

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830031

研究課題名(和文) 線条体ドーパミンシナプス接着分子の機能形態解析

研究課題名(英文) Functional morphology of dopamine synapses in the mouse striatum

研究代表者

内ヶ島 基政 (Uchigashima, Motokazu)

北海道大学・医学(系)研究科(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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：中脳ドーパミンニューロンは線条体においてドーパミンシナプスを多数形成し、運動調節や認知行動において不可欠な役割を担っているが、その基盤となるドーパミンシナプスを構成する分子は不明であった。本研究はドーパミンシナプスがドーパミン作動性のシナプス前部とGABA作動性のシナプス後部により構成されるユニークな接着構造であることを突き止め、さらにこの接着構造の形成にシナプス接着分子であるニューロリギン2が関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Midbrain dopaminergic neurons form a number of so-called dopamine synapses on striatal neurons, and have a strong influence on motor and cognitive functions. However, the molecular composition of dopamine synapses remains elusive. Here we found that dopamine synapses were heterologous contacts between a dopaminergic presynapse and GABAergic postsynapse in the mouse striatum, and synaptic adhesion molecule neuroligin-2 was involved in their formation. These suggest that dopamine synapses can increase the potency and selectivity of dopaminergic modulation by the anchorage of dopamine release sites to target striatal neurons.

研究分野：神経解剖学

キーワード：ドーパミン 線条体 ニューロリギン

1. 研究開始当初の背景

線条体は随意運動および認知行動に関与する神経核であり、モノアミンやペプチド、内因性カンナビノイドをはじめとする多様な神経伝達物質を介した精緻な制御を受ける (Wilson, *The Synaptic Organization of the Brain*, 2000; Uchigashima et al., *J Neurosci.*, 2007)。中でも、ドーパミン神経伝達は線条体機能に最も重要な役割を果たしており、その異常はパーキンソン病やトゥレット症候群、統合失調症などを引き起こすことが知られる。線条体において中脳から投射されるドーパミン作動性軸索はシナプス様の接着構造、いわゆるドーパミンシナプスを形成する (Freund et al., *Neuroscience*, 1984)。一方で、ドーパミン受容体はドーパミンシナプスに集積せず、シナプス外に広く分布することから、ドーパミン神経伝達におけるドーパミンシナプスの位置付けは不明であった。私達は形態学的アプローチにてこれまでにドーパミンシナプスがプレシナプス側にてドーパミンの放出装置を備えている一方、ポストシナプス側にて受容体の集積を伴わない“ヘミシナプス”とも言えるようなユニークな構造を呈するという所見を得た。しかし、このようなヘミシナプス構造は他に報告例がなく、そのポストシナプス側の分子構成も不明であった。

グルタミン酸シナプスや GABA シナプスを用いた研究から、シナプスではプレシナプスおよびポストシナプス側のどちらにも細胞外ドメインを持ったシナプス接着分子と呼ばれる分子群が集積し、経シナプス的な結合を介して神経伝達物質の放出装置と受容体を向かい合わせるように配置させる (Yamagata et al., *Curr Opin Cell Biol.*, 2003)。これまでに報告されてきたシナプス接着分子ファミリーのうち、一部はグルタミン酸シナプスと GABA シナプスとで異なる発現を示すことから (Chubykin et al., *Neuron*, 2007)、シナプス特有のシナプス接着分子発現が神経伝達物質と受容体をマッチさせたシナプス機能分化に重要であると考えられている。

ドーパミンシナプスは電子顕微鏡観察下にて GABA シナプスと非常によく似た形態を示し、シナプス間隙の電子密度は他のシナプスと同様に高くなっていることから、シナプス接着分子の存在が示唆される。さらに、シナプス接着分子の変異はドーパミン神経伝達異常が指摘される統合失調症や自閉症をはじめとする様々な精神神経疾患患者から見つかっており、シナプス接着分子とドーパミン神経伝達異常を容易に結びつけることができる。

本研究ではこれらの事実に着目し、ドーパミンシナプスの形成に関与するシナプス接着分子がドーパミンシナプスに存在するという仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究はドーパミンシナプスに発現するシナプス接着分子を探索し、ドーパミンシナプスに対するシナプス接着分子の機能的寄与を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 細胞生物学的手法を用いたドーパミンシナプス接着分子の探索

中脳ドーパミンニューロンと任意の分子を過剰発現する HEK293T 細胞を共培養する *in vitro* 実験系を開発した。ポストシナプス側のシナプス接着分子として知られる Neuroligin、Lysine Rich Repeat Trans-Membrane protein (LRRTM)、Slitrk 等の各ファミリー分子を HEK293T 細胞に発現させ、それらと接触するドーパミン作動性軸索上のプレシナプス分子発現を蛍光免疫染色にて評価した。

