

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 10 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2012～2016

課題番号：24220007

研究課題名(和文) 高次脳領域におけるシナプス伝達制御機構の分子形態学的研究

研究課題名(英文) Molecular-anatomical research on multi-modal regulation of synaptic transmission in higher brain regions

研究代表者

渡辺 雅彦 (WATANABE, MASAHIKO)

北海道大学・医学研究科・教授

研究者番号：70210945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 167,800,000円

研究成果の概要(和文)：シナプス伝達の「重み」は一樣ではなく、入力選択的・標的選択的・活動依存的・状況依存的に制御されている。本研究課題では、この多層的伝達制御機構の分子解剖学的基盤を追求した。その結果、シナプス後部のTARPとGluDが入力・標的・活動依存的なAMPAの発現制御に関わり、シナプス前部にVGluT3を発現するCCK陽性の抑制性介在ニューロンが特異な陥入型シナプスを形成し、そこにカンナビノイドを介する強力な逆行性脱抑制機構を構築していることを解明した。さらに、状況依存的行動制御に重要なドパミン投射が、GABA作動性シナプス後部分子を介して係留接着を形成するという、神経調節の新たな動作原理も発見した。

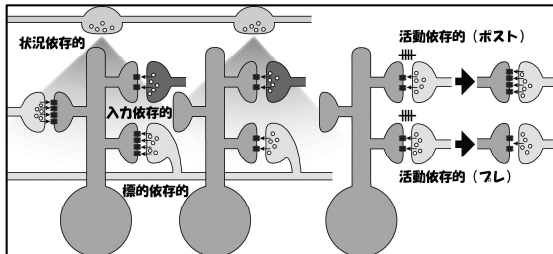
研究成果の概要(英文)：state-dependent manners. We found that TARP and GluD families play important roles in input-, target cell-, activity-dependent regulations in the cerebellum and hippocampus. In the cortex and cortex-like amygdala, CCK-positive interneurons expressing VGluT3 constructed unique invaginating synapses, which were also characterized by intense expression of endocannabinoid signaling molecules to powerfully drive activity- and state-dependent disinhibition. Furthermore, so-called 'dopamine synapses' are important for state-dependent controls of motor and cognitive functions. We address that dopamine synapses were neurexigin-2-mediated heterologous contacts formed between dopaminergic presynapse and GABAergic postsynapse, from which we propose the third mode of neural transmission, anchored transmission, in addition to classical modes of wired and volume transmissions.

研究分野：神経解剖学

キーワード：シナプス 入力選択性 標的選択性 活動依存性 グルタミン酸 GABA ドパミン

### 1. 研究開始当初の背景

情報処理が高度に発達した高次脳領域の情報処理ニューロンは、莫大な数の神経入力をシナプスを介した配線伝達により受取っている。そこでは、樹状突起と細胞体に配置する個々のシナプス伝達の「重み」は一定ではなく、入力選択的および標的選択的に異なるよう設定され、それぞれの伝達効率は活動依存的に変化し、神経調節物質を介したボリューム伝達により状況依存的に調節される。



このシナプス伝達の多層的な制御様式は、多数の入力源から神経情報を処理し統合する中枢神経機能の根幹であり、それぞれの領域のニューロン発火特性・シナプス伝達特性・神経回路の解剖学的構成は高次脳領域ごとに異なっているが、その制御機構についてはほとんど不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究は、代表的な高次脳領域におけるシナプス伝達分子の入力選択的、標的選択的、活動依存的、状況依存的な発現様式とその制御機構の解明を目的として立ち上げた。この研究目的を達成するために、シナプス後部分子、シナプス前部分子、シナプス周囲の神経調節物質の3点に焦点を絞り、具体的な解析項目を通して多層的な神経情報伝達制御の分子機構の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

