3L1415

ホヤ幼生の脳神経系で特異的に発現している G タンパク質遺伝子

○吉田 麗子、川上 功、岩佐 達郎、日下部 岳広、津田 基之（姫路工大・理・生命）

原索動物ホヤは最も原始的な脊椎動物であり、既にヒトの脳の基本設計ができていると言われている。ホヤのオタマジャクシ型幼生の神経系を構成する細胞は約 300 個程度、脳のニューロンに限れば 7-9 個と極めて少ない。また、胚発生における細胞系譜が明らかになっているため、脳神経系を発生工学的手法を用いて研究することができる。本研究では、脳神経系の形成過程とそこで働く情報伝達システムを明らかにするため、G タンパク質関連情報伝達系に注目し、マボヤの G タンパク質遺伝子の解析を行ってきた。しかし、マボヤは冬季の限られた期間しか受精できない。そこで、特定の遺伝子を解析するために、通年何時でも受精ができ、コスモポリタン種であるカタユウレイボヤを用いることにした。カタユウレイボヤ幼生 cDNA ライブラリーから、幼生の脳神経系にきわめて限定された発現を示す G タンパク質遺伝子をクローニングすることができたので報告する。

カタユウレイボヤ幼生の cDNA ライブラリーを作製し、PCR により 4 種類の異なる G タンパク質 cDNA 断片を得た。このうち Gi クラスに属する G タンパク質遺伝子 (GiGi) の全長をクローニングすることができた。この遺伝子の塩基配列を元にプローブを合成し、カタユウレイボヤ卵の発生に伴うその発現パターンを whole mount *in situ* hybridization により調べた。その結果、受精卵から 16 細胞期までは全割球で母系のメッセージが見られた。32~110 細胞期では、内胚葉、脊索に分化する割球以外の全ての割球で一過性の発現が見られた。尾芽胚期、及び幼生期では脳神経系に発現が限定されていた。この遺伝子の機能を明らかにするため、操作を加えた遺伝子をホヤの受精卵に導入し、発生したホヤ幼生の神経回路、行動の変化を見たい。

R.Yoshida, I.Kawakami, T.Iwasa, T.Kusakabe, M.Tsuda : A G protein gene specifically expressed in the cerebral nervous system of the ascidian larva

3L1445

小脳プルキンエ細胞における代謝調節型受容体間の相互作用

○廣野 守俊¹、小西 史朗²、吉岡 亨^{1,3}（¹早大・理工総研、²三菱化学生命研、CREST、³早大・人間科学・分子神経生物学）

小脳の平行線維—プルキンエ細胞間のシナプス後膜周辺には、抑制性神経伝達物質 GABA の代謝調節型受容体、GABA_B 受容体が豊富に存在する。一方、代謝調節型グルタミン酸受容体の 1 型 (mGluR1) もシナプス後膜に非常に多く発現し、mGluR1 の活性化は興奮性内向き電流と細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇を誘起することが知られている。このシナプス後膜において、GABA_B 受容体が mGluR1 の介する生理的応答を如何に制御し、シナプス可塑性にどのように関与するのか殆ど分かっていない。

本研究では、マウス小脳プルキンエ細胞にホールセルボルテジクランプ法と Ca²⁺ イメージング法を適用し、mGluR1 と GABA_B 受容体の同時活性化による生理的応答を記録した。まず、mGluR1 を 1S,3R-ACPD により活性化し、GABA_B 受容体の選択的アゴニスト、バクロフェンを灌流投与すると、mGluR1 の介する興奮性内向き電流と細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇が大きく増強した (EC₅₀ = 0.63 μ M)。他方、G 蛋白質結合型 K⁺ チャネルを介して生じる抑制性の電流は、EC₅₀ = 1.49 μ M であった。平行線維を高頻度刺激 (100Hz、10 回) すると、種々イオンチャネル結合型受容体の阻害薬存在下では、mGluR1 の介する slow EPSC (興奮性シナプス後電流) が観察される。そこで、slow EPSC に対する GABA_B 受容体活性化の影響を調べたところ、 μ M オーダーのバクロフェンでは、平行線維終末からの伝達物質放出が阻害されるために、slow EPSC は抑制された。ところが、低濃度 (300 nM) では増大することが明らかになった。以上から、ニューロンを抑制すると考えられているシナプス後膜の GABA_B 受容体は、mGluR1 の介する興奮性の生理的応答を増強し、シナプス可塑性に関わるものと推測された。

M. Hirono, S. Konishi, T. Yoshioka : Activation of GABA_B receptors has dual effects on mGluR1-mediated slow EPSCs in mouse cerebellar Purkinje cells.

