

内因性カンナビノイドを介する逆行性シナプス伝達のメカニズムとその生理的意義の解明

Elucidation of the mechanisms and physiological significance of endocannabinoid-mediated retrograde synaptic modulation

狩野 方伸 (KANO MASANOBU)

東京大学・大学院医学系研究科・教授



研究の概要

脳内に存在するマリファナ類似物質（内因性カンナビノイド）はニューロンのシナプス後部から放出され、逆行性にシナプス前終末のカンナビノイド CB1 受容体に作用して、神経伝達物質放出の減少を引き起こす。本研究では、内因性カンナビノイドのシナプス伝達調節の機構とその高次脳機能における役割の解明を目指している。

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：(A) 分子・細胞神経科学

1. 研究開始当初の背景・動機

- (1)マリファナの多様な精神神経作用は CB1 受容体を介する。
- (2)CB1 受容体の内因性のリガンド(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)がある。
- (3)2001 年に狩野らと米国の 2 グループが、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を報告した。
- (4)内因性カンナビノイドのシナプス伝達調節の機構や高次脳機能における役割など多くの重要な点が未解決であった。

2. 研究の目的

- (1)内因性カンナビノイドの生合成、放出、分解の分子機構の解明
 - (1)生合成経路の解明
 - (2)生理的放出条件の解明
 - (3)分解経路の解明
- (2)内因性カンナビノイド系のシナプス可塑性と脳高次機能における役割の解明
 - (4)シナプス可塑性のメカニズムの解明
 - (5)行動解析に基づく内因性カンナビノイドの生理的役割の検討

3. 研究の方法

- (1)培養海馬ニューロンペアからの whole-cell recording。カンナビノイド高感受性の抑制性シナプス後電流 (IPSC) を記録し、シナプス後ニューロンからの内因性カンナビノイドの放出を検知した。
- (2)マウスから小脳スライスプルキンエ細胞からの whole-cell recording。カンナビノイド高感受性の興奮性シナプス後電流 (EPSC) を記録した。固体レーザーと超高

- 性能三次元空気ばね式除振装置を既存の 2 光子励起顕微鏡に組み合わせ、細胞内カルシウム濃度をリアルタイム計測した。
- (3)マウス線条体スライスの中型有棘細胞 (Medium spiny neuron: MS neuron) から whole-cell recording を行い、カンナビノイド高感受性の IPSC をバイオアッセイに用いた。
- (4)免疫蛍光法と免疫電顕法によって CB1, DAGL 等の内因性カンナビノイドシグナル関連分子の小脳、海馬、線条体における局在を調べた。

4. これまでの成果

(1)内因性カンナビノイドの生合成、放出、分解の分子機構の解明

- (1)生合成経路の解明
 - a) 脱分極後の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇により放出される内因性カンナビノイドは、アナンダミドではなく 2-AG であることを明らかにした。
 - b) $G_{q/11}$ 結合型受容体活性化、および細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇と $G_{q/11}$ 結合型受容体活性化の相乗作用による内因性カンナビノイドの合成・放出に、海馬では PLC β 1 が、小脳の前半部のプルキンエ細胞では PLC β 4 が必須であることを明らかにした。
 - c) PLC β 1 及び PLC β 4 の活性が細胞内 Ca^{2+} 濃度に依存しており、 $G_{q/11}$ 結合型受容体活性化と Ca^{2+} 濃度上昇が同時に起こると相乗的に内因性カンナビノイドの放出が起こることを明らかにした。
 - d) 小脳スライスにおいて、 $G_{q/11}$ 結合型の代謝型グルタミン酸受容体 1 型 (mGluR1) の活性化と脱分極の同時刺激によって放出される 2-AG を生化学的に定量した。
 - e) 線条体スライスにおいて、大脳皮質から

