

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21500374

研究課題名(和文) 前脳基底核シナプス終末におけるドーパミン受容体とカルシウムチャネルの動態解析

研究課題名(英文) Analysis of dynamic interaction between dopamine receptors and calcium channels located on the synaptic terminals in the basal forebrain

研究代表者 粂山 俊彦 (MOMIYAMA TOSHIHIKO)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：20230055

研究成果の概要(和文)：

前脳基底核 (basal forebrain nuclei; 以下 BF と略) アセチルコリン性ニューロンから記録される EPSC に対するドーパミン D1 型受容体を介する抑制作用は生後発達とともに増強するが、アデニル酸シクラーゼ系を介して選択的に P/Q 型カルシウムチャネルをブロックする、という共役には変化がないことを明らかにした。また、新たなバイオセンサー素材として最近注目されているカーボンナノチューブを採用し、BF にドーパミン性線維を投射するドーパミン性ニューロン細胞体からのドーパミン遊離を酸化還元電流として検出することに成功した。次いで、一つのドーパミン性ニューロンにドーパミン遊離検出法とホールセルパッチクランプ法を同時に適用し、活動電位発生と伝達物質遊離との同時モニター法を確立し、ドーパミン性ニューロンの D2 型受容体活性化によって、膜の脱分極および活動電位の抑制に伴って、ドーパミン遊離が減少することを見出した。

研究成果の概要(英文)：

The present electrophysiological study has clarified a developmental increase in dopamine D1-like receptor-mediated inhibition of glutamatergic transmission onto cholinergic neurons in the rat basal forebrain through adenylyl cyclase and P/Q-type calcium channel regulation.

The present electrochemical study, introducing a new biosensor material, carbon nanotube, has succeeded in the detection of physiologically released dopamine as a redox current in brain slice preparation. Furthermore, the present study has established a method for simultaneous recordings of dopamine release and membrane potential, thereby clarifying that activation of D2-like receptors reduces dopamine release by hyperpolarizing the membrane of dopaminergic neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経・筋肉生理学

キーワード：前脳基底核、シナプス、ドーパミン受容体、カルシウムチャネル、パッチクランプ、カーボンナノチューブ

1. 研究開始当初の背景

前脳基底核 (basal forebrain nuclei; 以下 BF と略)は中枢神経系におけるアセチルコリン性ニューロンの起始核群であり、大脳皮質、海馬等様々な部位に線維を投射している。また、これまでの行動学および臨床医学的研究によれば、BF は注意、覚醒、記憶および学習機能と関連し、BFニューロンの変性と、アルツハイマー病等の認知、学習、記憶障害性疾患が密接に関連していることが示唆されている。

BF にはアセチルコリン性ニューロンとともに GABA 性投射ニューロンおよび介在ニューロンが混在していることが知られているが、BF ニューロン間の神経回路構成やそのシナプス伝達機構についての基礎的知見は少ない。申請者はこれまでに、BF ニューロンへのグルタミン酸性および GABA 性シナプス伝達に対するドーパミン受容体を介する抑制機構の解析を行ない、さらに、BF のアセチルコリン性ニューロンへのグルタミン酸性シナプス伝達修飾におけるドーパミン受容体と特定の型のカルシウムチャネルとの選択的共役を明らかにした。しかしながら、その生後発達変化は不明であり、これを明らかにすることによって、BF 関連の生理的機能および病態と年齢との関係に対する理解が深まると考えられる。さらに、BF にドーパミン性線維を投射する中脳のドーパミン性ニューロンからのドーパミン遊離機構も不明であり、申請者は最近、新たなバイオセンサー素材として注目されているカーボンナノチューブを用いて、単一ドーパミン性ニューロンからのドーパミン遊離機構解析に着手した。

2. 研究の目的

以上の背景により、本研究では、以下の電気生理学的電気化学的解析を行なう。

- ①スライスパッチクランプ法により、BF のアセチルコリン性ニューロンから記録される興奮性シナプス電流抑制に関与する D1 型受容体、カルシウムチャネルサブタイプ、細胞内情報伝達系の生後発達変化の解析を行なう。
- ②BF にドーパミン性軸索を投射する中脳のドーパミン性ニューロンの細胞体にカーボンナノチューブ電極を適用して、生理的ドーパミン遊離と活動電位との同時記録を行なう。

