

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860169

研究課題名(和文)ドーパミンの時空間的分泌ダイナミクス

研究課題名(英文)The dynamics of spatiotemporal dopamine release

研究代表者

篠田 陽 (Shinoda, Yo)

東京理科大学・理工学部・助教

研究者番号：80403096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウスDA作動性ニューロンの分散培養系の確立と、さらに本培養系において腹側被蓋野(VTA)由来のDAニューロンと、黒質緻密部(SNc)由来のDAニューロンとをcalbindinの染色により分別し、それぞれの部位特異的なCAPS2分布を明らかにした。さらに野生型マウスとCAPS2 KOマウスからDAニューロンの培養を行い、それぞれのニューロンからDA分泌をタイムラプスイメージングにより定量解析したところ、CAPS2 KOマウス由来のDAニューロンにおいて、有意にDAの分泌活性が低下していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：I established the primary culture method of DAergic neuron from mouse mesencephalon. The subcellular distributions of CAPS2 in the DAergic neuron from VTA and SNc are clarified by using anti-CAPS2 and anti-calbindin antibodies. Primary cultured DAergic neurons from WT and CAPS2 KO mice shows that the release activity of DA is significantly reduced in the DAergic neuron from CAPS2 KO mice.

研究分野：神経科学

キーワード：ドーパミン CAPS2

1. 研究開始当初の背景

DAは中枢神経に存在するカテコールアミン系神経伝達物質であり、運動調節、ホルモン調節、快の感情、意欲、学習などに関わる事が知られている。またパーキンソン病はDA分泌量の低下(DA作動性ニューロンの選択的脱落)による疾患である事に加え、近年は統合失調症の原因物質としても重要な分子である可能性が示唆されてきた。DAのこのような重要性に関わらず、その分泌機構に関する研究はそれほど多くない。例えばDAは軸索末端において通常の小胞分泌機構によって分泌されると考えられているが、実際にDA作動性ニューロンを用いて行われた研究は少ない。また、DAは軸索末端のみならず、細胞体及び樹上突起からも分泌される事が知られているが、軸索分泌と細胞体-樹上突起それぞれにおける分泌メカニズムも異なっている可能性が示唆されているものの、これについてもカルシウムに対する応答特性が異なる事が報告されているのみであり、どのような分子が寄与しているかといった研究はなされていない。さらに、DAはシナプス小胞だけでなく有芯小胞からも分泌されている事が知られているが、それぞれの分泌部位、分泌様式など、ほとんど未解明であった。

2. 研究の目的

申請者はこれまで、小胞分泌に関与するタンパク質を中心に海馬を材料とした研究を行っており、近年有芯小胞分泌関連タンパク質であるCAPS2が海馬におけるBDNFの分泌を促進的に制御していることを明らかにしている。CAPS2は*in situ* hybridizationにおいてDA作動性ニューロンが存在するSNc及びVTAに強く発現が観察され、免疫組織化学的にもDA作動性ニューロンに強く発現している(図)ことから、CAPS2がDA分泌を制御している可能性を着想した。そこで本申請研究では、DA作動性ニューロンにおけるCAPS2の機能的役割に注目し、CAPS2依存的なDAの時空間的・速度論的分泌メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

-マウス中脳初代培養系の確立
 ラットで確立されている中脳初代培養をマウスに適用し、その培養法を確立する。

-免疫組織化学によるCAPS2, DA含有小胞の細胞内分布解析

DAの軸索・細胞体-樹状突起、シナプス・シナプス外、シナプス小胞・有芯小胞それぞれについて、vMAT2-pHluorinと蛍光タンパク質融合マーカータンパク質の共発現またはマーカータンパク質の

疫染色により区別し、各々についてのDA小胞との分布の違いを比較解析する。

-WT, CAPS2 KO由来細胞を用いた下記分泌の時空間・速度論的蛍光イメージング比較

vMAT2-pHluorin 分泌イメージング後、SN由来・VTA由来細胞をカルビンディン抗体による*post hoc*染色により同定する。軸索・細胞体-樹状突起等、細胞内各部位からの分泌は上述のように蛍光融合マーカータンパク質を発現する事によって同定する

