

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06732

研究課題名(和文) 神経修飾因子シナプスに共通する分子形態基盤に関する研究

研究課題名(英文) Study of the molecular-anatomical basis common to neuromodulatory synapses

研究代表者

内ヶ島 基政 (Uchigashima, Motokazu)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：10614662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は精神神経疾患と密接な関わりのあるドーパミン、アセチルコリン、ノルアドレナリンなどの神経修飾因子が放出されるシナプスの構成分子を免疫組織化学的手法を用いて調べた。これらのシナプスでは、GABAを放出するための形態基盤に乏しいにも関わらず、GABAシナプスと共通のポストシナプス分子の発現を認めた。この結果はGABAシナプスのポストシナプス分子が神経修飾因子の放出部位を標的構造へと括り付ける普遍的な分子機構を担っていることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：We examined by immunohistochemistry the molecular composition of synaptic structures which release neuromodulators including dopamine, acetylcholine, and noradrenaline in the brain. We revealed that these synapses were composed of non-GABAergic presynaptic structures and GABAergic postsynaptic membranes. This mismatch between presynaptic and postsynaptic structures at distinct neuromodulator synapses suggests GABAergic postsynaptic molecules commonly anchor the molecular machinery to release neuromodulators to target structures.

研究分野：神経解剖学

キーワード：アセチルコリン ノルアドレナリン ドーパミン シナプス 免疫組織化学 電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系は多種類の神経伝達物質を介して情報伝達を行っている。グルタミン酸や GABA は主にポストシナプスに集積したイオンチャネル型受容体を介したシナプス局所での時空間的に限定された神経伝達を担うのに対し、ドーパミン、アセチルコリン、ノルアドレナリン、セロトニン、神経ペプチドなどの多くは G タンパク共役型受容体を介した時空間的に選択性の低い神経伝達を担うと考えられている。このような両者の性質の違いから、特に後者は神経修飾因子と呼ばれている。神経修飾因子はニューロンの興奮性やシナプス可塑性の調節に必須であるが、その伝達の理解に分子形態学的知見を欠くことはできない。過去の電子顕微鏡を用いた研究から、神経修飾因子を産生、放出するニューロンの終末はグルタミン酸あるいは GABA ニューロンと非常に類似したシナプス構造を形成することが知られている (Wilson, *The Synaptic Organization of the Brain*, 2000)。研究代表者は、中脳黒質ドーパミンニューロンにより形成されるドーパミンシナプスが、ドーパミン放出性のプレシナプスと GABA シナプス分子で構成されるポストシナプスによって作られ、GABA シナプス分子がドーパミン放出部位を標的構造に結びつけるための係留接着装置としての新たな役割を果たしていることをこれまでに明らかにしてきた (Uchigashima et al., *PNAS*, 2016)。興味深いことに、アセチルコリンまたはノルアドレナリン作動性ニューロンの神経終末も中脳ドーパミンニューロンと同様に GABA シナプスとよく似たシナプス構造を形成することが報告されている (Wainer et al., *Brain Res*, 1984; Seguela et al., *Neuroscience*, 1990)。さらに最近ではドーパミンシナプスと同様にアセチルコリンシナプスでもシナプス接着分子 Nlgn2 の発現が報告されている (Takacs et al., *PLoS One*, 2013)。そこで、本研究課題ではドーパミンシナプスで見られたような GABA シナプス分子を介した係留接着が他の神経修飾因子シナプスにおいても認められるような普遍的な分子機構ではないかという仮説を立てた。

2. 研究の目的

神経修飾因子ニューロンが形成するドーパミンシナプス、アセチルコリンシナプス、ノルアドレナリンシナプスの形態学的相同性を分子の視点から検討することにより、神経修飾因子シナプスにおけるシナプス分子の係留装置としての役割の普遍性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は線条体ドーパミンシナプスの比較対象として、線条体介在ニューロンが形成するアセチルコリンシナプスと、脳内で最も

