

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500419

研究課題名(和文) マウス嗅覚入力調整におけるドーパミン系ニューロンの神経回路の解明

研究課題名(英文) Structural basis for dopaminergic regulation of odor information in the olfactory bulb glomeruli

研究代表者

清蔭 恵美 (KIYOKAGE, EMI)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：30543392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：嗅覚の一次中枢である嗅球表面には糸球体と呼ばれる構造があり、匂い情報の入力調節を行う機能的単位と考えられている。我々は、糸球体を構成するニューロン群のうち、ドーパミン合成酵素 tyrosine hydroxylase (TH) を発現している TH ニューロンに着目し、レーザー顕微鏡と電子顕微鏡による対応観察と3次元再構築により TH ニューロンのシナプス解析を行った。その結果、単一の TH ニューロン上の空間的なシナプス分布を解析することで、より詳細な嗅覚神経回路が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Glomeruli are the initial site of synaptic integration in the olfactory pathway. Each glomerulus acts on the modulation of odor information inputs as a functional unit. We focus on tyrosine hydroxylase (TH) neurons that constitute glomeruli, and performed quantitative analysis of synapses TH neurons formed using correlative observation of immunoreactivity in confocal laser-scanning microscopy and transmission electron microscopy. Analysis of special distribution of synapses on TH neuron improves to understand the neural circuit for regulation of odor information.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：TH 嗅球 糸球体 介在ニューロン シナプス 3次元再構築 電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

(1)はじめに

嗅覚の一次中枢である嗅球の表面にある糸球体層は空間的に固定された嗅覚地図を形成する機能的なユニットであるとされている (Uchida N. et al., Nat Neurosci 2000(3):1035-1043)。匂い情報は嗅受容細胞の軸索(ON)を伝わって糸球体内に入り、投射ニューロンである僧帽細胞の一次樹状突起や房飾細胞の樹状突起にシナプスする。さらに、介在ニューロンによる入出力の調整を受けた匂い情報は投射ニューロンの軸索により高次中枢領域へと伝えられる。

嗅球糸球体は、古典的ゴルジ染色によって2種類の介在ニューロン(periglomerular cell(PG)、short axon cell (SA))と房飾細胞のひとつである external tufted cell(ET)によって構成されており (Pinching AJ.& Powell TP., J Cell Sci 1971(9):305-345)、匂い情報の入力調節を行う最初の領域であるとされている。またその後の研究で、嗅球糸球体を構成するニューロンは様々な神経活性化学物質を発現する多様な細胞群であることが明らかとなった。

(2)研究の背景

糸球体を構成する介在ニューロンの半数以上は GABA 系ニューロンであるが、糸球体層に限局して発現が見られる tyrosine hydroxylase (TH、ドーパミン合成酵素)は GABA と高い共存関係を示している (Kasaka K. et al., Neurosci Res 1995 (23):73-88)。しかし、TH ニューロンについては細胞体レベルでの免疫組織化学等による化学的性質の同定に留まり、TH ニューロンの機能や形態学的特徴は明らかになっていない。そこで、報告者は米国メリーランド大学留学中に glutamic acid decarboxylase 65KDa (GAD65、GABA の合成酵素)及び TH ニューロンについて、GAD65 と TH の発現を green fluorescent protein (GFP) で標識したトランスジェニックマウス (GAD65-及び TH-GFP マウス) の新鮮嗅球スライスを用いて形態解析を行った。具体的には、嗅受容細胞の軸索を電気刺激後 whole cell recording により介在ニューロンを同定後 biocytin を細胞体に注入し、DAB 反応で細胞を可視化させトレースし、TH 及び GAD65 ニューロンの立体再構築を行った。その結果、GAD65 ニューロンの突起は細く複雑に折れ曲がって分枝し、1~2 個の糸球体内で突起の伸長が留まる古典的に分類された PG の形態を示した。一方、TH ニューロンの突起は、細胞体から 700 μm 離れた領域にまで伸長する長い突起を持つ細胞で、平均で 11 個の糸球体にその突起が伸長することから PG よりもむしろ SA に分類されると考えた (後掲論文 (9))。これより GAD65 ニューロンは主にひとつの糸球体内(uniglomerular)で神経回路を作るのに対し、TH ニューロンは多数の糸球体(oligo- もしくは polyglomerular)をつないで神経回路を形成することから、異

