

〈原著論文〉

シナプスマーカー VGLUT1, VGAT を用いた嗅球神経回路の 新たな形態学的解析

松野 岳志, 清蔭 恵美, 樋田 一徳

川崎医科大学解剖学, 〒701-0192 倉敷市松島577

抄録 嗅覚の一次中枢である嗅球の投射ニューロン（僧帽細胞, 房飾細胞）は, その樹状突起上で樹状突起間シナプスを形成したのちに, 高次の脳中枢に情報を伝達する. 従って, 僧帽細胞の突起上のシナプスの分布を明らかにすることは, 匂い情報調節を解析する上で必須である. 従来, シナプス結合を形態学的に同定するものは高解像度な電子顕微鏡による解析であった. しかし, 電子顕微鏡では, 観察できる領域は限られ, 広範囲の解析を行うのは困難であり, 僧帽細胞を厳密に同定することもできない. Vesicular glutamate transporter (VGLUT1) や vesicular GABA transporter (VGAT) などのシナプスマーカーの有用性が最近多くの脳領域で報告されており, これらのマーカーにより電子顕微鏡による解析以上に, 嗅球でも信頼性の高いシナプスの定量ができるかもしれない. 本研究では, 新たなマーカーによる, 樹状突起間シナプスの同定の有用性をマウスの嗅球で検討した. まず, 嗅球を抗 VGLUT1 抗体, 抗 VGAT 抗体で単染色し, 電子顕微鏡で観察すると, 非対称性シナプス, 対称性シナプスのシナプス終末がそれぞれ標識されることが確認できた. 次に単一の僧帽細胞をウイルスベクター注入により標識し, 抗 VGLUT1 抗体, 抗 VGAT 抗体で多重染色して, 僧帽細胞と VGLUT1, VGAT との共存部位を共焦点レーザー顕微鏡で観察した. 次に同部位を電子顕微鏡で同定し, 微細構造を解析した. その結果, VGLUT1 陽性部位のうち 82% に非対称性シナプス, VGAT 陽性部位のうち 79% に対称性シナプスが電子顕微鏡で同定でき, VGLUT1, VGAT が, 嗅球のシナプスの質的な解析や定量のためのマーカーとして信頼できると結論づけた. また, 抗 VGLUT1 抗体, 抗 VGAT 抗体で二重染色したものを, 高解像度でモニタージュ撮影すると, VGLUT1 が外網状層を中心, VGAT が糸球体層に多く分布し, 外網状層に中等度分布するなど, 新たな知見が得られた. これらの結果は, VGLUT1 と VGAT が, シナプスの同定や広範囲の脳領域のシナプスの分布を解析するために有用なマーカーであることを示している.

doi:10.11482/KMJ-J42(2)127 (平成28年8月23日受理)

キーワード: シナプス, 樹状突起, VGAT, VGLUT1, シンドビスウイルス, 三次元構造解析, 嗅覚系

緒言

嗅覚における一次中枢である嗅球に, 嗅神経からもたらされた匂い情報は, 高次の中枢に伝達される前に嗅球内で調節を受けるとい

が知られている¹⁾.

嗅球には, 僧帽細胞と房飾細胞という2種類の投射ニューロンが存在している. これらのニューロンは, 一次樹状突起を嗅球表層の

単一の糸球体へと放射状に伸ばし、糸球体内で Tuft と呼ばれる房状に分岐した樹状突起で匂い情報を受け取り、軸索を介して嗅皮質に情報を伝達する²⁾。一方、これらの投射ニューロンは、外網状層 (EPL) 内を接線方向に水平に伸長する二次樹状突起も持ち、Tuft や二次樹状突起上で '相反性シナプス' と呼ばれる特徴的なシナプスを形成する。相反性シナプスは、二次樹状突起から介在ニューロンへの非対称性シナプス (興奮性) と介在ニューロンから二次樹状突起への対称性シナプス (抑制性) が隣接して形成されるものであり²⁾、それぞれの領域で細胞体に伝わる匂い情報の調節³⁻⁵⁾や嗅皮質への出力量の調節に寄与していると考えられている^{1, 6, 7)}。したがって、嗅覚情報の処理をより深く学ぶためには、この様なシナプスがそれぞれの投射ニューロン上でどのように分布しているかを知る必要がある。しかし、シナプスの同定は高解像度の電子顕微鏡でしか行えないこと、僧帽細胞と房飾細胞を電子顕微鏡のみで識別するのは不可能であること、僧帽細胞や房飾細胞は2000 μm を越える突起を伸ばすなど電子顕微鏡で観察するには大きすぎること、複数の投射ニューロンが入り乱れて存在していることなどから、シナプスの分布に関する報告は、細胞体や突起の一部など極めて限られた範囲での報告に留まっている⁸⁻¹¹⁾。

Vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) や vesicular GABA transporter (VGAT) は、グルタミン酸や GABA をシナプス小胞内に取り込むトランスポーターで、それぞれグルタミン酸作動性ニューロンや GABA 作動性ニューロンのシナプ終末に局在する¹²⁻¹⁵⁾。これらは、これまでのニューロンマーカーと比べ、より選択的に局在すること、トランスポーターであるために機能的に有効なシナプスに存在している可能性が高いことなど、シナプスマーカーとしての優れた特徴を持つ。実際に、様々な脳領域において、抗 VGLUT1抗体や抗 VGAT 抗体を用いたシナプスの同定やその分布の精査がなされている¹⁶⁻¹⁸⁾。上記の抗体を用いれば、投射ニュー

ロン上に存在するシナプスの位置を、電子顕微鏡を用いずに広範囲に解析することが可能となる。嗅球においても、抗 VGLUT1抗体や抗 VGAT 抗体を用いた報告はあるが^{14, 19, 20)}、選択的に単一の僧帽細胞を標識するのはこれまで不可能であり、故に僧帽細胞上の VGLUT1, VGAT がはたして嗅球ニューロンの樹状突起上でシナプスを標識するの可否かは、免疫電子顕微鏡法を用いて検討する必要がある。近年、ウイルスベクターを用いた単一ニューロン標識法が盛んに行われるようになってきており、シンドビスウイルスは、細胞体の大きな投射ニューロンを標識するのに優れていると提唱されるようになってきた^{21, 22)}。このウイルスを用いることで、単一の僧帽細胞を選択的かつ詳細に標識し、嗅球神経回路の主ニューロンに特徴的なシナプスの定量が初めて可能となる。

本研究は、シンドビスウイルスにより単一の僧帽細胞を標識し、蛍光多重染色で僧帽細胞に VGLUT1や VGAT が存在する部位に実際に形態学的にシナプスが存在するかを電子顕微鏡で確認し、シナプスマーカーがシナプス定量に有用であるかを検証して、シナプス分布の広範囲にわたる定量的解析のための新たな形態学的基盤を構築することを目的としたものである。

材料と方法

動物

本研究には、生後8~12週齢の C57BL/6J マウス (日本 SLC) を20匹 (雄16匹, 雌4匹) 用いた。すべての動物実験は、川崎医科大学動物実験委員会の承認を受けており (No.13-034)、川崎医科大学動物実験指針に従って行われた。

マウスをペントバルビタールナトリウム (共立製薬, Japan) の腹腔内注射 (0.1 ml/100 g) により深麻酔させた後、4%パラホルムアルデヒドと0.05%グルタルアルデヒドを含む0.1 M リン酸塩緩衝液 (PB) で心臓より灌流固定を行った。脳を取り出し同一の固定液につけて1日間液浸固定した後、嗅球をビプラトーム (Leica VT1200s, Germany) を用いて50 μm 厚

