

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07122

研究課題名(和文) ポストシナプスがゲートする神経伝達物質放出機構の解明

研究課題名(英文) Studying novel dopamine release gated by postsynaptic activity in Drosophila brain

研究代表者

上野 耕平 (UENO, Kohei)

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳・神経科学研究分野・副参事研究員

研究者番号：40332556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ドパミン作動性神経(dopaminergic neuron, DAN)は非常に大きな終末を備えており、DANが興奮すると、脳の広範囲にドパミンを放出する。しかし、記憶形成では神経回路特異性が重要であるため、DANは局所的な放出機構も備えているのではないかと考えられていた。私は、ハエ摘出脳の解析から、活性化した後シナプス細胞が近傍のDAN終末に作用し、局所的なドパミン放出を引き起こすことを見出した。遺伝学的解析とイメージング解析を組み合わせることで、この現象は後シナプスからの一酸化炭素がDAN終末のリアノジン受容体を活性化させるという全く新しいシナプス伝達機構によって達成されている事を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、神経伝達物質の放出は、その伝達物質を放出する神経が興奮し、これによって神経終末のCa²⁺レベルが上昇することが唯一の機構であると考えられてきた。しかし、本研究において神経伝達物質の受け手である後シナプス細胞が活性化することが直接の引き金となりうること、さらに一部の終末だけで神経伝達物質を放出させることも可能であることを見出した。本研究成果はこれらの知見からシナプス伝達の新しい概念を提案するものである。

研究成果の概要(英文)：The dopaminergic neuron (DAN), which releases dopamine, has very large terminals. Thus, when the DAN is excited, it releases dopamine over a wide area of the brain. However, since memory formation requires neural circuit specificity, it was thought that DANs may also have local release mechanisms. From the analysis of Drosophila isolated brains, I found that activated postsynaptic cells by odor and somatosensory inputs induce dopamine release from neighboring presynaptic terminals of DANs. By combining genetic and imaging analyses, I found that this phenomenon is achieved by a novel synaptic transmission mechanism in which carbon monoxide from the postsynaptic cells activates ryanodine receptors at the DAN terminal.

