hashimoto-dani, Y., van der Putten, H., Bettler, B. and Kano, M.: Ca²⁺ activity at GABA_B receptors constitutively promotes metabotropic glutamate signaling in the absence of GABA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 16952-16957, (2004).

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

Yamazaki, M., Ohno-Shosaku, T., Fukaya, M., Kano, M., Watanabe, M. and Sakimura, K.: A novel action of stargazin as an enhancer of AMPA receptor activity. *Neurosci. Res.* 50: 369-374 (2004).

Fukaya, M., Araishi, K., Aiba, A., Kano, M. and Watanabe, M.: Signaling complex formation of phospholipase C β 4 with mGluR1a and IP3 receptor at the perisynapse and endoplasmic reticulum in the mouse brain. *Eur. J. Neurosci.* 20: 2929-2944 (2004).

Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Maejima, T., Yoshida, T. and Hashimoto, K.: Retrograde modulation of synaptic transmission mediated by endogenous cannabinoids. *Curr. Neuropharmacol.* 2: 49-57, (2004).

Tabata, T. and Kano, M.: Calcium-dependence of native metabotropic glutamate receptor signaling in central neurons. *Mol. Neurobiol.* 29: 261-270, (2004).

Ohno-Shosaku, T., Maejima, T., Yoshida, T., Hashimoto, K., Fukudome, Y. and Kano, M.: Control of synaptic transmission in the CNS through endocannabinoid-mediated retrograde signaling. In: *Dendritic Neurotransmitter Release*. M. Ludwig, (ed), Springer, New York, 269-281, (2005).

○Hashimotodani, Y., Ohno-Shosaku, T., Tsubokawa, H., Ogata, H., Emoto, K., Maejima, T., Araishi, K., Shin, H-S. and Kano, M.: Phospholipase C β serves as a coincidence detector through its Ca²⁺ dependency for triggering endocannabinoid signal. *Neuron* 45: 257-268, (2005).

Tabata, T., Haruki, S., Nakayama, H. and Kano, M.: GABAergic activation of an inwardly rectifying K⁺ current in mouse cerebellar Purkinje cells. *J. Physiol. (London)*, 563: 443-457, (2005).

2. 国際会議、学会等：

(1) 国際会議および国際シンポジウム：

以下の2件を含む計9回の国際会議または学会における国際シンポジウムにおいて、招待講演者として、発表した。

Japan-UK Workshop "From Molecules to Memory 2002"(2002年8月29日、奈良)

Japan-US Brain Research Cooperative Program, Information Exchange Seminar "Neural Signalplexes and Ion Channel Regulation" (2003年3月17日、岡崎)

(2) 学会発表：

Maejima, T., Hashimoto, K., Yoshida, T., Aiba, A. and Kano, M.: Inhibition of cerebellar climbing fiber to Purkinje cell synaptic transmission mediated by metabotropic glutamate receptor subtype 1. Soc. Neurosci. Abst. 27: Program No. 499.20. (November 13) (2001). [Soc. Neurosci. 31th Annual Meeting, San Diego, November 10-15, 2001]

Kano, M., Maejima, T., Yoshida, T., Yamazaki, M. and Hashimoto, K.: Endocannabinoid-mediated retrograde signaling triggered by activation of postsynaptic metabotropic glutamate receptors in cerebellar Purkinje cells. Proceedings of the 29th Göttingen Neurobiology Conference and the 5th Meeting of the German Neuroscience Society Programm No. 155 (June 13), June 12-15, 2003.

Hashimotodani, Y., Ohno-Shosaku, T., Fukudome, Y. and Kano, M.: Enhancement of receptor-mediated phospholipase C activation by preceding depolarization in hippocampal neurons. *Neurosci. Res. Suppl.* 50 Suppl. 1: S54 (OH1-08) (2004). 第27回日本神経科学学会大会（大阪、大阪国際会議場、2004年9月21-23日、21日発表）

上記を含め、合計49回の学会発表を行った。