

## マウス嗅球神経回路におけるセロトニンニューロンの シナプスの微細構造解析

鈴木 良典, 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** 嗅球は明瞭な層構造を持ち, 少数のニューロン種から構成され, そこには豊富な化学物質を含むことがわかっており, 脳神経回路の解析に有用な領域である. 匂い情報を処理する嗅球は, 脳その他領域から複数の遠心性ニューロンによる入力を受けており, この一つがセロトニンを含有するニューロン(セロトニンニューロン)である. セロトニンニューロンは, 脳全体に広範囲に分布し様々な脳機能の調節を行っており, 嗅球においては非対称性シナプスを形成し, 嗅覚情報調節に関わっていると考えられている. しかし, このシナプスについては嗅覚調節機構と共に詳細な解析はなされていない. そこで, 本研究ではセロトニンニューロンによるシナプスの微細構造を, 免疫電子顕微鏡法と電子線トモグラフィーを用いて解析した. また, 非対称性シナプスを示すことから, 神経伝達物質としてのグルタミン酸の可能性を検討するため, セロトニンとVGLUT3(vesicular glutamate transporter 3)に対する多重蛍光免疫染色法で解析した. セロトニンニューロンによるシナプスは, 多くは球形のシナプス小胞を持つが, 扁平なものや有心性小胞も存在した. 更に, 既知のグルタミン酸作動性ニューロンによる非対称性シナプスと比べて, シナプス後肥厚の厚さの多様性が顕著で, シナプス間隙は狭く, シナプスの直径は小さかった. また, セロトニンニューロンの約半数はVGLUT3免疫陽性であり, 神経タンパクを含有する有心性小胞を持っていることから, 複数の神経伝達物質を含むことが示唆された. シナプス後肥厚は伝達物質であるグルタミン酸の刺激によって厚くなる. セロトニンニューロンは, グルタミン酸を含む複数の神経伝達物質を持つために, グルタミン酸だけを神経伝達物質として持つニューロンが形成する典型的な非対称性シナプスに比べて, 多様性のある非対称性シナプスを形成していると考えられる.

doi:10.11482/KMJ-J40(2)89 (平成26年9月22日受理)

キーワード: セロトニン, 嗅球, シナプス, 電子線トモグラフィー, 神経回路

### 緒言

嗅球は明瞭な層構造を持ち, 比較的少数のニューロン種から構成され, そこには豊富な生理活性化学物質を含むなど, 比較的よく解明されているため, 神経回路を解析する有用なモデルとして非常に魅力的な領域である<sup>1-3)</sup>. 匂い情報を受けた嗅神経は, 嗅球の糸球体へ軸索を

伸ばし, ここで投射ニューロン(僧帽/房飾細胞)の樹状突起とシナプスを形成して情報伝達を行う(匂い情報の入力). 投射ニューロンは, 軸索を嗅皮質へ伸ばしてさらに高次中枢へ情報を伝達する(匂い情報の出力). この入力と出力は, 情報伝達の過程で嗅球内に存在する様々な介在ニューロンによって調節されているが, その他

別刷請求先  
樋田 一徳  
〒701-0192 岡山県倉敷市松島577  
川崎医科大学解剖学

電話: 086 (462) 1111  
ファックス: 086 (462) 1199  
Eメール: E-mail: toida@med.kawasaki-m.ac.jp

に他の脳領域からの遠心性ニューロンからも入力を受けていることもわかっている<sup>4,6)</sup>。即ち、青斑核からのノルアドレナリン含有神経<sup>4)</sup>、ブローカ対角帯水平脚からのアセチルコリン含有神経<sup>5)</sup>、背側および正中縫線核からのセロトニン含有神経(セロトニンニューロン)<sup>6)</sup>などである。このうち、セロトニンはモノアミン系の神経伝達物質であり、これを含有するセロトニンニューロンは全脳の広範囲に軸索投射を行い、感情、抑うつ、覚醒、注意、自律神経系調節など様々な機能の調節に関わっている<sup>7-9)</sup>。嗅球は、セロトニンニューロンが多く分布している領域の一つであり<sup>10,11)</sup>、セロトニンが枯渇すると匂い識別能が低下することが分かっている<sup>12)</sup>。以上のような動物実験における所見のみならず、ヒトの場合においてもうつ病やアルツハイマー病では中枢神経系でセロトニン濃度の低下やセロトニンニューロンのセロトニン伝達機能の低下が認められる<sup>13,14)</sup>。