研究分野：神経科学

キーワード：ドパミン ショウジョウバエ シナプス 逆行性シグナル

1. 研究開始当初の背景

ドパミンは脳の様々な高次機能に関わる神経伝達物質であり、その放出量の増減が様々な精神疾患の原因となることが知られている。無脊椎動物においても、ドパミンは脳機能において重要であるが、特にショウジョウバエの匂い嫌悪学習（匂いと電気ショックによる連合学習）における記憶形成には必須の神経伝達物質である。すなわち、PPL1 クラスタと呼ばれるドパミン作動性神経（dopaminergic neuron, DAN）からのドパミン放出を抑制する、もしくは PPL1 DAN の投射先であるキノコ体神経の 1 型ドパミン受容体（D1R）を欠失させることでこの記憶形成は完全に抑制される（Kim et al., 2007 J. Neurosci., Aso et al., 2010 Curr. Biol.）。さらに、匂いと共に与える電気ショックの代わりに PPL1 DAN を活性化することでも、匂い嫌悪記憶様の変化を引き起こす事ができることから（Claridge-Chang et al., 2009 Cell, Aso et al., 2010 Curr. Biol.）、ハエにおいて DAN は電気ショック情報を伝達することで匂い記憶形成に貢献しているのではないかと考えられていた。以前に私は摘出したハエ脳において匂い嫌悪記憶様の変化を引き起こすことのできる *in vitro* 実験系を確立した（Ueno et al., 2013 J. Physiol.）。摘出脳の匂い中枢（antennal lobe, AL）と体性感覚上行経路（ascending fiber of ventral nerve cord, AFV）を電極によって同時に刺激すると、AL 刺激に対するキノコ体神経の Ca^{2+} 応答が長期的に増強するという可塑的な変化を引き起こす事ができ、これを long-term enhancement, LTE と呼んだ。LTE は匂い嫌悪記憶と同様にキノコ体神経上の D1R が必須であることから、摘出脳における LTE を指標にすることで、ドパミンの放出機序を解析すれば、匂い嫌悪記憶形成時におけるドパミンの役割を精密に評価出来るのではないかと考えた。いくつかの実験を行ったところ、興味深いことに AFV 刺激はドパミンではなくグルタミン酸の放出を誘導すること、そして放出されたグルタミン酸がキノコ体神経上の NMDA 受容体の活性化を引き起こすことが見出された。さらに、AL 刺激と同時に、NMDA 受容体の活性化を行うと、AL 刺激と AFV 刺激と同様に D1R 依存的な LTE が形成されることが見出された。一方、ドパミンはそれ単独で LTE を引き起こし、AL 刺激や AFV 刺激を必要としない。これらの結果は脳が AL 刺激と AFV 刺激を同時に受けると、それによってドパミンが放出され、放出されたドパミンがキノコ体神経に LTE を形成させるというモデルが想定される。実際に、AL と AFV 刺激（もしくは NMDA 受容体活性化）におけるドパミンの放出を観察すると、キノコ体神経が AL 入力と NMDA 受容体によって同時に活性化されるとドパミンが放出されることが見出された。これらの結果は、匂い嫌悪記憶形成時において、DAN は電気ショックを伝達するのではなく、電気ショックと匂いがキノコ体神経に伝達された後に放出され、それがキノコ体神経の可塑的な変化を引き起こすのではないかと考えられる（Ueno et al., eLife 2017）。さらに、同じ DAN が投射しているキノコ体神経の一部を活性化させると、ドパミンは活性化されたキノコ体上でのみ放出され、同じ DAN の終末でもキノコ体が活性化されていなければ放出は引き起こされなかった。すなわち、DAN からのドパミン放出は DAN 自身が決定するというよりも、受け手であるキノコ体神経が匂いとショックにより活性化されているか否かにより決定されていることを示唆する。この受け手の神経主体の放出様式をオンデマンド放出機構と名付けた（Ueno et al., 2017 eLife）。

2. 研究の目的

本研究は上記オンデマンド放出がどのような分子機構によって引き起こされているのかを明らかにすることを目的とする。前述したように、オンデマンド放出は受け手であるキノコ体神経の活性化が重要な引き金となっているため、活性化したキノコ体神経が何らかの分子経路によって近傍の PPL1 DAN 終末に働きかけていると考えられる。そこで、本研究ではまずオンデマンド放出を抑制する薬剤や遺伝子変異のスクリーニングを行うことで、オンデマンド放出の主要な分子経路を同定する。次いで、それら分子をキノコ体神経や PPL1 DAN 特異的に阻害することでも同様にオンデマンド放出が抑制されるのか否かを解析する。さらに、これらオンデマンド放出分子を活性化させた時、それだけでドパミンの放出が起きるのか否かを確認する。最後に、見出されたオンデマンド分子の遺伝子を破壊することで匂い嫌悪記憶にどのような変化を引き起こすのかを解析することで、オンデマンド放出によるドパミン放出が、生きたハエの匂い嫌悪記憶に関与するのかを明らかにする。

3. 研究の方法

オンデマンド放出の分子機構を探る実験系は、私が以前に開発した *in vitro* 実験系により行う

(図 1)。簡単に説明すると、ハエの脳を 0 mM Ca^{2+} HL3 溶液内で解剖し摘出する。摘出した脳を固定し、共焦点レーザー顕微鏡下 (A1R, Nikon 社) に置く。ガラス電極により AL を刺激しながら、NMDA を投与し、その時の DAN から exocytosis を synapto-pHluorin (spH) 蛍光 (Miesenböck et al., 1998 Nature) を観察することで、ドパミン放出を評価する。匂い嫌悪記憶は、teaching machine を用いた古典的手法により行う (Tully and Quinn, 1985 J. Comp. Physiol. A)。具体的には 3-octanol (OCT) もしくは 4-methylcyclo hexanol (MCH) をハエに呈示しながら電気ショックを与える (1 分間)。その後、OCT と MCH を T 字迷路にて両方呈示し、それぞれの匂いに移動したハエの匹数から、performance index (PI) を算出する。PI は電気ショックと同時に呈示された匂いとは逆の匂いに移動したハエの匹数から、電気ショックと同時に呈示された匂いに移動したハエの匹数を引き、それを全体の匹数で割ることで求める。