の冠状断連続切片を作製し, 0.1 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に保存した。

僧帽細胞のウイルスベクターによる標識

8匹 (雄7匹, 雌1匹) のマウスは, シンドビスウイルスによる僧帽細胞の選択的標識に用いられた。マウスを深麻酔させた後, 定位脳固定装置 (SR-5M-HT, Narishige, Japan) にて固定し, palmitoylation site を結合した green fluorescent protein (palGFP, 0.13×10^{10} IU/ml) や monomeric red fluorescent protein (palmRFP, 0.67×10^{10} IU/ml) を発現するシンドビスウイルス^{21, 22)} (京都大学金子武嗣教授, 古田貴寛准教授より供与) および0.5% 牛血清アルブミン (BSA) を含む PBS を嗅球の僧帽細胞層 (MCL) (Bregma から前方4.3 mm, 側方0.4 mm, 深度1.6 mm) へ Hamilton syringe (3005FN, Norgren Kloehn, USA) により注入し, 48時間後に灌流固定した。50 μ m 厚の切片を作製後, 光学顕微鏡で観察し (Olympus BX61 Olympus, Japan, Uplan Apo 40x/0.85), 細胞体が MCL に存在すること, Tuft が顆粒細胞層 (GCL) に存在すること, 二次樹状突起を水平方向に伸ばすことなどの形態的特徴から僧帽細胞を同定した^{2, 23)}。

免疫組織化学法

(1) 免疫単染色

50 μ m 厚に切断した切片を1%BSA と0.5% アジ化ナトリウムを含有する PBS で1時間ブロッキングし, 以下に示す抗体のうち1種類を3日間反応させた:(1)抗 GABA 抗体 (mouse anti-GABA IgG, 1:5000, Swant, Switzerland), (2)抗 glutamate decarboxylases of 65kDa and 67kDa (GAD65/67) 抗体 (rabbit anti-GABA65/67 IgG, 1:5000, Chemicon International, USA), (3)抗 VGLUT1 抗体 (mouse anti-VGLUT1 IgG, 1:1000, Synaptic Systems, Germany), (4)抗 VGAT 抗体 (rabbit anti-VGAT IgG, 1:5000, MilliporeSigma, USA), (5)抗 parvalbumin (PV) 抗体 (mouse anti-PV IgG, 1:5000, Swant), (6)抗 post synaptic density

95 kDa (PSD95) 抗体 (mouse anti-PSD95, 1:250, Affinity BioReagents, USA), (7)抗 gephyrin 抗体 (mouse anti-gephyrin, 1:5000, Synaptic Systems). PBS で洗浄したのちに, 切片は biotin 標識された二次抗体 (anti-mouse IgG, 1:200, Jackson ImmunoResearch, USA または anti-rabbit IgG, 1:200, Jackson ImmunoResearch) に2時間反応させた。PBS で洗浄後, 切片を Avidin-Biotin complex 法で2時間反応させ (ABC kit, 1:200, Standard Variety, Vector Laboratories, USA), ペルオキシダーゼ反応を0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Dojindo, Japan) で可視化させた (以上はすべて20°Cで行った)。PB で洗浄した後に, 3% グルタルアルデヒドで30分, 0.1% 四酸化オスミウム溶液で30分水上にて後固定を行った。その後, 室温にてエタノール溶液で段階的に脱水し, 酸化プロピレンに置換して樹脂への浸透性を高め, 60°C でエポニーアルアルダイト混合樹脂 (TAAB Laboratories Equipment Ltd, England) にて包埋を行った。

(2) 多重蛍光染色

僧帽細胞を含む切片を1%BSA と0.5% アジ化ナトリウムを含有する PBS で1時間ブロッキングし, 以下に示す抗体のうち最大4つの抗体を組み合わせて5-7日間反応させた。本研究で用いられた一次抗体は以下の通りである。(1)抗 GFP 抗体 (chicken anti-GFP IgY, 1:10000, Life Technologies, USA), (2)抗 mRFP 抗体 (guinea pig anti-mRFP IgG, 1:5000, 京都大学金子教授より供与), (3)抗 VGLUT1 抗体 (mouse-anti VGLUT1 IgG, 1:1000, Synaptic Systems), (4)抗 VGAT 抗体 (rabbit anti-VGAT IgG, 1:5000, MilliporeSigma), (5)抗 PV 抗体 (goat anti-PV IgG, 1:5000, Swant). PBS で洗浄したのちに, 切片は biotin 標識された二次抗体 (anti-chicken IgY, 1:200, Jackson ImmunoResearch または anti-guinea pig IgG, 1:200, Jackson ImmunoResearch) に2時間反応させた。次に, 以下の蛍光標識二次抗体を組み合わせて反応させた:(1)Alexa488-Conjugated Streptavidin (1:200, Life Technologies), (2)Alexa555-Conjugated

Streptavidin (1:200, Life Technologies), (3)fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗ウサギ IgG 抗体 (donkey anti-rabbit IgG, 1:200, Jackson immunoresearch), (4)Cy3標識抗マウス IgG 抗体 (donkey anti-mouse IgG, 1:200, Jackson immunoresearch), (5)Cy3標識抗ヒツジ IgG 抗体 (donkey anti-goat IgG, 1:200, Jackson immunoresearch), (6)Alexa Fluor 647標識抗ウサギ IgG 抗体 (donkey anti-rabbit IgG, 1:200, Jackson immunoresearch), (7)DyLight 405標識抗マウス IgG 抗体 (donkey anti-mouse IgG, 1:200, Jackson immunoresearch). 切片の一部は、その後 Hoechst (1:200, MilliporeSigma) に反応させた。それぞれの過程毎に PBS で10分間の洗浄を3回行った。蛍光標識した切片は、VECTASHIELD (Vector Laboratories) で封入後、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700, Zeiss, Germany, planApochromat 63x/1.40 oil, A1R-MP, Nikon, Japan, apochromat x25/NA 1.4 water) で観察撮影を行った。観察後、蛍光標識標本のカバーガラスを剥がし、PBS で洗浄して、切片を ABC 溶液で2時間反応させ、ペルオキシダーゼ反応を DAB で可視化させた(以上はすべて20℃で行った)。PBで洗浄した後に、3%グルタルアルデヒドで30分、0.1%四酸化オスミウム溶液で30分水氷にて後固定を行い、室温にてエタノール溶液で段階的に脱水し、酸化プロピレンに置換して樹脂への浸透性を高め、60℃でエポキシ樹脂にて包埋を行った。

電子顕微鏡による観察

上記のように DAB にて置換した後、電子顕微鏡で標本を観察する為に、以下のような行程を行った。3%グルタルアルデヒドで30分、1%四酸化オスミウム溶液で1時間氷上にて後固定をし、室温にて2%酢酸ウラン水溶液によるブロック電子染色をした。その後、室温にてエタノール溶液で段階的に脱水し、酸化プロピレンに置換して樹脂への浸透性を高め、60℃でエポキシ樹脂包埋を行った。光学顕微鏡で確認した後 (Olympus BX61 Olympus, Uplan Apo 40x/0.85), カバーガラスを剥離して、エ

ボン円柱に再包埋し、ウルトラマイクロトーム (Reichert-Nissei Ultra-Cuts, Leica) を用いて75 nm 厚の超薄切連続切片を作製した。超薄切片は、透過型デジタル電子顕微鏡 (JEM-1400, JEOL, Japan) を用いて観察した。

VGLUT1, VGAT 陽性部位のシナプスの同定

VGLUT1, VGAT 陽性部位にシナプスが存在するかを調べるために、GFP もしくは mRFP で標識した僧帽細胞を含む切片を、抗 GFP 抗体または抗 mRFP 抗体と抗 VGLUT1 抗体、抗 VGAT 抗体で上記手順により標識し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700, Zeiss, planApochromat 63x/1.40 oil) にて0.3 μm ステップで連続光学的断面画像撮影を行い、標識された僧帽細胞と VGLUT1, VGAT が共存している部位を確認した。その後、上記の電顕包埋を行い、共存部位を透過型デジタル電子顕微鏡 (JEM-1400, JEOL) で同定し、微細構造を解析した。

定量解析

3匹のマウスの50 μm 厚の切片を50枚ずつ作製し、層構造が典型的に観察できる切片をそれぞれ3枚ずつ選択して、抗 VGLUT1抗体、抗 VGAT 抗体を用いた二重染色を上記手順により行った。そして、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700, Zeiss, planApochromat 63x/1.40 oil) で観察し、その中で形態的解析に最も適した領域をマウス1匹につき1箇所ずつ選択し、嗅球のGCLから糸球体層(GL)までが観察できる範囲でモニター撮影した(縦6画像×横2画像)。得られた画像の各領域の輝度の平均をImage J (National Institutes of Health, USA) を用いて計測し、EPLの内側部(EPLi)を基準として、相対的な輝度を計算した。統計解析はpaired t検定を用い、それぞれ $P < 0.05$ を有意差ありとした。

