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
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	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11656
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60051
Type	doctoral thesis
File Information	Yuki_Omiya.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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. *in situ* 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^{+}/CCK^{+}介在ニューロンは CB_1 mRNA を高レベルに発現する・・・・・ 10 頁

II. VIP^{+}/CCK^{+}介在ニューロンは CB_1 mRNA を弱く発現する・・・・・・・・・ 12 頁

III. DGLαは VGluT3^{+}/CB_1^{+}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 $GABA_AR\alpha1$ 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 $mGluR_5$ 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_2R mRNA の高発現・・・・・・・・・ 19 頁

VIII. 皮質領域において VGluT3/CB_1/DGLα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 DGLα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 Ca^{2+}イオン濃度の上昇 [1-3]、$G\alpha_{q/11}$ 蛋白共役型受容体の活性化 [4]、またはその両者 [5-8] 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（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 [9]。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 [10]。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α（DGLα）によって合成される主要な eCB である [11-16]。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 [17-19]、逆行性伝達の強さや時空間的特性を調節している [20-24]。

大脳皮質、海馬及び扁桃体基底外側核では、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γアミノ酪酸（γ-aminobutylic acid、GABA）作動性終末に豊富に発現している [25-28]。これらの皮質領域や皮質様扁桃体において、DGLα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 [29-31]、錐体細胞を支配する興奮性終末では CB_1 の発現は弱い [32]。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 [10]。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、DGLαと 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 [33]。陥入型シナプスでは、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 DGLα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 [33,34]、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も未だ不明である。

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 $GABA_A$ 受容体を選択的に発現したが、α-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、$G\alpha_{q/11}$ 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、$mGluR_5$）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、$G\alpha_{q/11}$ 蛋白共役型の 2 型 CCK 受容体（CCK_2R）の mRNA も豊富に発現していた。さらに、VGluT3、CB_1、DGLα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 $G\alpha_{q/11}$ 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	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
BCIP	5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate
BSA	bovine serum albumin
CaMKIIα	calmodulin-dependent kinase II α subunit
CB_1	cannabinoid receptor type 1
CCK	cholecystokinin
DGLα	diacylglycerol lipase-α
DIG	digoxigenin
DSI	depolarization induced suppression of inhibition
eCB	endocannabinoid
FITC	fluorescein isothiocyanate
GABA	γ-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
$mGluR_5$	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%グルタールアルデヒド/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 μm 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 μm）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℃で 0.5%酢酸ウラン/メタノールに浸漬し、続いて-45℃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、ウルトラミクロトーム（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 μm）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 Ca^{2+}/calmodulin-dependent kinase II α subunit （CaMKIIα）、CB_1、DGLα、$GABA_A$ receptor α1 subunit（$GABA_AR\alpha1$）、AMPA receptor subunit GluA2、$mGluR_5$、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
CaMKIIα	ラット CaMKIIα	マウス	IB	Merck-Millipore（05-532、Clone 6G9）
CB_1	443-473（NM_007726）	ウサギ モルモット ヤギ	KO、IB	Fukudome et al.（2004）[36]
DGLα	1003-1044（NM198114）	ウサギ ヤギ	KO、IB	Yoshida et al.（2006）[30]
GABAAαR1	369-386（NM_010250）	ウサギ	IB/HEK	Ichikawa et al.（2011）[37]
GluA2	847-863（X57498）	ウサギ	IB/KO	Yamazaki et al.（2010）[38]
MAP2	927-1104（NM_008632）	ヤギ	*	Miura et al.（2006）[39]
$mGluR_5$	1144-1171（D10891）	ウサギ モルモット	KO	Uchigashima et al.（2007）[40]
VGluT3	558-601（AF510321）	モルモット ヤギ	IB	Somogyi et al.（2004） [34]
VIAAT	75-87（NM_031782）	マウス		Synaptic Systems（1310011）
VIP	porcine VIP	ウサギ	PT	Euro-Diagnostica（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ブ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ブ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[41]。マウス CB_1（121-1630bp、NCBI accession number U22948）、マウス preproCCK（124-411、NM_031161）、マウス CCK_2R（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 trithanolamine-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 分間リンスした後に風乾した。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℃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℃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 $MgCl_2$）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_2O_2 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（invitorogen）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 μg/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（Velctor Laboratries、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 μg/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%グルタールアルデヒド/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、ウルトラミクロトーム（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$GABA_AR\alpha1$ または GluA2 抗体（各 20 μg/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 Internatinal、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 ug/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 Internatinal）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$^+$/CCK$^+$介在ニューロンは CB_1 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_1、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_1 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[33,42-44]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。