研究代表者がこれまで開発してきた特異的な検出プローブを用いた高分解能の分子発現解析法と高精度の神経解剖学的解析法とを組み合わせ、遺伝子改変マウスや遺伝子ノックダウンマウスの光学および電子顕微鏡観察法により研究を進めた。

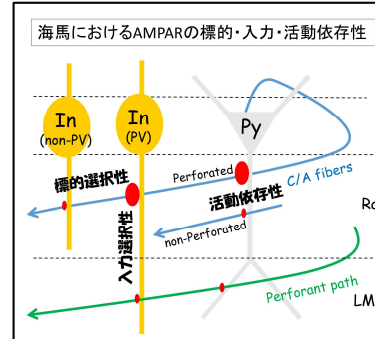
### 4. 研究成果

得られた研究成果は以下のとおりである。  
(1)シナプス後部分子による入力および標的選択的シナプス伝達制御に関する研究：

AMPAR の入力選択的および標的選択的シナプス発現の定量的評価 (発表論文 1)

海馬 CA1 において、同じ錐体細胞軸索が形成する興奮性シナプスの中で、標的が錐体細胞 (Py) とパルブアルブミン陽性介在ニューロン (PV) である場合、他の介在ニューロン (non-PV) に比べ AMPAR 発現量の数倍多いことが判明した (標的選択性)。また、同じ錐体細胞上 (もしくは PV 細胞上) に形成されるシナプスの中で、交連・連合性線維が作る放

射状層 (Ra) シナプスの方が、貫通線維が作る網状分子層 (LM) シナプスよりも数倍の AMPAR を発現していることが判明した (入力選択性)。さらに、LTP 発現状態と関連している perforated シナプスの方が、non-perforated シナプスより数倍の AMPAR を発現していた (活動依存的)。



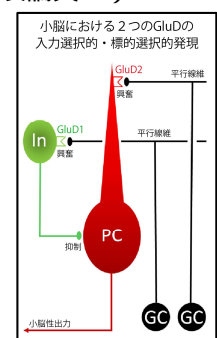
TARP による AMPAR の入力選択性および標的選択性の制御機構 (発表論文 1)

注目すべきことは、これらの海馬シナプス間の異なる AMPAR 発現量は TARP ファミリーの中の  $\gamma$ -2 のシナプス発現と強い相関を示し、TARP $\gamma$ -2 遺伝子欠損によりシナプス間のディスプレイティーが失われた。一方、海馬に最も豊富な TARP $\gamma$ -8 は、シナプスの種類によらずほぼ均質に発現し、その遺伝子欠損ではディスプレイティーを保存したまま AMPAR のシナプス発現量が全体的に減少した。以上の結果から、海馬 CA1 シナプスにおける AMPAR 発現には顕著な入力・標的・活動依存的発現が存在し、その定常的発現に対して TARP $\gamma$ -8 が、ディスプレイティーの形成と制御の対して TARP $\gamma$ -2 が関与していることが示唆された。

GluD1 による AMPAR の入力選択性および標的選択性の制御機構 (発表論文 2)

一方、小脳では、GluD2 はプルキンエ細胞の、GluD1 は分子層介在ニューロンの平行線維シナプス選択的に発現し、それぞれのシナプス形成と AMPAR の入力選択的ディスプレイティーを制御していた。

この研究テーマに関連して、GluD2 やこれと共同する mGluR1 が平行線維シナプスの再生や刈込みに関与することも明らかにすることができた (発表論部 3, 4)



(2)シナプス前部分子による活動依存的シナプス伝達制御に関する研究

小脳平行線維シナプスにおける VGlut2 1 スwitchングによる活動依存的な LTD 誘発制御 (論文執筆中)

