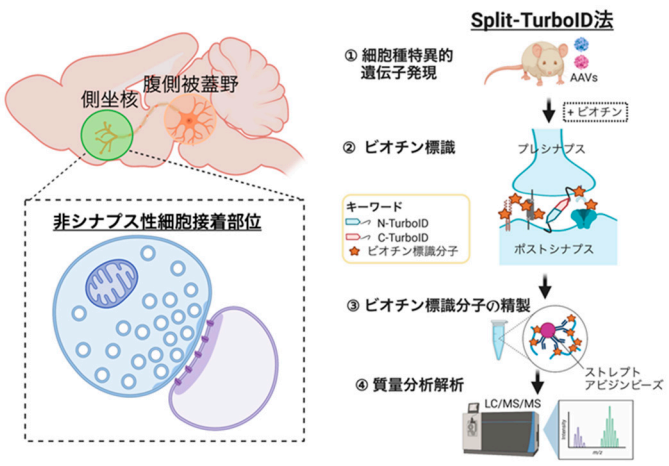
149　精神行動を制御する非シナプス性接着分子の網羅的探索	髙野　哲也

【目的】脳内において、神経細胞は主に「シナプス」と「非シナプス性接着」という 2 種類の細胞間相互作用により、記憶・情動・意欲などの脳高次機能を担う複雑な神経回路網の構築や再編成、神経活動を制御している。神経細胞のシナプスは、シナプス前膜と後膜にシナプス小胞や受容体が集積した非常に特徴的な接着構造を形成し、グルタミン酸や GABA などの神経伝達物質を介した速い情報伝達（配線伝達）を行う。一方で、非シナプス性接着構造はグリア細胞 - 神経細胞間やドーパミン作動性神経細胞 - 中型有棘神経細胞間で観察され、この非シナプス性接着構造では比較的遅い情報伝達（拡散性伝達）を行う。興味深いことに、ドーパミン作動性神経細胞の非シナプス性接着部位では神経伝達物質と受容体がミスマッチした「異種結合」であることもわかってきた（内ヶ島ら、***PNAS***、2016）。また、ドーパミンの拡散性伝達はグルタミン酸神経伝達への応答性を高めることで情動行動を制御しており（永井ら、***Neuron***、2016）、情動行動の異常は統合失調症、自閉症、気分障害などの多くの精神疾患と密接に関連している。しかし、拡散性伝達を担う非シナプス性接着構造を構成する分子メカニズムについては十分に分かっていない。近年、私達は分割型近依存性ビオチン標識（Split-TurboID）法を開発し、特定の細胞間接着部位に存在する構成分子のビオチン標識と網羅的探索を行ってきた（髙野ら、***Nature***、2020；髙野ら、***Neurosci Res***、2021）。そこで、本研究課題では、Split-TurboID 法を腹側被蓋野 - 側坐核のドーパミン作動性神経細胞に適用することによって、生体内ドーパミン作動性神経細胞の非シナプス性接着に関与する分子ネットワークの網羅的同定と生理的意義を解明することを目的とした。

【方法】私達は、まず野生型マウスを用いて Split-TurboID の断片 N TurboID を腹側被蓋野に、もう一方の断片 C TurboID を側坐核に細胞種特異的アデノ随伴ウィルス（AAV）を用いて遺伝子導入した。3 週間後にビオチン投与を行い、ビオチン標識を誘導した。その後に、ドーパミン作動性神経細胞特異的 Cre マウス（dopamine transporter 遺伝子-Cre マウス）を用いて同様の実験を行った。Split-TurboID によるビオチン標識を免疫組織染色、sliver staining にて検討し、また質量分析を用いてビオチン標識分子を解析した。