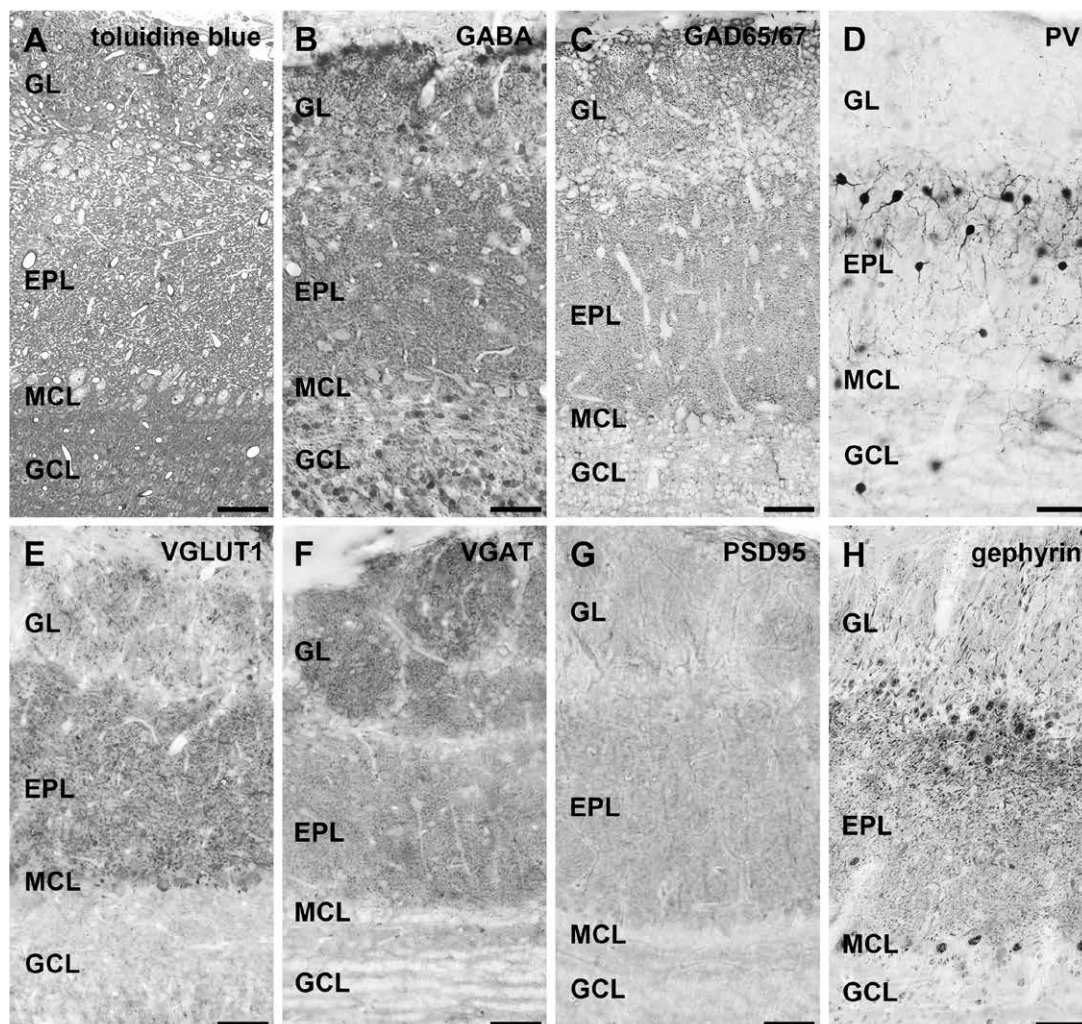


図1. 嗅球内のニューロンマーカーやシナプスマーカーの免疫単染色像

嗅球をA) toluidine blue, B) GABA, C) GAD65/67, D) PV, E) VGLUT1, F) VGAT, G) PSD95, H) gephyrinで標識した。GABAやGAD65/67は、嗅球全層にわたって存在しており、PVはEPL, 特にEPLの外側に分布している。一方、シナプスマーカーであるVGLUT1, VGAT, PSD95, gephyrinはGLやEPLにより多く存在している。Abbreviation: GL; 糸球体層, EPL; 外網状層, MCL; 僧帽細胞層, GCL; 顆粒細胞層, GAD65/67; glutamate decarboxylases of 65kDa and 67kDa, PV; parvalbumin, VGLUT1; vesicular glutamate transporter1, VGAT; vesicular GABA transporter, PSD95; post synaptic density 95 kDa, bar: A-H; 50 μ m

結果

嗅球内のニューロン及び、シナプスマーカーの分布

嗅球を toluidine blue, ニューロンマーカー (GABA, GAD65/67, PV), シナプスマーカー (VGLUT1, VGAT, PSD95, gephyrin) で単染色した。核や樹状突起などを標識する toluidine blue で染色すると、これまでも報告されてい

るように²⁴⁾, 浅層から深層まで様々な細胞群がそれぞれの位置に存在し、嗅球が独自の層構造を形成していることが確認できた。また、介在ニューロンの多くに発現する GABA, GAD65/67などのニューロンマーカーは嗅球の全層に存在し、特にGLやEPLに多く存在しており(図1B, C), PVを発現する介在ニューロンはEPL, 特に外側のEPL (EPLo)に多く

存在していた (図 1 D). しかし, 非対称性シナプスのシナプス終末に局在する VGLUT1, シナプス後部に局在する PSD95, 対称性シナプスのシナプス終末に局在する VGAT, シナプス後部を局在する gephyrin は, GL や EPL に, ニューロンマーカーの分布以上に偏在していた (図 1 E, F, G, H). 特に, gephyrin は EPLo により多く存在していた. したがって, 介在ニューロンの分布を観察するだけでは, ニューロン間の情報交換を推測することは難しく, 嗅球内の局所回路を解明する上で, ニューロン標識に加えてシナプスの分布, 特に投射ニューロン上のシナプスの分布を解析することが必須となる.

僧帽細胞の選択的標識

単一の僧帽細胞上のシナプスの分布を調べるために, シンドビスウイルスを用いて僧帽細胞を選択的に標識した (図 2 A). 蛍光標識された単一ニューロン像からは, 細胞体が MCL にあること, Tuft が GCL に存在すること, そして二次樹状突起が嗅球の各層と水平方向に伸びることなどの特徴的な形態が表出され, 形態学的に僧帽細胞と同定された. このように標識された僧帽細胞を含む切片を, VGLUT1 や VGAT などのシナプスマーカーや介在ニューロンのマーカーである PV に対する抗体を用いて多重染色することで, 僧帽細胞の樹状突起と VGLUT1 や VGAT, PV が共存している部位を同定し, 僧帽細胞の樹状突起と介在ニューロンが形成するシナプスの位置を推測することができた (図 2 B, C, D, E). 次に, 電子顕微鏡を用いて VGLUT1, VGAT のシナプスマーカーとしての信頼性を確認することとした.

VGLUT1, VGAT 陽性部位の解析

図 1 E, F のように, 抗 VGLUT1 抗体, 抗 VGAT 抗体で染色し, DAB で置換した切片を, さらに電顕用超薄切片とし, 透過型デジタル電子顕微鏡で観察した. 抗 VGLUT1 抗体で染色したものは非対称性シナプスのシナプス終末が

(図 3 A, 矢印), 抗 VGAT 抗体で標識したものは対称性シナプスのシナプス終末が (図 3 B, 矢頭) それぞれ標識されていた. 次に, 僧帽細胞と VGLUT1, VGAT が共存する部位を共焦点レーザー顕微鏡で観察し, その領域に実際に非対称性シナプス, 対称性シナプスが存在するかどうかを電子顕微鏡で確認した. VGLUT1 では 4 匹のマウス, VGAT では 5 匹のマウスを使って比較を行った. VGLUT1 陽性部位 (図 4 A3 矢印) のうち 83% に非対称性シナプス (図 4 A4 矢印) が存在していた (36 か所の VGLUT1 陽性部位のうち, 30 か所で非対称性シナプスが存在した). また, VGAT 陽性部位 (図 4 B3 矢頭) のうち 79% に対称性シナプス (図 4 B4 矢頭) が存在し (42 か所の VGAT 陽性部位のうち, 33 か所で対称性シナプスが存在した), 僧帽細胞と VGLUT1, VGAT が共存する部位にシナプスが存在する可能性が高いことが示された. 以上のことから, VGLUT1, VGAT はシナプスマーカーとしての信頼性を得た.