小脳顆粒細胞選択的な TARP $\gamma$ -2 欠損マウスでは、顆粒細胞における AMPAR の発現と機能

がほぼ完全に消失するだけでなく、小脳成熟過程で起こるべき顆粒細胞軸索（平行線維）における VGlut2 VGlut1 の発現スイッチングも障害されていた。このような VGlut のスイッチング障害は、プルキンエ細胞選択的な TARPγ-2 欠損マウスでは観察されないことから、顆粒細胞の活動性が VGlut スwitchングを誘導していることを意味する。興味深いことに、VGlut のスイッチングが障害された平行線維・プルキンエ細胞間シナプスでは LTD 誘発が消失していた。現在、VGlut2 VGlut1 の発現スイッチによる LTD 誘導機構について解析を実施している。

線条体中型有棘細胞における VGlut1,2 サブクラスによるシナプス後部の AMPAR 発現制御（論文投稿中）

海馬とは異なり、線条体では D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub> 受容体を発現する 2 種類の中型有棘細胞では、VGlut1 を発現する皮質シナプスと VGlut2 を発現する視床シナプスの間での AMPAR 発現量のディスパリティは存在しなかった。それぞれのシナプスにおける各種 TARP のシナプス発現量も均質であることから、線条体では TARP の均質的発現調節を介して AMPAR の入力選択性や標的選択性を最小化させ、ドパミンによる線条体出力制御を効果的に行っていることを示唆する

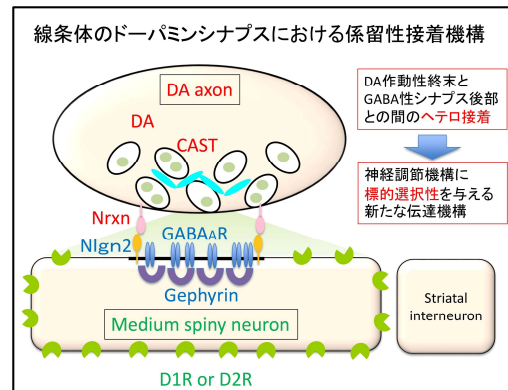
(3)シナプス周囲の神経調節物質受容体による状況依存的シナプス伝達制御に関する研究

黒質線条体ドパミン投射系の係留接着とボリューム伝達による状況依存的伝達制御（発表論文 5）

黒質から線条体へのドパミン投射は基底核による運動性および認知機能を調節している。線条体には、いわゆる 'ドパミンシナプス' が形成されていることが知られていたが、その分子解剖学的実体はほとんど不明であった。

本研究の推進により、ドパミンシナプスはドパミン放出性のシナプス前部と GABA 感受性のシナプス後部との間のヘテロな接着結合であり、中型有棘細胞を標的として形成されていることを見出した。このヘテロ接着の形成には、GABA 作動性シナプスに選択的な接着分子 neuroigin-2 が媒介することも実験的に証明した。従って、ドパミンシナプスは伝達性ではなく係留性接着装置であり、これによりドパミンによるボリューム伝達に標的選択性を付与していることを示唆する。

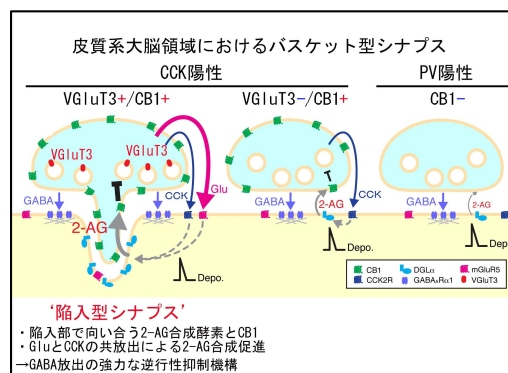
この研究テーマに関連して、青斑核から海馬へのノルアドレナリン投射は記憶の強化に重要であると従来考えられてきたが、その神経調節を行っている物質本体がノルアドレナリン合成系の前駆体であるドパミンであることも突き止めた（発表論文 6）。