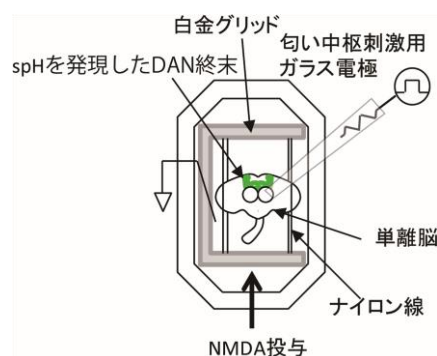


図 1 摘出脳におけるドパミン放出の観察 spH を DAN に発現させたハエ脳を摘出し、ナイロン糸で固定する。AL は電極で、NMDA はバス投与することで刺激する。

4. 研究成果

(1) キノコ体神経から DAN へのシグナル

オンデマンド放出は AL 刺激と同時に NMDA をバス投与した時のキノコ体神経上での PPL1 DAN における spH の蛍光変化で評価する。

AL 刺激と NMDA の同時投与により活性化したキノコ体神経がどのように PPL1 DAN へと情報を伝達するのかを明らかにするため、まずキノコ体神経からのシナプス放出を抑制した際のオンデマンド放出の有無を解析した。ショウジョウバエでは温度上昇によってシナプス小胞のリサイクリングを抑制することのできる遺伝子組換え体が知られており (*sh^{ts}*)、これをキノコ体に発現させて、チャンバーの温度を上げた時にオンデマンド放出が起きるか否かを調べた。その結果、キノコ体からのシナプス放出抑制はオンデマンド放出に影響を与えないことが示された (図 2)。後シナプスが前シナプスに直接シグナルを伝達する方法としては、ギャップ結合や逆行性シグナルが知られている。ギャップ結合阻害剤や、一般的な逆行シグナル分子である一酸化窒素 (NO) 合成酵素の阻害剤はオンデマンド放出に影響を与えなかったが、一酸化炭素

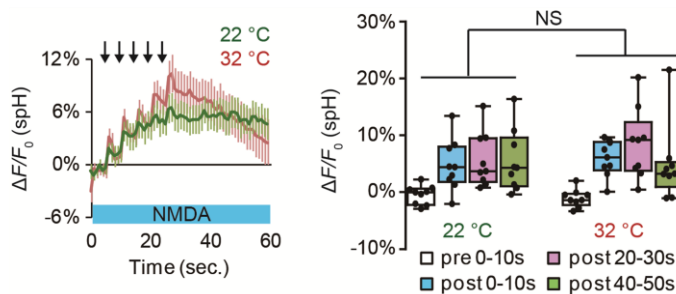


図 2 キノコ体からのシナプス放出とオンデマンド放出 熱刺激によってキノコ体からのシナプス放出が止まる遺伝子組換え体 (*MB>UAS-sh^{ts}*) を用いて AL 刺激 (→) と NMDA 刺激を同時に行った際の、PPL1 DAN 終末からのドパミン放出を観察したところ、熱刺激を行った場合 (32°C) も行わなかった場合 (22°C) も有意な違いは無かった。