【結果】マウス脳内において、腹側被蓋野から側坐核において長距離に投射されるドーパミン作動性神経細胞の非シナプス性細胞接着部位において Split-TurboID 法によりビオチン標識が誘導されることが分かった。また私達は、これらのドーパミン作動性神経細胞の非シナプス性細胞接着部位のビオチン標識タンパク質を streptavidin ビーズによるアフィニティークロマトグラフィーによって精製できることを確認し、質量分析解析を行った。その結果、ドーパミン作動性神経細胞の非シナプス性細胞接着部位を構成する分子として、194 もの分子を同定した。興味深いことに、これらの分子はシナプス関連分子が非常に多く含まれており、非シナプス細胞接着部位はシナプスとよく似た分子機能によって制御されている可能性が考えられた。

Split-TurboID 法を用いたドーパミン作動性神経細胞接着部位の構成分子の網羅的探索



149. 精神行動を制御する非シナプス性接着分子の網羅的探索

髙野　哲也

慶應義塾大学 医学部 生理学教室

Key words：ドーパミン神経細胞，BioID，Split-TurboID，シナプス，非シナプス性接着構造

緒　言

神経細胞はシナプスと呼ばれる細胞接着構造を形成することで、脳高次機能を担う様々な神経回路網を構築する。さらに、近年では神経細胞間や非神経細胞間にシナプスではない接着構造が存在し、複雑な脳内情報伝達を生み出していることも分かってきた。しかしながら、従来までの方法では特定のシナプス及び非シナプス性接着部位の構成分子を同定することが困難であった為、分子機序やその生理的意義については依然として不明のままであった。本研究では、独自の化学遺伝学的技術（Split-TurboID 法）を用いて［1］、脳内の腹側被蓋野から側坐核において長距離に投射されるドーパミン作動性神経細胞の非シナプス性細胞接着構造を制御する構成分子群の網羅的探索を行うことを目的に解析を進めた。まず、Split-TurboID を腹側被蓋野から側坐核において長距離に投射されるドーパミン作動性神経細胞に遺伝子導入したところ、非シナプス性細胞接着部位においてビオチン標識が誘導されることがわかった。そこで、これらのビオチン標識分子を精製し、質量分析を行った。その結果、ドーパミン作動性神経細胞の非シナプス性細胞接着部位を構成する分子として、194 もの分子を同定した（図 1）。興味深いことに、これらの分子はシナプス関連分子が非常に多く含まれており、非シナプス性細胞接着部位はシナプスとよく似た分子機能によって制御されている可能性が考えられた。

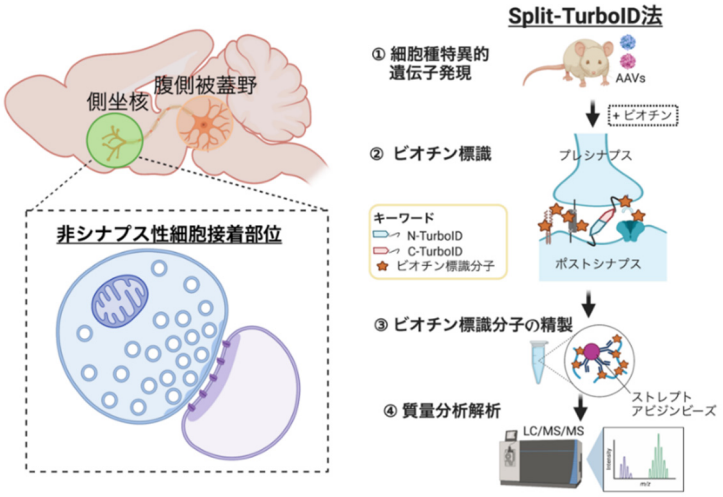


図 1. Split-TurboID 法を用いたドーパミン作動性神経細胞接着部位の構成分子の網羅的探索
本研究のワークフロー。Split-TurboID の断片 N TurboID を腹側被蓋野に、もう一方の断片 C TurboID を側坐核にアデノ随伴ウィルス（AAV）を用いて遺伝子導入した。3 週間後にビオチン投与を行い、ビオチン標識を誘導した。その後に、ドーパミン作動性神経細胞特異的 Cre マウス（dopamine transporter 遺伝子-Cre マウス）を用いて同様の実験を行った。Split-TurboID によるビオチン標識を免疫組織染色、sliver staining にて検討し、また質量分析を用いてビオチン標識分子を探索した。