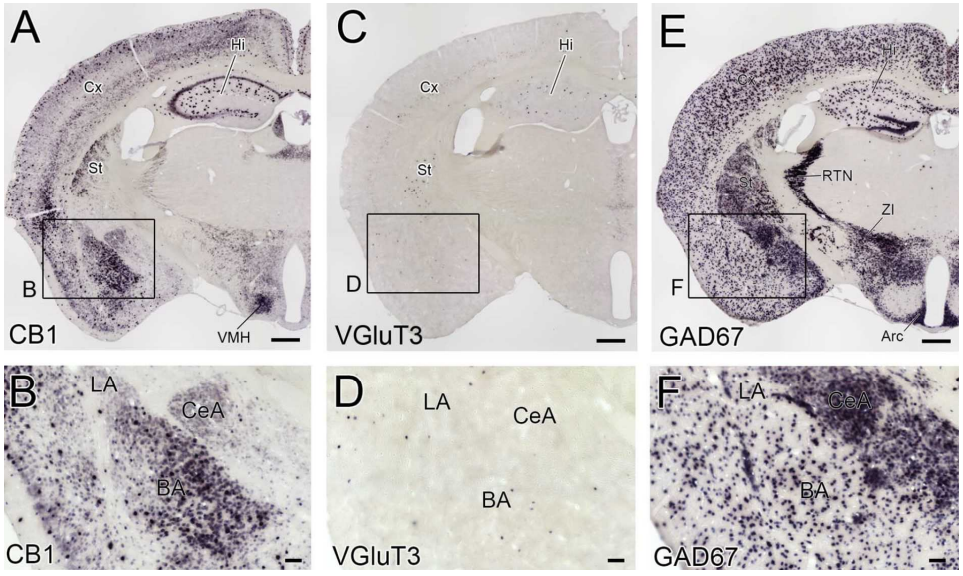

図 1 CB_1、 VGluT3、 GAD67 mRNA の発現パターン

成体マウスの扁桃体を含む前脳冠状断標本での CB_1（***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_1 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[45-47]。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_1 mRNA（n = 42）及び preproCCK mRNA（n = 52）を発現していた（図 2A-C、矢頭）。CB_1 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_1 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_1 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_1 mRNA を強発現する細胞（n = 152）のうち 27.6%であった。CB_1 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_1 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_1 強発現細胞の約 4 分の 1 を占めることが判明した。

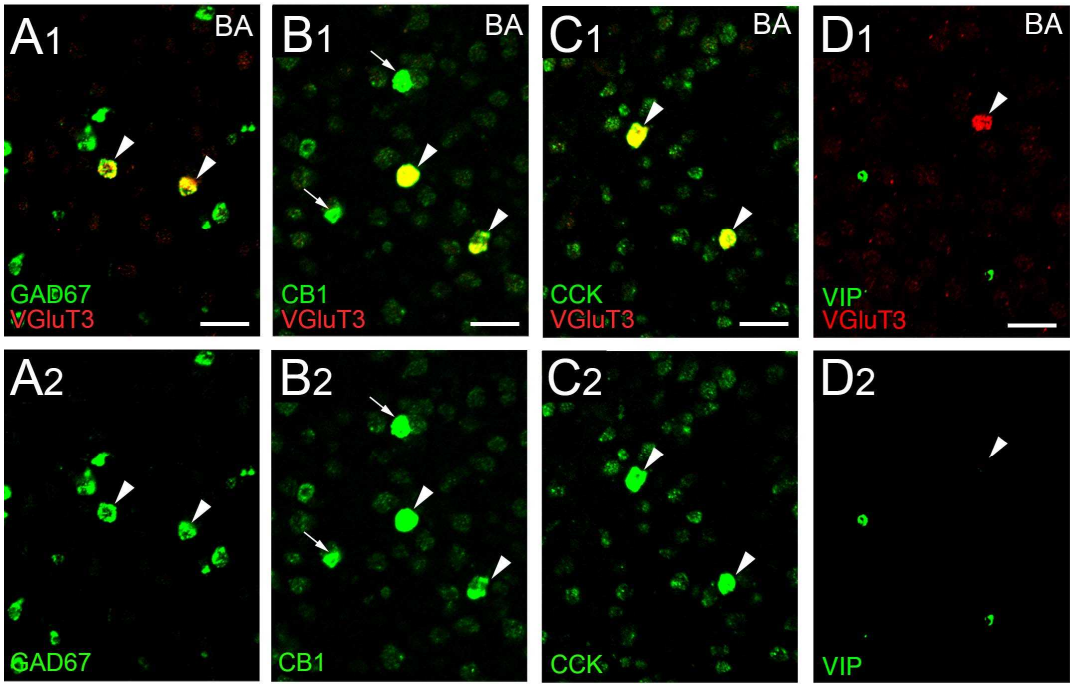

図 2 扁桃体基底核における VGluT3 mRNA の選択的発現

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_1 mRNA（***B***）および preproCCK mRNA（***B***）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$^+$/CCK$^+$介在ニューロンはCB_1 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[34]。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_1 mRNA（n＝106）を発現していたが、その大多数（89.6%） は CB_1 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_1 mRNA の発現は弱いことが判明した。