CCKによる局所回路のボリューム伝達による状況依存的伝達制御（発表論文 7）

カンナビノイドによる恐怖記憶消去との関連が注目されている扁桃体において、特殊な陥入構造を有しカンナビノイド伝達分子（2-AG 合成酵素の DGLα と CB1 受容体）が集中する抑制性シナプスを基底核で発見し、これを陥入型シナプスと命名した（Yoshida et al., PNAS 108:3059-3064, 2011）。

本研究の推進により、扁桃体基底核において VGlut3 を発現する CCK 陽性バスケット細胞が選択的に陥入型シナプスを形成していることを突き止めた。そのシナプス後部には GABA<sub>A</sub>R が選択的に発現し、G<sub>o/11</sub> 共役型の mGluR5 や CCK2R はシナプス外領域に広く分布していた。さらに、陥入型シナプスは、特定の皮質系大脳領域（運動野、体性感覚野、嗅内領皮質など）にも存在し、いずれも VGlut3 を発現する CCK 陽性バスケット細胞が錐体細胞に対して形成している点で共通していた。以上の観察結果から、陥入型シナプスから 3 種の伝達物質が共放出され、このうち CCK と VGlut3 を介したグルタミン酸が神経調節的に働いて 2-AG の合成を促進して逆行性に作用することで、GABA による速い抑制性シナプス伝達を強力に抑制する特異なシナプス装置であると考えられる



## 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 140 件)

1. Yamasaki M, Fukaya M, Yamazaki M, Azechi H, Natsume R, Abe M, Sakimura K, Watanabe M: TARP  $\gamma$ -2 and  $\gamma$ -8 differentially control biased AMPAR density across Schaffer collateral/ commissural synapses in the hippocampal CA1. **J Neurosci**, 36:4296-4312, 2016.DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4178-15.2016. 査読有.
2. Ichikawa R, Sakimura K, Watanabe M: GluD2 endows parallel fiber-Purkinje cell synapses with a high regenerative capacity. **J Neurosci**, 36:4846-4858. 2016.DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0161-16.2016. 査読有.
3. 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. USA**, 113:2282-2287,2016.DOI: 10.1073/pnas.1511513113. 査読有.
4. 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 USA**,113:4206-4211, 2016. DOI: 10.1073/pnas.1514074113. 査読有.
5. Takeuchi T, Duszkievicz AJ, Sonneborn A, Spooner PA, Yamasaki M, Watanabe M, Smith GC, Fernández G, Deisseroth K, Greene RW, Morris RGM: Locus coeruleus and dopaminergic consolidation of everyday memory. **Nature**, 537:357-362,2016.DOI: 10.1038/nature19325. 査読有.
6. Omiya Y, Uchigashima M, Konno K, Yamasaki M, Miyazaki T, Yoshida T, Kusumi I, Watanabe M: VGluT3-expressing CCK-positive basket cells construct invaginating synapses enriched with endocannabinoid signaling proteins in particular cortical and cortex-like amygdaloid regions of mouse brains. **J Neurosci**, 35:4215-4225, 2015. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4681-14.2015. 査読有.
7. Konno K, Matsuda K, Nakamoto C, Uchigashima M, Miyazaki T, Yamasaki M, Sakimura K, Yuzaki M, Watanabe M: Enriched expression of GluD1 in higher brain regions and its involvement in parallel fiber-interneuron synapse formation in the cerebellum. **J. Neurosci**, 34:7412-7424,2014.DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0628-14.2014. 査読有.
8. Yamasaki M, Okada R, Takasaki C, Toki S, Fukaya M, Natsume R, Sakimura K, Mishina M, Shirakawa T, Watanabe M: Opposing role of NMDA receptor GluN2B and GluN2D in somatosensory development and maturation. **J Neurosci**, 34:11534-11548,2014.DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1811-14.2014. 査読有.
9. Uesaka N, Uchigashima M, Mikuni T, Nakazawa T, Nakao H, Hirai K, Aiba A, Watanabe M, Kano M: Retrograde semaphorin signaling regulates synapse elimination in the developing mouse brain. **Science** 344: 1020-1023, 2014. DOI: 10.1126/science.1252514. 査読有.
10. Kudo T, Konno K, Uchigashima M, Yanagawa Y, Sora I, Minami M, Watanabe M: GABAergic neurons in the ventral tegmental area receive dual GABA/enkephalin-mediated inhibitory inputs from the bed nucleus of the stria terminalis. **Eur. J. Neurosci.**, 39:1796-1809, 2014. DOI: 10.1111/ejn.12503. 査読有.
11. Miyazaki T, Yamasaki M, Hashimoto K, Yamazaki M, Abe M, Usui H, Kano M, Sakimura K, Watanabe M: Ca(v)2.1 in Cerebellar Purkinje Cells Regulates Competitive Excitatory Synaptic Wiring, Cell Survival, and Cerebellar Biochemical Compartmentalization. **J.Neurosci**.32:1311-1328,2012.DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2755-11.2012. 査読有.
12. Ito-Ishida A, Miyazaki T, Miura E, Matsuda K, Watanabe M, Yuzaki M, Okabe S: Presynaptically released cbln1 induces dynamic axonal structural changes by interacting with GluD2 during cerebellar synapse formation. **Neuron**, 76:549-564, 2012. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.07.027. 査読有.