なる化学物質を含有するニューロンは異なる神経回路をつくると考えられるようになった。

(3)研究の動機

TH ニューロンは、嗅受容細胞軸索(ON)の電気刺激に対する反応性の差によって2種類に分類することができる。即ち 70-80%の TH ニューロンは burst spontaneous excitatory post synaptic current(burst sEPSC)、残りの 20-30%は single sEPSC を示した。またこれまでの一連の電気生理学的解析により、single sEPSC を示す介在ニューロンは ON から直接シナプスを受けているのに対して、burst sEPSC 介在ニューロンは多様な sEPSC を生ずることから、房飾細胞(ET)を介するなど、ON から間接的にシナプスを受けていると考えられている (Hayar A., et al., J Neurosci 2004 (24):6676-6685; 後掲論文 (9))。一方、ラット TH ニューロンの電子顕微鏡を用いたシナプス解析の結果では、TH ニューロンの postsynaptic site のうち 80%は ON から入力を受けており、TH ニューロンは ON と密なコンタクトを示すことが報告されている (Toida K. et al., Neuroscience 2000(101):11-17)。この電気生理学的解析と電子顕微鏡シナプス解析の間に生じた相反する結果の実態を明らかなるものにするため、TH ニューロンの後シナプス側に焦点を絞り、ON からのシナプスが TH ニューロン突起のどの位置に存在するのか、また ON 以外からの興奮性入力はそのニューロン種であるかを明らかにすることが必要となった。

2. 研究の目的

以上のような背景と動機から、本研究では、報告者のこれまでの解析結果を基盤として、嗅球糸球体内で TH ニューロンがどのようなニューロン種とシナプスを構築し、嗅覚入力調整に関わるかを明らかにすることにより、ドーパミンが嗅覚機能と関わる意義の解明を目指した。本研究では、TH ニューロンが形成する神経回路解明のために、電子顕微鏡連続切片からの立体再構築法による TH ニューロンのシナプス定量とシナプスの空間的分布を明らかにする。さらに、ウイルスによる投射ニューロンの標識から TH ニューロンに対して興奮性のシナプスを形成する non-ON ニューロンの同定を行った。これにより、複雑な匂い情報処理のメカニズムを理解するために、確かな形態学的基盤を構築することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

前述の研究目的を達成するため、以下の具体的計画に基づいて研究を遂行した。

【動物】動物は主に以下のマウスを用いた。

(1) B6. Cg-Tg (TH-GFP) 21-31 マウス(BRC No. 02095、理研バイオリソースセンターより提供; Matsushita N. et al., J Neurochem 2002

(82):295-304)
(2) C57BL/6J mouse

【方法】以下の解析法を用いた。

(1) TH GFP 陽性ニューロンの糸球体におけるシナプス定量と突起直径計測:

TH-GFP マウスを灌流固定・脳出し後、50 μm の連続スライスを作製する。

抗 GFP 抗体(Invitrogen A10262)を用いた ABC 法による包埋前免疫染色を行い、電子顕微鏡標本処理後、80 nm 厚の連続超薄切片を作製し電顕下で各種ニューロンを同定する。さらにシナプスと同定された GFP 陽性突起の直径を計測する。

(2) THニューロンへ入力するシナプス分布の定量解析:

TH GFP マウス灌流固定スライスを共焦点レーザー顕微鏡により 3 次元画像を撮る。上記方法(1) と同様の方法で作製した電子顕微鏡連続切片をデジタル電子顕微鏡(JEM1400、JEOL)で連続撮影し広範囲のモニターを撮る。

共焦点レーザー顕微鏡の 3 次元画像と対応させながら、NeuroLucida(ver.10.42、MBF)を用いて各モニター上のニューロン像をトレースし、さらにトレース上にシナプスをプロットし、立体再構築を行う。

シナプスの定量と分布の解析(Neuroexplore)を行う。

(3) Sindbis virus *in vivo* injection 法による投射ニューロンの標識:

麻酔下で脳定位固定装置で固定された TH-GFP マウスの嗅球の僧帽細胞層に、膜移行シグナル付赤色蛍光タンパク(palmRFP)を発現する sindbis virus を圧力インジェクターを用いて注入する。