III. DGLαは VGluT3$^+$/CB1$^+$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_1 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_1 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_1^+/VIAAT$^+$終末には VGluT3 陽性のものと（図 3A、矢頭）、VGluT3 陰性のものとがあり（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_1^+/VIAAT$^+$終末は、細胞体表面にある CB_1^+/VIAAT$^+$終末の 56.6%（n＝687）を占め、ニューロピルにある CB_1^+/VIAAT$^+$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_1^+/VIAAT$^+$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。

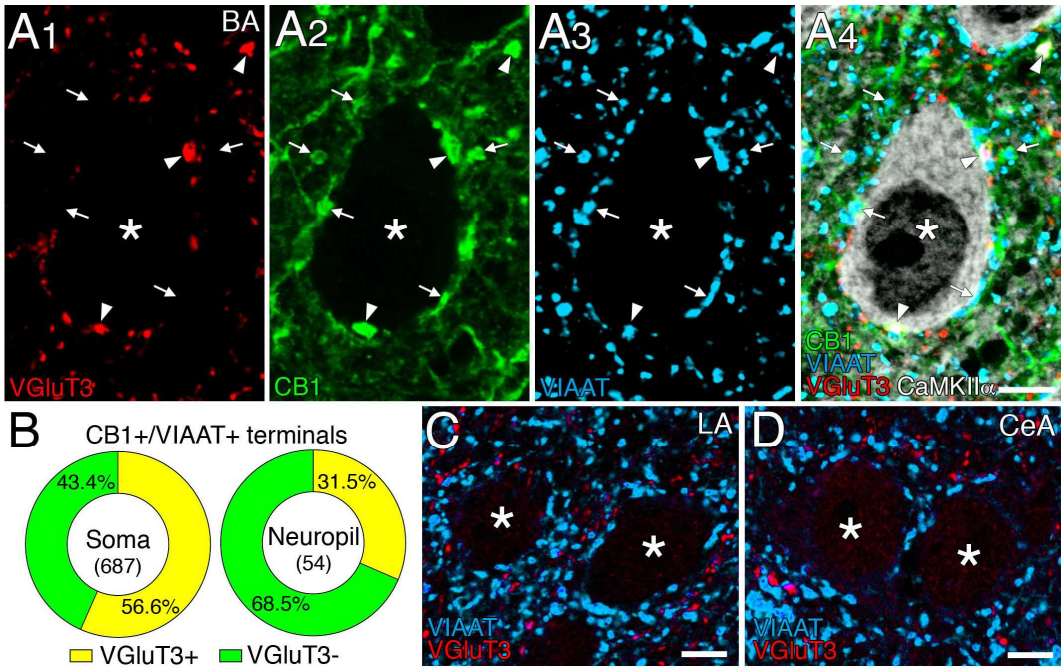

図 3 VGluT3 は CB1$^+$/VIAAT$^+$バスケット細胞終末に豊富に発現する

A : 扁桃体基底核における VGluT3（赤）、CB_1（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_1^+/VIAAT$^+$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 CB1$^+$/VIAAT$^+$終末の割合。中央の数値は解析に使用した CB1$^+$/VIAAT$^+$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_1 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[33]。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_1^+/VIAAT$^+$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 CB1$^+$/VIAAT$^+$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_1^+/VIAAT$^+$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 DGLα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_1 陽性バスケット細胞終末の直下に DGLα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。