13. Kudo T, Uchigashima M, Miyazaki T, Konno K, Yamasaki Y, Yanagawa Y, Minami M, Watanabe M: Three types of neurochemical projection from the bed nucleus of the stria terminalis to the ventral tegmental area in adult mice. **J. Neurosci.**, 32:18035-18046, 2012. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4057-12.2012. 査読有.
14. Iwakura A, Uchigashima M, Miyazaki T, Yamasaki M, Watanabe M: Lack of Molecular-anatomical evidence for GABAergic influence upon axon initial segment of cerebellar Purkinje cells by the pinceau formation. **J. Neurosci.** 32: 9438-9448,2012.DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1651-12.2012. 査読有.

〔学会発表〕(計 52 件)

1. Watanabe M: Glutamate transporter GLAST controls synaptic wrapping by Bergmann glia and ensures proper wiring in Purkinje cells. 47th NIPS International Symposium. 生理学研究所,Okazaki (Japan), October 26-28, 2016.
2. Watanabe M, Ichikawa R: mGluR1 sculpts heterologous inputs to cerebellar Purkinje cells. 8th International Meeting on Metabotropic Glutamate Receptors. Sicily (Italy), September 28-October 3, 2014.
3. Watanabe M: Homo- and heterosynaptic refinement of the cerebellar circuits. 23th International Symposium on Morphological Sciences. 朱鷺メッセ ,Niigata (Japan), September 10-13, 2013.
4. Watanabe M: TARPs as major molecular determinants for expression and heterogeneity in synaptic AMPA receptors. 36th International Union of Physiological Sciences. Brimingham (UK), July 21-26, 2013.

〔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〕  
ホームページ等  
<https://aande.hokkaido.university/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡辺雅彦 (Masahiko Watanabe)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：7210945

### (2) 研究分担者

崎村建司 (Kenji Sakimura)  
新潟大学・脳研究所・教授  
研究者番号：40162325

### (3) 連携研究者

1. 山崎美和子 (Miwako Yamasaki)  
北海道大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：10431305

2. 宮崎太輔 (Taisuke Miyazaki)  
北海道大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：90374230

3. 今野幸太郎 (Kohtarou Konno)  
北海道大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：20599641

4. 内ヶ島基政 (Motokazu Uchigashima)  
北海道大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：10614662

5. 狩野方伸 (Masanobu Kano)  
東京大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：40185963

6. 重本隆一 (Ryuichi Shigemoto)  
生理学研究所・大脳皮質機能研究系・教授  
研究者番号：20221294

7. 小林和人 (Kazuto Kobayashi)  
福島県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：90211903

### (4) 研究協力者

なし