VGLUT1, VGAT の嗅球各層での分布

図 1 で観察したように, 嗅球の各層には介在ニューロンが存在し, それぞれの層でシナプスを形成しているということが考えられた. シナプスマーカーである, VGLUT1, VGAT を嗅球で標識し, 各層でのこれらの免疫反応性を比較することで, シナプスを介した匂い情報の調整がどこを中心として行われているかを推測することができる. まず, 3 匹のマウスで VGLUT1, VGAT を二重染色し, 共焦点レーザー顕微鏡でマウス毎に 1 箇所ずつモニタージュ撮影をした. その結果, VGLUT1 は EPL 中心に分布し, VGAT は GL に高度に分布し, EPL に中等度存在していた (図 5). 続いて, 各層の輝度の平均を計算し, より詳細に比較を行った. EPL は, 外側と内側で, 突起を伸ばす投射ニューロンが異なること^{1, 25)}, PV ニューロンの分布が異なること²⁶⁾, 突起を伸ばす顆粒細胞の細胞体が別々の位置にあること¹⁾などの違いがあるため, この解析では EPL を EPLo と EPLi に分

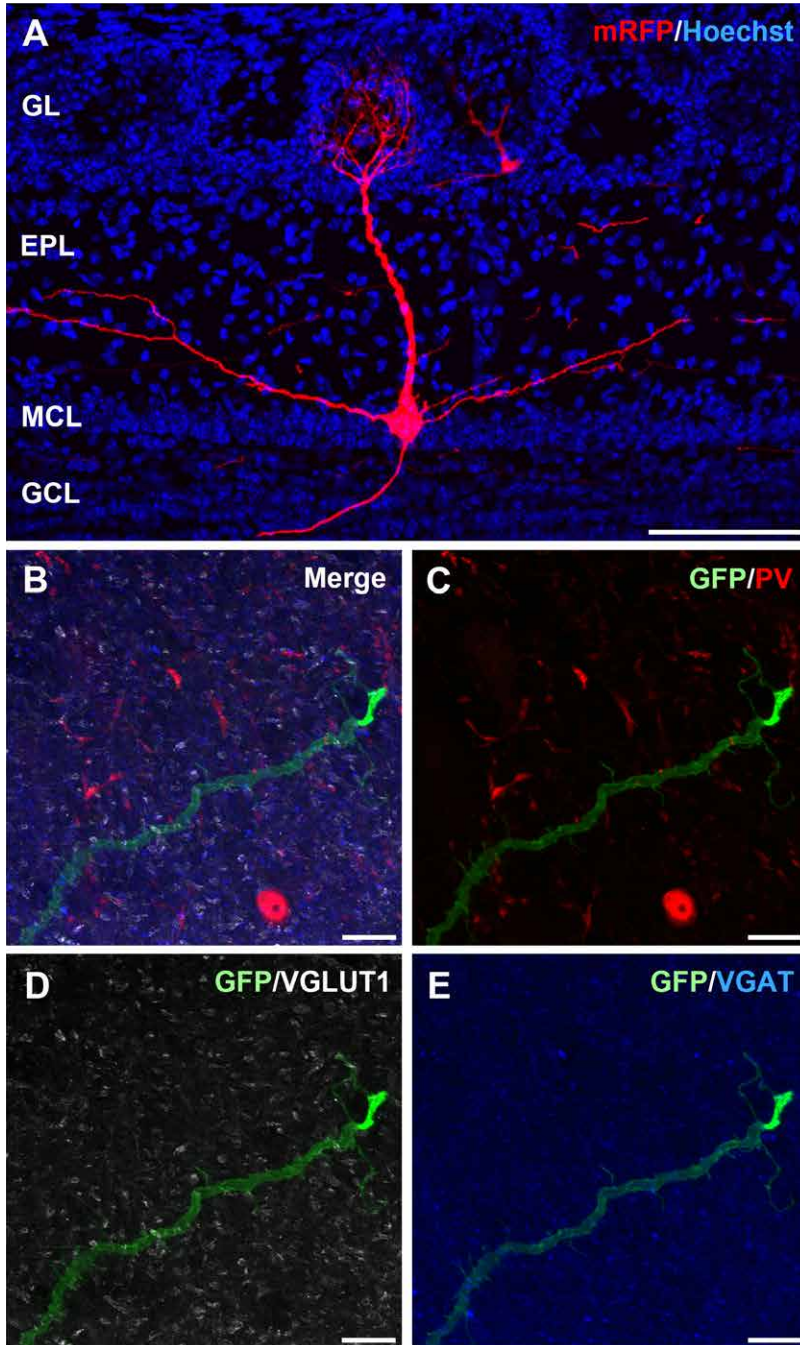


図2. 僧帽細胞とシナプスマーカー、ニューロンマーカーの共存

A) 僧帽細胞をウイルスベクターにより標識した (赤). MCLに細胞体, GLにTuft, EPLに二次樹状突起が存在する.
 B-E) GFPで標識した僧帽細胞 (緑) を抗VGLUT1抗体 (白), 抗VGAT抗体 (青), 抗PV抗体 (赤) で多重染色し, 共焦点レーザー顕微鏡で撮影した画像を最大値投影法で示した. GFPとVGAT, VGLUT1が共存する部分には, 僧帽細胞上に対称性シナプスや非対称性シナプスが存在していること, PVがVGLUT1と隣接するかVGATと共存する部分では, PV陽性ニューロンと僧帽細胞によりシナプスが形成されていることが推測できる. Abbreviation: GL; 糸球体層, EPL; 外網状層, MCL; 僧帽細胞層, GCL; 顆粒細胞層, mRFP; monomeric red fluorescent protein, GFP; green fluorescent protein, PV; parvalbumin, VGLUT1; vesicular glutamate transporter1, VGAT; vesicular GABA transporter, bar: A; 100 μ m, B-D; 10 μ m

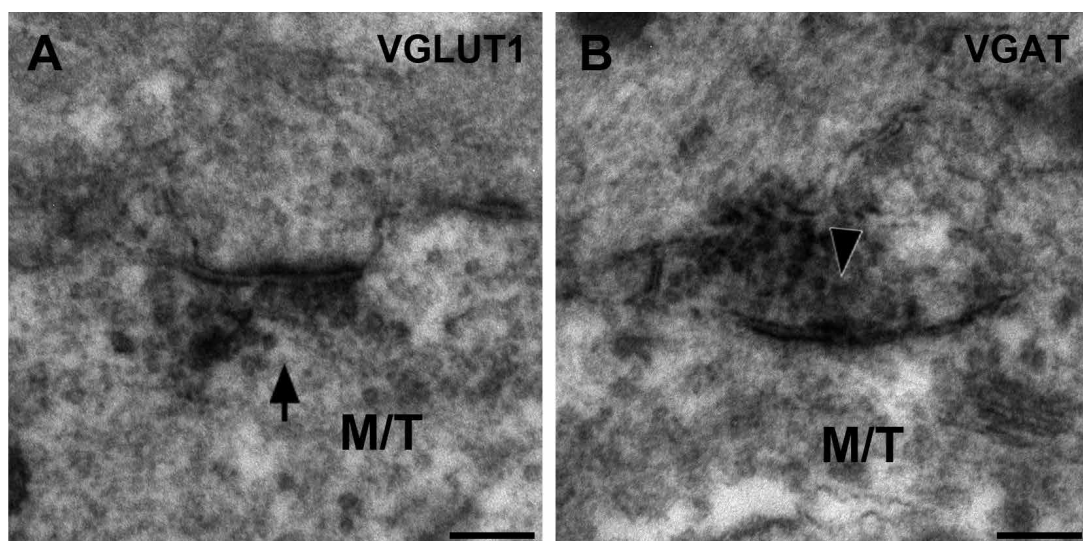


図3. 免疫電子顕微鏡像

A) VGLUT1の免疫染色像. VGLUT1陽性部位は, 非対称性シナプスのシナプス終末となっている (矢印). B) VGATの免疫染色像. VGAT陽性部位は, 対称性シナプスのシナプス終末となっている (矢頭). Abbreviation: VGLUT1; vesicular glutamate transporter1, VGAT; vesicular GABA transporter, M/T; 僧帽細胞/房飾細胞, bar: A, B; 200 nm