密なノルアドレナリン投射が作る弧束核→分界条床核ノルアドレナリンシナプスに対して以下の分子解剖学的検討を行った。

(1) 神経修飾因子ニューロンの神経化学的特性解析：蛍光 *in situ* ハイブリダーゼーション法と蛍光多重染色法により、異なる神経修飾因子ニューロンにてそれぞれに特有の神経修飾因子に加え、速いシナプス伝達に関わるグルタミン酸または GABA を共放出するための神経化学的特性を検討した。

(2) 神経修飾因子シナプスにおける分子発現解析：小胞膜アセチルコリン輸送体 (VACHT) とノルアドレナリン合成酵素であるドーパミンβ脱炭酸酵素 (DBH) をそれぞれアセチルコリンまたはノルアドレナリン作動性神経終末のマーカーとして用いることにより、線条体アセチルコリンシナプス及び分界条床核ノルアドレナリンシナプスにおける GABA ポストシナプス分子 (Gephyrin, Nlgn2, GABA_A 受容体α1) 及びグルタミン酸ポストシナプス分子 (Shank2, AMPA 型グルタミン酸受容体) の発現を中心に蛍光多重免疫染色法及び包埋後二重免疫電子顕微鏡法を用いて調べた。

(3) 神経修飾因子シナプスの分布解析：GFP 発現ウイルスベクターを用いた少数ニューロン標識と免疫染色を組み合わせることにより、ポストシナプス分子をマーカーとして神経修飾因子シナプスの分布する構造を同定した。

4. 研究成果

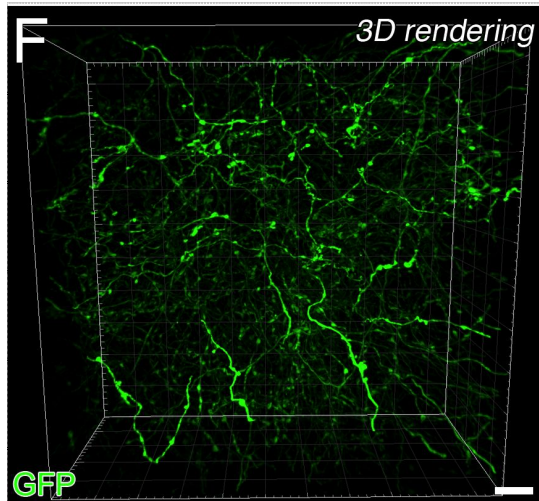
(1) 線条体アセチルコリンシナプスに発現する分子の同定

まず線条体アセチルコリンニューロンがアセチルコリン放出関連分子とグルタミン酸放出に寄与する 3 型小胞膜グルタミン酸輸送体を発現することを確認した。つまり、このニューロンはアセチルコリンに加え、グルタミン酸も共放出する形態基盤を有すると考えられる。線条体アセチルコリンシナプスは電子顕微鏡的に GABA シナプス型 (対称性) の構造を示し、既に報告のある Nlgn2 に加え、GABA シナプスに選択的な足場タンパクである Gephyrin が選択的に検出されたがグルタミン酸シナプスの足場タンパクである Shank2 は検出されなかった。すなわち、線条体アセチルコリンシナプスの分子発現は既に報告したドーパミンシナプスと同様、プレシナプスとポストシナプスの神経化学的特性がマッチせず、GABA シナプスのポストシナプス分子がプレシナプスの係留接着装置として機能していることが強く示唆された。

(2) 弧束核 分界条床核ノルアドレナリンシナプスに発現する分子の同定

弧束核ノルアドレナリンニューロンはノルアドレナリン放出関連分子に加え、2 型小胞膜グルタミン酸輸送体を発現していた。両者の発現強度は弧束核の垂核に依存して相

違が認められた。この両者の軸索レベルにおける相違を検討するため、透明化試薬 ScaleA2 を用いることで軸索上の分子発現を長い距離にわたって評価することができる新たな手法を開発した(下図)。この手法を