4. 研究成果

マウス中脳初代培養系を確立するために、ラットで確立している中脳初代培養をベースに検討を行った。まずマウス大脳皮質よりアストロサイトを純粋培養してフィーダーレイヤーを作成し、その上にE15-17のマウス中脳領域を播種した。さらにグリア由来神経栄養因子GDNFを添加し、24時間後にアストロサイトの増殖抑制の目的でFDUを添加した。培養7日後の細胞を固定し、DAニューロンを抗TH抗体及びMAP2により染色したところ、神経細胞全体の15%がTH陽性細胞として同定された(図1)。

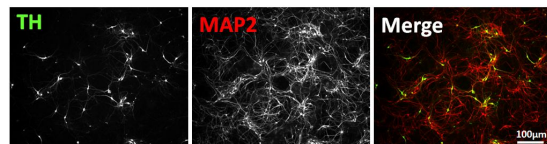


図1

また、固定した細胞を抗TH抗体と抗CAPS2抗体で染色したところ、約95%のTH陽性細胞がCAPS2陽性であった(図2)。

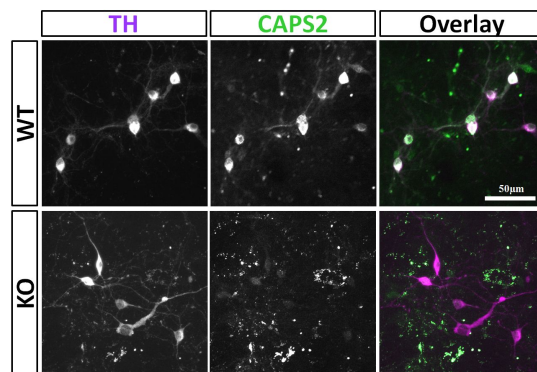


図2

次に、DAニューロンがVTA由来であるのか、SNc由来であるのかを明らかにするために抗Calbindin抗体で、樹状突起と軸索を同定するために抗MAP2, Tau抗体で染色し、これとTHおよびCAPS2を共染色した(図3)。

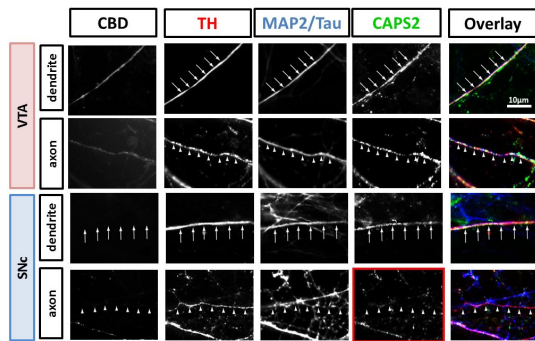


図 3

この染色像より VTA 由来及び SNc 由来の TH 陽性細胞それぞれにおける、軸索、樹状突起の CAPS2 タンパク質の分布について定量解析を行ったところ、VTA 由来の DA 作動性神経細胞の樹状突起では $67.1 \pm 6.6\%$ (n=9)、軸索では $45.3 \pm 2.5\%$ (n=9) という局在を示したのに対し、SNc 由来の DA 作動性神経細胞は、細胞体では $70.7 \pm 12.9\%$ (n=6)、樹状突起では $38.2 \pm 4.1\%$ (n=8)、軸索では $18.2 \pm 1.3\%$ (n=9) であった。また VTA における CAPS2 の発現量を基準として、SNc 由来の DA 作動性神経細胞の各部位(細胞体、樹状突起、軸索)における CAPS2 発現量を比較したところ、細胞体では $70.7 \pm 12.9\%$ 、樹状突起では $59.0 \pm 8.8\%$ 、軸索では $40.2 \pm 3.5\%$ であった(図 4)。すなわち、VTA に比べて SNc では全体として CAPS2 の発現レベルが低く、さらに軸索上では有意に発現レベルが低いということが明らかになった。