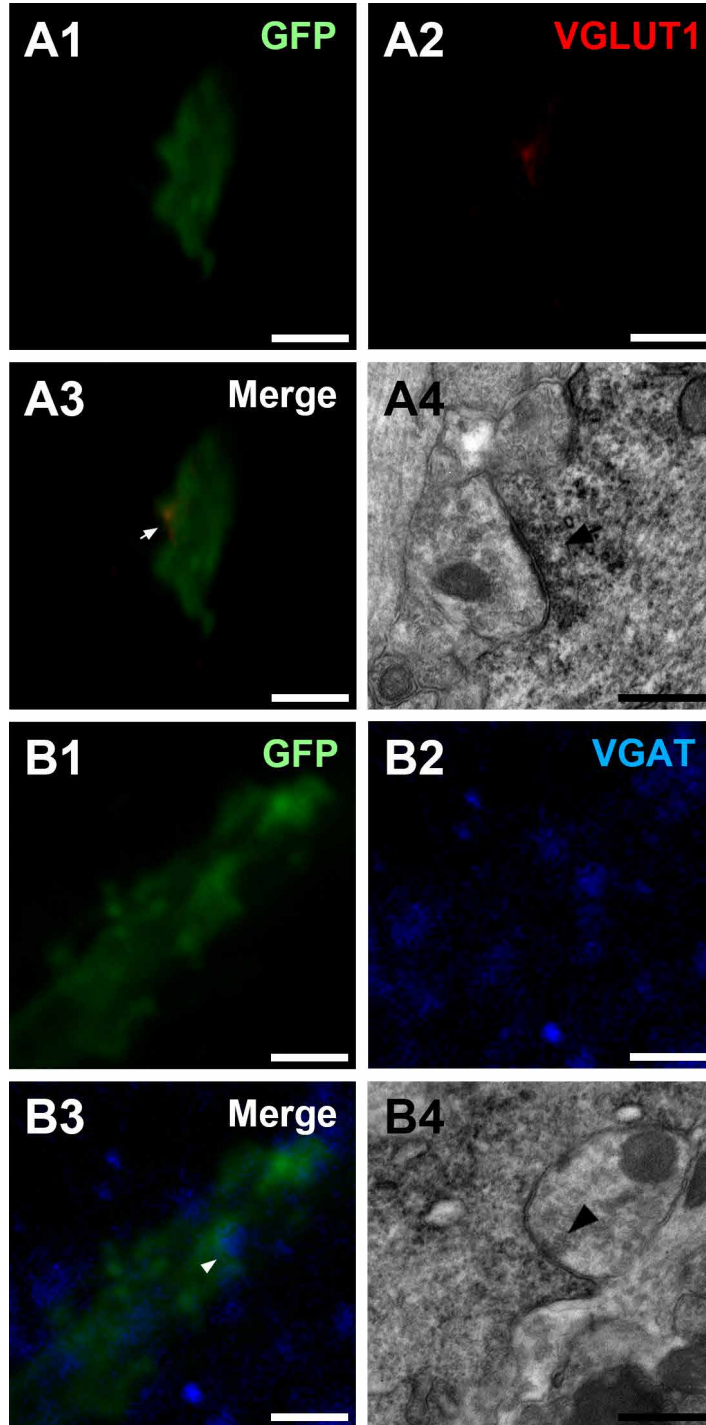


図4. 共存部位の共焦点レーザー顕微鏡像と同部位の電子顕微鏡像
 A1-A3) GFPで標識した僧帽細胞とVGLUT1の二重染色像. 共存部位が確認できる(白矢印). A4) 同部位の電子顕微鏡像. 非対称性シナプスが認められる(黒矢印). B1-B3) GFPで標識した僧帽細胞とVGATの二重染色像. 共存する部位が確認できる(白矢頭). B4) 同部位の電子顕微鏡像. 対称性シナプスが認められる(黒矢頭). Abbreviation: VGLUT1; vesicular glutamate transporter1, VGAT; vesicular GABA transporter, bar: A1-3, B1-3; 2 μ m, A4, B4; 500 nm

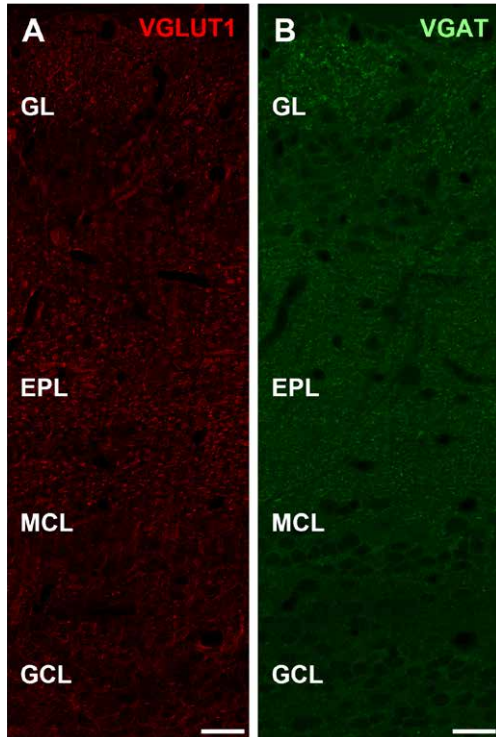


図5. VGLUT1, VGATのモンタージュ画像
抗VGLUT1抗体, 抗VGAT抗体の二重染色後, 共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700, planApochromat 63x/1.40 oil) を用い, 高解像度でモンタージュ撮影 (縦6画像×横2画像) した。A) VGLUT1のモンタージュ画像。B) VGATのモンタージュ画像。VGLUT1がEPLを中心に分布しており, VGATがGLに多く分布し, EPLに中等度存在している。
Abbreviation: GL; 糸球体層, EPL; 外網状層, MCL; 僧帽細胞層, GCL; 顆粒細胞層, VGLUT1; vesicular glutamate transporter1, VGAT; vesicular GABA transporter. bar: A, B; 20 μ m

けることとした。そして, EPLiを基準として相対的な輝度を計算した結果, VGLUT1はEPLiで最も多く, EPLoほぼ同程度に存在しており, その他の領域にも中等度存在していた。また, GLとEPLi, GLとEPLoの間には有意な差が認められた (図6 A, $GL=0.82 \pm 0.05$, $EPLo=0.96 \pm 0.08$, $EPL=1$, $MCL=0.83 \pm 0.12$, $GCL=0.81 \pm 0.10$, $GL-EPLo: P<0.05$, $GL-EPLi: P<0.05$, $GL-MCL: P=0.810$, $GL-GCL: P=0.878$, $EPLo-EPLi: P=0.422$, $EPLo-MCL: P=0.210$, $EPLo-GCL: P=0.137$, $EPLi-MCL: P=0.093$, $EPLi-GCL: P=0.052$, $MCL-GCL: P=$