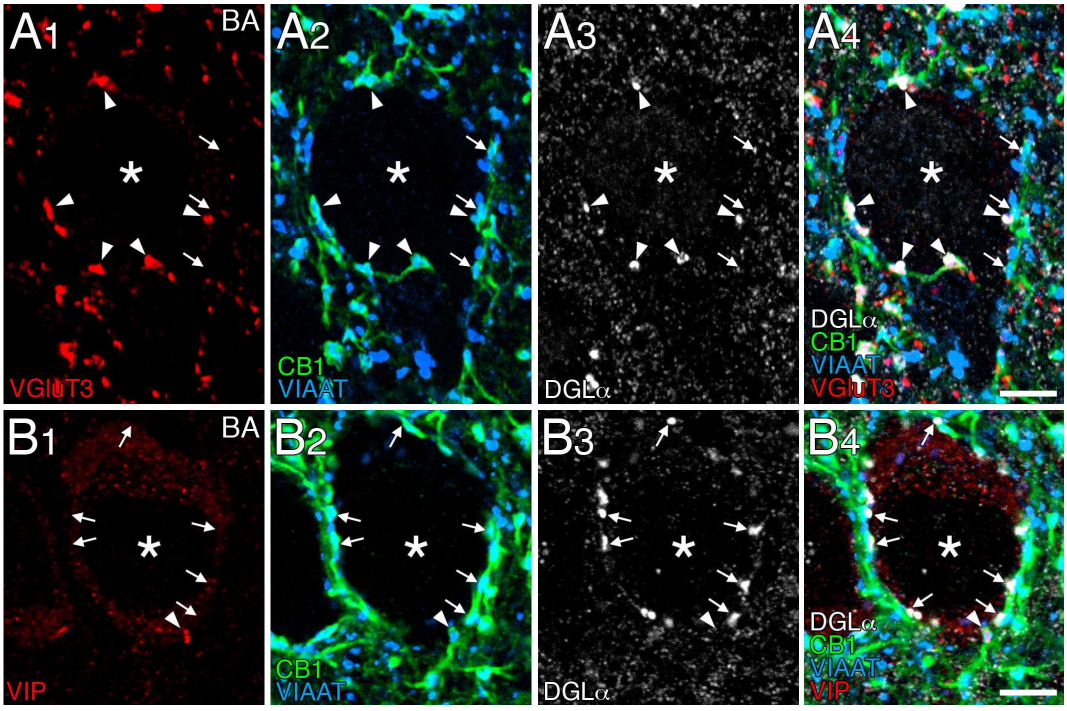

図 4 VGluT3 陽性の CB_1^+/$VIAAT^+$終末は DGLαクラスターと対向する

A：扁桃体基底核における VGluT3（赤）、CB_1（緑）、VIAAT（青）、DGLα（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_1^+/$VIAAT^+$終末を示す。VGluT3 陽性終末は DGLα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_1（緑）、VIAAT（青）、DGLα（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_1^+/$VIAAT^+$終末を示す。VIP 陽性終末の近傍には DGLαクラスターが認められない。

スケールバー：5 μm

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_1 陽性のバスケット細胞終末が錐体細胞細胞体上に特異な陥入構造を形成することが知られている[33]。そこで、VGluT3 陽性及び陰性のどちらの CB_1 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_1 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。

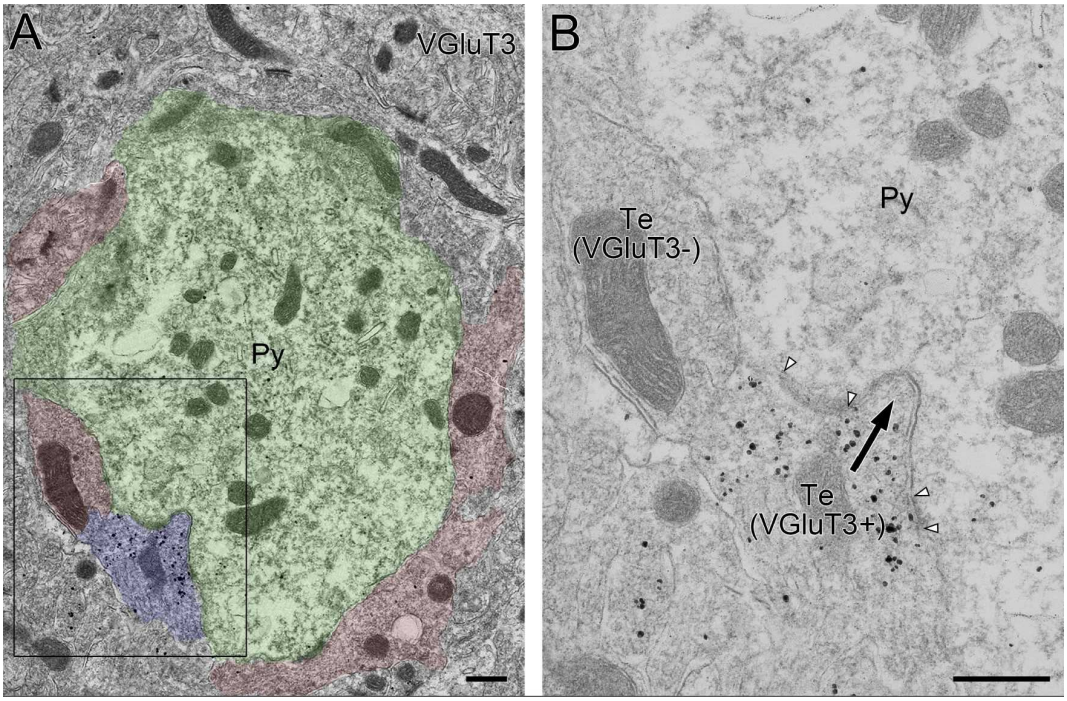

図 5 VGluT3 陽性バスケット細胞終末は選択的に陥入構造を形成する

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；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 $GABA_AR\alpha1$ 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[33]。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 $GABA_AR\alpha1$ 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 μm 当たりの金標識密度を計測したところ、$GABA_AR\alpha1$（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 ± 0.62（平均 ± 標準誤差 n = 30）および 0.00 ± 0.00（n =12）であり、非対称シナプスではそれぞれ 0.17 ± 0.17（n = 25）および 1.67 ± 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。