結果および考察

1. Split-TurboID 法を用いたドーパミン作動性神経細胞の非シナプス性細胞接着部位の標識

Split-TurboID 法を用いて生体内の腹側被蓋野から側坐核へのドーパミン作動性神経細胞の非シナプス性接着構造の構成分子群をビオチン標識する為に、Split-TurboID のそれぞれの断片を発現誘導する細胞種特異的アデノ随伴ウィルスを用いて成体マウス脳に遺伝子導入した。3 週間後にビオチン投与を行い、ビオチン標識を誘導した。その結果、腹側被蓋野から側坐核へのドーパミン作動性神経細胞の細胞接着部位においてビオチン標識が観察された。しかしながら、ドーパミン作動性神経細胞以外の神経細胞の標識も観察され、AAV-TH-Cre を用いた実験系ではドーパミン作動性神経細胞特異的に Split-TurboID 法を発現することができなかった。

そこで、Split-TurboID をドーパミン作動性神経細胞特異的に遺伝子導入する為に、DAT（dopamine transporter 遺伝子）-Cre マウスを The Jackson Laboratory より入手し、DAT-Cre マウスに Split-TurboID のアデノ随伴ウィルスを用いて遺伝子導入した。具体的には、Split-TurboID の N TurboID を腹側被蓋野に遺伝子導入し、C TurboID を側坐核に遺伝子導入した（図 2A）。その結果、側坐核（NAc）において観察されていた非特異的なビオチン活性化が消失し、Split-TurboID によって特異的にビオチン活性の再構成が検出された（図 2B）。一方、腹側被蓋野（VTA）ではこの様なビオチン標識分子は検出されなかった。以上の結果より、マウス脳内において、腹側被蓋野から側坐核において長距離に投射されるドーパミン作動性神経細胞の非シナプス性細胞接着部位において Split-TurboID 法によりビオチン標識されることが示唆された。