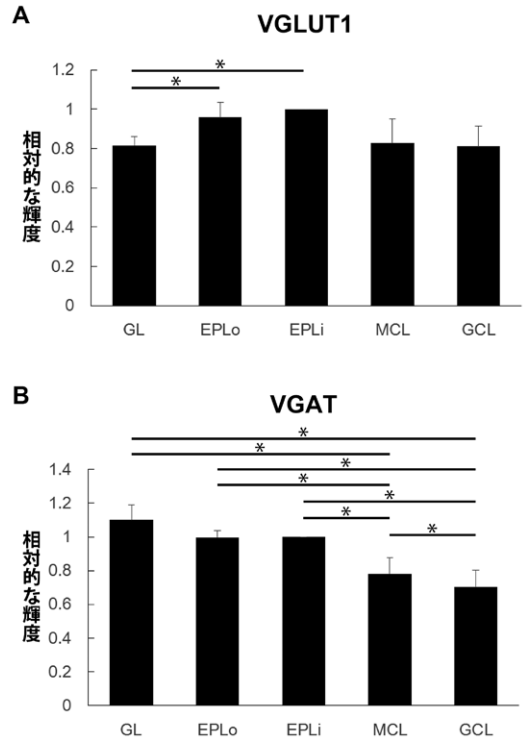


図6. 嗅球各層の相対的な輝度

VGLUT1, VGATの輝度をEPLiを基準にして計算した。VGLUT1では, EPLi, EPLoで最も高く, その他の領域は中等度であった。また, GLとEPLi, GLとEPLoの間には有意な差が認められた ($P<0.05$)。VGATでは, GLでもっとも高く, EPLiとEPLoでは中等度であり, GCLで最も低かった。GLとGCL, GLとMCL, EPLoとGCL, EPLoとMCL, EPLiとGCL, EPLiとMCL, MCLとGCLの間には有意差が認められた ($P<0.05$)。Abbreviation: GL; 糸球体層, EPLo; 外側の外網状層, EPLi; 内側の外網状層, MCL; 僧帽細胞層, GCL; 顆粒細胞層, VGLUT1; vesicular glutamate transporter1, VGAT; vesicular GABA transporter. * $P<0.05$

0.305)。一方, VGATは, GLで最も多く, EPLiとEPLoでは中等度, MCLにも軽度存在し, GCLで最も少なかった。また, GLとEPLo, GLとEPLi, EPLoとEPLiの間以外では有意差が認められた (図6 B, $GL=1.10 \pm 0.09$, $EPLo=0.99 \pm 0.04$, $EPL=1$, $MCL=0.78 \pm 0.09$, $GCL=0.70 \pm 0.10$, $GL-EPLo: P=0.208$, $GL-EPLi: P=0.137$, $GL-MCL: P<0.05$, $GL-GCL: P<0.05$, $EPLo-EPLi: P=0.916$, $EPLo-MCL: P<0.05$, $EPLo-GCL: P<0.05$, $EPLi-MCL: P<0.05$, $EPLi-GCL: P<0.05$, $MCL-GCL: P<0.05$)。

考 察

本研究で、我々は共焦点レーザー顕微鏡と電子顕微鏡を用いて、シナプスマーカーである VGLUT1, VGAT の陽性部位に実際にシナプスが存在するかを解析した。その結果、僧帽細胞と VGLUT1, VGAT が共存する部位には、高い確率でシナプスが存在することを初めて同定し、これらのマーカーが樹状突起間シナプスであっても有用であることを証明した。また、

VGLUT1, VGAT の嗅球の各層の分布を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察し、VGLUT1が EPL を中心に分布していること、VGAT が GL に多く分布し、EPL に中等度分布していることを明らかにした。

シナプスマーカーとしての VGLUT1, VGAT
VGLUT1, VGAT は、グルタミン酸, GABA をシナプス小胞内に輸入するトランスポーター

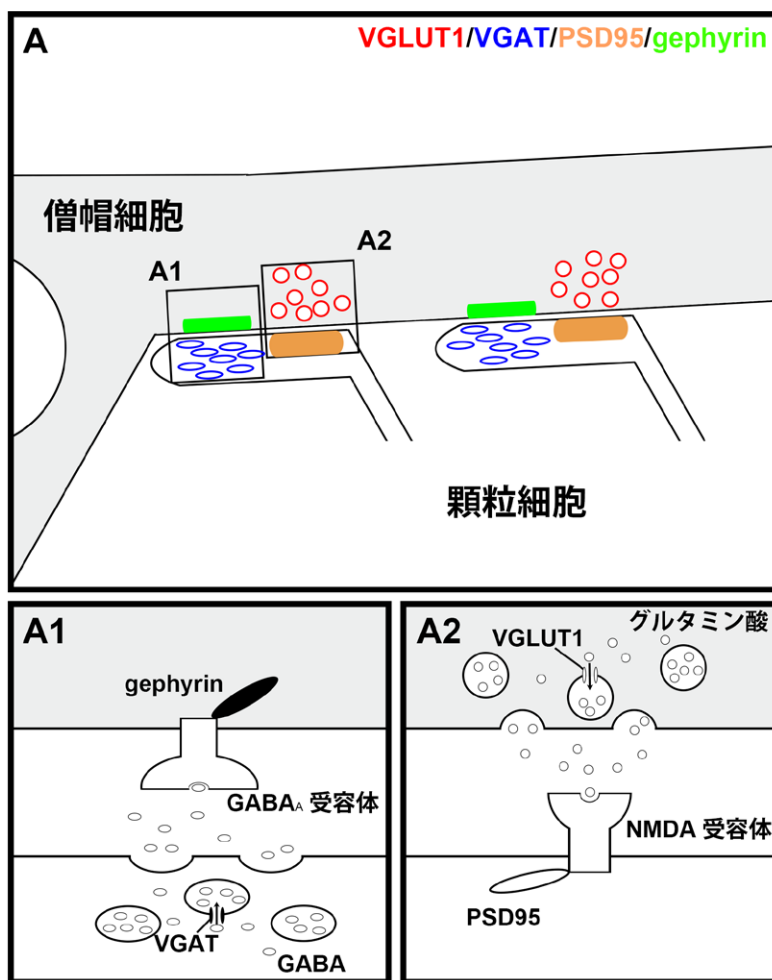


図7. シナプスマーカーの模式図

A) 4種のシナプスマーカーが、それぞれ標識する部位を示した。これらのマーカーと僧帽細胞を多重染色することで、効率的にシナプスの分布が観察できる。A1) Aの四角A1を詳しく見たもの。対称性シナプスにおいて、シナプス小胞には、GABAを小胞内に取り込むトランスポーター、VGATが存在している。また、gephyrinはGABA_A受容体に付着している。そのため、これらに対する抗体を用いれば、シナプス前・後部を染めることができる。A2) Aの四角A2を詳しく見たもの。非対称性シナプスにおいて、シナプス小胞には、グルタミン酸を取り込むトランスポーター、VGLUT1が存在している。また、PSD95は、NMDA受容体に付着している。 Abbreviation: VGLUT1; vesicular glutamate transporter1, VGAT; vesicular GABA transporter, PSD95; post synaptic density 95 kDa

であり (図7A1, A2), それぞれ非対称性シナプスのシナプス終末, 対称性シナプスのシナプス終末に存在している¹²⁻¹⁵⁾ (図7A). そのため, VGLUT1やVGATと僧帽細胞が共存している部位では, 僧帽細胞上に非対称性シナプスのシナプス終末や対称性シナプスのシナプス後部が存在していることが示唆され, VGATとPVが共存する部位に蛍光標識された僧帽細胞が隣接している部位には, PV陽性ニューロンが僧帽細胞と対称性シナプスを形成し, さらに僧帽細胞との隣接部位にVGLUT1が存在すれば, これらは相反性シナプスを形成することが推測される. 今回, 僧帽細胞とこれらのシナプスマーカーが共存する部位には, 高頻度にシナプスが存在するということを示した. したがって, これらは嗅球においても極めて信頼性の高いシナプスマーカーであり, これらのマーカーで多重染色すれば, 僧帽細胞上のシナプスを, 電子顕微鏡で解析可能な範囲以上のより広範囲にわたって共焦点レーザー顕微鏡のみで解析することができると考えられる. 一方, VGLUT1, VGAT陽性部位であっても, 僧帽細胞自体にはシナプスが存在しない場合も低い確率ではあるが認められた. また, 複数のシナプスが密集して分布する場合, 電子顕微鏡では別のシナプスとして認識できるが, 解像度の低い共焦点レーザー顕微鏡では, 実際のシナプス数よりも少なめに見積もってしまうという問題もある. シナプスマーカーには, VGLUT1, VGATのようなシナプス終末を標識するものだけでなく, シナプス後部を標識するものもある. PSD95やgephyrinは, それぞれシナプス後膜上のNMDA受容体やGABAA受容体に付着して存在する (図7A1, A2). そのため, それぞれ非対称性シナプス, 対称性シナプスのシナプス後部を標識するマーカーとして用いることができる²⁷⁻²⁹⁾ (図7A). VGLUT1とPSD95, VGATとgephyrinを同時に染色すれば, シナプス終末とシナプス後部を同時に標識することができ, より確実にシナプスの分布を解析することができるようになる (図7A). 今後, 僧帽細胞上のシナプス

を解析する場合には, 非対称性シナプスと対称性シナプスの関係性を見る際にはVGLUT1とVGAT, 介在ニューロンからの対称性シナプスの分布をより詳細に観察するには, VGAT, gephyrinと各種介在ニューロンマーカーを, 介在ニューロンへの非対称性シナプスの分布を詳細に観察する際には, VGLUT1, PSD95と各種ニューロンマーカーをという様に, 必要に応じて標識するマーカーを使い分けることが必要である. そうすることで, より効率的かつ正確な解析を行うことができると考えられる.