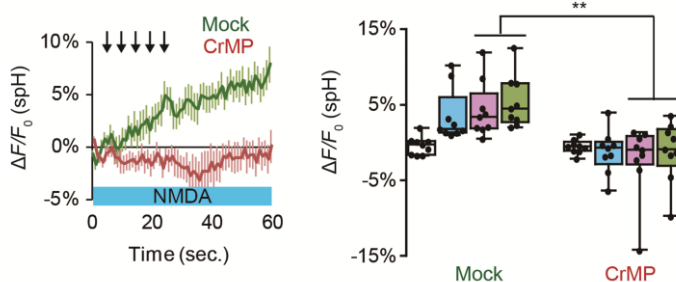


図 3 オンデマンド放出における CO 合成酵素阻害剤の効果 AL 刺激と NMDA 刺激を同時に行った際の、PPL1 DAN 終末からのドパミン放出を観察したところ、CO 合成酵素阻害剤 (CrMP) を投与するとその放出は著しく阻害された。

(CO) 合成酵素 (heme oxygenase, HO) 阻害剤である CrMP はオンデマンド放出を抑制した (図 3)。HO の発現をキノコ体で抑制した脳においても、また CO 吸着剤を脳に投与した場合においてもオンデマンド放出は抑制された。一方、CO を水中で発生させる CO ドナーである CORM-3 を脳に投与すると、キノコ体神経を刺激することなくともオンデマンド放出を誘導することができた (図 4)。以上の結果から、AL 刺激と NMDA の同時投与により活性化したキノコ体神経は、CO によって PPL1 DAN からのドパミン放出を引き起こさせることが示唆された。

(2) COによるオンデマンド放出はCa²⁺が必要か

一般的に、神経細胞が興奮するとその活動電位が神経終末まで伝播し、その電位変化によって終末の電位依存性Ca²⁺チャンネルからCa²⁺が流入することで細胞内Ca²⁺濃度が上昇する。これが引き金となってシナプス小胞のexocytosisが誘導される。ALとNMDAによる同時刺激を行うと、PPL1 DAN終末でCa²⁺レベルの上昇が観察される。同様に、CORM-3を脳に投与することでもCa²⁺レベルの上昇が観察される(図5)。これらの結果から、オンデマンド放出においてもDAN終末におけるCa²⁺が重要な働きを担っていると考えられる。

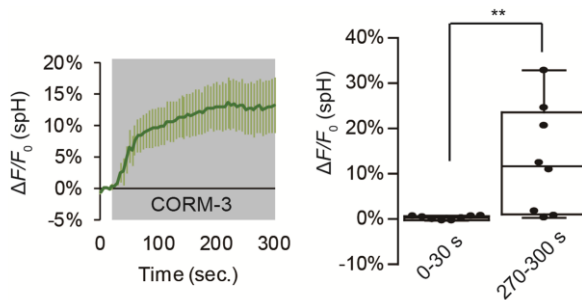


図4 COドナーによるドーパミン放出誘導
チャンパー内に20 μM CORM-3を投与した場合のPPL1 DAN終末からのドーパミン放出。入れた直後から強い放出が観察される。

(3) COによるCa²⁺上昇のCa²⁺ソースはどこか

前述したように、神経興奮による神経終末のCa²⁺レベル上昇は電位依存性Ca²⁺チャンネルによる細胞外からのCa²⁺がそのソースである。ではCOによるCa²⁺レベル上昇はどうか。細胞外のCa²⁺をキレートした状態でCORM-3を投与してもドーパミン放出は変化しなかった。しかし、細胞内のCa²⁺をキレートするとCORM-3によるドーパミン放出は抑制された。さらに、細胞内Ca²⁺貯蔵を枯渇させる薬剤(thapsigargin)による処理を行ってもCORM-3によるドーパミン放出は抑制された。これらの結果は、COは細胞内Ca²⁺貯蔵からのCa²⁺を細胞内に放出させることでCa²⁺レベル上昇を引き起こしていると考えられる。細胞内Ca²⁺貯蔵からCa²⁺を放出させる経路は2つ知られている。