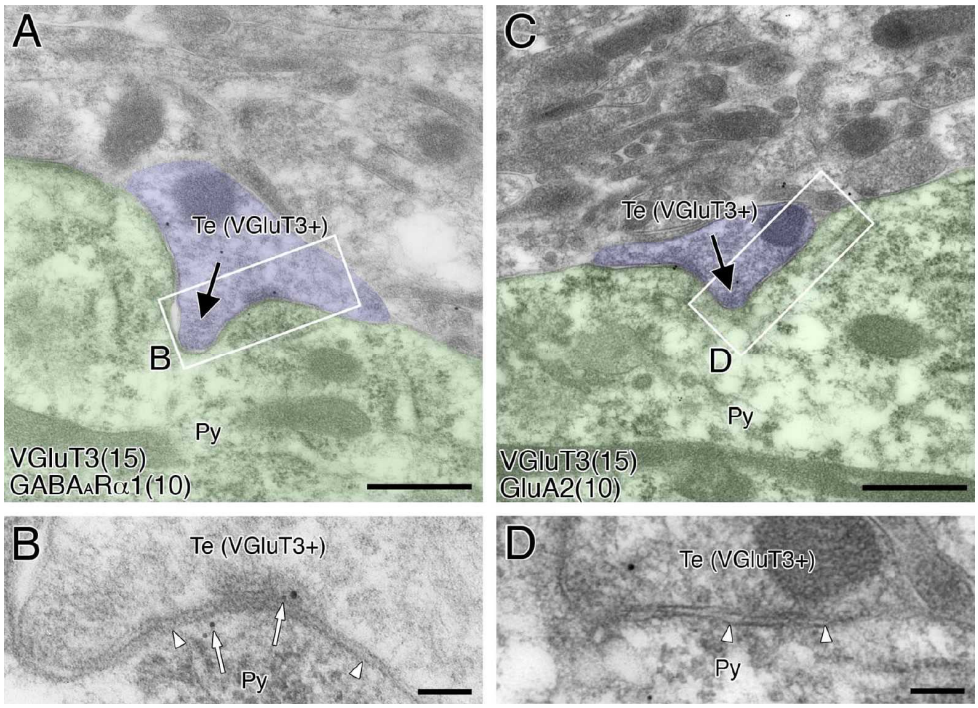

図 6 陥入型シナプスのシナプス後膜の表現型は GABA 作動性である

陥入型シナプスにおける $GABA_AR\alpha1$（***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（ϕ = 15 nm 金コロイド粒子）及び $GABA_AR\alpha1$（***A***、***B***;、ϕ = 10 nm）、またはグルタミン酸受容体 GluA2（***C***、***D***、 ϕ = 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 $GABA_AR\alpha1$ 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 $mGluR_5$ 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 $mGluR_5$[33] 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、$mGluR_5$ 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）。$mGluR_5$ の免疫反応は、錐体細胞細胞体の DGLα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、$mGluR_5$ 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、$mGluR_5$ 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。