- MS neuron への興奮性シナプスでは、脱分極により誘発される興奮の抑圧 (Depolarization-induced suppression of excitation: DSE) は起こらない。一方、 $G_{q/11}$ 結合型の group I mGluR の活性化によって、内因性カンナビノイドを介する逆行性抑圧は起こり、また group I mGluR のアゴニスト存在下では DSE が生じた。
- f) 線条体の MS neuron の抑制性シナプスでは、脱分極により誘発される興奮の抑圧 (Depolarization-induced suppression of inhibition: DSI) が効率よく生じた。
- g) 海馬培養ニューロンにおいて NMDA 受容体を通して流入した Ca^{2+} によって 2-AG が産生され逆行性シナプス伝達抑制をおこすことを明らかにした。
- (2) 生理的放出条件の解明
- a) 小脳スライスにおいて、興奮性の平行線維シナプス活動により、mGluR1 活性化と樹状突起の局所脱分極による Ca^{2+} 濃度上昇が起こり、内因性カンナビノイド放出がおこることを電気生理学的に示した。
- b) 線条体スライス標本において、コリン作動性介在ニューロンが持続的に発火しており、それによって供給されるアセチルコリンが $G_{q/11}$ 結合型の M1 ムスカリニック受容体を介して、MS neuron からの内因性カンナビノイド放出を持続的に増強していることを明らかにした。
- c) 小脳スライスのブルキンエ細胞を用いて、CB1 の活性化が、微小シナプス後電流のうち、 Ca^{2+} に関係なく発生する成分には影響せず、 Ca^{2+} による増強成分のみを選択的に抑制することを明らかにした。
- (3) 分解経路の解明
- a) 海馬培養細胞において、2-AG の分解酵素 monoacylglycerol lipase (MGL) が、細胞外の 2-AG 濃度を低く保っており、またシナプス後ニューロンから放出された 2-AG を分解して、逆行性シナプス抑制を終結させることを明らかにした。
- b) MGL ノックアウトマウスを作成し、解析を始めた。
- (2) 内因性カンナビノイド系のシナプス可塑性と脳高次機能における役割の解明
- a) CB1 受容体ノックアウトマウスでは、小脳依存性の運動学習パラダイムである瞬目反射条件付けが著しく障害されていた。
5. これまでの進捗状況と今後の計画
- (1) 研究は順調に進行し、予想以上の成果を挙げている。
- (2) 平成 20-21 年度の研究はほぼ当初計画どおりに行う (2. 研究の目的 参照)。
- (3) 特に、これまでに作製した遺伝子改変マウスの解析に重点を置く。
6. これまでの発表論文等
(研究代表者は太字、研究分担者には下線)
- 1) **Ohno-Shosaku, T.**, Hashimoto, Y., Ano, M., Takeda, S., Tsubokawa, H. & **Kano, M.**: Endocannabinoid signalling triggered by NMDA receptor-mediated calcium entry into

- rat hippocampal neurons. **J. Physiol. (Lond)**. 584, 407-418, 2007
- 2) Hashimoto, Y., **Ohno-Shosaku, T.**, **Kano, M.**: Ca^{2+} -assisted receptor-driven endocannabinoid release: mechanisms that associate presynaptic and postsynaptic activities. **Curr Opin Neurobiol** 17: 360-365, 2007
- 3) Hashimoto, Y., **Ohno-Shosaku, T.**, **Kano, M.**: Presynaptic monoacylglycerol lipase activity determines basal endocannabinoid tone and terminates retrograde endocannabinoid signaling in the hippocampus. **J Neurosci** 27: 1211-1219, 2007
- 4) Narushima, M., Uchigashima, M., Fukaya, M., Matsui, M., Manabe, T., Hashimoto, K., Watanabe, M., **Kano, M.**: Tonic enhancement of endocannabinoid-mediated retrograde suppression of inhibition by cholinergic interneuron activity in the striatum. **J Neurosci** 27: 496-506, 2007
- 5) Kishimoto, Y., **Kano, M.**: Endogenous cannabinoid signaling through the CB1 receptor is essential for cerebellum-dependent discrete motor learning. **J Neurosci** 26: 8829-8837, 2006
- 6) Kawamura, Y., Fukaya, M., Maejima, T., Yoshida, T., Miura, E., Watanabe, M., Ohno-Shosaku, T., **Kano, M.**: The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic site in the hippocampus and cerebellum. **J Neurosci** 26: 2991-3001, 2006
- 7) Kishimoto, Y., Nakazawa, K., Tonegawa, S., Kirino, Y., **Kano, M.**: Hippocampal CA3 NMDA receptors are crucial for adaptive timing of trace eyeblink conditioned response. **J Neurosci** 26: 1562-1570, 2006
- 8) Yamasaki, M., Hashimoto, K., **Kano, M.**: Miniature synaptic events elicited by presynaptic Ca^{2+} rise are selectively suppressed by cannabinoid receptor activation in cerebellar Purkinje cells. **J Neurosci** 26: 86-95, 2006
- 9) Kakizawa, S., Miyazaki, T., Yanagihara, D., Iino, M., Watanabe, M., **Kano, M.**: Maintenance of presynaptic function by AMPA receptor-mediated excitatory postsynaptic activity in adult brain. **Proc Natl Acad Sci USA**. 102: 19180-19185, 2005
- 10) Maejima, T., Oka, S., Hashimoto, Y., **Ohno-Shosaku, T.**, Aiba, A., Wu, D., Waku, K., Sugiura, T., **Kano, M.**: Synaptically driven endocannabinoid release requires Ca^{2+} -assisted metabotropic glutamate receptor subtype 1 to phospholipase C β 4 signaling cascade in the cerebellum. **J Neurosci** 25: 6826-6835, 2005

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/~neurophy/>