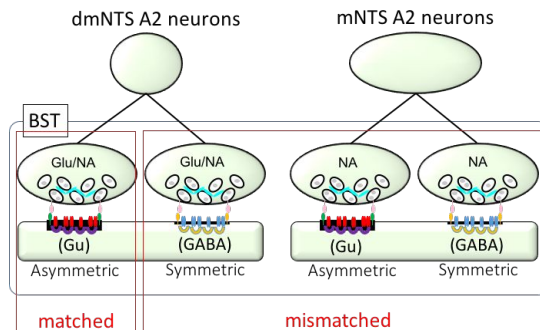


用いて、弧束核 分界条床核ノルアドレナリン軸索はグルタミン酸優位型神経終末とノルアドレナリン優位型神経終末を形成し、同一軸索上では神経化学的特性がよく似ていることを突き止めた。つまり、グルタミン酸優位型のノルアドレナリン軸索ではグルタミン酸優位な神経伝達が行われ、ノルアドレナリン優位型の軸索ではノルアドレナリン優位な神経伝達が行われると予想された。

分界条床核ノルアドレナリンシナプスは電子顕微鏡的に 35%が GABA シナプス性(対称性)、65%がグルタミン酸シナプス性(非対称性)の構造を示した。GABA シナプス性のノルアドレナリンシナプスは GABA シナプスのポストシナプス分子(Gephyrin、Nlgn2、GABA_A 受容体 α 1)を発現し、グルタミン酸シナプス性のノルアドレナリンシナプスはグルタミン酸シナプスのポストシナプス分子(Shank2、AMPA 型グルタミン酸受容体)を発現していた。単一軸索上に形成されるノルアドレナリンシナプスのポストシナプス分子発現を検討した結果、グルタミン酸優位型とノルアドレナリン優位型のいずれの弧束核 分界条床核ノルアドレナリン軸索も GABA シナプス性とグルタミン酸シナプス性のノルアドレナリンシナプスをほぼ同じ比率で形成していることが明らかとなった。つまり、単一弧束核 分界条床核ノルアドレナリン軸索が形成するノルアドレナリンシナプスは、一部がグルタミン酸シナプスとして機能しているが、それ以外はプレシナプスとポストシナプスの神経化学的特性が一致しない係留接着装置として機能していると考えられる(右図)。この結果は現在、投稿準備中である。

本研究課題により、アセチルコリンシナプスやノルアドレナリンシナプスにおいてもドーパミンシナプスと同様、GABA シナプスの

ポストシナプス分子が神経修飾因子を放出するプレシナプスを標的構造に係留する分子装置として機能していることを強く示唆する結果が得られた。脳においてシナプス分子を介した神経修飾因子シナプスの係留接着機構が普遍的に備わっていると考えられ



る。一方、本研究課題を通じて、単一ノルアドレナリン軸索が GABA 性シナプスだけでなく、グルタミン酸シナプスも形成するという予想外の結果を得た。単一軸索が両方のタイプのシナプスを同時に形成する例はほとんどなく、その生理学的意義は不明である。今後は弧束核 分界条床核ノルアドレナリンシナプスのタイプと標的ニューロンの種類の関係性について解析を進めることで、上記構造の機能および生理学的意義に迫る予定である。

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10件)

Natsubori A, Tsutsui-Kimura I, Nishida H, Bouchekioua Y, Sekiya H, Uchigashima M, Watanabe M, de Kerchove d'Exaerde A, Mimura M, Takata N, Tanaka KF. Ventrolateral Striatal Medium Spiny Neurons Positively Regulate Food-Incentive, Goal-Directed Behavior Independently of D1 and D2 Selectivity. *J Neurosci*. 査読有, 37(10), 2017, 2723-2733
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3377-16

Tsutsui-Kimura I, Takiue H, Yoshida K, Xu M, Yano R, Ohta H, Nishida H, Bouchekioua Y, Okano H, Uchigashima M, Watanabe M, Takata N, Drew MR, Sano H, Mimura M, Tanaka KF. Dysfunction of ventrolateral striatal dopamine receptor type 2-expressing medium spiny neurons impairs instrumental motivation. *Nat Commun*. 査読有, 8, 2017, 14304
DOI: 10.1038/ncomms14304