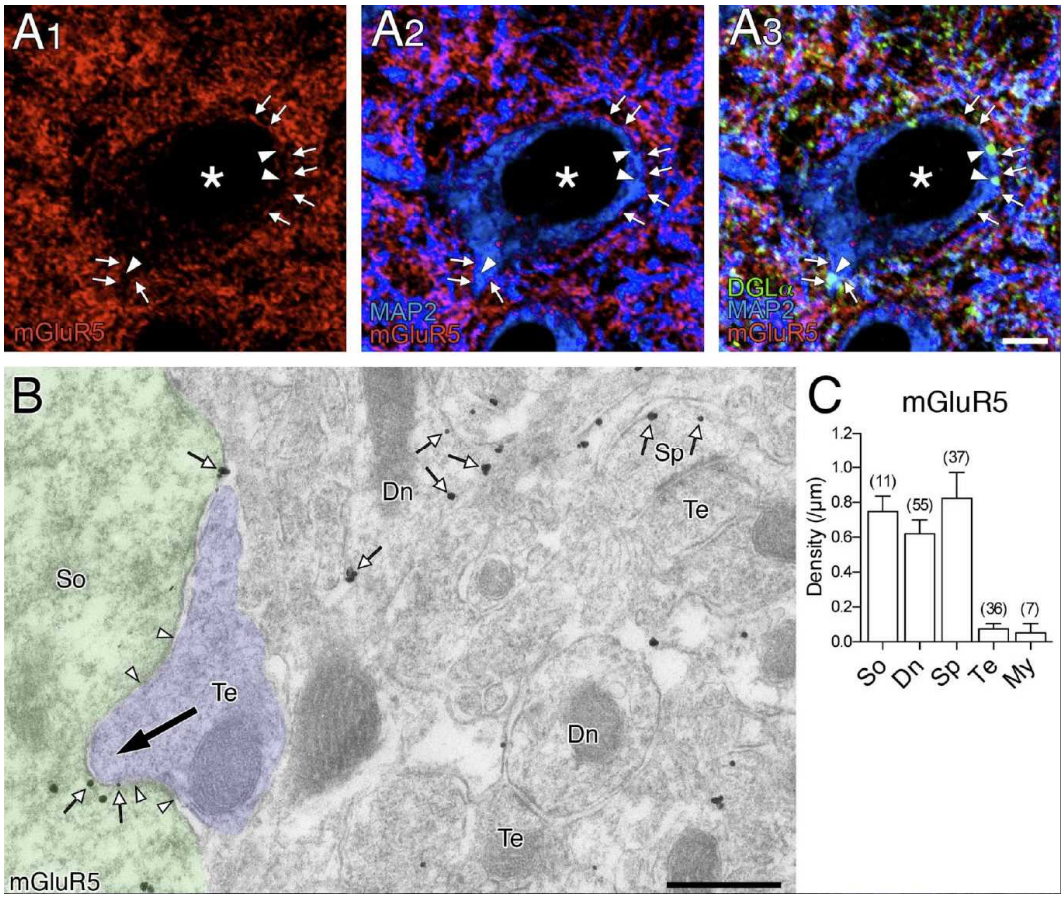

図 7 扁桃体基底核の錐体細胞における $mGluR_5$ のシナプス外発現

A：$mGluR_5$（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 $mGluR_5$ の発現が認められる。

B：$mGluR_5$ 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 $mGluR_5$ 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 μm；***B***、500 nm

VII. 扁桃体基底核の錐体細胞における CCK_2R 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_2R 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_2R 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_2R 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_2R 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）。

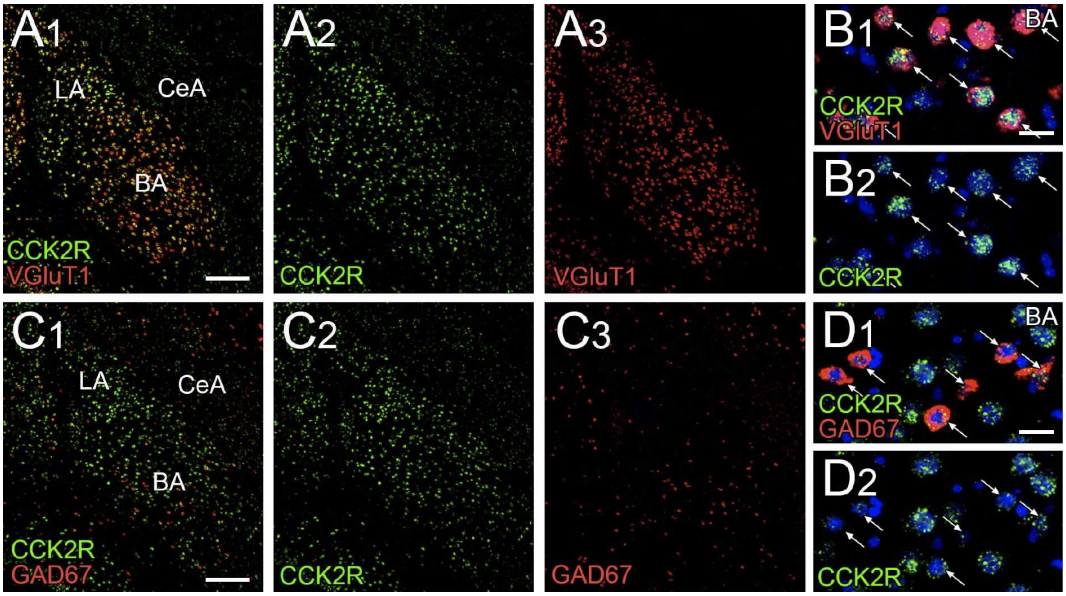

図 8 扁桃体基底核及の錐体細胞に CCK_2R mRNA が豊富に発現している

扁桃体基底核における CCK_2R 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_1/DGLα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_1 及び DGLα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_1、VIAAT（または DGLα）及び CaMKIIα 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_1^+/$VIAAT^+$終末が CaMKIIα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 DGLα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_1^+/$VIAAT^+$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、DGLα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、CaMKIIα標識された錐体細胞細胞体上に VGluT3 陽性の CB_1^+/$VIAAT^+$終末が１つ以上結合している錐体細胞の出現頻度と、DGLα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_1^+/$VIAAT^+$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、DGLα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_1^+/$VIAAT^+$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_1^+/$VIAAT^+$終末が結合し、かつ DGLα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。