Injection から 24 時間後にマウスを灌流固定し・脳出し後、50 μm の連続スライスを作製し、RFP で標識されている単一僧帽細胞を選ぶ。

スライスを共焦点レーザー顕微鏡により三次元撮影する。

抗 mRFP 抗体を用いて光顕レベル、及び電顕レベルで多重染色を行なう。具体的には、mRFP に対してビオチン化 2 次抗体及び Alexa594-FluoroNanogold-Streptavidin (Nanoprobe) で蛍光標識することにより TH-GFP との多重蛍光観察が可能となる。この多重蛍光標識標本をレーザー顕微鏡で解析し、ニューロンの三次元的全体像(突起の近接度・相互位置関係)を明らかにする。次いで TH-GFP 成分は PAP 法により DAB 発色し、その後、mRFP 成分を金コロイドで銀増感し、電子顕微鏡用に包埋する。

70 nm 厚の電子顕微鏡連続超薄切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡の 3 次元画像と対応する箇所をデジタル電子顕微鏡で連続撮影しシナプスの確認を行う。

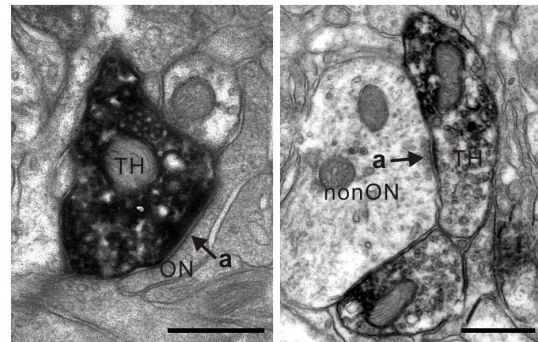
4. 研究成果

TH-GFP マウスの GFP 陽性細胞が、従来の免疫組織化学法による抗体標識と同一であることを確かめ、以後の実験は TH-GFP マウスを用いて行った。

(1) THニューロンが形成するシナプス定量解析:

THニューロンが形成するシナプスについて、抗 GFP 抗体を用いて THニューロンを免疫染色した切片の電顕超薄切片をランダムに選びシナプスの観察と、シナプスが見られる GFP 陽性突起の直径を計測した。

THニューロンへ入力するシナプスのうち pre 側のニューロンは 66 %が嗅受容細胞の軸索(ON)からで、26 %が嗅受容細胞の軸索以外(non-ON)からの非対称性シナプスであった。また、GABA系ニューロンからの対称性シナプスは 8 %であった。THニューロンから出力する対称性シナプスは入力シナプスに比べて 1/7 と少なく、以前のラットの報告(Toida K. et al., Neuroscience 2000(101):11-17)と同様に THニューロンは調節を受けやすい介在ニューロンであることが示唆された。下図に ON から(左)または non-ON から THニューロンへの非対称性シナプス(右)をそれぞれ示す。



さらにシナプスを形成する突起径の計測として、長径に対して直行する短径の最長のものを直径とするという測定基準を用いて行った。ON から入力を受けている TH 突起径が平均約 530 nm であるのに対して non-ON から約 770 nm という特徴が得られ、ON は比較的細い THニューロン突起上にシナプスする傾向が見られた。また、THニューロンから他ニューロンへの対称性シナプスが見られる突起径は平均 740 nm と比較的太い突起であった。

(2) THニューロンのシナプス分布:

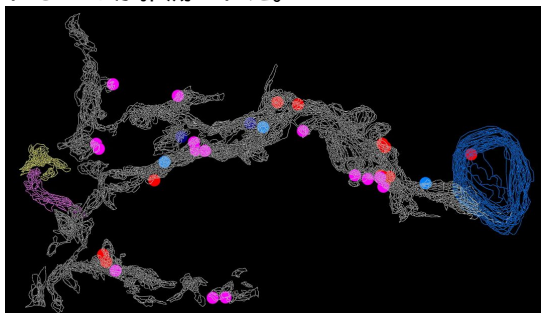
次に単一の THニューロンが構成するシナプスの空間的な分布を調べるため、報告者が独自に確立した連続超薄切片を用いた電顕画像の 3 次元再構築法により THニューロン突起上での ON と non-ON からのシナプス分布を解析した。