電気生理学的解析で、セロトニンニューロンは嗅球内の投射ニューロンと介在ニューロンの双方を脱分極させることが報告されている<sup>11,15)</sup>。この解析結果から考えると、嗅球においてセロトニン濃度が低下すると投射ニューロンの興奮が起こらず嗅覚情報の伝達が行われぬ。また、介在ニューロンの興奮が起こらないために投射ニューロンが抑制されず、投射ニューロンの感度が下がって、識別能が低下し、結果としてうつ病やアルツハイマー病の患者において嗅覚障害を起こすと考えられている。このようなセロトニンニューロンの嗅覚系機能に対する生理学的及び臨床医学的所見に対応して、形態学的には嗅球系球体層で非対称性シナプスを形成することも報告されており<sup>16)</sup>、Gracia-Llanes FJら<sup>16)</sup>は、セロトニンニューロンが形成するシナプスは heterogeneous appearance を呈すると報告している。しかし、シナプスの多様性についてはシナプス間隙、シナプス後肥厚 (postsynaptic density, PSD)、シナプス小胞など、シナプスを構成する主要な要素について一定の見解が得られていないのが現状である。我々はこれまで、

セロトニンニューロンの嗅球神経回路の調節機構について形態学的解析を進めてきた。その中で、未だ詳細な解析のなされていないセロトニンニューロンのシナプス構造の多様性について着目し、これを最新の電子線トモグラフィー法によって微細三次元構造解析を試みた。

電子線トモグラフィーとは、電子顕微鏡画像を予め定めた角度の傾斜をつけながら連続撮影した傾斜画像を取得し、得られた画像を①投影データの一次元フーリエ変換、②フィルタリング、③逆投影(逆フーリエ変換)、の3つの手順による再構成アルゴリズムの原理によりコンピューターを用いて三次元再構成を行うものである(図1)。この電子線トモグラフィー法により、通常の二次元的な電子顕微鏡透過像のみならず、超薄切片内の垂直方向の情報を含めてシナプスのナノメートル単位の微細な立体構造を正確に解析することができる。本研究は、この手法を用いてセロトニンニューロンが形成するシナプスを詳細に解析し、セロトニンニューロンの嗅球神経回路に対する調節メカニズムの理解のための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C57BL/6J系マウス(雄、8-10週齢、日本SLC)を8匹用いた。全ての実験は、川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け(No.13-034)、川崎医科大学動物実験指針に基づいて実施された。マウスは、一定周期の明暗環境(7時 light on, 21時 light off)、 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ の室温の下、食餌、飲水を自由に行えるよう飼育した。

ペントバルビタールナトリウム(共立製薬, Japan)をマウスの腹腔内に投与した後(0.1 ml/100 g)、4%パラフォルムアルデヒドと0.05%グルタルアルデヒドを含む0.1 Mのリン酸塩緩衝液(PB)で灌流固定を行った(100 ml, 15分間)。脳を取出し、灌流固定と同じ固定液で液浸固定を行った後、嗅球をビプラトーム(Leica VT1200s, Germany)を用いて50  $\mu\text{m}$ の厚さで全

脳の矢状断連続スライスまたは, 嗅球の冠状断連続スライスを作成した.

### 免疫組織化学

セロトニンニューロンの軸索を可視化するために免疫染色を行った. 非特異的反応を防ぐためにスライスを1% bovine serum albumin (BSA)で1時間ブロッキングし, 抗セロトニン抗体(rabbit, 1:50,000, ImmunoStar, USA)を5日間反応させた. 2次抗体はビオチン標識された抗ウサギ抗体(horse, 1:200, Vector, USA)を用いて2時間反応させ, その後 Avidin-Biotin complex (ABC, standard variety, 1:200, Vector)を2時間反応させた. 免疫標識されたセロトニンニューロンの軸索を0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Dojindo, Japan)で可視化した. (以上は全て20℃で行った.)次に, 1%四酸化オスミウム溶液による後固定を氷上温で1時間, 2%酢酸ウラン水溶液でのブロック電子染色を室温で30分

間行った. 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℃でエポニーアラルダイト混合樹脂にて熱重合包埋した.