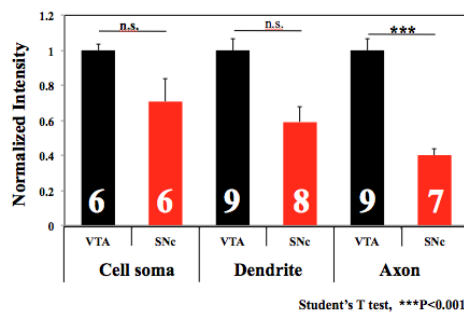


図 4

CAPS2 が DA の分泌を制御しているかどうかを明らかにする目的で、野生型及び CAPS2 KO マウス由来 DA 作動性ニューロンからの、脱分極刺激依存的な DA 小胞の開口放出を、DA トランスポーターに選択的に取り込まれる蛍光指示薬 FFN511 を用いた蛍光タイムラプスイメージングにより行った。FFN511 を培養 DA ニューロンに暴露することで DA 小胞に FFN511 を取り込ませ、これを洗浄した後に高 KCl 溶液を細胞に投与することで脱分極刺激を起こし、これによる FFN511 の蛍光強度減衰を測定することで DA 小胞の分泌を定量的

に解析したところ、野生型に比べて CAPS2 KO マウス由来の DA 作動性ニューロンからの DA 小胞分泌能力は低下していることが示された(図 5)。

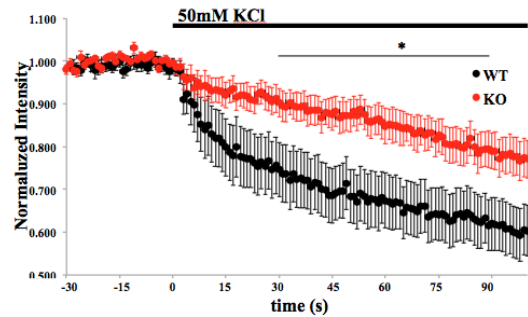


図 5

DA 小胞分泌のタイムラプスイメージング結果をさらに詳細に解析するために、刺激直後の FFN511 の蛍光変化を、Early phase(0-15s)と Late phase(15-90s)に分けて、それぞれにおける分泌速度を解析したところ、とりわけ Early phase の分泌速度に影響が出ている事が明になった(図 6)。

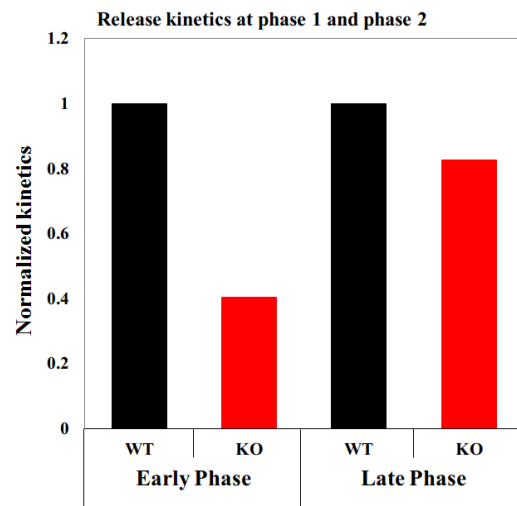


図 6

以上のように、CAPS2 の VTA 及び SNc 由来 DA 作動性ニューロンにおける軸索、樹状突起上の局在を明らかにし、さらに CAPS2 KO マウス由来 DA 作動性ニューロンを用いたタイムラプスイメージングの結果、CAPS2 が DA 小胞分泌に寄与している事、特に DA 小胞分泌の初期相において強く関与していることが明らかになった。

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 8 件)