糸球体内での THニューロンの空間的なシナプス分布を調べるためには、糸球体をまる

ごとカバーする領域の電顕撮影が必要となる。マウスの糸球体直径は約 50~80 μm であり、共焦点レーザー顕微鏡で観察した空間領域は 180 μm × 180 μm × 50 μm (0.232 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ 、0.5 $\mu\text{m}/\text{section step}$; 776 pixels × 776 pixels × 100 sections) で、これをカバーするための電顕解析領域は 190 μm × 190 μm × 50 μm 、75 nm/section が必要になる。この領域をシナプス同定可能な最低倍率で広範囲の電顕モニター撮影を行った。

TH ニューロンの立体再構築とシナプス解析の結果、ON からのシナプスのうち約 60% は TH ニューロン細胞体から約 30 μm 離れた突起上に見られたのに対して、少数の non-ON からの入力も細胞体から 10 μm 以内の突起にシナプスしていた。(下図に再構築した TH ニューロンとシナプスを示す。赤色は non-ON から、ピンク色は ON からのシナプスを示す)

以上の結果から、細胞体近傍突起への少数の non-ON からの入力は、細胞体から遠位の突起にシナプスする多数の ON からの入力よりもさらに効果的にシナプス電位が伝達されることが推測された。



(3) non-ON ニューロンの同定

単一の TH ニューロン上のシナプス分布を解析することで、電気生理学的実験から得られた結果と形態学的な解析結果を統合させて入力調整回路を理解することが可能となった。そこで、さらに TH ニューロンが形成する神経回路を明らかにするため、non-ON ニューロンの同定をウイルス感染法を用いて行った。

Sindbis virus を TH-GFP マウスの嗅球僧帽細胞に感染させ、単一の僧帽細胞と TH ニューロンが近接する箇所の電顕観察を行った。共焦点レーザー顕微鏡による観察では、糸球体内における単一の僧帽細胞と TH ニューロンは 7~8 箇所の近接が見られた。電子顕微鏡連続超薄切片の観察ではウイルス感染によって標識された僧帽細胞から TH ニューロンへの非対称性シナプスが、さらに同じ TH ニューロンから非標識の僧帽/房飾細胞への対称性シナプスが連続して見られた。現在、単一の TH ニューロンと標識された投射ニューロンのコンタクトについて解析を進めている。

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 9件)

(1) Kiyokage E., Toida K., S.-Yamamoto T., Ishimura K.

Cellular localization of 5alpha-reductase in the rat cerebellum.

Journal of Chemical Neuroanatomy (2014 in Press)doi:10.1016/j.jchemneu.2014.04.02、査読有

(2) 清蔭恵美、野津英司、松野岳志、鈴木良典、樋田一徳

透過型電子顕微鏡による広範囲モニター撮影と連続切片再構築法を用いた脳神経回路の解析

細胞、第 46 巻 10 (613):44 -47 (2014 掲載予定)、査読有

(3) 谷口美季、清蔭恵美、小林和人、樋田一徳

嗅覚系脳神経回路の解明：鼻閉モデルマウスを用いた嗅入力遮断効果の解析

川崎医学会誌 40 巻 2 号：(2014 掲載予定)、<http://igakkai.kms-igakkai.com/>、査読有

(4) Kurokawa K., Mizuno K., Kiyokage E., Shibasaki M., Toida K., and Ohkuma S.

Dopamine D1 receptor signaling system regulates ryanodine receptor expression after intermittent exposure to methamphetamine in primary cultures of midbrain and cerebral cortical neurons.

Journal of Neurochemistry 118:773-783 (2011)doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07366.x. 査読有

(5) Kurokawa K., Shibasaki M., Kiyokage E., Mizuno K., Toida K., and Ohkuma S.

Involvement of NMDA receptors in ryanodine receptor expression in dopaminergic neurons in the ventral tegmental area of mice with intermittent methamphetamine treatment.

Synapse65:1156-1165(2011)doi:10.1002/syn.20953. 査読有

(6) Kurokawa K., Mizuno K., Shibasaki M., Kiyokage E., Toida K., and Ohkuma S.

Cocaine increases ryanodine receptors via dopamine D1 receptors.