嗅球におけるシナプス分布

実際に嗅球内において, 非対称性, 対称性シナプスがどのように分布しているか, 投射ニューロンの突起, 細胞体が分布しているGL, EPL²⁴⁾に焦点をあて, VGLUT1とVGATの分布で検討してみることにする. これらシナプスマーカーの分布をみることにより, シナプスが, どれだけの数でどのように分布しているかを広範囲に観察することができるため, 情報処理が主にどこで, どの程度行われているかを推測することができる. 実際, VGLUT1はEPLに多く存在し, VGATは, GLやEPLに多く存在するなど, 従来の報告による投射ニューロンがGLやEPLで情報処理を受けるという生理学的知見^{1, 6, 24)}を形態学的に支持する結果が得られている.

(1) EPL内の分布

EPLは, 細胞や突起の分布によってEPLoとEPLiの2層に分けることができる. 僧帽細胞の二次樹状突起の多くはEPLi内にとどまり, EPLo内に存在する突起の多くは房飾細胞の樹状突起が占めている²⁵⁾. また, PV陽性ニューロンの密度はEPLoで高く²⁶⁾, EPLiにはGCL深層の顆粒細胞が突起を伸長し, EPLoには浅層の顆粒細胞が突起を伸ばし¹⁾, その新生時期も異なることが報告されている³⁰⁾. つまり, EPLiとEPLoでは, 投射ニューロンと異なるサブグループの介在ニューロン間で情報の処理がなされていると考えられている. そのため,

EPL を EPLi と EPLo に分け, それぞれの層ごとの VGLUT1, VGAT の免疫反応性を比較したが, EPLi と EPLo では明らかな差が認められず, シナプスの分布自体には大きな違いがないということが示唆された. 一方, 対称性シナプスの後部のマーカーである gephyrin は, EPLi より EPLo の方がより強く標識されており²⁹⁾, 対称性シナプスの終末のマーカーである VGAT の所見と異なる (図 1 H). 実際にはシナプスの数は EPLo の方が多く, シナプス当たりのシナプス小胞の数が EPLo と EPLi で異なるために, VGAT が EPLo と EPLi で結果的に等しくみえるということも考えられた. また, EPLi に伸長する僧帽細胞の二次樹状突起の方が, EPLo に見られる二次樹状突起よりも長い²⁵⁾, それぞれの層を占める投射ニューロンの突起の太さや密度が互いに異なり, gephyrin や VGAT の免疫反応性に影響を与えている可能性もある. これらのマーカーや, 電子顕微鏡による詳細な解析を行い, 結果に影響を及ぼし得るニューロンの突起の密度等の要素も含め, 今後検証していかねばならない.

(2) GL 内の分布

VGAT は GL で最も多く存在していた. 投射ニューロンは GL では一つの糸球体内に局限して Tuft を分布させるが, EPL では広範囲に突起を伸ばしている^{1, 2)}. したがって, 投射ニューロンは, GL において, EPL より狭い範囲で情報の調節を受けることになる. そのため, シナプス密度が高く, 局所に集中して情報の調節が行われており, VGAT の量もそれを反映していると考えられる. 一方, VGLUT1 の GL の輝度は EPL よりも低かった. VGLUT には VGLUT1 のほかに VGLUT2, VGLUT3 などのサブタイプが存在し³¹⁾, VGLUT1, VGLUT2 は相補的に存在すると考えられている^{32, 33)}. 嗅球の EPL に存在する VGLUT はほとんど VGLUT1 であるが, GL には, VGLUT1, VGLUT2 が存在している¹⁴⁾. GL 内での非対称性シナプスは, 嗅神経からの入力と僧帽細胞の樹状突起間シナプスが主であり²⁴⁾, VGLUT1 は GL の樹状突起樹状突起間シナプス, VGLUT2 は GL の嗅神経

の軸索終末のシナプスに存在し, GL においては VGLUT2 の発現量の方が多いとの報告もある^{14, 32, 34)}. したがって, GL における興奮性のシナプスは嗅神経由来のものの方が優位であることが考えられる. 実際に GL の対称性シナプスの分布密度は EPL よりも高いのか, GL の非対称性シナプスは, 嗅神経の軸索末端由来が多いのか, 機能的にも有意なのかについては, 今後解析していきたい.

結 語

VGAT, VGLUT1 マーカーは, 信頼できるシナプスマーカーである. シナプス後部のマーカーである, PSD95 や gephyrin などと組み合わせることにより正確なシナプスの分布を求めることができる (図 7 A). 今後, これらのシナプスマーカーと投射ニューロンを同時に染色し, その共存を広範囲にわたって観察することにより, 嗅球における匂い情報の制御に関して, 詳しい解析を行いたい.

謝 辞

本研究を進めるにあたり, 実験を行う上での技術的な補助をいただいた解剖学教室の大森利枝研究補助員, 中央研究センターバイオイメージングユニットの須田泰司主任技術員, 松田宣昭技術員, シンドビスウイルスベクター (palGFP, palmRFP) を供与いただいた京都大学高次脳形態学教室の金子武嗣教授と古田貴寛准教授に深く感謝の意を表す. 本研究は, 科学研究費 (24500418), 川崎医科大学プロジェクト研究費 (26基整-88) (26基-43) (26大-6) の援助を受けて行われた.

引用文献

- 1) Mori K, Nagao H, Yoshihara Y: The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. *Science* 286: 711-715, 1999
- 2) Price JL, Powell TPS: The mitral and short axon cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 7: 631-651, 1970
- 3) Kosaka K, Aika Y, Toida K, Heizmann CW, Hunziker W, Jacobowitz DM, Nagatsu I, Streit P, Visser TJ, Kosaka T: Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb. *Neurosci Res* 23: 73-88, 1995