1. Mishima Y, Shinoda Y, Sadakata T, Kojima M, Wakana S, Furuichi T. *Scientific Reports*, (2015) 5: 8932. Lack of stress responses to long-term effects of corticosterone in *Cans2* knockout mice. (査読有) DOI : 10.1038/srep08932
 2. *Shinoda Y, Ahmed S, Ramachandran B, Bharat V, Brockelt D, Altas B, *Dean C. *Front. Synaptic Neurosci.*, (2014) 6: 27, 1-12. BDNF enhances spontaneous and activity-dependent neurotransmitter release at excitatory terminals but not at inhibitory terminals in cultured hippocampal neurons. (査読有) DOI : 10.3389/fnsyn.2014.00027
 3. Sato Y, Yoshikawa F, Sadakata T, Shinoda Y, Koebis M, and *Furuichi T. *Neurosci. Lett.*, (2014) 581: 14-19. Age-dependent redistribution and hypersialylation of the central myelin paranodal loop membrane protein Opalin in the mouse brain. (査読有) DOI : 10.1016/j.neulet.2014.08.017
 4. *Sadakata T, Kakegawa W, Shinoda Y, Hosono M, Katoh-Semba R, Sekine Y, Sato Y, Saruta C, Ishizaki Y, Yuzaki M, Kojima M, and *Furuichi T. *PLoS ONE*, (2014) 9(6): e92291. Axonal localization of Ca²⁺-dependent activator protein for secretion 2 is critical for subcellular locality of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 release affecting proper development of postnatal mouse cerebellum. (査読有) DOI : 10.1371/journal.pone.0099524
 5. Equally contribution. Sadakata T, Shinoda Y, Sato A, Iguchi H, Ishii C, Matsuo M, Yamaga R, *Furuichi T. *Int J Environ Res Public Health*, (2013) 10(12): 6335-6353. Mouse Models of Mutations and Variations in Autism Spectrum Disorder-Associated Genes: Mice Expressing *Caps2/Cadps2* Copy Number and Alternative Splicing Variants. (査読有) DOI : 10.3390/ijerph10126335
 6. *Sadakata T, Kakegawa W, Shinoda Y, Hosono M, Katoh-Semba R, Sekine Y, Sato Y, Tanaka M., Iwasato T, Itohara S, Furuyama K, Kawaguchi Y, Ishizaki Y, Yuzaki M, and *Furuichi T. *J. Neurosci.*, (2013) 33(44), 17326-17334. CAPS1 deficiency perturbs dense-core vesicle trafficking and Golgi structure and reduces presynaptic release probability in the mouse brain. (査読有) DOI : 10.1523/JNEUROSCI.2777-13.2013
 7. Shinoda Y, Sadakata T, *Furuichi T. *Exp. Anim.* (2013) 62(2), 71-78. Animal Models of Autism Spectrum Disorder (ASD): A Synaptic-level Approach to Autistic-like Behavior in Mice. (査読有) DOI : 10.1538/expanim.62.71
 8. *Sadakata, T., Shinoda, Y, Oka, M., Sekine, Y, and *Furuichi, T. *FEBS Lett.* (2013) 587: 54-59. Autistic-like behavioral phenotypes in a mouse model with copy number variation of the *CAPS2/CADPS2* gene. (査読有) DOI : 10.1016/j.febslet.2012.10.047
- [学会発表](計 26 件)
1. Michinori Koebis, Yuzuru Saito, Yo Shinoda, Teiichi Furuichi. Brain-specific expression of lysosomal-associated membrane protein 5 (LAMP5) gene. Society for Neuroscience 44st Annual Meeting. Poster. (Washington DC, US) Nov, 17th, 2014 (poster# 394)
 2. T. FURUICHI, Y. SATO, F. YOSHIKAWA, T. SADAKATA, Y. SHINODA, M. KOEBIS. Age-dependent redistribution and hypersialylation of the central myelin loop membrane protein Opalin in the mouse brain. Society for Neuroscience 44st Annual Meeting. Poster. (Washington DC, US) Nov, 16th, 2014 (poster# 131)
 3. Y. YAMAGUCHI, S. SATOH, T. IJIMA, R. KANZAKI, T. FURUICHI, Y. SHINODA, S. KAKEI, S. MASAKI, H. WAGATSUMA, T. MIYAKAWA, K. TAKAO, H. IKENO, K. TANAKA, Y. OKAMURA-OHO, Y. OKUMURA, S. KAMAKURA1, Y. ISONO, Y. MORII, S. SUENAGA, S. USUI. Tutorial contents on the INCF japan node platforms. Neuroscience 2014. Exhibitor. (Washington DC, US) Nov, 15th, 2014 (poster# 25.10SA/VV27)
 4. 定方哲史、篠田陽、古市貞一. BDNF の分泌と自閉症. 第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学会大会. 招待講演. (奈良: 奈良県文化会館・奈良県新公会堂) 2014 年 10 月 1 日
 5. Yo Shinoda, Akira Sato, Michinori Koebis, Tetsushi Sadakata, Noriyuki Morita, Michisuke Yuzaki, Takafumi Inoue, Hirozumi Nishibe, Yoko Yamaguchi, Teiichi Furuichi. Cerebellar Development Transcriptome Database (CDT-DB) –