3L1430

ラット小脳バスケット細胞の β -アドレナリン受容体で仲介される GABA シナプス増強機構

○齋藤 文仁^{1,2}、小西 史朗^{1,2}（¹三菱生命研、²CREST・JST）

ラット小脳プルキンエ細胞 (PC) に入力する GABA シナプスではノルアドレナリン (NA) が β -アドレナリン受容体を介して伝達効率を増強する。一昨年の本会で、この増強作用はシナプス前性機構により GABA 放出頻度を高め、伝達効率を増強することを報告した。この作用は forskolin で模倣されることからシナプス前細胞であるバスケット細胞 (BC) 内の cAMP 上昇が関与することが示唆された。本研究ではこの増強反応の機構をさらに解析し、BC 上の β 受容体の刺激に伴い過分極活性型の陽イオンチャネル (H チャネル) の活性化と脱分極が関与していることを新たに見出した。 β アゴニスト isoproterenol (ISP) は H チャネルの膜電位に依存した活性化曲線を脱分極側にシフトした。また、H チャネルの特異的ブロッカー ZD7288 (50mM) を先行投与すると、スパイク頻度が減少した。その後 ISP によるスパイク頻度の上昇効果は、阻害された。これらの結果から、ラット小脳 BC の H チャネルは静止膜電位の維持に寄与し、BC の β 受容体活性化に伴い、脱分極が発生しスパイク頻度を上昇することが示された。この効果は NA による GABA シナプス電流の頻度上昇の原因と考えられる。一方、電気刺激により誘発される GABA シナプス反応は、H チャネル抑制下でも振幅が増加した。従って、NA による GABA シナプス増強には、少なくとも 2 つの異なった分子機構が関与することが示唆された。

F. Saitow and S. Konishi : Mechanisms of beta-adrenergic receptor-mediated facilitation of GABAergic synapse at cerebellar basket cell

3L1500

神経活動に伴って放出される増強誘導蛋白質分子は既知ニューロトロフィンと異なる経路で作用する

○工藤 卓、永井 里奈、清末 和之、田口 隆久（工技院・大工研・脳神経工学ラボラトリー）

シナプス部位において分子が相互作用して情報伝達効率を調節する。個々のシナプスの変化は、神経回路網の動的特性を制御し、これによって脳の高次機能が担われている。この一連の過程を統合的に理解するため、我々はニワトリ大脳解離培養系を開発し、この系がシナプス活動を制御する物質を探るのに有効であることを示してきた。本系においては、一時的な Mg²⁺ 除去によって自発性シナプス後電流 (SEPPSCs) 振幅の増強が誘導されること、増強を誘導した培養皿から調製した条件付け記録外液 (CM) 中にシナプス増強を誘導する蛋白質分子が存在することを報告してきた。この因子は、既知のニューロトロフィンとは異なる経路で増強を誘導する。ニワトリ大脳解離培養系に於いても、50ng/ml の脳由来神経栄養因子 (BDNF)、ニューロトロフィン 3 (NT3) により、自発性シナプス後電流の増強が誘導されるが、これらの増強は、チロシンキナーゼ阻害剤である K252a により阻害された。一方、CM 中の蛋白質因子による増強は K252a では阻害されなかった。BDNF, NT3 のように生理的に重要な因子は生物種が異なっても生理活性を持つことが考えられる。そこで、ニワトリ由来の蛋白質因子が、ラット、マウス由来の解離培養系に於いても作用するか検討したところ、同様に自発性シナプス後電流の増強が誘導された。神経活動に伴って放出される蛋白質因子は、生理的に重要な機能を担い、異生物種間で保存されている可能性が高い。

S.N.Kudoh, R.Nagai, K.Kiyosue, and T.Taguchi : A protein factor in the conditioned medium induced a synaptic enhancement through a different path than neurotrophins.