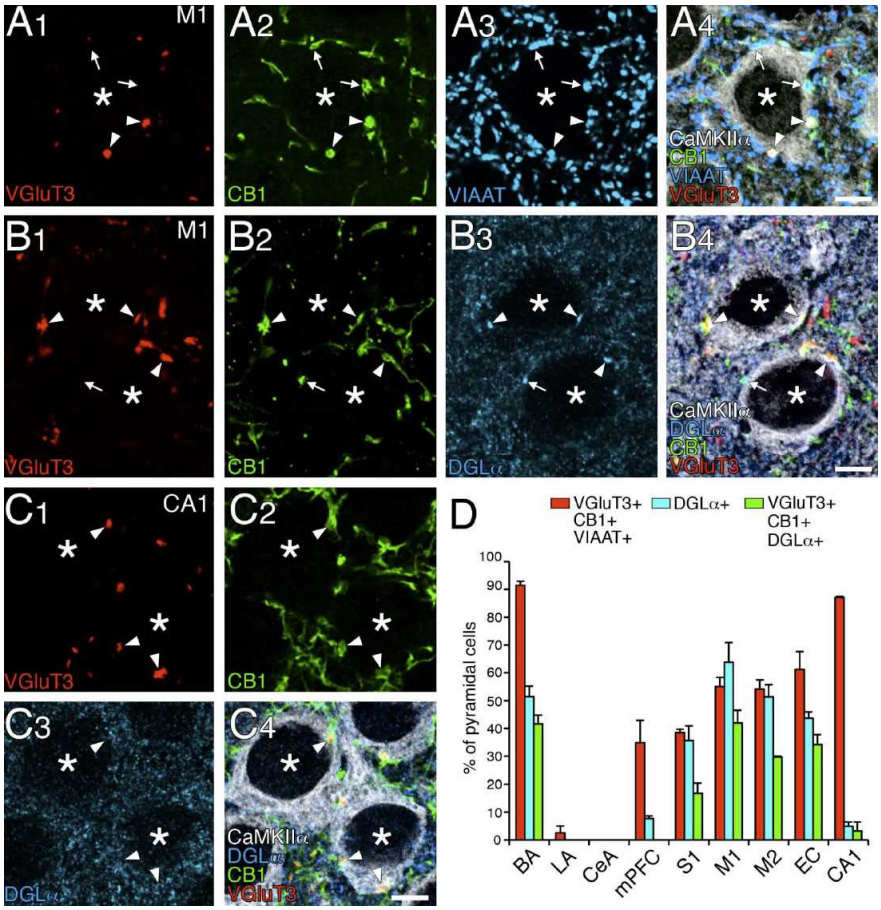

図 9 VGluT3/CB_1/DGLαが集積するバスケット細胞シナプスの皮質領域分布

A：一次運動皮質における VGluT3（赤）、CB_1（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 $CB1^+$/$VIAAT^+$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_1（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_1^+/$VIAAT^+$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_1^+/$VIAAT^+$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 CaMKIIα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 DGLa クラスターと対向していた（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、DGLαクラスターをもつ 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 DGLαクラスター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 DGLαのクラスター形成が観察された（図 10E）。以上の所見から、VGluT3/CB_1/ DGLα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。