Oh YM, Karube F, Takahashi S, Kobayashi K, Takada M, Uchigashima M, Watanabe M, Nishizawa K, Kobayashi K, Fujiyama F. Using a novel PV-Cre rat model to characterize pallidonigral cells and their terminations. Brain Struct Funct. 査読有, 222(5), 2017, 2359-2378
DOI: 10.1007/s00429-016-1346-2

Narushima M, Uchigashima M, Yagasaki Y, Harada T, Nagumo Y, Uesaka N, Hashimoto K, Aiba A, Watanabe M, Miyata M, Kano M. The Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 1 Mediates Experience-Dependent Maintenance of Mature Synaptic Connectivity in the Visual Thalamus. Neuron. 査読有, 91(5), 2016, 1097-1109
DOI: 10.1016/j.neuron.2016.07.035

Sugaya Y, Yamazaki M, Uchigashima M, Kobayashi K, Watanabe M, Sakimura K, Kano M. Crucial Roles of the Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol in the Suppression of Epileptic Seizures. Cell Rep. 査読有, 16(5), 2016, 1405-1415
DOI: 10.1016/j.celrep.2016.06.083

Matsuda K, Budisantoso T, Mitakidis N, Sugaya Y, Miura E, Kakegawa W, Yamasaki M, Konno K, Uchigashima M, Abe M, Watanabe I, Kano M, Watanabe M, Sakimura K, Aricescu AR, Yuzaki M. Transsynaptic Modulation of Kainate Receptor Functions by C1q-like Proteins. Neuron. 査読有, 90(4), 2016, 752-67
DOI: 10.1016/j.neuron.2016.04.001

Uchigashima M, Ohtsuka T, Kobayashi K, Watanabe M. Dopamine synapse is a neuroligin-2-mediated contact between dopaminergic presynaptic and GABAergic postsynaptic structures. Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有, 113(15), 2016, 4206-11
DOI: 10.1073/pnas.1514074113

Ichikawa R, Hashimoto K, Miyazaki T, Uchigashima M, Yamasaki M, Aiba A, Kano M, Watanabe M. Territories of heterologous inputs onto Purkinje cell dendrites are segregated by mGluR1-dependent parallel fiber synapse elimination. Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有, 113(8), 2016, 2282-7
DOI: 10.1073/pnas.1511513113

Nagai T, Nakamuta S, Kuroda K, Nakauchi S, Nishioka T, Takano T, Zhang X, Tsuboi D, Funahashi Y, Nakano T, Yoshimoto J, Kobayashi K, Uchigashima M, Watanabe M, Miura M, Nishi A, Kobayashi K, Yamada K, Amano M, Kaibuchi K. Phosphoproteomics of the Dopamine Pathway Enables Discovery of Rap1 Activation as a Reward Signal In Vivo. Neuron. 査読有, 89(3), 2016, 550-65
DOI: 10.1016/j.neuron.2015.12.019

Takeda H, Ogasawara T, Ozawa T, Muraguchi A, Jih PJ, Morishita R, Uchigashima M, Watanabe M, Fujimoto T, Iwasaki T, Endo Y, Sawasaki T. Production of monoclonal antibodies against GPCR using cell-free synthesized GPCR antigen and biotinylated liposome-based interaction assay. Sci Rep. 査読有, 5, 2015, 11333
DOI: 10.1038/srep11333

〔学会発表〕(計 2 件)

Motokazu Uchigashima, Masahiko Watanabe, Striatal dopamine synapses are neuroligin-2-mediated heterologous contacts between dopaminergic presynapse and GABAergic postsynapse. Neuroscience 2015 (国際学会) 2015年10月17日～2015年10月21日, シカゴ(アメリカ)

内ヶ島基政, 渡辺雅彦, 皮質系構造においてVGLUT3/CCK発現バスケット細胞は内因性カンナビノイドシグナル伝達関連分子を豊富に備えた貫入型シナプスを形成する。第38回日本神経科学大会, 2015年7月28日～2015年7月31日, 神戸国際会議場(神戸)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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
<https://aande.hokkaido.university>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内ヶ島 基政 (UCHIGASHIMA, Motokazu)
北海道大学・医学研究院・助教
研究者番号：10614662

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()