- 4) Kosaka K, Toida K, Margolis FL, Kosaka T: Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb--II. Prominent differences in the intraglomerular dendritic arborization and their relationship to olfactory nerve terminals. *Neuroscience* 76: 775-786, 1997
- 5) Aungst JL, Heyward PM, Puche AC, Karnup SV, Hayar A, Szabo G, Shipley MT: Centre-surround inhibition among olfactory bulb glomeruli. *Nature* 426: 623-629, 2003.
- 6) Yokoi M, Mori K, Nakanishi S: Refinement of odor molecule tuning by dendrodendritic synaptic inhibition in the olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 3371-3375, 1995
- 7) Miyamichi K, Shlomai-Fuchs Y, Shu M, Weissbourd BC, Luo L, Mizrahi A: Dissecting local circuits: parvalbumin interneurons underlie broad feedback control of olfactory bulb output. *Neuron* 80: 1232-1245, 2013
- 8) Benson TE, Ryugo DK, Hinds JW: Effects of sensory deprivation on the developing mouse olfactory system: a light and electron microscopic, morphometric analysis. *J Neurosci* 4: 638-653, 1984
- 9) Toida K, Kosaka K, Heizmann CW, Kosaka T: Synaptic contacts between mitral/tufted cells and GABAergic neurons containing calcium-binding protein parvalbumin in the rat olfactory bulb, with special reference to reciprocal synapses between them. *Brain Res* 650: 347-352, 1994
- 10) Toida K, Kosaka K, Heizmann CW, Kosaka T: Electron microscopic serial-sectioning/reconstruction study of parvalbumin-containing neurons in the external plexiform layer of the rat olfactory bulb. *Neurosci* 72: 449-466, 1996
- 11) Toida K: Synaptic organization of the olfactory bulb based on chemical coding of neurons. *Anat Sci Int* 83: 207-217, 2008
- 12) Chaudhry FA, Reimer RJ, Bellocchio EE, Danbolt NC, Osen KK, Edwards RH, Storm-Mathisen J: The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. *J Neurosci* 18: 9733-9750, 1998
- 13) Dumoulin A, Rostaing P, Bedet C, Lévi S, Isambert MF, Henry JP, Triller A, Gasnier B: Presence of the vesicular inhibitory amino acid transporter in GABAergic and glycinergic synaptic terminal boutons. *J Cell Sci* 112: 811-823, 1999.
- 14) Gabellec MM, Panzanelli P, Sassoè-Pognetto M, Lledo PM: Synapse-specific localization of vesicular glutamate transporters in the rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 25: 1373-1383, 2007
- 15) Zander JF, Münster-Wandowski A, Brunk I, Pahner I, Gómez-Lira G, Heinemann U, Gutiérrez R, Laube G, Ahnert-Hilger G: Synaptic and vesicular coexistence of VGLUT and VGAT in selected excitatory and inhibitory synapses. *J Neurosci* 30: 7634-7645, 2010.
- 16) Mandolesi G, Vanni V, Cesa R, Grasselli G, Puglisi F, Cesare P, Strata P: Distribution of the SNAP25 and SNAP23 synaptosomal-associated protein isoforms in rat cerebellar cortex. *Neuroscience* 164: 1084-1096, 2009
- 17) Hioki H, Okamoto S, Konno M, Kameda H, Sohn J, Kuramoto E, Fujiyama F, Kaneko T: Cell type-specific inhibitory inputs to dendritic and somatic compartments of parvalbumin-expressing neocortical interneuron. *J Neurosci* 33: 544-555, 2013
- 18) Rotterman TM, Nardelli P, Cope TC, Alvarez FJ: Normal distribution of VGLUT1 synapses on spinal motoneuron dendrites and their reorganization after nerve injury. *J Neurosci* 34: 3475-3492, 2014
- 19) Panzanelli P, Perazzini AZ, Fritschy JM, Sassoè-Pognetto M: Heterogeneity of gamma-aminobutyric acid type A receptors in mitral and tufted cells of the rat main olfactory bulb. *J Comp Neurol* 484: 121-131, 2005
- 20) Mizuguchi R, Naritsuka H, Mori K, Yoshihara Y: Tbr2 deficiency in mitral and tufted cells disrupts excitatory-inhibitory balance of neural circuitry in the mouse olfactory bulb. *J Neurosci* 32: 8831-8844, 2012
- 21) Furuta T, Tomioka R, Taki K, Nakamura K, Tamamaki N, Kaneko T: In vivo transduction of central neurons using recombinant Sindbis virus: Golgi-like labeling of dendrites and axons with membrane-targeted fluorescent proteins. *J Histochem Cytochem* 49: 1497-1507, 2001
- 22) Suzuki Y, Kiyokage E, Sohn J, Hioki H, Toida K: Structural basis for serotonergic regulation of neural circuits in the mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol* 523: 262-280, 2015
- 23) Pinching AJ, Powell TPS: The neuropil of the glomeruli of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 9: 347-377, 1971
- 24) Shepherd GM, Chen WR, Greer CA: Olfactory bulb. In G.M. Shepherd (ed): *The Synaptic Organization of the Brain* 5th ed. New York: Oxford University Press. 2004 pp165-216.
- 25) Orona E, Rainer EC, Scott JW: Dendritic and axonal organization of mitral and tufted cells in the rat olfactory

- bulb. *J Comp Neurol* 226: 346-356, 1984
- 26) Kosaka K, Heizmann CW, Kosaka T: Calcium-binding protein parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat olfactory bulb. 2. Postnatal development. *Exp Brain Res* 99: 205-213, 1994
- 27) Giustetto M, Kirsch J, Fritschy JM, Cantino D, Sassoè-Pognetto M: Localization of the clustering protein gephyrin at GABAergic synapses in the main olfactory bulb of the rat. *J Comp Neurol* 395: 231-244, 1998
- 28) Henny P, Jones BE : Innervation of orexin/hypocretin neurons by GABAergic, glutamatergic or cholinergic basal forebrain terminals evidenced by immunostaining for presynaptic vesicular transporter and postsynaptic scaffolding proteins. *J Comp Neurol* 499: 645-661, 2006
- 29) Bartel DL, Relu L, Hsieh L, Greer CA: Dendrodendritic synapses in the mouse olfactory bulb external plexiform layer. *J Comp Neurol* 523: 1145-1161, 2015
- 30) Mandairon N, Sacquet J, Jourdan F, Didier A: Long-term fate and distribution of newborn cells in the adult mouse olfactory bulb: Influences of olfactory deprivation. *Neuroscience* 141: 443-451, 2006
- 31) Shigeri Y, Seal RP, Shimamoto K: Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Brain Res Rev* 45: 250-265, 2004
- 32) Kaneko T, Fujiyama F, Hioki H: Immunohistochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat brain. *J Comp Neurol* 444: 39-62, 2002
- 33) Varoqui H, Schäfer MK, Zhu H, Weihe E, Erickson JD: Identification of the differentiation-associated Na⁺/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J Neurosci* 22: 142-155, 2002
- 34) Nakamura K, Hioki H, Fujiyama F, Kaneko T: Postnatal changes of vesicular glutamate transporter (VGLUT)1 and VGLUT2 immunoreactivities and their colocalization in the mouse forebrain. *J Comp Neurol* 492: 263-288, 2005

〈Regular Article〉

Newly developed morphological analysis of the olfactory bulb neural circuit using the synaptic markers, VGLUT1 and VGAT.

Takeshi MATSUNO, Emi KIYOKAGE, Kazunori TOIDA

Department of Anatomy, Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan

ABSTRACT The olfactory bulb (OB) is the primary center of the olfactory system in the brain. The projection neurons of the OB, mitral cells and tufted cells, form dendro-dendritic synapses with interneurons on their dendrites and relay olfactory information to higher brain regions. Thus, it is necessary to identify the distribution of synapses on mitral cell dendrites to study the processing of olfactory information. High-resolution analysis by electron microscopy (EM) enables morphological identification of synapses; however, examination of large areas is difficult with EM because of its narrow observation range. Further, mitral cells cannot be clearly identified with EM. Vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) and vesicular GABA transporter (VGAT) are synapse markers and the usefulness of them for estimating synaptic distributions has been reported in many brain regions. Using these markers for quantitative analysis of synapses on dendrites of OB projection neurons may provide higher reliability than EM analysis. In this study, we examined the usefulness of these markers for identification of dendro-dendritic synapses in the mouse OB. First, the OB was single-immunolabeled for VGLUT1 or VGAT and processed for EM. Using EM analysis, we observed VGLUT1 labeling in asymmetrical synapses and VGAT labeling in symmetrical synapses. Second, individual mitral cells were selectively labeled by viral injection and single or double-labeled for VGLUT1, VGAT or both. Labeled sites on mitral cells were analyzed with confocal laser scanning microscopy and subsequently examined with EM. We identified that 82% of VGLUT1-positive and 79% of VGAT-positive sites corresponded to asymmetrical synapses and symmetrical synapses identified by EM, respectively. Thus, we conclude that these synaptic markers are reliable for qualitative observation and quantification of synapses in the OB. Finally, the OB was double-labeled for VGLUT1 and VGAT, and examined by confocal microscopy with high-resolution montage imaging to analyze distributions of the synaptic markers. VGLUT1 was mainly distributed in the external plexiform layer. VGAT was mainly distributed in the glomerular layer and moderately in the external plexiform layer. These findings indicate that VGLUT1 and VGAT are reliable presynaptic markers for individual synapses and for distribution throughout a brain region.

(Accepted on August 23, 2016)

Key words : Synapse, Dendrites, VGLUT1, VGAT, Sindbis viral vector, Olfactory system

Corresponding author

Kazunori Toida

Department of Anatomy, Kawasaki Medical School, 577
Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan

Phone : 81 86 462 1111

Fax : 81 86 462 1199

E-mail : toida@med.kawasaki-m.ac.jp