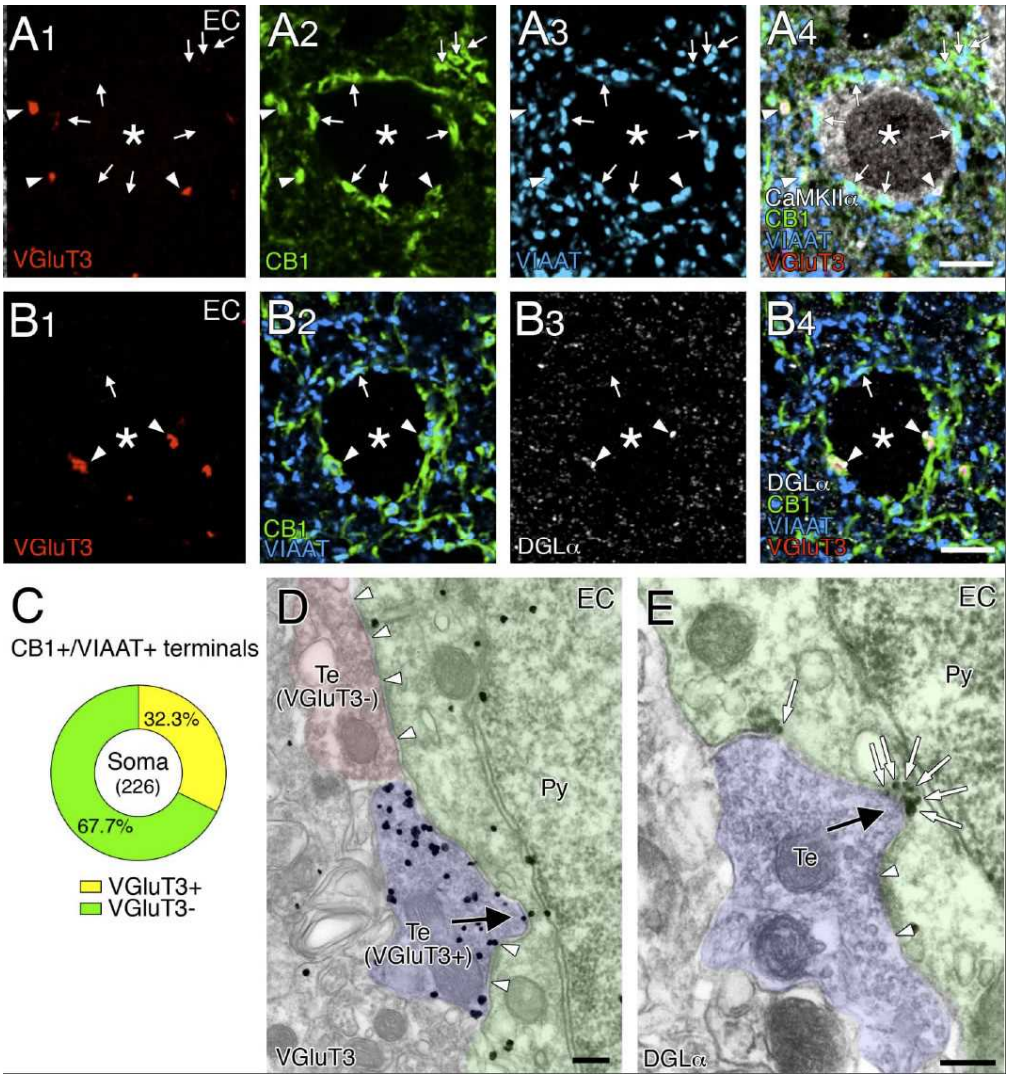

図 10 内嗅領皮質における VGluT3、CB1、DGLαをもつ陥入型シナプス

A : VGluT3（赤）、CB_1（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 $CB1^+$/$VIAAT^+$終末を示す。

B : VGluT3（赤）、CB_1（緑）、DGLα（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_1 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 $CB1^+$/$VIAAT^+$終末の割合を示す円グラフ。中央の数値は解析に用いた $CB1^+$/$VIAAT^+$終末の数を示す。

D、***E*** : 嗅内領皮質の VGluT3（***D***）及び DGLα（***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 μm ; ***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[34,35]。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_1 を高いレベルで発現するという特徴も備えている[25-28,46]。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、活動依存的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[48,49]。扁桃体基底核の CB_1 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_1 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 DGLαクラスターをもつ錐体細胞において VGluT3 陽性の CB_1 発現バスケット細胞終末の 81.7%が DGLαクラスター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_1 と DGLα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[34,43,50,51]。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[52-55]。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 $GABA_AR\alpha1$、$mGluR_5$ 及び CCK_2R の発現を検出した。この中で、$GABA_AR\alpha1$ 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、$mGluR_5$ 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 $mGluR_5$ 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[40,56,57]。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[33]、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_1 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[33,45,46,58,59]。また、グルタミン酸伝達に関する見解は、$mGluR_5$ 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[59]、海馬での CB_1 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[60]。

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われる。CCK と CCK_2R は扁桃体基底核において高レベルで発現しており[61-64]、本研究では、扁桃体基底核の錐体細胞に豊富な CCK_2R mRNA の発現を確認した。CCK_2R 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_2R 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[65,66]。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 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇、基礎レベルの $[Ca^{2+}]_i$ 下での強い $G\alpha_{q/11}$ タンパク共役型受容体の活性化、および $[Ca^{2+}]_i$ の上昇と $G\alpha_{q/11}$ 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[10,67]。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 $G\alpha_{q/11}$ タンパク共役型の $mGluR_5$ と CCK_2R 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_1 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 $mGluR_5$ と CCK_2R の活性化が閾値以下であったとしても、脱分極誘発性の $[Ca^{2+}]_i$ 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であろう。この 2-AG 産生の促進メカニズムに加え、CB_1 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_1 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[33]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、DGLα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_1 と向かい合う[33]。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_1 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_1 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[68-70]。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_1 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[71-73]。興味深いことに、CCK_2R と CB_1 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[74]。薬理学的な CB_1 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_2R 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[75]は CB_1 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_1 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[76]、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 DGLα集積の関連性

さまざまな皮質領域で、VGluT3 陽性の CB_1^+/$VIAAT^+$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、DGLα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_1、DGLα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 DGLα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 DGLαクラスターは内側前頭前野や海馬 CA1 では、CB_1 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 DGLα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_1/DGLα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 [33]。今回の研究では、扁桃体基底核の錐体細胞の中にも、DGLα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 DGLα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 DGLα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的および細胞依存的な制御を受けており、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_1 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 DGLα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_1 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_1 陽性バスケット細胞終末の大多数が DGLα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 $GABA_AR\alpha1$ 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、$G\alpha_{q/11}$ タンパク共役型の代謝型グルタミン酸受容体 $mGluR_5$ は錐体細胞のシナプス外膜に広く発現し、$G\alpha_{q/11}$ タンパク共役型の CCK 受容体である CCK_2R も錐体細胞に高いレベルで発現していた。

VGluT3、CB_1、DGLα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、そこにが DGLα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_1 と DGLα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 $G\alpha_{q/11}$ タンパク共役型の $mGluR_5$ と CCK_2R 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_1 と DGLα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_1 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的および状況依存的な微調整を行う。

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 Cbeta serves as a coincidence detector through its Ca2+ dependency for triggering retrograde endocannabinoid signal. *Neuron* **45**, 257-268 (2005).

8 Maejima, T. *et al.* Synaptically driven endocannabinoid release requires Ca2+-assisted metabotropic glutamate receptor subtype 1 to phospholipase Cbeta4 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 Hashimotodani, 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 serotoninergic 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 Lasztoczi, 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 cholecystokininergic 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).