(2) 免疫組織化学的手法を用いたドーパミンシナプスにおける分子発現解析

共培養実験にて同定されたドーパミンシナプス接着分子に対する特異的抗体を用いた免疫組織化学的手法 (蛍光多重免疫染色、免疫電子顕微鏡法) にて *in vivo* でのマウス線条体ドーパミンシナプスにおける分子発現解析を行った。

(3) 単一樹状突起におけるドーパミンシナプス分布の定量的解析

GFP 発現レンチウイルスベクターをマウス線条体に注入することで、線条体ニューロンの単一樹状突起に対する GFP 標識が可能となる。この GFP 標識とドーパミンシナプス分子に対する蛍光多重免疫染色を組み合わせ、さらに共焦点レーザー顕微鏡にて取得した画像を立体再構築することにより、樹状突起上に分布するドーパミンシナプスの密度をニューロンの種類ごとに定量的に評価した。

(4) *in vivo* におけるドーパミンシナプス接着分子の機能評価

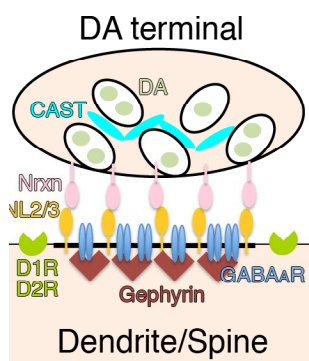
ドーパミンシナプス接着分子の発現を RNA 干渉を介して抑制するレンチウイルスベクターを作製し、マウス線条体へ投与した。レポーターとして GFP を共発現させることにより (3) で確立した樹状突起上におけるドーパミンシナプス密度の評価方法をそのまま応用することが可能となるため、ドーパミンシナプス密度を計測することによってドーパミンシナプス接着分子の機能的寄与を評価した。

4. 研究成果

(1) ドーパミンシナプスは GABA シナプス選択的なシナプス接着分子 NL2 を発現する。

まず、中脳ドーパミンニューロンと HEK293T 細胞の共培養実験により、Neuroligin ファミリー (NL1~3) がドーパミ

ン作動性軸索のプレシナプス分化を促進することを見出した。NL1 はグルタミン酸シナプス、NL2 は GABA シナプス、NL3 は両方に分布することが知られている。マウス線条体を用いた免疫組織化学的解析によって、ドーパミンシナプスのポストシナプスは GABA シナプスと同様に NL2 を発現することが明らかとなり、両シナプスにおける NL2 の発現強度も同じであった。この結果はドーパミンシナプスが GABA シナプスと同じシナプス接着分子による制御を受けていることを強く支持するものである。さらに予想外なことにドーパミンシナプスが GABA 受容体や足場タンパクである gephyrin を発現することも認められたことから、ドーパミンシナプスのポストシナプスは GABA シナプスと同様な分子構成であると考えられた。すなわち、ドーパミンシナプスはドーパミン作動性のプレシナプスと GABA 作動性のポストシナプスからなる、これまでに報告例のない神経化学的特性が一致しないシナプスであると推察される。



(2) ドーパミンシナプスの主要な標的は有棘投射型ニューロンである。

(1)の結果はドーパミンシナプスが GABA シナプスと共通する NL2 を介したシナプス形成機構を介してドーパミン放出部位を特定の標的構造に係留していることを強く示唆している。そこで、NL2 や gephyrin に対する蛍光免疫染色を用いてドーパミンシナプスの分布の可視化し、異なる線条体ニューロンの樹状突起上におけるドーパミンシナプスの分布密度を評価したところ、ドーパミンシナプスは介在ニューロンよりも2種類の有棘投射型ニューロン(直接路型と間接路型)を主な標的としており、直接路型と間接路型の間ではドーパミンシナプスの分布密度に大きな違いがないことが明らかとなった。有棘投射型ニューロンの樹状突起はドーパミン受容体を豊富に発現することが知られており、ドーパミンシナプスの解剖学的標的と機能的標的の分布が一致する。したがって、ドーパミンシナプスはドーパミン受容体を豊富に備えた標的ニューロンにドーパミンの放出部位を NL2 を介して係留することで、ドーパミン神経伝達の強度と選択性を向上させていると考えられる。

(3) 有棘投射型ニューロンにおけるドーパ

ミンシナプスの形成はNL2により制御される。

さらに *in vivo* 下のドーパミンシナプス形成に対する NL2 の役割を追求するため、レンチウイルスベクターを用いて少数の線条体投射型ニューロンの NL2 発現を抑制したところ、樹状突起上のドーパミンシナプスの密度が有意に減少した。その一方で GABA シナプスの密度の上昇も認めたことから、*in vivo* 下でのドーパミンシナプス形成に対する NL2 の役割は *in vitro* 下のように単純ではなく、ドーパミンシナプスと GABA シナプスとの間に競合的なシナプス形成機構の存在が示唆され、そこに NL2 が重要な役割を果たしていると考えられる。

本研究成果はドーパミンシナプスが (1)GABA シナプスと同様のシナプス接着分子 NL2 を発現し、(2)NL2 を介してドーパミン放出部位を標的となる有棘投射型ニューロンに係留し、(3)GABA シナプスとの間で NL2 依存競合を伴いながら形成されるこれまで知られていない機構の一端を明らかにした。従来のシナプス研究はグルタミン酸シナプスと GABA シナプスのみに着目してきたが、本研究成果はドーパミン神経伝達の正常および病態生理にグルタミン酸や GABA シナプスと共通するシナプス分子が直接関与する可能性を強く示唆するものであり、従来より想定されてきた神経修飾因子としてのドーパミン神経伝達のあり方を変える重要な発見である。

さらに、ドーパミン以外の神経修飾因子を神経伝達物質とするアセチルコリン作動性ニューロンやノルアドレナリン作動性ニューロンも GABA シナプスと類似したシナプス構造を形成することがすでに報告されており、NL2 を介して形成される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シナプスはドーパミンシナプスだけではなく、他の神経修飾因子シナプスにも共通する可能性があり、今後の検討が必要である。

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8件)

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*, 査読有, 35(10), 2015, 4215-4228 doi:10.1523/JNEUROSCI.4681-14.2015
Uesaka N, Uchigashima M, Mikuni T, Hirai H, Watanabe M, Kano M.

Retrograde signaling for climbing fiber synapse elimination. *Cerebellum*, 査読有, 14(1), 2015, 4-7 doi: 10.1126/science.1252514

Konno K, Takahashi-Iwanaga H, Uchigashima M, Miyasaka K, Funakoshi A, Watanabe M, Iwanaga T. Cellular and subcellular localization of cholecystikinin (CCK)-1 receptors in the pancreas, gallbladder, and stomach of mice. *Histochem Cell Biol*, 査読有, 143(3), 2015, 301-312 doi: 10.1007/s00418-014-1281-3

Song X, Yamasaki M, Miyazaki T, Konno K, Uchigashima M, Watanabe M. Neuron type- and input pathway-dependent expression of Slc4a10 in adult mouse brains. *Eur J Neurosci*, 査読有, 40(5), 2014, 2797-2810 doi: 10.1111/ejn.12636

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*, 査読有, 34(22), 2014, 7412-7424 doi: 10.1523/JNEUROSCI.0628-14.2014

Uesaka N, Uchigashima M, Mikuni T, Nakazawa T, Nakao H, Hirai H, Aiba A, Watanabe M, Kano M. Retrograde semaphorin signaling regulates synapse elimination in the developing mouse brain. *Science*, 査読有, 344(6187), 2014, 1020-1023 doi: 10.1126/science.1252514

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*, 査読有, 39(11), 2014, 1796-1809 doi: 10.1111/ejn.12503

Tsujino N, Tsunematsu T, Uchigashima M, Konno K, Yamanaka A, Kobayashi K, Watanabe M, Koyama Y, Sakurai T. Chronic alterations in monoaminergic cells in the locus coeruleus in orexin neuron-ablated narcoleptic mice. *PLoS One*, 査読有, 8(7), 2013, e70012 doi: 10.1371/journal.pone.0070012

〔学会発表〕(計4件)

内ヶ島基政、CCK/VGluT3 妖精バスケット細胞シナプスに特異的な 2-アラキドノイルグリセロールシグナルを介した

シナプス伝達修飾の分子形態基盤、第37回日本神経科学大会、2014年9月11日～2014年9月13日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

内ヶ島基政、Nigrostriatal dopamine afferents form heterologous contacts with GABAergic postsynaptic molecules in the mouse striatum、第119回日本解剖学会総会全国学術集会、2014年3月27日～2014年3月29日、自治医科大学(栃木県下野市)

内ヶ島基政、マウス線条体における Neuroligin-3 の免疫組織化学的分布、第59回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会、2013年9月14日～2013年9月15日、北海道大学(北海道札幌市)

内ヶ島基政、線条体ドパミンシナプスは GABA シナプスと共通のポストシナプス分子を発現する、第36回日本神経科学大会、2013年6月20日～2013年6月23日、国立京都国際会館(京都府京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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