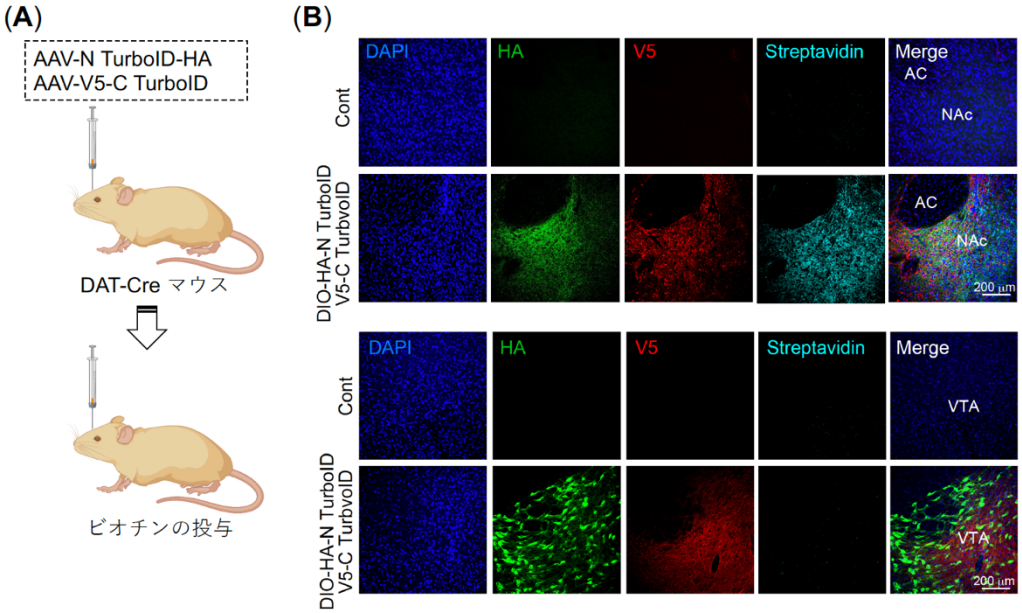


図 2. Split-TurboID は脳内の非シナプス性細胞接着部位をビオチン標識する

A) 実験のワークフロー。Split-TurboID を DAT-Cre マウス脳内の腹側被蓋野（VTA）と側坐核（NAc）に遺伝子導入し、ビオチンを投与した。

B) 側坐核（NAc）の非シナプス性細胞接着部位においてのみビオチン標識が観察された（スケールバー：200μm）。

2. Split-TurboID 法によりビオチン標識された分子の精製

上記 1）より検出されたビオチン標識分子を質量分析によって同定する為に、Streptavidin ビーズによるアフィニティー精製にビオチン標識分子を単離した（図 3A）。具体的には、コントロールマウス（Cont）、TurboID 発現マウス（TurboID）、TurboID-surface 発現マウス（TurboID-surface）、Split-TurboID 発現マウス（Split-TurboID）をそれぞ

れ 2 匹分の側坐核からタンパク質を抽出した。その結果、それぞれの側坐核より抽出したタンパク質量は約 10 mg であることを確認した（図 3B）。これらのタンパク質を steraptavidin ビーズにより精製したところ、TurboID によって 89、45.2 μg、TurboID-surface によって 76.7、48.5 μg、Split-TurboID によって 50.7、48 μg ものビオチン標識タンパク質が単離された（図 3B）。これらのタンパク質量は十分に質量分析解析できるタンパク量である為に、さらに質量分析を行った。

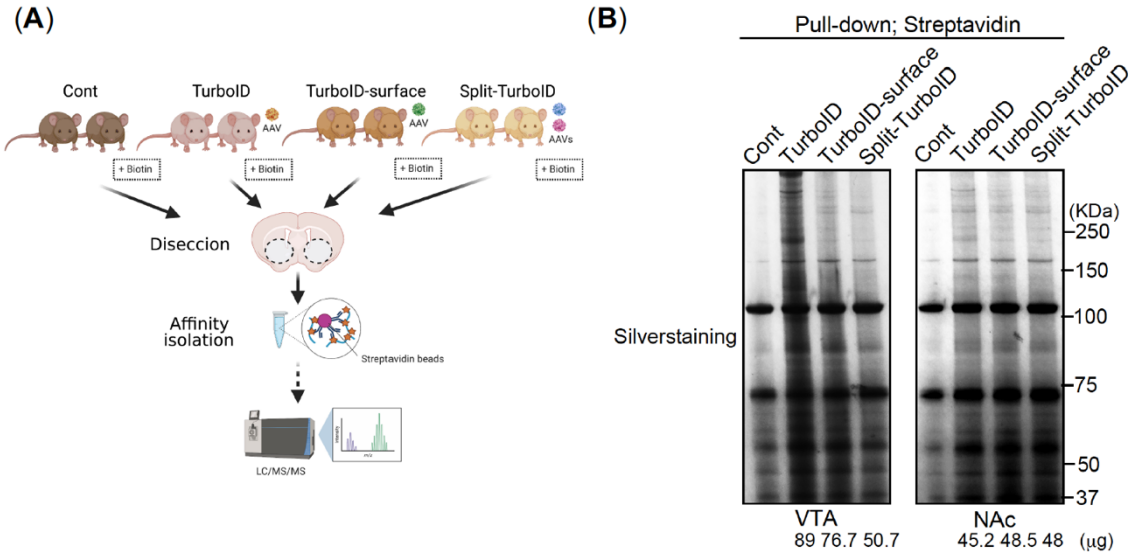


図 3. Split-TurboID によるビオチン標識タンパク質の精製

A) 実験のワークフロー。TurboID、TurboID-surface、Split-TurboID を DAT-Cre マウス脳内の腹側被蓋野（VTA）と側坐核（NAc）に遺伝子導入し、ビオチンを投与した。その後、streptavidin ビーズを用いてビオチン標識タンパク質を精製し、質量分析を行った。