- Profiling of Spatio-Temporal Gene Expression During Postnatal Development of Mouse Brain. INCF Japan Node International Workshop, Advances in Neuroinformatics 2014 (AINI 2014). Oral. (Saitama, Japan) Sep, 26th, 2014 (RIII-4)
6. 柳下香織、**篠田陽**、古市貞一. 成体ニューロン新生における CAPS2 の役割. 第 37 回日本神経科学大会. Poster. (神奈川：パシフィコ横浜) 2014 年 9 月 13 日
 7. 齊藤新平、**篠田陽**、定方哲史、西岡朋生、貝淵弘三、古市貞一. 長期増強のシナプス特異性に寄与するプレシナプスタグの探求. 第 37 回日本神経科学大会. Poster. (神奈川：パシフィコ横浜) 2014 年 9 月 12 日
 8. 中島柚依、**篠田陽**、古市貞一. シナプス小胞と有芯小胞における同時イメージング解析. 第 37 回日本神経科学大会. Poster. (神奈川：パシフィコ横浜) 2014 年 9 月 12 日
 9. 古戎道則、齊藤由弦、**篠田陽**、古市貞一. 小脳における LAMP5 の発現. 第 37 回日本神経科学大会. Poster. (神奈川；パシフィコ横浜) 2014 年 9 月 11 日
 10. 三島百合子、須田翔子、猿田千尋、定方哲史、**篠田陽**、和田直之、小島正巳、若菜茂晴、古市貞一. Ca^{2+} 依存性分泌関連タンパク質 CAPS ファミリーのマウス胚脳神経系における遺伝子発現. 第 86 回日本生化学会大会. Poster. (神奈川；パシフィコ横浜) 2013 年 9 月 11 日~13 日
 11. **Yo Shinoda**, Saheeb Ahmed, Reimi Abe, Ankit Awasthi, Teiichi Furuichi, Camin Dean. Synaptotagmin3: Potential molecule to regulate surface expression level of synaptic proteins. The comprehensive brain summer workshop. Poster. (Nagoya International convention center, Aichi) Aug, 31st, 2013 (poster# A01)
 12. **Yo Shinoda**, Saheeb Ahmed, Reimi Abe, Ankit Awasthi, Teiichi Furuichi, Camin Dean. Synaptotagmin3: Potential molecule to regulate surface expression level of synaptic proteins. The 36th annual meeting of the Japan Neuroscience Society. Poster. (Kyoto International convention center, Kyoto) Jun, 21st, 2013 (poster#P2-2-29)
 13. **篠田陽**、阿部麗実、古市貞一. シナプスタグミン 3: ポストシナプスタンパク質の表面発現制御因子. Neuro2013. Poster. (京都：国立京都国際会館) 2013 年 6 月 20 日~23 日
 14. 石井千晶、**篠田陽**、定方哲史、古市貞一. CAPS1 コンディショナル・ノックアウトマウスにおけるシナプス伝達. Neuro2013. Poster. (京都：国立京都国際会館) 2013 年 6 月 20 日~23 日
 15. 井口大壽、小林翔太、定方哲史、**篠田陽**、古市貞一. マウスドーパミン作動性神経の初代培養系における大型有芯小胞からのドーパミン分泌と CAPS2 の関係. Neuro2013. Poster. (京都：国立京都国際会館) 2013 年 6 月 20 日~23 日
 16. A. Awasthi, S. Ahmed, **Y. Shinoda**, H. Martens, B. Cooper, F. Göttfert, S. W. Hell, C. Dean. A synaptotagmin enriched in the post-synaptic membrane is involved in receptor recycling. Neuroscience 2013. Poster. (San Diego Convention center, CA) Nov. 30th, 2013
 17. 齊藤由弦、藤原真奈、**篠田陽**、古市貞一. 脳特異的 BAD-LAMP の発現と機能. 第 90 回日本生理学会大会. Poster. (東京・タワーホール船堀) 2013 年 3 月 27 日~29 日
 18. 阿部麗実、**篠田陽**、古市貞一、Camin Dean. Synaptotagmin3: 小胞分泌 - 取り込み制御分子としての役割. 第 90 回日本生理学会大会. Poster. (東京・タワーホール船堀) 2013 年 3 月 27 日~29 日
 19. 土井樹、古市貞一、**篠田陽**、Camin Dean. BDNF によって増強される興奮性シナプス小胞分泌のメカニズム. 第 90 回日本生理学会大会. Poster. (東京・タワーホール船堀) 2013 年 3 月 27 日~29 日
 20. 山鹿亮祐、長江彩那、定方哲史、**篠田陽**、古市貞一. CADPS タンパク質は視床下部オキシトシン産生ニューロンで発現し、下垂体後葉と共局在する. 第 90 回日本生理学会大会. Poster. (東京・タワーホール船堀) 2013 年 3 月 27 日~29 日
 21. 石井千晶、**篠田陽**、定方哲史、古市貞一. CAPS1 cKO マウスの海馬におけるシナプス伝達. 第 90 回日本生理学会大会. Poster. (東京・タワーホール船堀) 2013 年 3 月 27 日~29 日
 22. 中川直紀、**篠田陽**、古市貞一、松尾誠. 刺激の違いによる BDNF 放出動態の比較と CAPS2 活性に関わる Ca^{2+} チャネルの特定. 第 90 回日本生理学会大会. Poster. (東京・タワーホール船堀) 2013 年 3

