

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19800012

研究課題名（和文）神経活動依存的なドーパミン作動性シナプスの発達・維持・可塑性

研究課題名（英文） Activity-dependent development, maintenance and plasticity of dopaminergic synapses

研究代表者 徳岡宏文（TOKUOKA HIROFUMI）

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：10452020

研究成果の概要：

ドーパミンは脳の諸機能の調節を行い、またパーキンソン病などの神経精神疾患にも関係するが、ドーパミン神経細胞の働く仕組みはまだ良く分かっていない。この点について解析を進めるため、本研究では、GFP 遺伝子改変マウスからの培養により、ドーパミン神経細胞を生きのまま観察する系を確立した。そして蛍光色素を用い、ドーパミン神経細胞のシナプスの活動を可視化することに成功した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,280,000	0	1,280,000
2008 年度	1,230,000	369,000	1,599,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,510,000	369,000	2,879,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：神経科学、神経細胞、ドーパミン、シナプス、チロシン水酸化酵素

1. 研究開始当初の背景

ドーパミンは神経伝達物質の一種で、随意運動や報酬依存的学習の調節を行っている。また、パーキンソン病や統合失調症などの精神・神経疾患にも関わると考えられている。ドーパミンは、

ドーパミン作動性神経細胞（ドーパミン神経細胞）より放出される。これらの細胞は、脳内のごく限られた部位にあるのみであるが、脳機能の調節に重要な役割を果たしている。ドーパミン神経細胞についての知見の多くは、ドーパミン受容

体に対する拮抗薬や作動薬などによる薬理的な解析に依存してきた。またトランスジェニックマウスの技術の発達により、動物個体レベルでの解析も進んできた。しかし、ドーパミン神経細胞の仕組みについては未だに理解が不十分であった。例えば、一般に、神経細胞はシナプスによりネットワークを形成するが、ドーパミン作動性シナプスについてはこれまでその作動機構や活動依存的な変化についての解析が不十分であった。また、ドーパミン神経細胞がどのような可塑性を示すのか、またその仕組みについても理解が不十分であった。

その理由の一つとして、ドーパミン神経細胞やドーパミン作動性シナプスの解析を行う良い実験系が少なかったことが挙げられる。従来、ドーパミンの合成、代謝や放出については、副腎髄質由来の PC12 細胞株が良く用いられてきた。細胞株ゆえに実験には便利であったが、神経細胞ではない、シナプスを作らない、といった問題点があった。一方、組織レベルでの解析では、ドーパミン神経細胞およびシナプスは高密度に存在し、細胞レベルでの解析という観点からは空間分解能に問題があった。

本研究ではこれらの点を踏まえ、以下のような研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では、ドーパミン神経細胞、特にそのシナプスについてさらにその仕組みや神経活動依存的な変化を明らかにしていくことを目的とした。その為に、まずドーパミン神経細胞の初代培養系の確立を目指した。次に、もともと少数しかないドーパミン神経細胞を識別するため、TH-GFP トランスジェニックマウスからの初代培養を行い、生きたドーパミン神経細胞の可視化を目指した。この系を用いて、ドーパミン神経細胞の活動依存的な形態変化の解析、FM 色素を

用いたドーパミンシナプスの動作の可視化を目指した。

3. 研究の方法

以下に方法と結果をまとめる。

(1) マウス胎児の中脳腹側部(黒質および腹側被蓋野のドーパミン神経細胞を多く含む)より神経細胞の初代培養を行った。チロシン水酸化酵素 (TH) や芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) に対する免疫染色により、ドーパミン作動性神経細胞の存在を確認した。さらに条件の検討により、一ヶ月以上の培養が可能となった。

(2) この系で神経活動を抑える TTX を 2 日間投与し、ドーパミン作動性神経細胞の軸索への形態的な影響を調べたが、明瞭な形態的な変化は認められなかった。また、コンディショナル・ノックアウト・マウスである、Floxed TH マウスからも同様の培養を行い、Cre 組み換え酵素を発現させるアデノ随伴ウイルス (AAV-Cre) を使い TH 遺伝子の欠損を誘導することに成功した。この場合についても、ドーパミン作動性神経細胞の軸索への影響を調べたが、明瞭な形態的な変化は認められなかった。

(3) ドーパミン神経細胞のマーカーであるチロシン水酸化酵素のプロモーター下流で GFP を発現させるトランスジェニックマウス (TH-GFP マウス) を用い、同様の培養を行った。これにより、ドーパミン神経細胞を生きたまま観察できるようになった。樹状突起におけるスパインの経時的観察を行い、ドーパミン受容体アゴニスト刺激による影響を調べた。しかし、短時間の刺激による、ス

パイン形態の明瞭な変化は認められなかった。

(4)この培養系を用いて、ドーパミンシナプスの活動のイメージング解析系の立ち上げを行った。GFPを発現している培養ドーパミン神経細胞について、細胞外電気刺激により脱分極が信頼性高く引き起こされることをカルシウムイメージングにより確認した。さらに、シナプス小胞の動態を調べるため、シナプス小胞の染色が可能である FM4-64 色素を用いた。細胞外電気刺激を用い、エンドサイトーシスによる FM4-64 によるシナプス小胞の染色、および、エキソサイトーシスによる脱染色が確認された。

4. 研究成果

(1) 中脳黒質および腹側被蓋野由来のドーパミン神経細胞について、4 週間以上の長期培養が可能となり、発達したドーパミン神経細胞の軸索および樹状突起について、生きた細胞のまま観察可能となった。

(2) 少なくとも本培養系においては、一時的な神経活動の低下やドーパミン放出の低下はドーパミン神経細胞の軸索や神経終末の形態に大きな影響を与えない事が示唆された。一方、樹状突起スパインの形態はドーパミン受容体刺激による短時間に大きな影響を受けるものではないことが示唆された。

(3) 蛍光色素 FM4-64 によるドーパミンシナプスのイメージング系を確立した。ドーパミンシナプスのシナプス小胞の動態を可視化することに成功し、今後のドーパミンシナプス解析の基礎を形作ることが出来た。

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 1 件)

① Tokuoka H and Goda Y (2008)
Activity-dependent coordination of presynaptic release probability and postsynaptic GluR2 abundance at single synapses. Proc Natl Acad Sci USA 105:14656-14661. 査読有り

[学会発表] (計 4 件)

- ① 徳岡 宏文、他「チロシン水酸化酵素のタンパク量と活性の代償的制御」第 12 回 活性アミンワークショップ 昭和大学 2008 年 8 月 29 日
- ② 川畑 伊知郎、柳下 三郎、長谷川 一子、パルベ ハサン、徳岡 宏文、永津 郁子、永津 俊治、一瀬 宏「プロテアソーム障害によるリン酸化チロシン水酸化酵素の不溶性凝集体の形成」第 31 回日本神経科学会 東京 2008 年 7 月 9 日 - 11 日
- ③ H. Ichinose, I. Kawahata, W. Sato, K. Mizuno, Y. Kurabayashi, H. Tokuoka, I. Toyoshima, S. Yagishita, K. Hasegawa
“Developmental alterations of LRRK2 in the mouse brain” 12th International Congress of Parkinson’s Disease and Movement Disorders, Chicago, IL, 2008 年 6 月 22 日 - 26 日
- ④ Tokuoka H, Goda Y. Presynaptic release probability and GluR2 abundance at individual synapses in cultured hippocampal neurons 第 30 回日本神経科学会 横浜 2007 年 9 月 10 日 - 12 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳岡 宏文 (TOKOKA HIROFUMI)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：10452020

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし