



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |   |
|---------------------|---|
| Title               | VGLuT3を発現するCCK陽性バスケット細胞はマウスの脳の特定の皮質及び皮質様扁桃核領域において内因性カンナビノイドシグナル関連分子を豊富に備えた陥入型シナプスを形成する          |
| Author(s)           | 大宮, 友貴  |
| Description         | 配架番号 : 2138   |
| Degree Grantor      | 北海道大学   |
| Degree Name         | 博士(医学)  |
| Dissertation Number | 甲第11656号  |
| Issue Date          | 2015-03-25  |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k11656">https://doi.org/10.14943/doctoral.k11656</a> |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/60051">https://hdl.handle.net/2115/60051</a>               |
| Type                | doctoral thesis   |
| File Information    | Yuki_Omiya.pdf  |



# 学位論文

VGluT3 を発現する CCK 陽性バスケット細胞はマウスの脳の特定の皮質及び皮質様扁桃体領域において内因性カンナビノイドシグナル関連分子を豊富に備えた陥入型シナプスを形成する

( VGluT3-expressing CCK-positive basket cells construct invaginating synapses enriched with endocannabinoid signaling molecules in particular cortical and cortex-like amygdaloid regions of mouse brains )

2015 年 3 月

北海道大学

大宮 友貴



# 学位論文

VGluT3 を発現する CCK 陽性バスケット細胞はマウスの脳の特定の皮質及び皮質様扁桃体領域において内因性カンナビノイドシグナル関連分子を豊富に備えた陥入型シナプスを形成する

( VGluT3-expressing CCK-positive basket cells construct invaginating synapses enriched with endocannabinoid signaling molecules in particular cortical and cortex-like amygdaloid regions of mouse brains )

2015 年 3 月

北海道大学

大宮 友貴

## 目次

|   |      |
|---|------|
| 発表論文目録および学会発表目録   | 1 頁  |
| 緒言  | 2 頁  |
| 略語表   | 4 頁  |
| 実験方法  |      |
| I. 使用動物及び脳切片作成  | 5 頁  |
| II. 抗体  | 5 頁  |
| III. <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション   | 6 頁  |
| IV. 蛍光免疫染色  | 8 頁  |
| V. 免疫電子顕微鏡法   | 8 頁  |
| 実験結果  |      |
| I. VGluT3 <sup>+</sup> /CCK <sup>+</sup> 介在ニューロンはCB <sub>1</sub> mRNA を高レベルに発現する            | 10 頁 |
| II. VIP <sup>+</sup> /CCK <sup>+</sup> 介在ニューロンはCB <sub>1</sub> mRNA を弱く発現する                 | 12 頁 |
| III. DGL $\alpha$ はVGluT3 <sup>+</sup> /CB <sub>1</sub> <sup>+</sup> バスケット細胞終末近傍にクラスターを形成する | 12 頁 |
| IV. VGluT3 陽性のバスケット細胞終末は選択的に陥入構造を形成する   | 15 頁 |
| V. 陥入型シナプスにおけるGABA <sub>A</sub> R $\alpha$ 1 の発現  | 15 頁 |
| VI. 扁桃体基底核の錐体細胞におけるシナプス外のmGluR <sub>5</sub> のシナプス外発現  | 17 頁 |
| VII. 扁桃体基底核の錐体細胞におけるCCK <sub>2</sub> R mRNA の高発現  | 19 頁 |
| VIII. 皮質領域においてVGluT3/CB <sub>1</sub> /DGL $\alpha$ が集積するバスケット細胞シナプス                         | 20 頁 |
| IX. 内嗅領皮質の陥入型シナプス   | 22 頁 |
| 考察  |      |
| I. 陥入型シナプスに共通する3種の伝達物質の表現型  | 24 頁 |
| II. 陥入型シナプスの神経化学的特性が示唆するシナプスメカニズム   | 25 頁 |
| III. 解剖学的陥入とDGL $\alpha$ の集積の関連性  | 27 頁 |
| 総括および結論   | 28 頁 |
| 謝辞  | 30 頁 |
| 引用文献  | 31 頁 |

## 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Yuki Omiya, Motokazu Uchigashima, Kohtarou Konno, Miwako Yamasaki, Taisuke Miyazaki, Takayuki Yoshida, Ichiro Kusumi, Masahiko Watanabe  
VGlut3-expressing CCK-positive basket cells construct invaginating synapses enriched with endocannabinoid signaling molecules in particular cortical and cortex-like amygdaloid regions of mouse brains.  
**J. Neurosci.**, in submission

本研究の一部は以下の学会に発表した

1. 大宮友貴、内ヶ島基政、渡辺雅彦  
扁桃体基底核において VGlut3/CB1/CCK 陽性バスケット細胞の内因性カンナビノイド 2-AG 関連分子を豊富に備えた”陥入型シナプス”を形成する  
第 60 回東北・北海道連合支部学術集会、平成 26 年 9 月 6-7 日、福島

## 緒言

大麻（マリファナ）に含まれる麻薬成分や、近年問題視されている、いわゆる”危険ドラッグ”の主成分は、カンナビノイド受容体の強力な作動薬である。これらは神経回路に発現するカンナビノイド受容体に作用して、多幸感、幻覚、鎮静、鎮痛、記憶障害、不安軽減、食欲増進などさまざまな神経薬理作用を及ぼす。生体内にはこの受容体に対するリガンドである内因性カンナビノイド（endocannabinoid、eCB）の存在が知られており、扁桃体においてはカンナビノイド受容体を活性化することが恐怖記憶の消去学習に関わっている。この機能の障害は、ヒトにおいては、恐怖体験記憶の消去学習が進まず心身の病的反応が持続する心的外傷後ストレス障害と関与している可能性があり、eCB シグナル伝達の詳細な生理的機構を解明することは臨床的にも有用である可能性が示唆される。

近年、中枢神経系の神経回路におけるカンナビノイドシグナル伝達のメカニズムに関する理解が急速に進んでいる。脱分極誘発性の  $\text{Ca}^{2+}$  イオン濃度の上昇<sup>13</sup>、 $\text{G}\alpha_{q/11}$  蛋白共役型受容体の活性化<sup>4</sup>、またはその両者<sup>5-8</sup>によって、eCB がポストシナプスニューロンから産生・放出され、プレシナプス神経終末上に発現する1型カンナビノイド受容体 ( $\text{CB}_1$ ) に逆行性に働き、伝達物質放出の短期及び長期抑制を誘導する<sup>9</sup>。この逆行性伝達抑制は、上記の多くの神経機能調節に関与している<sup>10</sup>。脳において、2-アラキドノイルグリセロール (2-arachidonoylglycerol、2-AG) は、sn-1 ジアシルグリセロールリパーゼ $\alpha$  ( $\text{DGL}\alpha$ ) によって合成される主要な eCB である<sup>11-16</sup>。2-AG は主にモノアシルグリセロールリパーゼ (monoacylglycerol lipase、MGL) によって分解され<sup>17-19</sup>、逆行性伝達の強さや時空間的特性を調節している<sup>20-24</sup>。

大脳皮質、海馬及び扁桃体基底外側核では、 $\text{CB}_1$  は、錐体細胞の細胞体を標的とするコレシストキニン (cholecystokinin、CCK) 陽性バスケット細胞の $\gamma$ アミノ酪酸 ( $\gamma$ -aminobutylic acid、GABA) 作動性終末に豊富に発現している<sup>25-28</sup>。これらの皮質領域や皮質様扁桃体において、 $\text{DGL}\alpha$ は錐体細胞で興奮性シナプスを形成する樹状突起スパインに集積しているが<sup>29-31</sup>、錐体細胞を支配する興奮性終末では  $\text{CB}_1$  の発現は弱い<sup>32</sup>。この相反的な分子配置は、2-AG によって媒介される興奮性及び抑制性の逆行性伝達抑制のバランスを調整していると考えられている<sup>10</sup>。私が所属する研究室は、この一般的な分子配置パターンとは異なり、 $\text{DGL}\alpha$ と  $\text{CB}_1$  の双方が高いレベルで発現集積するユニークなシナプスを扁桃体基底核において発見しており、その特異な形状から陥入型シナプスと命名した<sup>33</sup>。陥入型シナプスでは、 $\text{CB}_1$  を発現する CCK 陽性バスケット細胞の神経終末が錐体細胞の細胞体に対して陥入構造を形成し、その陥入部位のポスト側に  $\text{DGL}\alpha$  が高密度で集積している。皮質領域では、CCK 陽性バスケット細

胞には 3 型小胞性グルタミン酸トランスポーター (vesicular glutamate transporter-3、VGLuT3) を共発現するものと、血管作動性腸管ポリペプチド (vasoactive intestinal polypeptide、VIP) を共発現する二群に分けられるが<sup>33,34</sup>、陥入型シナプスを形成する扁桃体基底核のバスケット細胞がそのどちらかであるかは不明である。さらに、陥入型シナプスは扁桃体の中では基底核に特異的に形成されるが、皮質領域に存在するかどうか未だ不明である。

本研究では、私はこれら 2 つの疑問点を解明する目的で、VGLuT3 を発現する扁桃体基底核の CCK 陽性バスケット細胞の神経化学的特性を追求し、皮質領域における陥入型シナプスの存在について検討した。その結果、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特異的に陥入型シナプスを形成することを見出した。陥入型シナプスのポストシナプス膜は GABA<sub>A</sub> 受容体を選択的に発現したが、 $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 型グルタミン酸受容体の発現は観察されなかった。一方、G $\alpha_{q11}$  蛋白共役型である 5 型代謝型グルタミン酸受容体 (metabotropic glutamate receptor-5、mGluR<sub>5</sub>) は錐体細胞の細胞体及び樹状突起表面のシナプス外膜に広く分布していた。錐体細胞には、G $\alpha_{q11}$  蛋白共役型の 2 型 CCK 受容体 (CCK<sub>2</sub>R) の mRNA も豊富に発現していた。さらに、VGLuT3、CB<sub>1</sub>、DGL $\alpha$  が集積する陥入型シナプスは体性感覚野、運動野、嗅内領皮質など特定の皮質領域にも豊富に存在していた。これらの所見は、GABA/グルタミン酸/CCK という 3 種類の伝達物質からなる表現型は、皮質領域や皮質様扁桃体における陥入型シナプスに共通する神経化学的特性であることを示すとともに、GABA が速いシナプス伝達に関与し、グルタミン酸と CCK がそれぞれの G $\alpha_{q11}$  タンパク共役型受容体の活性化を介してこれらの伝達物質の放出を逆行性に制御していることを示唆する。

## 略語表

本文中及び図中で使用した略語は以下の通りである。

|                    |  |
|--------------------|--|
| 2-AG               | 2-arachidonyl glycerol                                       |
| AMPA               | $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid |
| BCIP               | 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate                          |
| BSA                | bovine serum albumin   |
| CaMKII $\alpha$    | calmodulin-dependent kinase II $\alpha$ subunit              |
| CB <sub>1</sub>    | cannabinoid receptor type 1                                  |
| CCK                | cholecystokinin  |
| DGL $\alpha$       | diacylglycerol lipase- $\alpha$                              |
| DIG                | digoxigenin  |
| DSI                | depolarization induced suppression of inhibition             |
| eCB                | endocannabinoid  |
| FITC               | fluorescein isothiocyanate                                   |
| GABA               | $\gamma$ -aminobutylic acid                                  |
| GAD67              | 67 kDa-glutamic acid decarboxylase                           |
| GluA2              | ionotropic glutamate receptor subunit A2                     |
| GTBST              | gort normal serum tris-buffered saline with triton           |
| MAP2               | microtubules-associated protein 2                            |
| MGL                | monoacylglycerol lipase                                      |
| mGluR <sub>5</sub> | metabotropic glutamate receptor type 5                       |
| NBT                | nitro-blue tetrazolium                                       |
| NTE                | NaCl-Tris-EDTA   |
| PB                 | phosphate buffer   |
| PBS                | phosphate buffered saline                                    |
| SSC                | saline sodium citrate buffer                                 |
| TBST               | Tris-buffered saline with triton                             |
| TNT                | Tris-NaCl-Tween20  |
| TSA                | tyramide signal amplification                                |
| VGluT3             | vesicular glutamate transporter 3                            |
| VIAAT              | vesicular inhibitory amino acid transporter                  |
| VIP                | vasoactive intestinal peptide                                |

## 実験方法

### I. 使用動物及び脳切片作成

成熟（2-4 月齢）雄性 C57BL/6 マウスを用いた動物実験は、全て「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定（平成 19 年 4 月 1 日）」を遵守して行った。それぞれの定性及び定量データは 2-3 匹のマウスから取得した。

ペントバルビタール深麻酔下で、4%パラホルムアルデヒド/0.1 M リン酸バッファー（PB、pH 7.2）で経心的に灌流固定を行った脳を蛍光免疫染色及び発色性 *in situ* ハイブリダイゼーション法に用い、4%パラホルムアルデヒド/0.1%グルタルアルデヒド/0.1 M PB で灌流固定を行った脳を免疫電子顕微鏡法に用いた。蛍光免疫染色及び包埋前免疫電子顕微鏡法には、マイクロスライサー（VT1000S、Leica、Nussloch、Germany）を用いて切片（50  $\mu\text{m}$  厚）を作成した。包埋後電子顕微鏡法には、マイクロスライサー切片（400  $\mu\text{m}$ ）を 30%グリセロール/0.1 M PB に浸漬した後、EM CPC unit（Leica）中で液体プロパンにより瞬間凍結した。AFS freeze-substitution unit（Leica）内で凍結切片を $-90^{\circ}\text{C}$ で 0.5%酢酸ウラン/メタノールに浸漬し、続いて $-45^{\circ}\text{C}$ で Lowicryl HM-20 resin（Chemisch Werke Lowi）に浸漬した。紫外線下で重合させた組織標本から、ウルトラマイクローム（Ultracut ; Leica）を用いて超薄切片（80 nm）を作製した。

発色性 *in situ* ハイブリダイゼーション法には、灌流固定後の脳標本を同固定液で 3 日間の室温後固定を行った脳を、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法にはエーテル麻酔処置下で摘出した新鮮脳を用い、いずれも粉末状にしたドライアイスにより全脳を凍結し、クライオスタット（CM1900、Leica）を用いて凍結切片（50  $\mu\text{m}$ ）を作成した。

### II. 抗体

蛍光免疫染色及び免疫電子顕微鏡法において、本研究では  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase II  $\alpha$  subunit（CaMKII $\alpha$ ）、CB<sub>1</sub>、DGL $\alpha$ 、GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha$ 1 subunit（GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1）、AMPA receptor subunit GluA2、mGluR<sub>5</sub>、microtubules-associated protein 2（MAP2）、VGluT3、vesicular inhibitory amino acid transporter（VIAAT）及び VIP に対する一次抗体を用いた。これらの一次抗体の抗原部位の配列、宿主、特異性、参考文献情報を、表 1 に示した。

| 抗原分子               | 抗原部位 (NCBI#)            | 宿主           | 特異性    | 参照                                      |
|--------------------|-------------------------|--------------|--------|---|
| CaMKII $\alpha$    | ラット CaMKII $\alpha$     | マウス          | IB     | Merck-Millipore<br>(05-532、Clone 6G9)   |
| CB <sub>1</sub>    | 443-473<br>(NM_007726)  | ウサギ<br>モルモット | KO、IB  | Fukudome et al. (2004) <sup>36</sup>    |
| DGL $\alpha$       | 1003-1044<br>(NM198114) | ウサギ<br>ヤギ    | KO、IB  | Yoshida et al. (2006) <sup>30</sup>     |
| GABAAR $\alpha$ 1  | 369-386<br>(NM_010250)  | ウサギ          | IB/HEK | Ichikawa et al. (2011) <sup>37</sup>    |
| GluA2              | 847-863<br>(X57498)     | ウサギ          | IB/KO  | Yamazaki et al. (2010) <sup>38</sup>    |
| MAP2               | 927-1104<br>(NM_008632) | ヤギ           | *      | Miura et al. (2006) <sup>39</sup>       |
| mGluR <sub>5</sub> | 1144-1171<br>(D10891)   | ウサギ<br>モルモット | KO     | Uchigashima et al. (2007) <sup>40</sup> |
| VGluT3             | 558-601<br>(AF510321)   | モルモット<br>ヤギ  | IB     | Somogyi et al. (2004) <sup>34</sup>     |
| VIAAT              | 75-87<br>(NM_031782)    | マウス          |        | Synaptic Systems<br>(1310011)           |
| VIP                | porcine VIP             | ウサギ          | PT     | Euro-Diagnostica<br>(RB311)             |

表 1. 使用した一次抗体の抗原部位の配列、宿主、特異性、参考文献

IB、脳ホモジナイズによるイムノプロットによる特異性検定；KO、遺伝子ノックアウトマウスによる特異性検定；HEK、標的分子をトランスフェクションした HEK 細胞におけるイムノプロットによる特異性検定；PT、免疫吸収試験による特異性検定；\*、抗 MAP2 抗体は、ニューロンの細胞体及び樹状突起選択的な免疫反応を示したことから特異的であると判断した。

### III. *in situ* ハイブリダイゼーション

cRNA プローブの調製と *in situ* ハイブリダイゼーションは過去に報告されたプロトコルに従って行った<sup>41</sup>。マウス CB<sub>1</sub> (121-1630bp、NCBI accession number U22948)、マウス preproCCK (124-411、NM\_031161)、マウス CCK<sub>2</sub>R (206-1243、NM\_007627)、マウス 67 kDa-glutamic acid decarboxylase (GAD67、1035-2015；NM\_008077)、マウス VGluT1 (301-1680、BC054462)、マウス VGluT3 (22-945、NM\_182959) 及びマウス preproVIP (155-683、NM\_011702) の cDNA フラグメントを pBluescript II プラスミドベクターにサブクローニングし、直鎖化したプラスミドを鋳型として、フルオレセインまたはジゴキシゲニン (digoxigenin、DIG) 標識の cRNA プローブを調製した。

新鮮凍結切片を用いる場合は、まず 4%パラホルムアルデヒド/0.1 M PB で 10 分間固定した。0.25%無水酢酸を含む 0.1 M trisethanolamine-HCl (pH 8.0) で 10 分間アセチル化した後、2 x SSC (1 x SSC : 15 mM クエン酸ナトリウム/150 mM NaCl) /0.1% Tween20、0.1 x SSC/0.1% Tween20、70%エタノール、100%エタノールと順次 5 分間リンスした後、風に乾した。その後、ハイブリダイゼーションバッファー (50% 脱イオン化ホルム

アミド、50 mM Tris 塩酸緩衝液 (pH 8.0) 、 200 ug/mL tRNA (Gibco-BRL、Bethesda、MD、USA) 、 1 x Denhardt (0.0004% Fincoll、0.0004% ポリビニルピロリドン、0.0004% BSA) 、 0.6 M NaCl、0.25% SDS、10% デキストラン硫酸) を用いて室温で1時間プレハイブリダイズさせ、2 x SSC/0.1% Tween20、0.1 x SSC/0.1% Tween20、70%エタノール、100%エタノールと順次5分間リンスし、風乾した。前述のリボプローブをハイブリダイゼーションバッファーにそれぞれ 1:1000 希釈となるように添加して切片に搭載し、63.5°Cで12時間のハイブリダイゼーションを行った。洗浄は、まず61°Cで5 x SSC/0.0005% Tween20 で30分間、4 x SSC/50% ホルムアミド/0.001% Tween20 で40分間、2 x SSC/50% ホルムアミド/0.001% Tween20 で40分間、0.1 x SSC/0.0005% Tween20 で15分間(2回)を行ない、次に室温で0.1 x SSC/0.0005% Tween20 で15分間行った。NTEバッファー(0.5 M NaCl、0.01 M Tris 塩酸緩衝液 (pH 8.0) 、0.5 mM EDTA、0.0005% Tween20) で10分間洗浄した後、NTE バッファーにヨードアセトアミドを20 mMとなるように加え、室温下30分間反応させ、NTE バッファーでさらに10分間、TNT バッファー (0.1 M Tris 塩酸緩衝液 (pH 7.5) 、0.15 M NaCl、0.00075% Tween20) で15分間洗浄した。

フルオレセイン及びDIGの免疫組織化学的検出のために、発色性検出の際にはDIG blocking solution (1% blocking reagent (Roche Diagnostics、Basel、Switzerland) 、4%正常ヒツジ血清/TNT バッファー) で1時間、蛍光検出の際にはDIG blocking solution 及び0.5% tyramide signal amplification (TSA) blocking reagent (PerkinElmer、Waltham、MA、USA) /TNT バッファーでそれぞれ30分間、ブロッキングを行った。その後、発色性検出の際にはDIG blocking solution で1:500に希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗DIG抗体 (Roche Diagnostics) で1.5時間、蛍光検出の際にはDIG blocking solution で1:1000に希釈したペルオキシダーゼ標識抗DIG (Roche Diagnostics) または抗フルオレセイン抗体 (Invitrogen、Eugene、OR) を1時間、反応させた。発色性検出にはTNT バッファーで15分ずつ2回洗浄した後、detection buffer (0.1 M Tris 塩酸緩衝液 (pH 9.5) 、0.1 M NaCl、50 mM MgCl<sub>2</sub>) 1:50希釈した nitro-blue tetrazolium (NBT) /5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate (BCIP) (Roche Diagnostics) と12時間反応させた。

二重蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションでは、まず切片にペルオキシダーゼ標識抗フルオレセイン抗体を1時間反応させ、その後 fluorescein isothiocyanate (FITC) -TSA plus amplification kit (PerkinElmer) を10分間反応させフルオレセイン標識cRNAの検出を行った。1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を30分間反応させて残存するペルオキシダーゼ活性を失活させた後、切片にペルオキシダーゼ標識抗DIG抗体を1時間反応させ、その後、indocarbocyanine (Cy3) -TSA plus amplification kit (PerkinElmer) を10分間反応させてDIG標識cRNAの検出を行った。TOTO-3 (invitrogen) をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)

中に 1:50 希釈し、20 分間反応させることで対比染色を行った。

発色性 *in situ* ハイブリダイゼーションの画像は光学顕微鏡 (BZ-9000 ; Keyence, Japan) と PlanApo (4 x/0.20、10 x/0.45) 対物レンズ (Nikon, Tokyo, Japan) で撮像し、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションの画像は HeNe/Ar レーザーを搭載した共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて撮像した。なお、前述のアンチセンスプローブを用いたハイブリダイゼーションシグナルの特異性は、それぞれのセンスプローブでは有意なシグナルが現れないことによって確認した。

#### IV. 蛍光免疫染色

免疫組織化学的反応は、全て室温でガラス試験管を用いた浮遊法で行った。抗体希釈及び洗浄には PBS/0.1%Tween20 を用いた。マイクロスライサー切片を 10%正常ヤギ血清/PBS を用いて 20 分間反応させた後、PBS/0.1%Tween20 で希釈した一次抗体の混合液 (各 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) と一晩反応させた。翌日、5 分間の洗浄を 3 回行った後、PBS/0.1%Tween20 で希釈した動物種特異的な Alexa405、Alexa488、Cy3 及び Alexa647 標識ロバ二次抗体 (1:200、Invitrogen, Eugene, OR, USA ; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA ; Abcam, Cambridge, UK) と 2 時間反応させた。5 分間の洗浄を 3 回行った後、スライドグラス上にマウントし、VectaShield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて封入した。

画像は 405、473、559、547 nm ダイオードレーザーと PLAPON 60 x OSC2 対物レンズ (NA 1.4) を備えた共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV1200 ; Olympus) を用いて撮像した。

#### V. 免疫電子顕微鏡法

包埋前銀増感免疫金電子顕微鏡法では、マイクロスライサー切片をブロッキング溶液 (Aurion, Wageningen, The Netherlands) に 30 分間反応させた後、1%ウシ血清アルブミン (BSA) /0.004%サポニン/PBS で希釈した一次抗体 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) と一晩反応させた。翌日、0.004%サポニン/PBS による 10 分間の洗浄を 3 回行った後、0.004%サポニン/PBS で希釈した 1.4 nm 径金標識二次抗体 (1:100、Molecular probes, Stony Brook, NY, USA) と 2 時間反応させ、0.004%サポニン/PBS で 10 分間の洗浄を 3 回行った。1%グルタルアルデヒド/PBS で 10 分間の後固定を行い、PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行った後、銀増感キット (R-GENT SE-EM, Aurion) を用いて免疫金粒子シグナルを増強した。免疫染色後の切片を 1%四酸化オスミウム溶液に 15 分間、2%酢酸ウラン溶液に 20 分間反応させ、アルコール脱水を行い、QY-1 に置換後、Epon812 に包埋した。Epon812 に包埋した組織標本から、ウルトラマイクロトーム (Ultracut ; Leica) を用いて超薄切片 (80 nm) を作製した。銅グリッド上の超薄切片を 2%酢酸ウラン溶液で 5 分

間、5 分間、3 回超純水で洗浄後、Reynold クエン酸鉛溶液で 30 秒間、電子染色を行い、再び3 回の洗浄を行った。

包埋後免疫金電子顕微鏡法では、ニッケルグリッド上の超薄切片を飽和ナトリウムエトキシドで 2 秒間エッチングを行った後、50 mM グリシン/TBST (0.03% Triton X-100/Tris 緩衝生理食塩水、pH 7.4) で 10 分間反応させ、ブロッキング溶液 (2% 正常ヤギ血清/TBST (GTBST)) で 10 分間ブロッキングを行った。GTBST で希釈した一次抗体 (ウサギ GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1 または GluA2 抗体 (各 20  $\mu$ g/mL)) を一晩反応させた。5 mg/mL ポリエチレングリコール含有 GTBST で希釈した金コロイド (直径 10 nm) 標識抗ウサギ二次抗体 (1:100、British BioCell International, Cardiff, UK) で 2 時間反応させた。TBST で洗浄した後、2% 正常ウサギ血清/TBST で 30 分ブロッキングを行い、GTBST で希釈したモルモット抗 VGluT3 抗体 (20  $\mu$ g/mL) を 6 時間反応させ、5 mg/mL ポリエチレングリコール含有 GTBST で希釈した金コロイド (15 nm) 標識抗モルモット二次抗体 (1:100、British BioCell International) で 2 時間反応させた。切片を超純水で洗浄した後、5% 酢酸ウラン/40% エタノールで 90 秒間、Reynold クエン酸鉛溶液で 90 秒間、電子染色を行った。

画像は H-7100 (Hitachi, Tokyo, Japan) または JEM1400 (JOEL, Tokyo, Japan) 電子顕微鏡で撮像した。定量的な解析では、シナプス後膜から金粒子中心までの距離が 30 nm 未満であるものをシナプス後膜に結合した金粒子と定義し、ImageJ ソフトウェア (<http://imagej.nih.gov/ij/>) を使用し計測した。

## 実験結果

### I. VGluT3<sup>+</sup>/CCK<sup>+</sup>介在ニューロンはCB<sub>1</sub> mRNAを高レベルに発現する

まず全体の発現パターンを把握する目的で、扁桃体を含む前脳の冠状断切片を用いてCB<sub>1</sub>、VGluT3及びGAD67 mRNAに対する発色性 *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。前脳では、CB<sub>1</sub> mRNAの2つの異なる細胞発現パターン（びまん性で弱い細胞発現と孤立性で強い細胞発現）が認められた（図1A、B）。大脳皮質、海馬及び扁桃体基底核では2つの細胞発現パターンが混在していたのに対して、線条体、扁桃体中心核及び視床下部腹内側核ではびまん性で弱い細胞発現パターンのみが観察された。VGluT3 mRNAは、大脳皮質、海馬、線条体及び扁桃体基底核の少数の細胞に孤立性に発現していたが、扁桃体外側核や中心核には発現細胞は認められなかった（図1C、D）。GAD67 mRNAは大脳皮質、海馬、扁桃体基底核及び外側核では比較的少数の細胞に発現しており、扁桃体中心核、線条体、視床網様核、不確帯及び視床弓状核ではほとんど全て細胞に発現していた（図1E、F）。これらの発現パターンは、先行研究<sup>33,42-44</sup>と一致していた。また、センスプローブを使用した場合には、有意な反応は見られなかった（データ不掲載）。これらの結果から、使用した *in situ* ハイブリダイゼーションプローブの特異性が確認された。

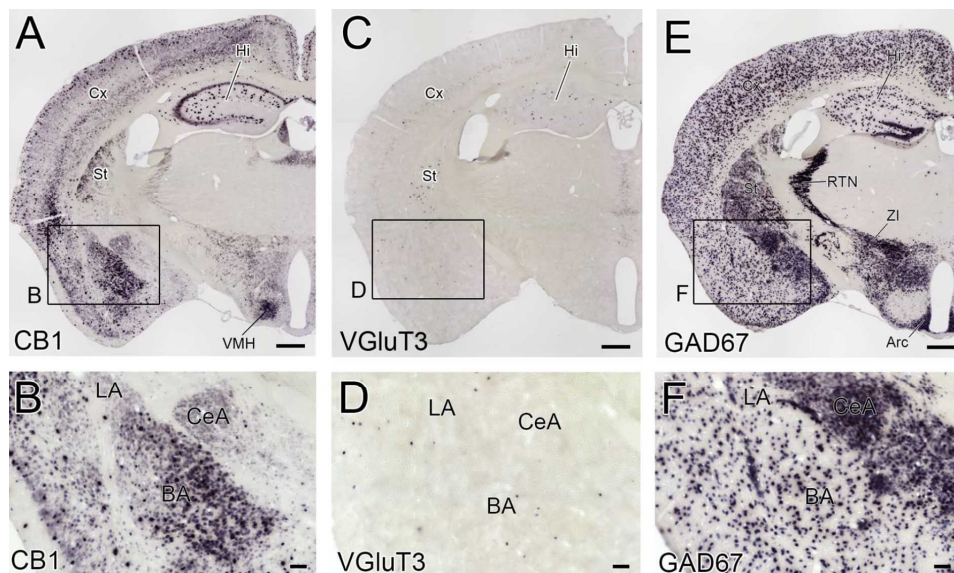


図1 CB<sub>1</sub>、VGluT3、GAD67 mRNAの発現パターン

成体マウスの扁桃体を含む前脳冠状断標本でのCB<sub>1</sub> (A、B)、VGluT3 (C、D)、GAD67 (E、F) mRNAに対する発色性 *in situ* ハイブリダイゼーション。B、D、FはそれぞれA、C、Eの枠内の拡大画像。

Arc、視床下部弓状核；BA、扁桃体基底核；CeA、扁桃体中心核；Cx、大脳皮質；Hi、海馬；LA、扁桃体外側核；RTN、視床網様核；St、線条体；VMH、視床下部腹内側核；ZI、不確帯。

スケールバー：A、C、E、500 μm；B、D、F、100 μm

扁桃体基底核では、CB<sub>1</sub> mRNA を強く発現する細胞は CCK 陽性 GABA 作動性介在ニューロンであることが知られている<sup>45-47</sup>。VGlut3 mRNA を発現する細胞の神経化学的特性を検討するために、二重標識蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションを行った(図2)。全ての VGlut3 mRNA 陽性細胞は、GAD67 mRNA (n=57 細胞)、CB<sub>1</sub> mRNA (n=42) 及び preproCCK mRNA (n=52) を発現していた(図2A-C、矢頭)。CB<sub>1</sub> mRNA 及び preproCCK mRNA の発現パターンに関して、扁桃体基底核では強く発現する細胞と弱く発現する細胞とが容易に識別され、VGlut3 mRNA を発現するニューロンは全て CB<sub>1</sub> mRNA と preproCCK mRNA を共に強発現する細胞であった(図2B、C、矢頭)。一方、CB<sub>1</sub> mRNA と preproCCK mRNA を共に強発現する細胞には、VGlut3 mRNA を発現しない細胞もあった。VGlut3 mRNA を発現する細胞は、CB<sub>1</sub> mRNA を強発現する細胞 (n=152) のうち 27.6% であった。CB<sub>1</sub> を弱発現する細胞のほとんどは VGlut1 mRNA を発現する錐体細胞で、一部は GAD67 mRNA を発現する GABA 作動性介在ニューロンであった(データ不掲載)。従って、VGlut3 mRNA を発現する全てのニューロンは、CB<sub>1</sub> と preproCCK を強発現する GABA 作動性介在ニューロンであり、これは扁桃体基底核における CB<sub>1</sub> 強発現細胞の約 4 分の 1 を占めることが判明した。

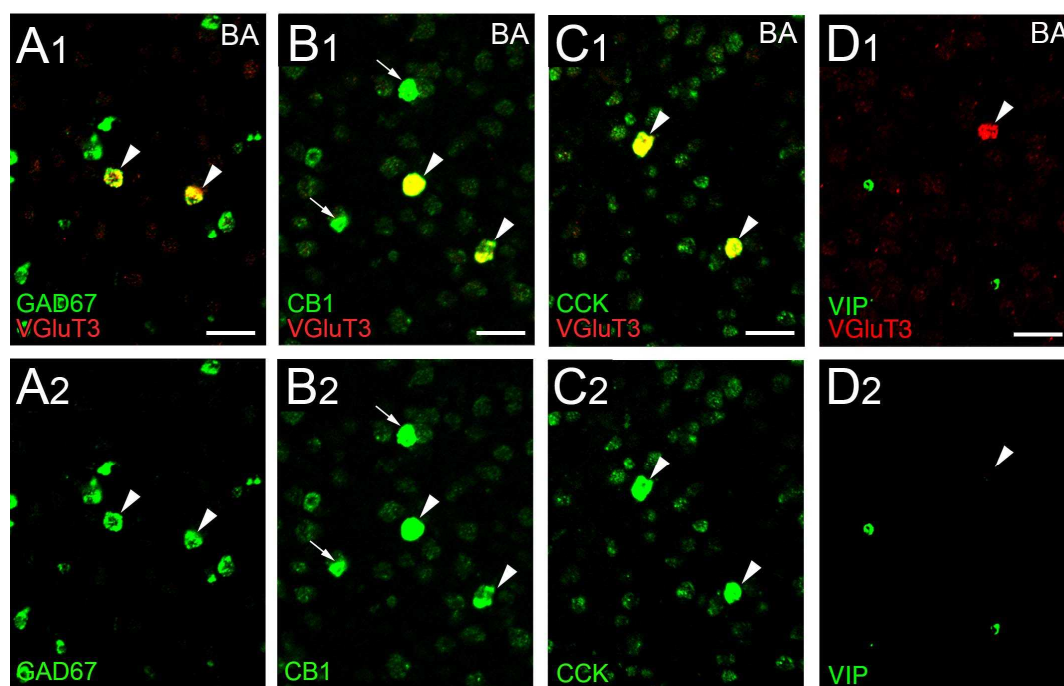


図2 扁桃体基底核における VGlut3 mRNA の選択的発現

扁桃体基底核における VGlut3 mRNA (赤) と神経マーカー (緑) に対する二重標識蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション。矢頭は、VGlut3 mRNA を発現するニューロンは GAD67 mRNA (A)、CB<sub>1</sub> mRNA (B) および preproCCK mRNA (C) を高レベルで共発現する一方、preproVIP mRNA (D) を発現しないことを示す。

スケールバー ; 50 μm

## II. VIP<sup>+</sup>/CCK<sup>+</sup>介在ニューロンはCB<sub>1</sub> mRNA を弱く発現する

海馬や大脳皮質では、VIP も CCK 陽性バスケット細胞に発現しているが、これは VGluT3 を発現する細胞とは別の集団を構成することが報告されている<sup>34</sup>。扁桃体基底核では、preproVIP mRNA を発現する介在ニューロンは VGluT3 mRNA をほとんど発現せず、逆も同様であった (図 2D)。preproVIP mRNA を発現する全てのニューロンは CB<sub>1</sub> mRNA (n=106) を発現していたが、その大多数 (89.6%) は CB<sub>1</sub> 弱陽性細胞に分類された。このように扁桃体基底核では、VIP 発現 CCK 陽性介在ニューロンは VGluT3 発現 CCK 陽性介在ニューロンとは異なる細胞集団を形成し、CB<sub>1</sub> mRNA の発現は弱いことが判明した。

## III. DGLαはVGluT3<sup>+</sup>/CB1<sup>+</sup>バスケット細胞終末近傍にクラスターを形成する

次に、扁桃体基底核の CB<sub>1</sub> と VGluT3 を共発現する GABA 作動性介在ニューロンの終末分布を、多重標識免疫染色で検証した (図 3)。CB<sub>1</sub> に対する強い免疫反応を示したほぼ全ての終末は、GABA 作動性及びグリシン作動性抑制性終末のマーカーである VIAAT と重なっていた。これらの CB<sub>1</sub><sup>+</sup>/VIAAT<sup>+</sup>終末には VGluT3 陽性のものと (図 3A、矢頭)、VGluT3 陰性のものがあり (矢印)、いずれも CaMKIIα陽性の錐体細胞細胞体を取り囲むにバスケットを形成したり、ニューロピルにも分布していた (図 3A)。VGluT3 陽性の CB<sub>1</sub><sup>+</sup>/VIAAT<sup>+</sup>終末は、細胞体表面にある CB<sub>1</sub><sup>+</sup>/VIAAT<sup>+</sup>終末の 56.6% (n=687) を占め、ニューロピルにある CB<sub>1</sub><sup>+</sup>/VIAAT<sup>+</sup>終末の 31.5% (n=54) を構成した (図 3B)。この異なる構成比率は、VGluT3 陽性 CB<sub>1</sub><sup>+</sup>/VIAAT<sup>+</sup>終末が錐体細胞の細胞体を優先的に支配していることを示唆する。一方、扁桃体外側核 (図 3C) や中心核 (図 3D) では、VGluT3 は主にニューロピルに分布し、細胞体周囲にバスケットを形成する傾向は認められなかった。しかも、VGluT3 と VIAAT とはほとんど重ならないことから、VGluT3 は GABA 作動性終末以外の終末に発現していることも判明した。

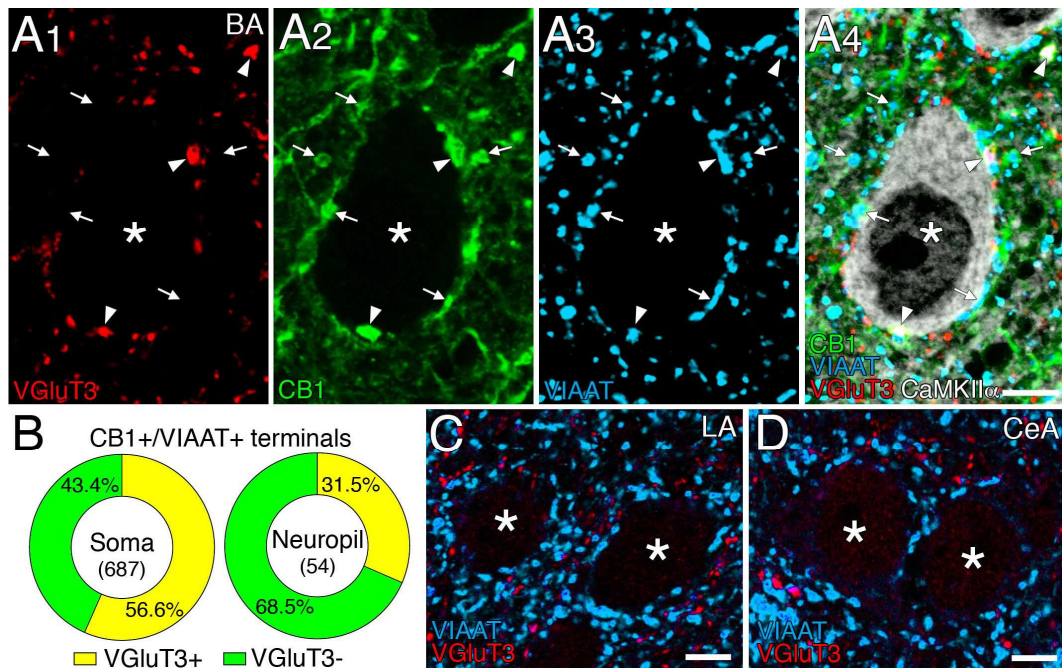


図3 VGluT3はCB1<sup>+</sup>/VIAAT<sup>+</sup>バスケット細胞終末に豊富に発現する

A: 扁桃体基底核におけるVGluT3 (赤)、CB<sub>1</sub> (緑)、VIAAT (青)、CaMKIIα (白) に対する四重蛍光免疫染色。矢印と矢頭は、それぞれ、CaMKIIα陽性の錐体細胞細胞体 (\*) 及びニューロピルにおけるVGluT3陽性または陰性のCB<sub>1</sub><sup>+</sup>/VIAAT<sup>+</sup>終末を示す。

B、C: VGluT3 (赤) 及びVIAAT (青) に対する二重蛍光免疫染色。扁桃体外側核 (LA、B) 及び中心核 (CeA、C) では錐体細胞細胞体上のバスケット細胞終末にはVGluT3が発現していない。

D: 細胞体 (左) とニューロピル (右) におけるVGluT3陽性 (黄) 及びVGluT3陰性 (緑) のCB<sub>1</sub><sup>+</sup>/VIAAT<sup>+</sup>終末の割合。中央の数値は解析に使用したCB<sub>1</sub><sup>+</sup>/VIAAT<sup>+</sup>終末の数を示す。

スケールバー ; 5 μm

扁桃体基底核で、2-AGの主な合成酵素であるDGLαが、錐体細胞の細胞体に集積し、CB<sub>1</sub>発現CCK陽性バスケット細胞終末と対向するように存在する<sup>33</sup>。今回、VGluT3陽性またはVGluT3陰性のバスケット細胞終末がどのようにDGLαクラスターと対向しているかを比較検討するために、これらの分子の四重免疫染色を行った (図4)。その結果、細胞体近傍にDGLαクラスターを形成する錐体細胞と、CB<sub>1</sub><sup>+</sup>/VIAAT<sup>+</sup>終末に囲まれていてもDGLαクラスターを形成しない錐体細胞とが存在することが判明した (データ不掲載)。そこで、細胞体にDGLαクラスターをもつ97個の錐体細胞を解析した結果、大多数 (81.7%) のVGluT3陽性CB<sub>1</sub><sup>+</sup>/VIAAT<sup>+</sup>終末がDGLαクラスターと対向していた (図4A、矢頭、n = 246)。一方、VGluT3陰性CB<sub>1</sub><sup>+</sup>/VIAAT<sup>+</sup>終末では、28.8%のみがDGLαクラスターと対向し、残りの大多数はDGLαクラスターと対向しなかった (図4A、矢印、n = 215)。

同様の四重蛍光免疫染色による解析をVIPについても行ったところ、VIP陽性終末が錐体細胞の細胞体近傍に出現する頻度は非常に低かった(図4B)。細胞体近傍のVIP陽性終末はVIAAT、CB1と共に標識されたが、近傍にDGL $\alpha$ クラスターは認められなかった(n = 15)。これらの所見は、VGluT3を発現するCB<sub>1</sub>陽性バスケット細胞終末の直下にDGL $\alpha$ のクラスターが選択的に形成されていることを示している。

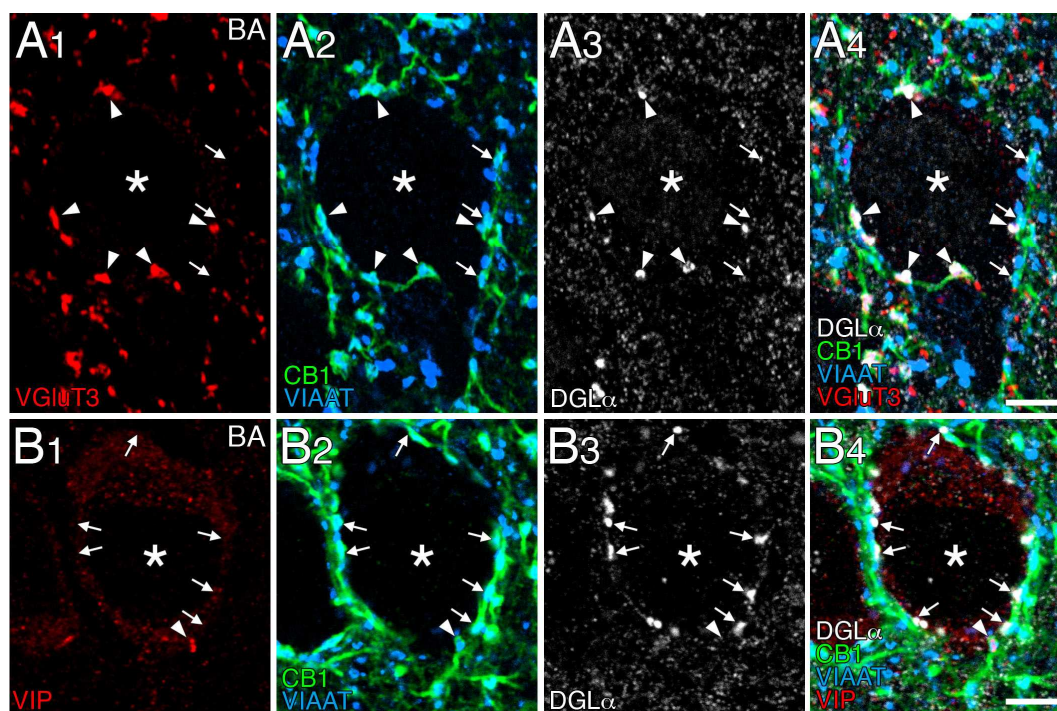


図4 VGluT3陽性のCB<sub>1</sub><sup>+</sup>/VIAAT<sup>+</sup>終末はDGL $\alpha$ クラスターと対向する

**A** : 扁桃体基底核におけるVGluT3(赤)、CB<sub>1</sub>(緑)、VIAAT(青)、DGL $\alpha$ (白)に対する四重蛍光免疫染色。矢頭と矢印はそれぞれ錐体細胞細胞体(\*)上のVGluT3陽性及びVGluT3陰性のCB<sub>1</sub><sup>+</sup>/VIAAT<sup>+</sup>終末を示す。VGluT3陽性終末はDGL $\alpha$ クラスターと対向するが、陰性終末は対向しない。

**B** : 扁桃体基底核におけるVIP(赤)、CB<sub>1</sub>(緑)、VIAAT(青)、DGL $\alpha$ (白)に対する四重蛍光免疫染色。矢頭と矢印はそれぞれ錐体細胞細胞体(\*)上のVIP陽性及びVIP陰性のCB<sub>1</sub><sup>+</sup>/VIAAT<sup>+</sup>終末を示す。

VIP陽性終末の近傍にはDGL $\alpha$ クラスターが認められない。

スケールバー : 5  $\mu$ m

#### IV. VGluT3 陽性のバスケット細胞終末は選択的に陥入構造を形成する

扁桃体基底核において、CB<sub>1</sub> 陽性のバスケット細胞終末が錐体細胞細胞体上に特異的な陥入構造を形成することが知られている<sup>33</sup>。そこで、VGluT3 陽性及び陰性のどちらの CB<sub>1</sub> 陽性バスケット細胞終末が陥入構造を形成するかを、VGluT3 に対する包埋前免疫電子顕微鏡法を用いて調べた (図 5)。錐体細胞の細胞体上に対称性シナプスを形成する終末を解析したところ、VGluT3 陽性終末の 91.2%が細胞体への陥入を形成する陥入型シナプスを形成していた (n = 34)。対照的に、VGluT3 陰性終末は全て陥入構造を形成しない平坦型シナプスであった (n = 105)。この結果は、VGluT3 を発現する CB<sub>1</sub> 陽性バスケット細胞終末が選択的に陥入型シナプスを形成していることを示している。

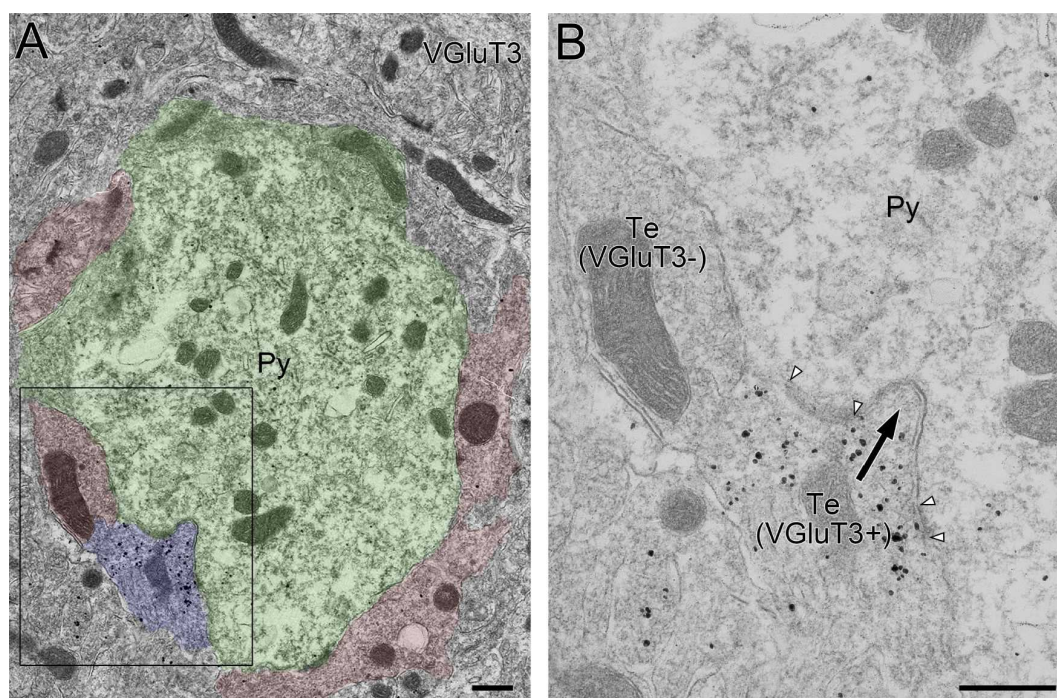


図 5 VGluT3 陽性バスケット細胞終末は選択的に陥入構造を形成する

A: 錐体細胞細胞体 (緑)、VGluT3 陽性バスケット細胞終末 (青)、VGluT3 陰性バスケット細胞終末 (赤) を疑似着色した低倍の電子顕微鏡像。B は A の枠内領域の拡大画像。VGluT3 陽性終末が陥入型シナプス (矢印) を形成し、その上の VGluT3 陰性終末は平坦型シナプスを形成している。2つの矢頭は、陥入構造の周囲にある対称性シナプス結合を示す。

Py、錐体細胞細胞体 ; Te、神経終末

スケールバー : 500 nm

## V. 陥入型シナプスにおける GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1 の発現

扁桃体基底核における陥入型シナプスの対称型結合は、速いシナプス伝達を媒介する主な伝達物質が GABA であることを示唆する<sup>33</sup>。分子解剖学的視点からこれを確認するために、陥入型シナプスのシナプス後膜上における GABA 受容体 GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1 とグルタミン酸受容体 GluA2 の発現局在を、包埋後免疫金電子顕微鏡法を用いて調べた (図 6)。陥入型シナプスのサンプリングにあたっては、陥入構造の存在と (黒矢印、図 6A、C)、シナプス前終末で VGlut3 が少なくとも 2 つ以上の金粒子で標識されているものを抽出した。また、比較のために、非対称性の軸索-樹状突起シナプスも抽出した (画像不掲載)。シナプス後膜 1  $\mu$ m 当たりの金標識密度を計測したところ、GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1 (白矢印、図 6B) 及び GluA2 (白矢印、図 6D) の標識密度は、陥入型シナプスではそれぞれ  $2.75 \pm 0.62$  (平均  $\pm$  標準誤差  $n = 30$ ) および  $0.00 \pm 0.00$  ( $n = 12$ ) であり、非対称シナプスではそれぞれ  $0.17 \pm 0.17$  ( $n = 25$ ) および  $1.67 \pm 0.61$  ( $n = 24$ ) であった。この所見から、陥入型シナプスは GABA 作動性の神経化学特性を有することが示された。

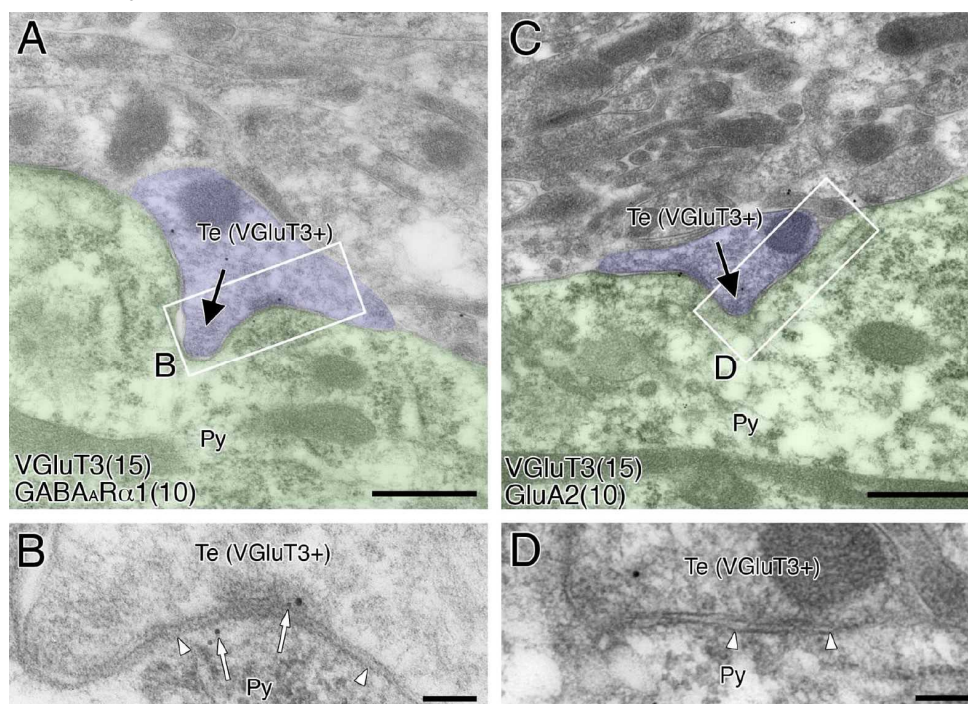


図 6 陥入型シナプスのシナプス後膜の表現型は GABA 作動性である

陥入型シナプスにおける GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1 (A、B) と GluA2 (C、D) の発現。包埋後免疫金電子顕微鏡法により、VGlut3 ( $\phi = 15$  nm 金コロイド粒子) 及び GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1 (A、B、 $\phi = 10$  nm)、またはグルタミン酸受容体 GluA2 (C、D、 $\phi = 10$  nm) を二重標識を行った。B の白矢印は陥入型シナプスにおける GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1 の免疫金標識を示す。B 及び D はそれぞれ、A 及び C の枠内領域の拡大画像である。

Py、錐体細胞細胞体 ; Te、神経終末

スケールバー : A、C、500 nm、B、D、100 nm

## VI. 扁桃体基底核の錐体細胞における mGluR<sub>5</sub> のシナプス外発現

VGluT3 の発現は、このバスケット細胞終末から GABA に加えグルタミン酸も共放出され、代謝型グルタミン酸受容体の活性化を介して神経調節的に作用する可能性を示唆する。これを追究するため、G $\alpha_{q/11}$  タンパク共役型グルタミン酸受容体の 1 つであり、扁桃体基底核の錐体細胞で豊富に発現することが知られている mGluR<sub>5</sub><sup>33</sup> の免疫組織化学的分布を調べた (図 7)。扁桃体基底核において、mGluR<sub>5</sub> の蛍光免疫反応は MAP2 で標識された錐体細胞の細胞体及び樹状突起表面周囲に広範に検出された (図 7A、矢印)。mGluR<sub>5</sub> の免疫反応は、錐体細胞細胞体の DGL $\alpha$  クラスターの周囲に集積する傾向は認められなかった (図 7A、矢頭)。包埋前免疫電子顕微鏡法で検討すると、mGluR<sub>5</sub> を示す金属粒子は、錐体細胞の細胞体、樹状突起およびスパインのシナプス外膜や細胞内領域に広く分布していた (図 7B)。一方、シナプス膜は、シナプスの端を除いてほとんど標識されなかった。細胞膜に結合した金属粒子の密度を計測した所、神経終末やミエリン鞘と比較して、細胞体、樹状突起およびスパインにおいて高い標識レベルであることが確認された (図 7C)。したがって、mGluR<sub>5</sub> は、扁桃体基底核の錐体細胞の細胞体・樹状突起領域のシナプス外膜に広く分布していることが明らかとなった。

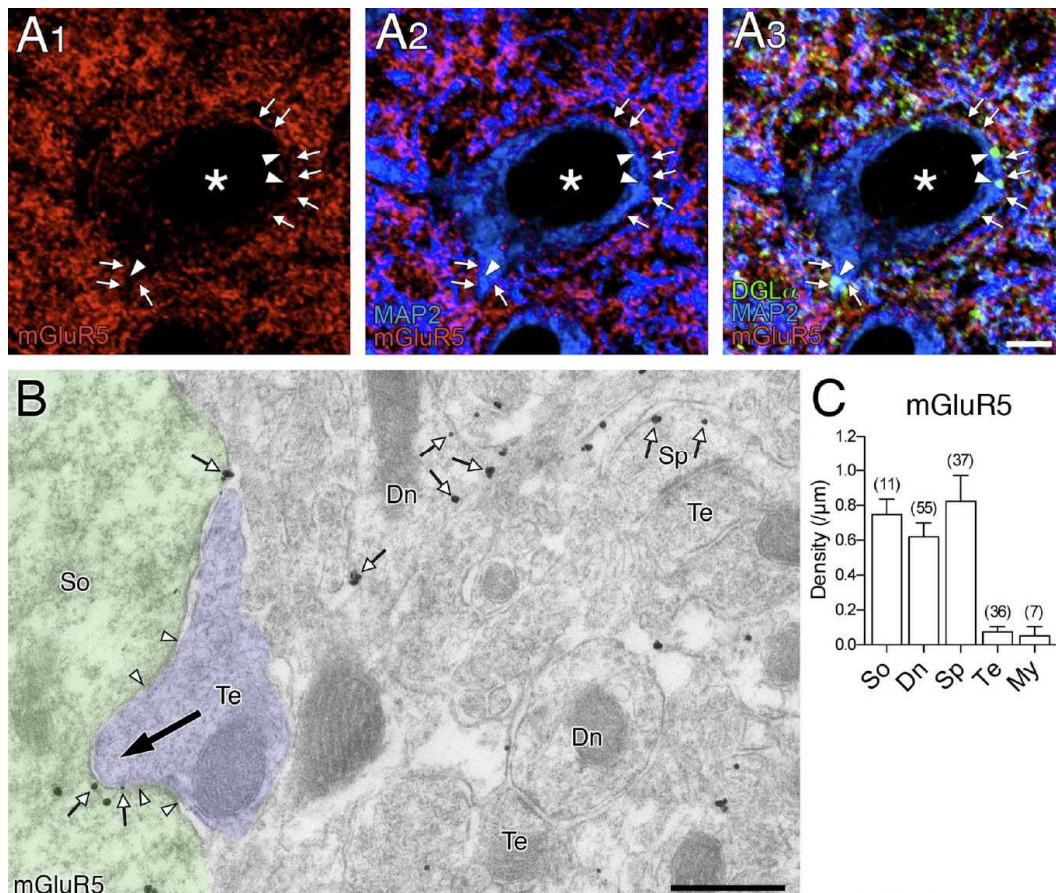


図7 扁桃体基底核の錐体細胞における mGluR<sub>5</sub> のシナプス外発現

**A** : mGluR<sub>5</sub> (赤)、DGLα (緑)、MAP2 (青) に対する三重蛍光免疫染色。MAP2 陽性の細胞体及び樹状突起 (矢印) に沿って mGluR<sub>5</sub> の発現が認められる。

**B** : mGluR<sub>5</sub> に対する包埋前免疫金電子顕微鏡像。細胞体の細胞膜 (So)、樹状突起軸 (Dn) 及び樹状突起スパイン (Sp) の細胞膜に結合している金属粒子を白矢印で示す。2つの矢頭は対称性シナプス結合の両端を示す。

**C** : ニューロン各部の領域における、細胞膜に結合している mGluR<sub>5</sub> の金属粒子の密度を表した棒グラフ。ミエリン鞘の標識はネガティブコントロールのために計算した。それぞれの棒グラフ上の数値は計測した構造の個数を示す。

S、細胞体；Dn、樹状突起軸；Sp、樹状突起スパイン；Te、神経終末；My、ミエリン鞘

スケールバー：A、5  $\mu\text{m}$ ；B、500 nm

## VII. 扁桃体基底核の錐体細胞における CCK<sub>2</sub>R mRNA の高発現

陥入型シナプスを形成する終末から CCK も共放出され、CCK 受容体、特に神経系に豊富な CCK<sub>2</sub>R の活性化を介して神経調節的作用を及ぼすことも考えられる。免疫組織化学で使用可能な抗 CCK<sub>2</sub>R 抗体は未だ得られていないことから、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションによってその発現を調べた (図 8)。CCK<sub>2</sub>R mRNA のアンチセンスリボプローブは扁桃体基底核で強く標識した (図 8A、C)。二重標識蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションによって、CCK<sub>2</sub>R mRNA は、VGluT1 mRNA を発現する錐体細胞と GAD67 mRNA を発現する介在ニューロンの両方に発現が認められ、前者の方が明らかに高いレベルであった (図 8B、D)。

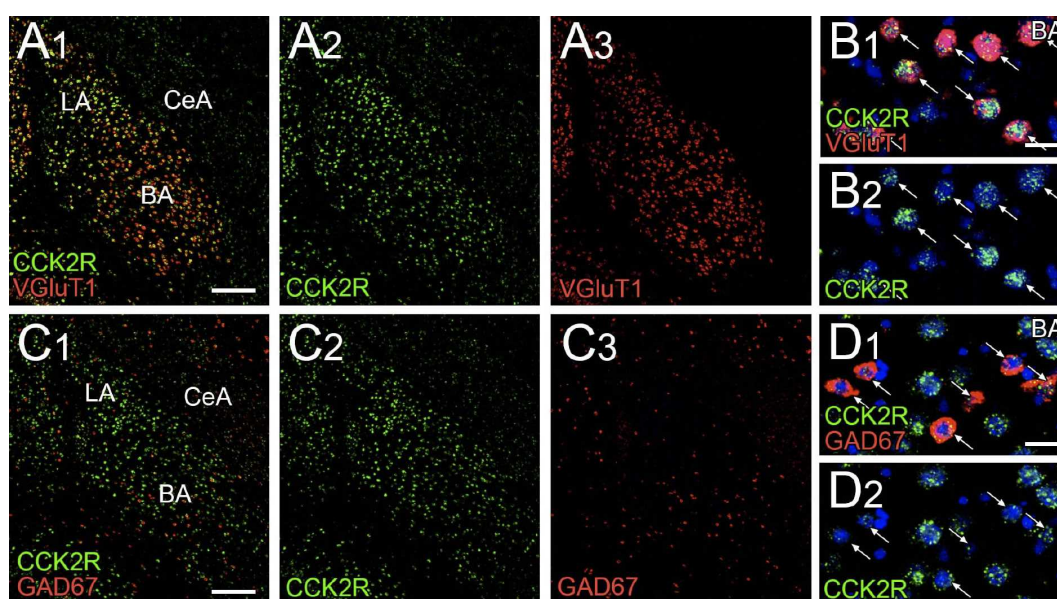


図 8 扁桃体基底核及の錐体細胞に CCK<sub>2</sub>R mRNA が豊富に発現している

扁桃体基底核における CCK<sub>2</sub>R mRNA (緑) と神経マーカー (**A**、**B**、VGluT1 mRNA; **C**、**D**、GAD67 mRNA; 赤) に対する二重標識蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション。矢印は、VGluT1 mRNA を発現する錐体細胞 (**B**) と GAD67 mRNA を発現する GABA 作動性介在ニューロン (**D**) を示す。

BA、扁桃体基底核; LA、扁桃体外側核; CeA、扁桃体中心核

スケールバー: **A**、**C**、200 μm; **B**、**D**、20 μm

## VIII. 皮質領域において VGluT3/CB<sub>1</sub>/DGL $\alpha$ が集積するバスケット細胞シナプス

次に、扁桃体において基底核に特異的な VGluT3、CB<sub>1</sub> 及び DGL $\alpha$ が集積する錐体細胞を標的とするバスケット細胞シナプスが、大脳皮質や海馬などの皮質領域にも存在するかをどうかを検討した (図 9)。VGluT3、CB<sub>1</sub>、VIAAT (または DGL $\alpha$ ) 及び CaMKII $\alpha$  に対する四重蛍光免疫染色を行ったところ、一次運動野において、VGluT3 陽性の CB<sub>1</sub><sup>+</sup>/VIAAT<sup>+</sup>終末が CaMKII $\alpha$  で標識された錐体細胞細胞体を取り囲むバスケットを形成し (矢頭、図 9A)、その多くが DGL $\alpha$  のクラスターと対向していた (矢頭、図 9B)。対照的に、海馬 CA1 では、VGluT3 陽性の CB<sub>1</sub><sup>+</sup>/VIAAT<sup>+</sup>終末が錐体細胞に対してバスケットを形成しているにも関わらず、DGL $\alpha$  のクラスター形成は認められなかった (矢頭、図 9C)。

このような神経化学特性を有するシナプスの領域分布の違いを明らかにするために、CaMKII $\alpha$  標識された錐体細胞細胞体上に VGluT3 陽性の CB<sub>1</sub><sup>+</sup>/VIAAT<sup>+</sup>終末が 1 つ以上結合している錐体細胞の出現頻度と、DGL $\alpha$  クラスターが 1 つ以上観察される錐体細胞の出現頻度をそれぞれ計測した。VGluT3 陽性の CB<sub>1</sub><sup>+</sup>/VIAAT<sup>+</sup>終末が結合している錐体細胞の出現頻度は、40~90% の頻度分布の範囲の中で計測した全ての皮質領域 (内側前頭前野、1 次体性感覚野、1 次運動野、2 次運動野、内嗅領皮質、海馬 CA1) に存在していた (図 9D、赤カラム)。これに対して、DGL $\alpha$  クラスターを持つ錐体細胞の出現頻度は皮質領域により大きく異なり、GluT3 陽性の CB<sub>1</sub><sup>+</sup>/VIAAT<sup>+</sup>終末が結合している錐体細胞の出現頻度との相関性は認められなかった (図 9D、青カラム)。さらに、VGluT3 陽性の CB<sub>1</sub><sup>+</sup>/VIAAT<sup>+</sup>終末が結合し、かつ DGL $\alpha$  クラスターを持つ錐体細胞の出現頻度を求めると、一次運動野、二次運動野、一次体性感覚野、嗅内領皮質において扁桃体基底核と同様に高い出現頻度が認められ、海馬 CA1 及び内側前頭前野には扁桃体外側核や中心核のように極めて稀であった (図 9D、緑カラム)。したがって、陥入型シナプスに特徴的な分子集合体を持つ錐体細胞周囲のバスケット細胞シナプスは皮質領域にも存在し、その存在頻度は皮質領域間で大きく異なることが明らかとなった。

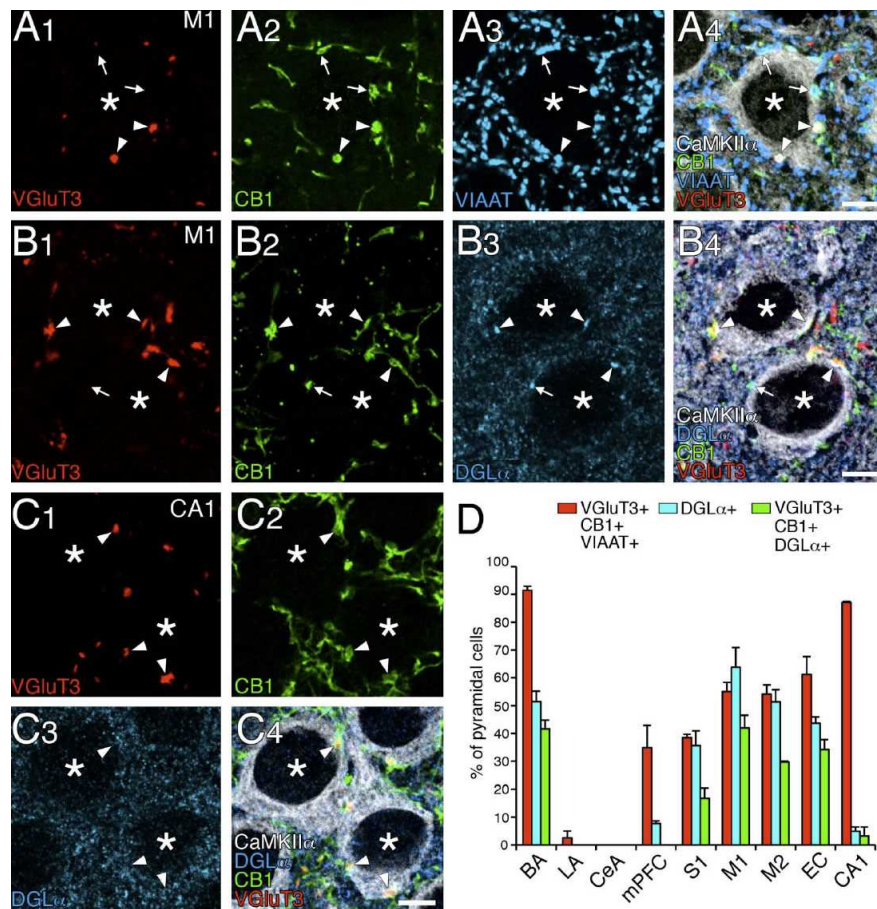


図9 VGluT3/CB<sub>1</sub>/DGLαが集積するバスケット細胞シナプスの皮質領域分布

A : 一次運動皮質における VGluT3 (赤)、CB<sub>1</sub> (緑)、VIAAT (青) 及び CaMKIIα (白) に対する四重蛍光免疫染色。矢頭と矢印はそれぞれ、CaMKIIα錐体細胞細胞体 (\*) 上の VGluT3 陽性または VGluT3 陰性の CB<sub>1</sub><sup>+</sup>/VIAAT<sup>+</sup>終末を示す。

B, C : 一次運動皮質 (B) 及び海馬 CA1 (C) における VGluT3 (赤)、CB<sub>1</sub> (緑)、DGLα (青) 及び CaMKIIα (白) に対する四重蛍光免疫染色。

D : 皮質領域における、VGluT3 陽性の CB<sub>1</sub><sup>+</sup>/VIAAT<sup>+</sup>終末が1つ以上結合している錐体細胞の出現頻度 (赤カラム)、1つ以上の DGLαクラスターを持つ錐体細胞の出現頻度 (青カラム)、VGluT3 陽性の CB<sub>1</sub><sup>+</sup>/VIAAT<sup>+</sup>終末が1つ以上結合し、かつ1つ以上の DGLαクラスターを持つ錐体細胞の出現頻度 (緑カラム) 示す棒グラフ。皮質領域として、内側前頭前野 (mPFC)、1次体性感覚野 (S1)、1次運動野 (M1)、2次運動野 (M2)、内嗅領皮質 (EC)、海馬 CA1 (CA1) を計測した。比較対照として、扁桃体の基底核 (BA)、外側核 (LA), 中心核 (CeA) の出現頻度もグラフの左側に示す。なお、計測した錐体細胞数は、扁桃体基底核 (VGluT3 発現に関して錐体細胞 165、DGLαクラスターに関して 170)、扁桃体外側核 (32、58)、扁桃体中心核 (66、53)、内側前頭前野 (119、117)、一次体性感覚野 (114、134)、一次運動野 (176、169)、二次運動野 (159、104)、嗅内領皮質 (133、209)、海馬 CA1 (70、61)。層状皮質では第2/3層を解析した。

スケールバー : 5 μm

## IX. 内嗅領皮質の陥入型シナプス

最後に、嗅内領皮質の錐体細胞におけるのバスケット細胞シナプスについて精査した (図 10)。ここでも、VGluT3 陽性の  $CB_1^+/VIAAT^+$  終末は CaMKII $\alpha$  陽性の錐体細胞細胞体に結合し (矢頭、図 10A)、これらの終末の多くは DGL $\alpha$  クラスタと対向していた (矢頭、図 10B)。VGluT3 陽性の  $CB_1^+/VIAAT^+$  終末は、細胞体上の  $CB_1^+/VIAAT^+$  終末の 32.3% を占めていた (図 10C ;  $n = 226$ )。さらに、DGL $\alpha$  クラスタをもつ 46 個の錐体細胞の細胞体をサンプリングし計測したところ、VGluT3 陽性の  $CB_1^+/VIAAT^+$  終末の 75.0% が DGL $\alpha$  クラスタと対向していたのに対し ( $n = 108$ )、VGluT3 陰性の  $CB_1^+/VIAAT^+$  終末の 28.8% のみが対向していた ( $n = 111$ )。さらに、VGluT3 陽性のバスケット細胞終末が陥入構造を形成し (図 10D)、そのような陥入構造に対向して DGL $\alpha$  のクラスタ形成が観察された (図 10E)。以上の所見から、VGluT3/ $CB_1$ /DGL $\alpha$  が集積する陥入型シナプスは、特定の皮質領域においても形成されていることが明らかとなった。

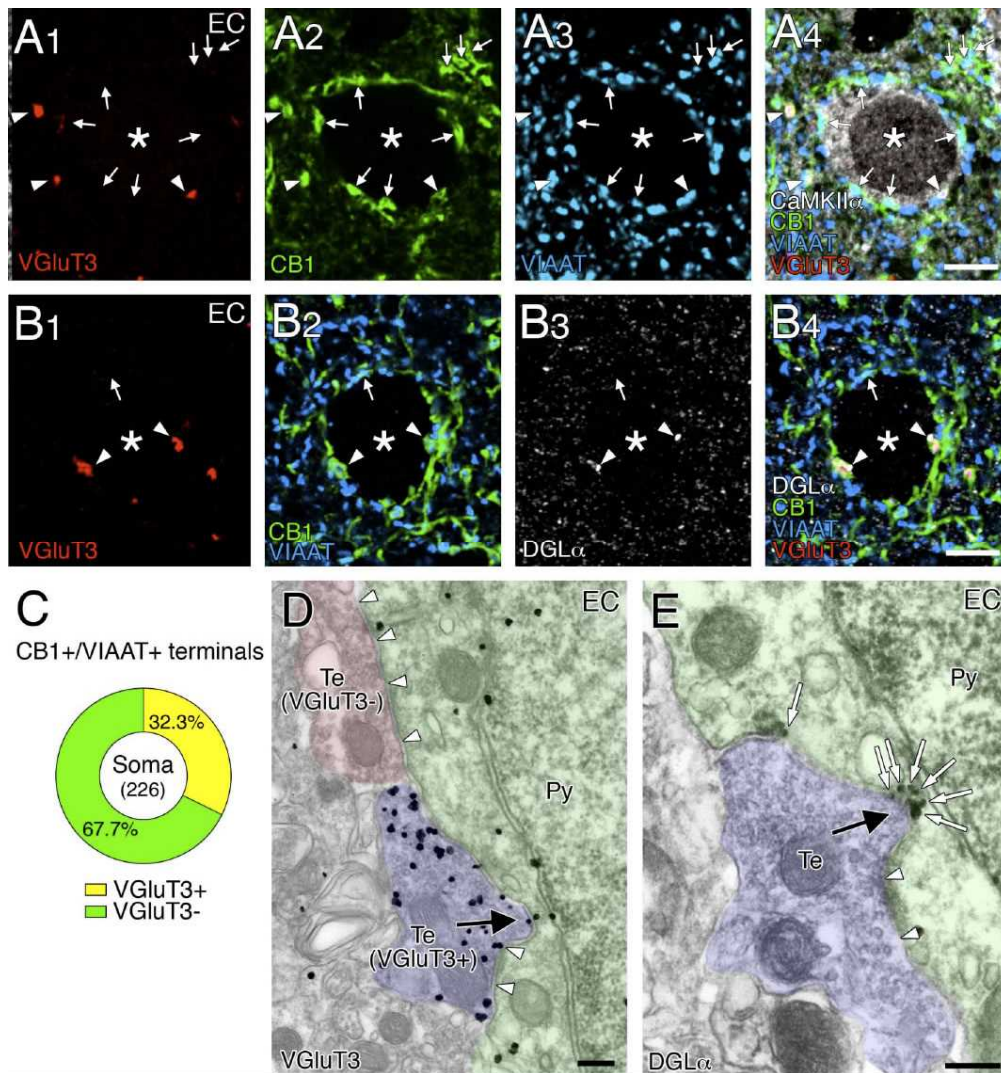


図 10 内嗅領皮質における VGluT3、CB<sub>1</sub>、DGL $\alpha$ をもつ陥入型シナプス

**A** : VGluT3 (赤)、CB<sub>1</sub> (緑)、VIAAT (青) 及び CaMKII $\alpha$  (白) に対する四重蛍光免疫染色。矢頭と矢印はそれぞれ、CaMKII $\alpha$ 錐体細胞細胞体 (\*) 上の VGluT3 陽性または VGluT3 陰性の CB<sub>1</sub><sup>+</sup>/VIAAT<sup>+</sup>終末を示す。

**B** : VGluT3 (赤)、CB<sub>1</sub> (緑)、DGL $\alpha$  (青) 及び CaMKII $\alpha$  (白) に対する四重蛍光免疫染色。矢頭と矢印はそれぞれ、CaMKII $\alpha$ 錐体細胞細胞体 (\*) 上の VGluT3 陽性または VGluT3 陰性の CB<sub>1</sub> 陽性終末を示す。

**C** : 錐体細胞細胞体上の VGluT3 陽性及び VGluT3 陰性の CB<sub>1</sub><sup>+</sup>/VIAAT<sup>+</sup>終末の割合を示す円グラフ。中央の数値は解析に用いた CB<sub>1</sub><sup>+</sup>/VIAAT<sup>+</sup>終末の数を示す。

**D**、**E** : 嗅内領皮質の VGluT3 (**D**) 及び DGL $\alpha$  (**E**) に対する包埋前免疫金電子顕微鏡像。矢頭は錐体細胞細胞体上の対称性シナプス結合を示している。

スケールバー : **A**、**B**、5  $\mu$ m ; **D**、**E**、200 nm

## 考察

GABA 作動性介在ニューロンは、発火パターン、分子発現特性、神経支配する錐体細胞領域に基づいて分類される。VGluT3 を発現する CCK 陽性バスケット細胞は、海馬 CA1 では少なくとも 21 種類存在する介在ニューロンのうちの 1 種である<sup>34,35</sup>。CCK 陽性バスケット細胞は、皮質領域と扁桃体基底外側核において CB<sub>1</sub> を高いレベルで発現するという特徴も備えている<sup>25-28,46</sup>。CCK 陽性バスケット細胞は、海馬錐体細胞のネットワーク振動の特定の位相タイミングで活動することが知られ、その内在性カンナビノイドへの感受性を介して、活動依存のおよび状況依存的な記憶プロセスの制御に関係すると考えられてきた<sup>48,49</sup>。扁桃体基底核の CB<sub>1</sub> を発現する CCK 陽性バスケット細胞が選択的に VGluT3 を発現することは、海馬 CA1 に代表される皮質領域の介在ニューロン多様性の基本的枠組みと一致する。今回の私の研究を通して、扁桃体基底核において、錐体細胞細胞体周囲の CB<sub>1</sub> を発現するバスケット細胞終末の 56.6%は VGluT3 に免疫陽性であること、また DGL $\alpha$  クラスタをもつ錐体細胞において VGluT3 陽性の CB<sub>1</sub> 発現バスケット細胞終末の 81.7%が DGL $\alpha$  クラスタと対向することを明らかになった。さらに電子顕微鏡を用いた解析により、91.2%の VGluT3 陽性終末が陥入構造を形成する一方、VGluT3 陰性終末でこれを形成するものは皆無であった。従って、この研究におけるオリジナルで重要な所見は、「VGluT3 を発現する CCK 陽性バスケット細胞が、CB<sub>1</sub> と DGL $\alpha$  が集積する特異な陥入型シナプスを選択的に形成する」ということを明らかにした点にある。

### I. 陥入型シナプスに共通する 3 種の伝達物質の表現型

VGluT1 と VGluT2 が古典的なグルタミン酸作動性ニューロンに発現しているのに対し、VGluT3 は一部の GABA 作動性、セロトニン作動性及びコリン作動性ニューロンに発現している<sup>34,43,50,51</sup>。最近の研究で、VGluT3 を発現する神経終末から実際にグルタミン酸が共放出されていることが示されている<sup>52-55</sup>。VGluT3 を発現する CCK 陽性バスケット細胞終末が陥入型シナプスを選択的に形成しているということは、その終末から GABA、グルタミン酸、CCK の 3 種の伝達物質が放出され、それが陥入型シナプスに共通する神経化学的表現型であることを示している。

この 3 つの伝達物質表現型に対応して、私は、扁桃体基底核の錐体細胞において GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1、mGluR<sub>5</sub> 及び CCK<sub>2</sub>R の発現を検出した。この中で、GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1 は陥入型シナプスのシナプス後膜に集積しているのに対し、mGluR<sub>5</sub> は扁桃体基底核の錐体細胞のシナプス外膜に広く分布していた。シナプス外膜に優勢な mGluR<sub>5</sub> の発現分布は、海馬錐体細胞や線条体中型有棘細胞とも一致している<sup>40,56,57</sup>。異なる受容体クラスの異なる細胞領域分布から、GABA は速い抑制性シナプス伝達に関与していることが示

唆される。一方、グルタミン酸は、通常は興奮性シナプスにおける速い興奮性シナプス伝達の主役を担っているが、陥入型シナプスではむしろボリューム伝達的にニューロンやシナプス機能を調節する神経調節物質として機能していることを示唆する。GABA 伝達に関するこの見解は、陥入型シナプスは抑制性シナプスに典型的な対称性結合であることや<sup>33</sup>、陥入型シナプスのシナプス後膜に AMPA 型グルタミン酸受容体が検出されないこと、さらに、扁桃体基底外側核の錐体細胞への GABA 作動性のシナプス伝達が CB<sub>1</sub> を介して短期抑制 (depolarization-induced suppression of inhibition (DSI)) や長期抑圧を受けるという観察結果によって支持される<sup>33,45,46,58,59</sup>。また、グルタミン酸伝達に関する見解は、mGluR<sub>5</sub> の遮断薬により扁桃体基底外側核での DSI の持続時間が短縮することや<sup>59</sup>、海馬での CB<sub>1</sub> 媒介性短期シナプス抑制が消失するという事実とも一致する<sup>60</sup>。

このようなグルタミン酸による調節的役割は、CCK についても成り立つと思える。CCK と CCK<sub>2</sub>R は扁桃体基底核において高レベルで発現しており<sup>61-64</sup>、本研究では、扁桃体基底核の錐体細胞に豊富な CCK<sub>2</sub>R mRNA の発現を確認した。CCK<sub>2</sub>R の細胞上の局在は不明であるが、扁桃体基底核の錐体細胞の活動性が CCK<sub>2</sub>R を介して直接的に促進されるという薬理学的実験結果から、少なくともその細胞体や樹状突起に発現していることが示唆される<sup>65,66</sup>。従って、この3種の伝達物質とその受容システムは、陥入型シナプスが何らかの特別なシナプスメカニズムを駆動するための協同的制御機構を反映していることが考えられる。

## II. 陥入型シナプスの神経化学特性が示唆するシナプスメカニズム

それでは、陥入型シナプスの特異な神経化学特性から、どのような種類のシナプスメカニズムが予測されるのだろうか。

シナプス後側のニューロンでの 2-AG の産生は、3つのメカニズムによって誘導される。すなわち、強い脱分極によって誘発される[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇、基礎レベルの[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>下での強い Gα<sub>q11</sub> タンパク共役型受容体の活性化、および[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇と Gα<sub>q11</sub> タンパク共役型受容体の活性化の共同による誘導メカニズムである<sup>10,67</sup>。第一の予測は、共放出されるグルタミン酸と CCK が、錐体細胞上に発現する Gα<sub>q11</sub> タンパク共役型の mGluR<sub>5</sub> と CCK<sub>2</sub>R を活性化することによる 2-AG の産生促進である。これらの受容体の活性化単独で 2-AG の産生に十分であれば、CB<sub>1</sub> によって媒介される GABA 放出の逆行性抑制が陥入型シナプスによって誘発されるであろう。たとえ mGluR<sub>5</sub> と CCK<sub>2</sub>R の活性化が閾値以下であったとしても、脱分極誘発性の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇と同時に起こったとき、2-AG の産生が容易に起こるのである。この 2-AG 産生の促進メカニズムに加え、CB<sub>1</sub> の高い発現が相乗することで、他の領域のシナプスと比べ、扁桃体基底核の

抑制性シナプスがCB<sub>1</sub>媒介性逆行性抑制の誘発閾値が低く振幅も大きいという機能特性<sup>33</sup>の分子基盤と考えられる。

陥入型シナプスの構造的特徴は、シナプス前終末の突出構造とそれに対応するシナプス後部の陥凹構造による非シナプス性接触領域の拡大である。一方、GABA作動性シナプスは陥入部の縁の部分、すなわち、陥入型シナプスの周辺部に形成される。このシナプス構造において、DGL $\alpha$ は陥凹構造の非シナプス性接触領域に高密度に集積し、狭い細胞間隙を挟んでシナプス前終末の突出部のCB<sub>1</sub>と向かい合う<sup>33</sup>。この極端な近接性により、他のシナプスに比べ、陥入型シナプスのCB<sub>1</sub>は、一旦2-AGが産生されれば、たとえそれが少量であっても、より容易に2-AGと結合し容易に飽和することが想定される。したがって、第二の予測は、陥入型シナプスでは、CB<sub>1</sub>の活性化によるGABA放出抑制が持続的に起こりやすい性質を有していることである。海馬での電気生理学的研究から、CCK陽性バスケット細胞の活性化によって錐体細胞での大きな抑制性シナプス後電位が誘発されるものの、一部のCCK陽性介在ニューロン・錐体細胞シナプスではeCBを介したGABA伝達の持続的抑制が標的細胞依存的かつ標的部位依存的に起こっていることが報告されている<sup>68-70</sup>。この予測が正しいのであれば、陥入型シナプスは、2-AG媒介性の伝達物質放出の持続的抑制を受けやすいシナプスとして進化してきたと推測することも可能であろう。バスケット細胞の活動性変化、CB<sub>1</sub>の細胞表面発現動態の変化、細胞間隙の2-AG濃度変化など、陥入型シナプスの持続的抑制を誘導したり解除しうる生理的および病態生理的な状態に応じて、陥入型シナプスは錐体細胞の興奮性や発火パターンを強力に制御し変化させるのではないだろうか。

CCKは不安を惹起する神経ペプチドとして知られ、げっ歯類においては不安様行動と条件付け恐怖発現を促進させ、人間ではパニック発作を誘発する<sup>71-73</sup>。興味深いことに、CCK<sub>2</sub>RとCB<sub>1</sub>を介した伝達システムは、恐怖記憶の消去に対して相反した作用を及ぼすことが知られている<sup>74</sup>。薬理的なCB<sub>1</sub>遮断による恐怖記憶の消去障害が、扁桃体基底外側核へのCCK<sub>2</sub>R作動薬の注入によって回復するという観察に基づき、Chhatwalら<sup>75</sup>はCB<sub>1</sub>阻害作用によって生じた恐怖消去学習の障害は、eCBがCCK放出を抑制できなくなることが原因であると提唱している。この仮説に基づけば、第三の予測として、陥入型シナプスは、CB<sub>1</sub>の活性化によってCCK伝達を効果的に抑制するためのシナプス装置として機能するという仮説が浮上する。CCK陽性バスケット細胞の活動は、動物の情動や動機づけなどの生理的状況に非常に敏感に反応することが知られており<sup>76</sup>、eCBとCCK伝達系の機能的な相互作用は、陥入型シナプスからのCCK放出に対し逆行性に調節可能なメカニズムを提供することで、錐体細胞の振動制御に対して活動依存的および状況依存的な微調整を可能にしているのかもしれない。これらの3つの予測の妥当性は、今後の実験を通して確かめる必要がある。

### III. 陥入構造と DGL $\alpha$ 集積の関連性

さまざまな皮質領域で、VGluT3 陽性の CB<sub>1</sub><sup>+</sup>/VIAAT<sup>+</sup>終末は、錐体細胞の細胞体上にバスケット型シナプスを形成していた。それにも関わらず、DGL $\alpha$ クラスターを持つ錐体細胞の出現頻度は、皮質領域によって大きく異なっていた。VGluT3、CB<sub>1</sub>、DGL $\alpha$ の3者の分子集合体を備えた錐体細胞は、感覚性および運動運動皮質や嗅内領皮質に豊富であった。さらに、嗅内領皮質では、陥入構造はVGluT3 陽性終末とDGL $\alpha$ クラスターの部位で選択的に形成されていた。対照的に、細胞体周囲のDGL $\alpha$ クラスターは内側前頭前野や海馬CA1では、CB<sub>1</sub>とVGluT3の両方を発現するバスケット細胞終末が錐体細胞周囲にバスケットを構築しているものの、そこにDGL $\alpha$ のクラスターは形成されていなかった。扁桃体基底外側核では、CB<sub>1</sub>/DGL $\alpha$ が集積する陥入型シナプスは扁桃体基底核に選択的である<sup>33</sup>。今回の研究では、扁桃体基底核の錐体細胞の中にも、DGL $\alpha$ クラスターを持つものと持たないものが存在すること、VGluT3を発現するGABA作動性介在ニューロンとその終末が扁桃体外側核には存在しないことも明らかにした。

これらのさまざまな事象を考え合わせると、解剖学的な陥入構造は、VGluT3を発現するCCK陽性バスケット細胞が、その接触部分にDGL $\alpha$ を集める能力を有する錐体細胞を神経支配した時に形成誘導されると理解することが、最も合理的である。さらに、陥入構造形成とDGL $\alpha$ 集積を制御するメカニズムは、皮質領域及び皮質様扁桃体において領域依存のおよび細胞依存の制御を受けており、その違いは2-AGを介した逆行性伝達の誘導、制御、協同性メカニズムに対するニューロン間での異なる要求性を反映しているだろう。

## 総括および結論

### 本研究全体から得られた新知見

扁桃体基底核において見出された陥入型シナプスは、脳の主要な eCB である 2-AG シグナル伝達分子が集まるユニークな GABA 作動性シナプスである。このシナプスでは、CB<sub>1</sub> を強発現する CCK 陽性バスケット細胞の軸索終末が錐体細胞の細胞体に陥入し、この陥入部位の錐体細胞膜に 2-AG 合成酵素である DGL $\alpha$  が集積する。この学位論文研究では、マウス終脳における陥入型シナプスについて精査した。扁桃体基底核において、小胞性グルタミン酸トランスポーター VGLuT3 は、CB<sub>1</sub> を強発現する GABA 作動性ニューロンの約 4 分の 1 に発現していた。VGLuT3 陽性の CB<sub>1</sub> 陽性バスケット細胞終末の大多数が DGL $\alpha$  のクラスターと対向するのに対して、VGLuT3 陰性の多くは対向しなかった。電子顕微鏡で観察すると、VGLuT3 陽性のバスケット細胞終末のほとんどは陥入構造を形成するのに対して、観察した全ての VGLuT3 陰性のバスケット細胞終末は陥入構造を作らなかった。

陥入型シナプスのポストシナプス膜は、GABA 受容体 GABA $\alpha$ R $\alpha$ 1 を発現したが、AMPA 型グルタミン酸受容体 GluA2 は検出されなかった。一方、G $\alpha$ <sub>q11</sub> タンパク共役型の代謝型グルタミン酸受容体 mGluR<sub>5</sub> は錐体細胞のシナプス外膜に広く発現し、G $\alpha$ <sub>q11</sub> タンパク共役型の CCK 受容体である CCK<sub>2</sub>R も錐体細胞に高いレベルで発現していた。

VGLuT3、CB<sub>1</sub>、DGL $\alpha$  の分子集合を備えた錐体細胞は、運動野、体性感覚野、内嗅領皮質などの皮質領域にも豊富に観察され、海馬や内側前頭前野には乏しかった。内嗅領皮質を電子顕微鏡で観察すると、陥入構造を有するシナプスは VGLuT3 陽性終末により形成され、そこに DGL $\alpha$  が集積し、扁桃体基底核と同様の陥入型シナプスであることを確認することができた。

以上の所見から、2-AG シグナル伝達分子が集まる陥入型シナプスは、終脳の皮質領域や皮質様扁桃体領域の VGLuT3 を発現する CCK 陽性バスケット細胞が形成することが明らかとなった。また、このバスケット細胞終末から共放出すると考えられる 3 種類の伝達物質は、シナプス性および非シナプス性の作用を介して特異なシナプス機能を発揮することが考えられる。さらに、皮質領域特異的な陥入型シナプスの構築は、2-AG を介した逆行性伝達の誘導、制御、協同性メカニズムに対するニューロン間での異なる要求性を反映しているものと考えられる。

## 新知見の意義

本研究では、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 CB<sub>1</sub> と DGL $\alpha$  が集積する特異な陥入型シナプスを選択的に形成することを明らかにした。この新知見は、GABA、グルタミン酸、CCK の3種の伝達物質が陥入型シナプスに共通する神経化学的表現型であることを意味し、それらに結合する受容体が錐体細胞に発現していることも明らかにした。さらに、このような分子解剖学的特性を有するシナプスは、特定の皮質領域にも存在していることも判明した。

今回明らかになった陥入型シナプスの神経化学特性と解剖学的特性から、次の3つのシナプス作用機序の可能性が示された。

- 1) 共放出されるグルタミン酸と CCK が G $\alpha_{q11}$  タンパク共役型の mGluR<sub>5</sub> と CCK<sub>2</sub>R の活性化を介して 2-AG の産生を促進し、GABA 作動性の抑制性伝達の逆行性抑制を促進する。
- 2) 狭い細胞外空間を挟んだ CB<sub>1</sub> と DGL $\alpha$  との極端な近接性から、陥入型シナプスでは 2-AG を介した持続的な放出抑制が起こりやすく、持続的抑制の誘導や解除を介して錐体細胞の興奮性や発火パターンを強力に制御する。
- 3) 陥入型シナプスは、CB<sub>1</sub> の活性化によって CCK 伝達を効果的にシャットオフするためのシナプス装置として、錐体細胞の振動制御に対して活動依存のおよび状況依存の微調整を行う。

## 新知見から展開されうる今後の研究

eCB は恐怖記憶の消去に関与することが知られている。陥入型シナプスが恐怖記憶の消去に対する制御機構について、上記3つの可能性の視点から今後追求する必要がある。

## 今後の課題

本研究では、eCB シグナル伝達に関与する分子集団をもつ陥入型シナプスの分子解剖学的特性を調べ、そこに VGLuT3 が存在することを発見したが、この生理的あるいは病理的機能については未だ不明である。また、VGLuT3 陽性 CCK バスケット細胞による陥入型シナプス形成の機序、形成される時期、陥入型シナプスの機能的意義などについても、未だ推測の域を超えない。これらの解明を通して、VGLuT3 及び陥入型シナプスの機能的意義の解明が、今後解決すべき重要な研究課題である。

## 謝 辞

本研究の立案、研究計画作成、実験手技修得、実験遂行にあたりご指導下さった北海道大学大学院医学研究科解剖発生学分野の内ヶ島基政先生始め解剖発生学分野の教員の皆様、そしてこのような研究に専念する機会を与えてくださった北海道大学大学院医学研究科精神医学分野の小山司名誉教授、久住一郎教授に深く感謝いたします。

最後になりますが、このような大変興味深い研究テーマを与えていただき、大学院生としての勉強や研究を支えて下さり、また、論文を指導し実験についての示唆を数多く与えて下さいました北海道大学大学院医学研究科解剖発生学分野の渡辺雅彦教授に厚く御礼を申し上げます。

## 引用文献

- 1 Kreitzer, A. C. & Regehr, W. G. Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron* **29**, 717-727 (2001).
- 2 Ohno-Shosaku, T., Maejima, T. & Kano, M. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron* **29**, 729-738 (2001).
- 3 Wilson, R. I. & Nicoll, R. A. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* **410**, 588-592 (2001).
- 4 Maejima, T., Hashimoto, K., Yoshida, T., Aiba, A. & Kano, M. Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors. *Neuron* **31**, 463-475 (2001).
- 5 Varma, N., Carlson, G. C., Ledent, C. & Alger, B. E. Metabotropic glutamate receptors drive the endocannabinoid system in hippocampus. *J. Neurosci.* **21**, RC188 (2001).
- 6 Ohno-Shosaku, T., Shosaku, J., Tsubokawa, H. & Kano, M. Cooperative endocannabinoid production by neuronal depolarization and group I metabotropic glutamate receptor activation. *Eur. J. Neurosci.* **15**, 953-961 (2002).
- 7 Hashimotodani, Y. *et al.* Phospholipase C $\beta$  serves as a coincidence detector through its Ca<sup>2+</sup> dependency for triggering retrograde endocannabinoid signal. *Neuron* **45**, 257-268 (2005).
- 8 Maejima, T. *et al.* Synaptically driven endocannabinoid release requires Ca<sup>2+</sup>-assisted metabotropic glutamate receptor subtype 1 to phospholipase C $\beta$ 4 signaling cascade in the cerebellum. *J. Neurosci.* **25**, 6826-6835 (2005).
- 9 Hashimotodani, Y., Ohno-Shosaku, T. & Kano, M. Endocannabinoids and synaptic function in the CNS. *Neuroscientist* **13**, 127-137 (2007).
- 10 Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimotodani, Y., Uchigashima, M. & Watanabe, M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol. Rev.* **89**, 309-380 (2009).
- 11 Mechoulam, R. *et al.* Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 83-90 (1995).
- 12 Tanimura, A. *et al.* The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase  $\alpha$  mediates retrograde suppression of synaptic transmission. *Neuron* **65**, 320-327 (2010).
- 13 Sugiura, T. *et al.* 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor

- ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215**, 89-97 (1995).
- 14 Stella, N., Schweitzer, P. & Piomelli, D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* **388**, 773-778 (1997).
- 15 Bisogno, T. *et al.* Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J. Cell Biol.* **163**, 463-468 (2003).
- 16 Gao, Y. *et al.* Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice. *J. Neurosci.* **30**, 2017-2024 (2010).
- 17 Dinh, T. P. *et al.* Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 10819-10824 (2002).
- 18 Blankman, J. L., Simon, G. M. & Cravatt, B. F. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem. Biol.* **14**, 1347-1356 (2007).
- 19 Schlosburg, J. E. *et al.* Chronic monoacylglycerol lipase blockade causes functional antagonism of the endocannabinoid system. *Nat. Neurosci.* **13**, 1113-1119 (2010).
- 20 Gulyas, A. I. *et al.* Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur. J. Neurosci.* **20**, 441-458 (2004).
- 21 Hashimoto, Y., Ohno-Shosaku, T. & Kano, M. Presynaptic monoacylglycerol lipase activity determines basal endocannabinoid tone and terminates retrograde endocannabinoid signaling in the hippocampus. *J. Neurosci.* **27**, 1211-1219 (2007).
- 22 Pan, B. *et al.* Blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis by selective monoacylglycerol lipase inhibitor 4-nitrophenyl 4-(dibenzo[d][1,3]dioxol-5-yl(hydroxy)methyl)piperidine-1-carboxylate (JZL184) Enhances retrograde endocannabinoid signaling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **331**, 591-597 (2009).
- 23 Tanimura, A. *et al.* Synapse type-independent degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol after retrograde synaptic suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 12195-12200 (2012).
- 24 Blankman, J. L. & Cravatt, B. F. Chemical probes of endocannabinoid metabolism. *Pharmacol. Rev.* **65**, 849-871 (2013).
- 25 Marsicano, G. & Lutz, B. Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 4213-4225 (1999).
- 26 Katona, I. *et al.* Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA

- release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J. Neurosci.* **19**, 4544-4558 (1999).
- 27 Tsou, K., Mackie, K., Sanudo-Pena, M. C. & Walker, J. M. Cannabinoid CB1 receptors are localized primarily on cholecystokinin-containing GABAergic interneurons in the rat hippocampal formation. *Neuroscience* **93**, 969-975 (1999).
- 28 Bodor, A. L. *et al.* Endocannabinoid signaling in rat somatosensory cortex: laminar differences and involvement of specific interneuron types. *J. Neurosci.* **25**, 6845-6856 (2005).
- 29 Katona, I. *et al.* Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J. Neurosci.* **26**, 5628-5637 (2006).
- 30 Yoshida, T. *et al.* Localization of diacylglycerol lipase-alpha around postsynaptic spine suggests close proximity between production site of an endocannabinoid, 2-arachidonoyl-glycerol, and presynaptic cannabinoid CB1 receptor. *J. Neurosci.* **26**, 4740-4751 (2006).
- 31 Uchigashima, M. *et al.* Molecular and morphological configuration for 2-arachidonoylglycerol-mediated retrograde signaling at mossy cell-granule cell synapses in the dentate gyrus. *J. Neurosci.* **31**, 7700-7714 (2011).
- 32 Kawamura, Y. *et al.* The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J. Neurosci.* **26**, 2991-3001 (2006).
- 33 Yoshida, T. *et al.* Unique inhibitory synapse with particularly rich endocannabinoid signaling machinery on pyramidal neurons in basal amygdaloid nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 3059-3064 (2011).
- 34 Somogyi, J. *et al.* GABAergic basket cells expressing cholecystokinin contain vesicular glutamate transporter type 3 (VGLUT3) in their synaptic terminals in hippocampus and isocortex of the rat. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 552-569 (2004).
- 35 Klausberger, T. & Somogyi, P. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* **321**, 53-57 (2008).
- 36 Fukudome, Y. *et al.* Two distinct classes of muscarinic action on hippocampal inhibitory synapses: M2-mediated direct suppression and M1/M3-mediated indirect suppression through endocannabinoid signalling. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 2682-2692 (2004).
- 37 Ichikawa, R. *et al.* Developmental switching of perisomatic innervation from climbing fibers to basket cell fibers in cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* **31**, 16916-16927 (2011).
- 38 Yamazaki, M. *et al.* TARPs gamma-2 and gamma-7 are essential for AMPA receptor

- expression in the cerebellum. *Eur. J. Neurosci.* **31**, 2204-2220 (2010).
- 39 Miura, E. *et al.* Expression and distribution of JNK/SAPK-associated scaffold protein JSAP1 in developing and adult mouse brain. *J. Neurochem.* **97**, 1431-1446 (2006).
- 40 Uchigashima, M. *et al.* Subcellular arrangement of molecules for 2-arachidonoyl-glycerol-mediated retrograde signaling and its physiological contribution to synaptic modulation in the striatum. *J. Neurosci.* **27**, 3663-3676 (2007).
- 41 Yamasaki, M., Matsui, M. & Watanabe, M. Preferential localization of muscarinic M1 receptor on dendritic shaft and spine of cortical pyramidal cells and its anatomical evidence for volume transmission. *J. Neurosci.* **30**, 4408-4418 (2010).
- 42 Matsuda, L. A., Bonner, T. I. & Lolait, S. J. Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J. Comp. Neurol.* **327**, 535-550 (1993).
- 43 Gras, C. *et al.* A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J. Neurosci.* **22**, 5442-5451 (2002).
- 44 Schafer, M. K., Varoqui, H., Defamie, N., Weihe, E. & Erickson, J. D. Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *J. Biol. Chem.* **277**, 50734-50748 (2002).
- 45 Marsicano, G. *et al.* The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* **418**, 530-534 (2002).
- 46 Katona, I. *et al.* Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. *J. Neurosci.* **21**, 9506-9518 (2001).
- 47 McDonald, A. J. & Mascagni, F. Localization of the CB1 type cannabinoid receptor in the rat basolateral amygdala: high concentrations in a subpopulation of cholecystokinin-containing interneurons. *Neuroscience* **107**, 641-652 (2001).
- 48 Lasztocki, B., Tukker, J. J., Somogyi, P. & Klausberger, T. Terminal field and firing selectivity of cholecystokinin-expressing interneurons in the hippocampal CA3 area. *J. Neurosci.* **31**, 18073-18093 (2011).
- 49 Robbe, D. *et al.* Cannabinoids reveal importance of spike timing coordination in hippocampal function. *Nat. Neurosci.* **9**, 1526-1533 (2006).
- 50 Fremeau, R. T., Jr. *et al.* The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 14488-14493 (2002).
- 51 Herzog, E. *et al.* Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. *Neuroscience* **123**, 983-1002 (2004).
- 52 Higley, M. J. *et al.* Cholinergic interneurons mediate fast VGLUT3-dependent

- glutamatergic transmission in the striatum. *PLoS One* **6**, e19155 (2011).
- 53 Nelson, A. B., Bussert, T. G., Kreitzer, A. C. & Seal, R. P. Striatal cholinergic neurotransmission requires VGLUT3. *J. Neurosci.* **34**, 8772-8777 (2014).
- 54 Noh, J., Seal, R. P., Garver, J. A., Edwards, R. H. & Kandler, K. Glutamate co-release at GABA/glycinergic synapses is crucial for the refinement of an inhibitory map. *Nat. Neurosci.* **13**, 232-238 (2010).
- 55 Varga, V. *et al.* Fast synaptic subcortical control of hippocampal circuits. *Science* **326**, 449-453 (2009).
- 56 Baude, A. *et al.* The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 alpha) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron* **11**, 771-787 (1993).
- 57 Lujan, R., Nusser, Z., Roberts, J. D., Shigemoto, R. & Somogyi, P. Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* **8**, 1488-1500 (1996).
- 58 Azad, S. C. *et al.* Circuitry for associative plasticity in the amygdala involves endocannabinoid signaling. *J. Neurosci.* **24**, 9953-9961 (2004).
- 59 Zhu, P. J. & Lovinger, D. M. Retrograde endocannabinoid signaling in a postsynaptic neuron/synaptic bouton preparation from basolateral amygdala. *J. Neurosci.* **25**, 6199-6207 (2005).
- 60 Sheinin, A., Talani, G., Davis, M. I. & Lovinger, D. M. Endocannabinoid- and mGluR5-dependent short-term synaptic depression in an isolated neuron/bouton preparation from the hippocampal CA1 region. *J. Neurophysiol.* **100**, 1041-1052 (2008).
- 61 Honda, T., Wada, E., Battey, J. F. & Wank, S. A. Differential Gene Expression of CCK(A) and CCK(B) Receptors in the Rat Brain. *Mol. Cell. Neurosci.* **4**, 143-154 (1993).
- 62 Larsson, L. I. & Rehfeld, J. F. Localization and molecular heterogeneity of cholecystokinin in the central and peripheral nervous system. *Brain Res.* **165**, 201-218 (1979).
- 63 Mascagni, F. & McDonald, A. J. Immunohistochemical characterization of cholecystokinin containing neurons in the rat basolateral amygdala. *Brain Res.* **976**, 171-184 (2003).
- 64 Vanderhaeghen, J. J. *et al.* Co-existence of cholecystokinin- or gastrin-like peptides with other peptides in the hypophysis and the hypothalamus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **448**, 334-344 (1985).
- 65 Chung, L. & Moore, S. D. Cholecystokinin excites interneurons in rat basolateral

- amygdala. *J. Neurophysiol.* **102**, 272-284 (2009).
- 66 Meis, S., Munsch, T., Sosulina, L. & Pape, H. C. Postsynaptic mechanisms underlying responsiveness of amygdaloid neurons to cholecystokinin are mediated by a transient receptor potential-like current. *Mol. Cell. Neurosci.* **35**, 356-367 (2007).
- 67 Hashimotodani, Y., Ohno-Shosaku, T. & Kano, M. Ca(2+)-assisted receptor-driven endocannabinoid release: mechanisms that associate presynaptic and postsynaptic activities. *Curr. Opin. Neurobiol.* **17**, 360-365 (2007).
- 68 Ali, A. B. & Todorova, M. Asynchronous release of GABA via tonic cannabinoid receptor activation at identified interneuron synapses in rat CA1. *Eur. J. Neurosci.* **31**, 1196-1207 (2010).
- 69 Lee, S. H., Foldy, C. & Soltesz, I. Distinct endocannabinoid control of GABA release at perisomatic and dendritic synapses in the hippocampus. *J. Neurosci.* **30**, 7993-8000 (2010).
- 70 Losonczy, A., Biro, A. A. & Nusser, Z. Persistently active cannabinoid receptors mute a subpopulation of hippocampal interneurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 1362-1367 (2004).
- 71 Belcheva, I., Belcheva, S., Petkov, V. V. & Petkov, V. D. Asymmetry in behavioral responses to cholecystokinin microinjected into rat nucleus accumbens and amygdala. *Neuropharmacology* **33**, 995-1002 (1994).
- 72 Chen, Q., Nakajima, A., Meacham, C. & Tang, Y. P. Elevated cholecystokinergic tone constitutes an important molecular/neuronal mechanism for the expression of anxiety in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 3881-3886 (2006).
- 73 Kennedy, J. L. *et al.* Investigation of cholecystokinin system genes in panic disorder. *Mol. Psychiatry* **4**, 284-285 (1999).
- 74 Marsicano, G. *et al.* The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* **418**, 530-534 (2002).
- 75 Chhatwal, J. P. *et al.* Functional interactions between endocannabinoid and CCK neurotransmitter systems may be critical for extinction learning. *Neuropsychopharmacology* **34**, 509-521 (2009).
- 76 Freund, T. F. Interneuron Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends Neurosci.* **26**, 489-495 (2003).