B) 精製したビオチン標識タンパク質を silverstaining により検討した。側坐核（NAc）では、コントロールに比べて、TurboID、TurboID-surface、Split-TurboID では顕著にビオチン標識分子が増加していた。

3. 質量分析解析によるドーパミン神経細胞の非シナプス細胞接着部位の構成分子の同定

上記 1)、2）より、マウス脳内において、腹側被蓋野から側坐核において長距離に投射されるドーパミン作動性神経細胞の非シナプス性細胞接着部位において Split-TurboID 法によりビオチン標識を確認し、これらのビオチン標識分子の精製に成功した為、質量分析を行った。その結果、コントロールマウスに比べて 1.5 倍以上濃縮している分子として 194 分子が同定された。これらの分子群を、GO term 解析により局在別に分類したところ、興味深いことにシナプスに関連している分子やシナプス近傍に局在する分子が非常に多く含まれていることがわかった（表 1）。さらに、分子機能別に分類したところシナプス形成分子、シナプス小胞輸送関連分子が非常に多く含まれていた（表 1）。これらの結果から、腹側被蓋野から側坐核において長距離に投射されるドーパミン作動性神経細胞の非シナプス性細胞接着部位にはシナプスと非常によく似た構成分子が存在し、シナプスと類似した分子機能により細胞間相互作用が制御されている可能性が示唆された。実際に、先行研究においてドーパミン作動性神経細胞の非シナプス性細胞接着部位にはシナプス前部において伝達物質種放出に関わるアクティブゾーンタンパク質 CAST、シナプス接着分子ニューレキシン、ニューロリジン、シナプス足場タンパク質ゲフィリンが存在していることが報告されており［2］、これらの知見は私達の質量分析のデータを支持していると考えられる。

表 1. 同定された非シナプス性細胞接着部位の構成分子群の GO term 解析

(A)

Cellular Component ontology terms

Ontology term
synapse
presynapse
synaptic vesicle membrane
postsynapse
extrinsic component of synaptic vesicle membrane
presynaptic cytosol
integral component of synaptic vesicle membrane
presynaptic endocytic zone membrane
anchored component of synaptic vesicle membrane
postsynaptic cytosol

(B)

Biological Process ontology terms

Ontology term
process in the synapse
synaptic vesicle cycle
process in the presynapse
synaptic vesicle exocytosis
trans-synaptic signaling
chemical synaptic transmission
synapse organization
synaptic vesicle endocytosis
synaptic vesicle proton loading
presynaptic dense core vesicle exocytosis

A）は GO term 解析により局在別に分類したものである。B）は GO term 解析により分子機能別に分類したものである。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、慶應義塾大学医学部生理学の柚﨑通介教授、山崎世和助教、京都大学の浜地格教授、田村朋則講師である。この場をお借りしまして、深く御礼申し上げます。

文　献

1） Takano T, Wallace JT, Baldwin KT, Purkey AM, Uezu A, Courtland JL, Soderblom EJ, Shimogori T, Maness PF, Eroglu C, Soderling SH. Chemico-genetic discovery of astrocytic control of inhibition in vivo. Nature. 2020 Dec;588(7837):296-302. doi: 10.1038/s41586-020-2926-0. Epub 2020 Nov 11. PMID: 33177716

2） Motokazu Uchigashima, Toshihisa Ohtsuka, Kazuto Kobayashi, Masahiko Watanabe. Dopamine synapse is a neuroligin-2-mediated contact between dopaminergic presynaptic and GABAergic postsynaptic structures. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Apr 12;113(15):4206-11. doi: 10.1073/pnas.1514074113. Epub 2016 Mar 25. PMID: 27035941