月 27 日~29 日

23. 松尾誠、中川直紀、**篠田陽**、古市貞一。CAPS2 による BDNF の放出の制御。第 90 回日本生理学会大会。Poster。(東京・タワーホール船堀)2013 年 3 月 27 日~29 日
24. 井口大壽、小林翔太、定方哲史、**篠田陽**、古市貞一。マウス初代培養ドーパミンニューロンにおける CAPS タンパク質の発現と大型有芯小胞開口放出との関係。第 90 回日本生理学会大会。Poster。(東京・タワーホール船堀)2013 年 3 月 27 日~29 日
25. 小林翔太、佐藤友美、**篠田陽**、定方哲史、井口大壽、古市貞一。PC12 における VMAT2-pHluorin 利用した大型有芯小胞の開口放出イメージング。第 90 回日本生理学会大会。Poster。(東京・タワーホール船堀)2013 年 3 月 27 日~29 日
26. **Yo Shinoda**, Tetsushi Sadakata, Teiichi Furuichi. BDNF secretion regulated by secretory vesicle-associated protein CAPS2. The 90th annual meeting of the Physiological Society of Japan. Poster. (Tower Hall Funabori, Tokyo) Mar, 27th, 2013 (poster# SPK-1(3PK-213))
27. **篠田陽**, Camin Dean. 海馬におけるシナプトタグミン 3 (SYT3) の役割。包括的神経グリア研究会。一般講演。(静岡: 館山寺サゴーロイヤル)2013 年 1 月 12 日~13 日

〔図書〕(計 1 件)

篠田陽。自閉症の今。科学フォーラム (2013) Vol.11, 全 6 頁(P30-35)

〔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：
出願年月日：

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.lmn.bs.noda.tus.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
篠田 陽 (SHINODA YO)
東京理科大学理工学部・嘱託助教
研究者番号：80403096

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：