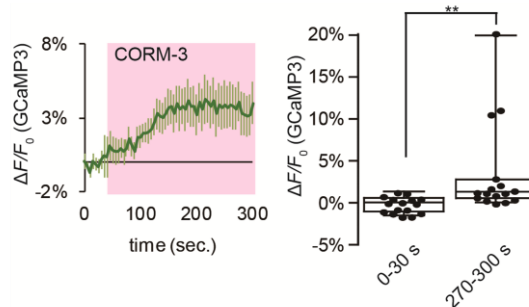


図5 COドナーによるCa²⁺上昇
CORM-3によりPPL1 DAN終末のCa²⁺が上昇する。

リアノジン受容体(ryanodine receptor, RyR)とIP₃受容体である。それぞれの阻害剤を投与してCORM-3によるドーパミン放出を観察したところ、RyR阻害剤がドーパミン放出を抑制した。以上の結果から、COによるCa²⁺レベル上昇はRyRによる細胞内Ca²⁺貯蔵からのCa²⁺放出によることが示唆された。このことを更に確認するために、RyRをPPL1 DANで成虫になった後にノックダウンした遺伝子組換え体を作成し、この脳に対してCO暴露を行ったところ、確かにドーパミン放出は抑制されていることが確認された(図6)。以上の結果から、キノコ体神経がALとNMDAによる同時入力を受けて活性化すると、COが産生され、遊離したCOが近傍のPPL1 DAN終末のRyRを活性化することで(直接か間接かは不明)細胞内Ca²⁺レベルを上昇させ、このCa²⁺がexocytosisを引き起こし、ドーパミン放出を誘導するというモデルが想定された。

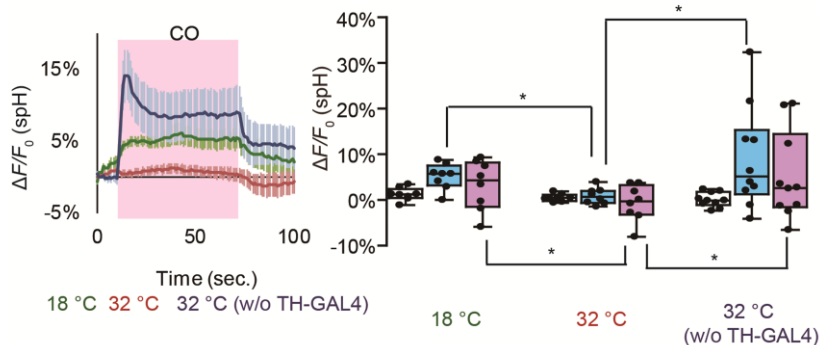


図6 COによるドーパミン放出とRyR遺伝子
熱遺伝学によってPPL1 DAN終末におけるRyR遺伝子発現抑制した脳(32°C)、発現抑制していない脳(18°C)、さらに熱は加えているが発現ドライバを持たない脳(w/o TH-GAL4)に対してCOで飽和させた生理食塩水を投与したときの、ドーパミン放出。発現抑制した脳は他の脳に対してドーパミン放出が顕著に抑制された。

(4) オンデマンド放出の匂い嫌悪記憶への貢献

ここまでオンデマンド放出がどのような分子機序によって引き起こされているのかを明らかにしてきた。最後に、このオンデマンド放出に関わる分子が、匂い嫌悪記憶形成に関与するの否かを解析した。CO合成酵素であるHOをキノコ体でノックダウンしたハエ、もしくはRyRをPPL1 DANでノックダウンしたハエを作成し、それぞれの匂い嫌悪記憶を測定した(図7)。その結果、これらのハエでは匂い嫌悪記憶形成が部分的に阻害されていることが見出された。以上の結果から、生きたハエの匂い学習時においてもオンデマンド放出が起きていることが示唆された。