3. 研究の方法

生後 20-50 日齢のラットを定位脳固定装置に固定し、マイクロシリッジを用いて、Cy3-192IgG を右側の側脳室に約 $3\mu\text{l}$ 注入する。3-6 日後にラットを断頭し、マイクロスライサーを用いて前脳基底核を含む厚さ $300\mu\text{m}$ の冠状断スライスを作成する。蛍光顕微鏡下に、アセチルコリン性ニューロンは赤色の細胞として同定できる。アセチルコリン性ニューロンからパッチクランプ用増幅器によりホールセル記録を行う。薬理的に GABA 性、グリシン性および NMDA 性伝達を遮断した状態で記録ニューロン近傍に電気刺激を与えることにより non-NMDA 性シナプス後電流 (EPSCs) を誘発する。

電気生理学的解析

アセチルコリン性ニューロンから記録される興奮性シナプス電流抑制の生後発達変化

幼若ラットで得られた知見 (Momiya & Fukazawa, J. Physiol., 2007) をもとに、EPSC に対するドーパミン受容体選択的アゴニスト、アンタゴニスト、カルシウムチャネルサブタイプ選択的ブロッカー、およびアデニル酸シクラーゼ系関連薬物の作用を、生後 20-50 日齢にわたって解析する。

電気化学的解析

カーボンナノチューブ電極を用いたドーパミン性ニューロンからのドーパミン遊離検出と活動電位との同時記録

生後 2 週齢前後のマウス脳から、中脳を含む厚さ $300\mu\text{m}$ の水平断スライス標本を作製する。

1) 電気化学用増幅器として使用するパッチクランプ用増幅器に接続したカーボンナノチューブ電極をスライス上のドーパミン性ニューロンに密着させて、増幅器を通じて大きな酸化電位 ($+700\sim+800\text{ mV}$) を電極に与えることにより、ドーパミン遊離を電流イベントとして記録する。次いで、外液中のカルシウムイオン濃度とドーパミン遊離の関係を解析する。さらに、ドーパミン遊離に対するドーパミン受容体アゴニストの効果解析する。

2) ドーパミン遊離を検出するニューロンと同一のニューロンからホールセル記録を同時に行ない、活動電位発生とドーパミン遊離

との関係を解析する。

4. 研究成果

電気生理学的解析

BF のアセチルコリン性ニューロンから記録される EPSC に対するドーパミンによる抑制作用は生後発達とともに増強するが、D1 型受容体を介し、アデニル酸シクラーゼ系を介して選択的に P/Q 型カルシウムチャネルをブロックする、という共役には変化がないことを明らかにした (業績②)。

電気化学的解析

1)カーボンナノチューブを採用し、スライス標本内のドーパミン性ニューロン細胞体からのドーパミン遊離を酸化還元電流として検出することに成功した。ドーパミン遊離量は細胞外のカルシウムイオン濃度に依存することが明らかとなった。

2)一つのドーパミン性ニューロンにドーパミン遊離検出法とホールセルパッチクランプ法を同時に適用し、活動電位発生と伝達物質遊離との同時モニター法を確立した。一部のドーパミン性ニューロンでは、活動電位発生とドーパミン遊離が同期すること、また、ドーパミン D2 型受容体アゴニストによって、膜が過分極するとともにドーパミン遊離が減少することが明らかとなった。

(以上論文投稿準備中)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

①Mitsumori T., Furuyashiki T., Momiyama T., Nishi A., Shuto T., Hayakawa T., Ushikubi F., Kitaoka S., Aoki T., Inoue H., Matsuoka T. & *Narumiya S. (2011). Thromboxane receptor activation enhances striatal dopamine release, leading to suppression of GABAergic transmission and enhanced sugar intake. *European Journal of Neuroscience* **34**, 594-604. (査読有)
DOI: 10.1111/j.1460-9568.2011.07774.x.