Synapse65:1106-1112(2011)doi:10.1002/syn.20935. 査読有

(7) 清蔭恵美、野津英司、赤木貴彦、樋田一徳

神経形態学におけるデジタルトレース顕微鏡、第 46 巻 2: 132-136 (2011)、<http://www.microscopy.or.jp/magazine/microscopy.html> 査読有

(8) Parrish-Aungst S., Kiyokage E., Szabo G., Yanagawa Y., Shipley M.T., and Puche A.C.

Sensory experience selectively regulates transmitter synthesis enzymes in

interglomerular circuits.
Brain Research 1382:70-76 (2011) doi:
10.1016/j.brainres.2011.01.068. 査読有
(9) Kiyokage E., Pan Y., Shao Z., Kobayashi
K., Szabo G., Yanagawa Y., Obata K., Okano
H., Toida K., Puche C.A., and Shipley T.M.
Molecular Identity of Periglomerular and
Short Axon Cells.
Journal of Neuroscience 30(3):1185-1196
(2010)doi:10.1523/JNEUROSCI.3497-09.201
0. 査読有

〔学会発表〕(計 10件)

(1) 清蔭恵美、鈴木良典、樋田一徳
嗅球系球体：電子顕微鏡連続切片再構築による
シナプス解析
日本顕微鏡学会第 69 回学術講演会、2013 年
5 月 20 日、於ホテル阪急エキスポパーク
(2) 清蔭恵美
嗅球系球体：電子顕微鏡連続切片再構築と単
一ニューロン標識による構造解析
第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会講
演：神経解剖懇話会シンポジウム「単一ニュー
ロン標識法と神経回路の解析」2013 年 3 月
28 日、於サンポートホール高松・かがわ国際
会議場
(3) 清蔭恵美、樋田一徳
マウス嗅球におけるドーパミンニューロンの
シナプス解析
第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 21 日、
於名古屋コンベンションセンター
(4) Kiyokage E., Shao Z., Puche C. A.,
Shipley T. M., Kobayashi K., Toida K.
Structural analysis for distribution of
synapses on mouse olfactory bulb
dopaminergic neurons
第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会、
2011 年 3 月 30 日、於パシフィコ横浜
(5) Akagi T., Kiyokage E., and Toida K.
Morphological analysis for migration of
postnatal neurogenesis in the mouse
olfactory system
第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会、
2011 年 3 月 28-30 日、於パシフィコ横浜
(6) Taniguchi M., Kiyokage E., and Toida
K.
Olfactory Brain Circuitry: morphological
analysis of input deprivation effect using
nasal closure model mice
第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会、
2011 年 3 月 28-30 日、於パシフィコ横浜
(7) 谷口美季、清蔭恵美、樋田一徳
嗅覚系脳神経回路の解明：鼻閉モデルマウス
を用いた嗅入力遮断効果の解析
日本顕微鏡学会第 55 回シンポジウム、2011
年 9 月 30 日-10 月 1 日、於かがわ国際会議場
(8) 赤木貴彦、清蔭恵美、樋田一徳
嗅覚系脳神経回路の解明：新生ニューロンの
遊走動態に関する形態学的解析
日本顕微鏡学会第 55 回シンポジウム、2011

年 9 月 30 日-10 月 1 日、於かがわ国際会議場
(9) 清蔭恵美、樋田一徳
マウス嗅球系球体における TH ニューロンの
シナプス解析
第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会、
2010 年 3 月 28 日、於盛岡県民会館
(10) Kiyokage E., Shao Z., Puche C. A.,
Shipley T. M. Kobayashi K., and Toida K.
Differential distribution of olfactory
nerve synapses on mouse olfactory bulb
dopaminergic neurons.
40th Annual meeting of the Society for
Neuroscience, November 15th 2010, at San
Diego, USA. San Diego Convention Center
〔図書〕(計 0件)

〔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〕
解剖学教室ホームページ
<http://igakkai.kms-igakkai.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
清蔭 恵美 (Kiyokage Emi)
川崎医科大学・解剖学・講師
研究者番号：30543392

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
樋田 一徳 (Toida Kazunori)
川崎医科大学・解剖学・教授
研究者番号：40253405

金子 武嗣 (Kaneko Takeshi)
京都大学・高次脳形態学・教授
研究者番号：90177519