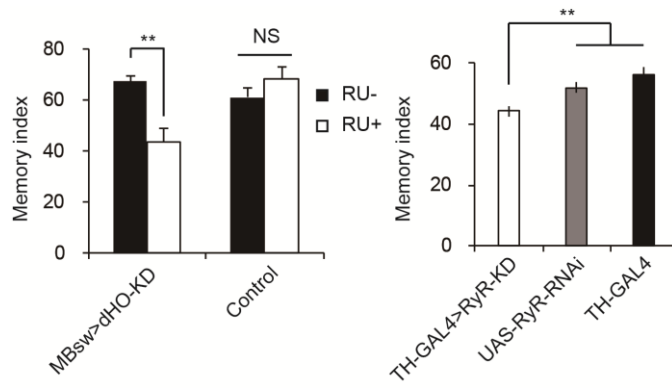


図7 オンデマンド分子と匂い嫌悪記憶

(左) キノコ体神経において、RU 投与によって CO 合成酵素 HO を発現抑制したハエ (白) は、発現抑制していないハエ (黒) に比べて匂い嫌悪記憶が有意に低下していた。(右) 同様に PPL1 DAN において RyR の発現抑制をしたハエは (TH-GAL4>RyR-KD) はコントロールのハエ (UAS-RyR-RNAi, TH-GAL4) に対して記憶の低下が見出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ueno Kohei, Morstein Johannes, Ofusa Kyoko, Naganos Shintaro, Suzuki-Sawano Ema, Minegishi Saika, Rezgui Samir P., Kitagishi Hiroaki, Michel Brian W., Chang Christopher J., Horiuchi Junjiro, Saitoe Minoru	4. 巻 40
2. 論文標題 Carbon Monoxide, a Retrograde Messenger Generated in Postsynaptic Mushroom Body Neurons, Evokes Noncanonical Dopamine Release	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 3533 ~ 3548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.2378-19.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Sato Shoma, Ueno Kohei, Saitoe Minoru, Sakai Takaomi	4. 巻 596
2. 論文標題 Synaptic depression induced by postsynaptic cAMP production in the Drosophila mushroom body calyx	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 2447 ~ 2461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP275799	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki-Sawano Ema, Ueno Kohei, Naganos Shintaro, Sawano Yoshihiro, Horiuchi Junjiro, Saitoe Minoru	4. 巻 7
2. 論文標題 A Drosophila ex vivo model of olfactory appetitive learning	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-17955-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ueno Kohei, Suzuki Ema, Naganos Shintaro, Ofusa Kyoko, Horiuchi Junjiro, Saitoe Minoru	4. 巻 6
2. 論文標題 Coincident postsynaptic activity gates presynaptic dopamine release to induce plasticity in Drosophila mushroom bodies	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.21076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Morstein Johannes, H?fler Denis, Ueno Kohei, Jurss Jonah W., Walvoord Ryan R., Bruemmer Kevin J., Rezgui Samir P., Brewer Thomas F., Saitoe Minoru, Michel Brian W., Chang Christopher J.	4. 巻 142
2. 論文標題 Ligand-Directed Approach to Activity-Based Sensing: Developing Palladacycle Fluorescent Probes That Enable Endogenous Carbon Monoxide Detection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 15917 ~ 15930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.0c06405	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Ueno Kohei and Minoru Saitoe
2. 発表標題 The role of on-demand dopamine release in the olfactory aversive conditioning.
3. 学会等名 第43回日本神経科学学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohei Ueno
2. 発表標題 Dopamine release is gated by postsynaptic activity in Drosophila brain
3. 学会等名 第41回日本神経科学学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上野耕平
2. 発表標題 逆行性シグナルによるドパミン放出のゲーティング機構
3. 学会等名 2017次世代脳プロジェクト冬のシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kohei Ueno
2. 発表標題 oincidentally activated postsynaptic mushroom body neurons evoke dopamine release via cGMP/ryanodine receptor signaling in Drosophila.
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Researchmap https://researchmap.jp/kueno 東京都医学総合研究所 学習記憶プロジェクトHP http://www.igakuken.or.jp/memory/
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------