②Momiyama T. (2010). Developmental increase in D₁-like dopamine receptor-mediated inhibition of glutamatergic transmission through P/Q-type channel regulation in the basal forebrain of rats. *European Journal of Neuroscience* **32**, 579-590 (査読有)
DOI: 10.1111/j.1460-9568.2010.07306.x

③ Sasaki J., Kofuji S., Itoh R., Momiyama

T., Takayama K., Murakami H., Chida S., Tsuya Y., Takasuga S., Eguchi S., Asanuma K., Horie Y., Miura K., Davis M., Mitchell C., Yamazaki M., Hirai H., Takenawa T., Suzuki A. & *Sasaki T. (2010). The Pdlns(3,4)P2-phosphatase INPP4A is a suppressor of excitotoxic neuronal death. *Nature* **465**, 497-501.

(査読有) doi:10.1038/nature09023

④Yoshikawa G., Momiyama T., Oya S., Takai K., Tanaka J., Higashiyama S., Saito N., Kirino T. & *Kawahara N. (2010). Growth factors induce striatal neurogenesis and generate region-specific functional mature neurons after ischemia.

Journal of Neurosurgery **113**, 835-850. (査読有) DOI: 10.3171/2010.2.JNS09989.

⑤Tanaka Y., Furuyashiki T., Momiyama T., Namba H., Mizoguchi A., Mitsumori T., Kayahara T., Shichi H., Kimura K., Matsuoka T., Nawa H. & *Narumiya S. (2009). Prostaglandin E receptor EP1 enhances GABA-mediated inhibition of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and regulates dopamine level in the dorsal striatum. *European Journal of Neuroscience* **30**, 2338-2346. (査読有) DOI: 10.1111/j.1460-9568.2009.07021.x

[学会発表] (計 8 件)

①榎山俊彦、佐藤朝子、勝木元也、笹岡俊邦
ドーパミン受容体ノックアウトマウスにおける行動および線条体抑制性シナプス伝達の解析、第 89 回日本生理学会大会、2012 年 3 月 29 日、松本

②榎山俊彦、ラット中脳ドーパミン性ニューロンからのドーパミン遊離とニューロン活動の同時記録、第 85 回日本薬理学会年会シンポジウム、2012 年 3 月 16 日、京都

③榎山俊彦、佐藤朝子、勝木元也、笹岡俊邦、ドーパミン D1 および D2 受容体ノックアウトマウスにおける行動および線条体 GABA 性シナプス伝達の解析、第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 17 日、横浜

④Momiyama T., Sato A., Katsuki M. & Sasaoka T. Motor activity and GABAergic synaptic transmission of dopamine D1 and D2 receptor knock-out mice. 8th International Congress of Neuroscience, 17 July 2011, Florence, Italy.

⑤榎山俊彦、カーボンナノチューブ電極を用いたドーパミン性ニューロン細胞体からのドーパミン遊離検出、第 33 回日本神経科学大会、2010 年 9 月 2 日、神戸

⑥ Momiyama T., Sato A., Katsuki M. & Sasaoka T. Motor activity and GABAergic synaptic transmission of dopamine receptor knock-out mice, 7th FENS Forum of European Neuroscience, 4 July 2010, Amsterdam, The Netherland.

⑦ 糀山俊彦、前脳基底核アセチルコリン性ニューロンへの興奮性シナプス伝達に対するドーパミンD1型受容体を介する抑制の細胞内情報伝達系、第32回日本神経科学大会、2009年9月17日、名古屋

⑧ Momiyama T., Sato A., Katsuki M. & Sasaoka T. GABAergic synaptic transmission in the striatum of dopamine receptor knock-out mice, XXXVI International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009), 29 July 2009, Kyoto.

〔図書〕（計2件）

① 糀山俊彦 「中枢神経興奮薬」リッピンコット シリーズ イラストレイテッド薬理学 第4版 第10章 丸善、東京、2010、675.

② Momiyama T., Developmental changes in the calcium channel and D1-like receptors involved in the glutamatergic transmission onto rat basal forebrain cholinergic neurons. Edt. Fisher A & Hanin I., *Medimond S.r.l. International Proceedings* 299-305. In: *New Trends in Alzheimer and Parkinson Related Disorders*, Abraham Fisher Israel Hanin, 2009, 323.

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者 糀山 俊彦

(MOMIYAMA TOSHIHIKO)

研究者番号：20230055