### 電子顕微鏡での解析

樹脂へ包埋した標本の中で, 光学顕微鏡(Olympus, BX61, Japan)で軸索が明瞭に可視化されている標本を選択し, エポニーアラルダイト混合樹脂に再包埋した. その免疫染色標本を, 嗅球の糸球体層, 外網状層, 顆粒細胞層を含んだ観察対象部位を残してトリミングし, ウルトラマイクローム(Reichert-Nissei Ultra-Cuts, Leica, Germany)を用いて75 nm厚の超薄切連続切片を作製した. その後, 透過型デジタル電子顕微鏡(JEM-1400, JEOL, Japan)を用いて, セロトニンニューロン, 嗅神経, 僧帽/房飾細胞のシナプスをそれぞれ解析した. 嗅神経は糸球体層で僧帽/房飾細胞の樹状突起へ非対称性シナプスを形成し, 僧帽/房飾細胞は糸球体層,

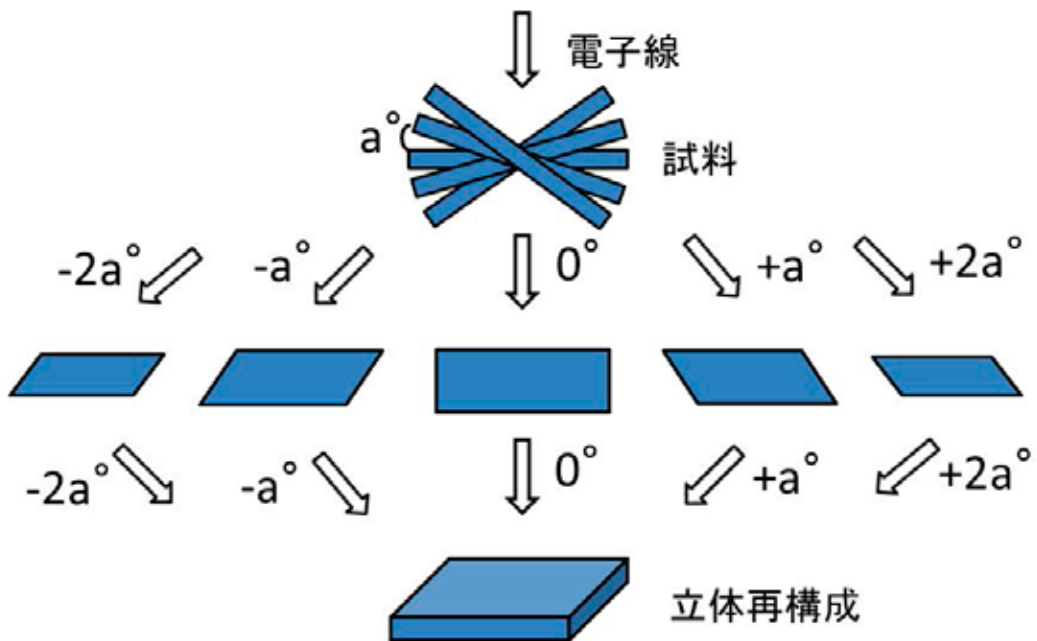


図1 電子線トモグラフィー理論の概念

樹脂に包埋した試料を $\pm 60\sim 70^\circ$ の範囲で $1^\circ$ 毎に傾けながら連続した傾斜角度を撮影する. それぞれの傾斜角度に対して, 位置, 明るさの補正を行い, フーリエ変換する. その後, そのデータを, 撮影角度をもとに空間に当てはめて三次元化し, 逆フーリエ変換により, 実空間での三次元像が再構成される.

外網状層で介在ニューロンに対して非対称性シナプスを形成する。これらは、これまで我々の研究を含めた多くの報告により明らかになっており<sup>3)</sup>、嗅球内における主要なグルタミン酸作動性の興奮性シナプスと考えられている<sup>17)</sup>。

#### 電子線トモグラフィーによる解析

上記3種類、即ち、セロトニンニューロン、嗅神経、僧帽/房飾細胞が形成するシナプスを形態的に高精細に比較するために、電子線トモグラフィーによる立体解析を行った。高傾斜試料ホルダーに切片をのせて、透過型デジタル電子顕微鏡にセットし、 $-70^{\circ}$  から  $+60^{\circ}$  まで  $1^{\circ}$  ステップで傾斜をつけながら TEM recorder (JEOL, Japan) を用いて連続的に傾斜画像を撮影した。得られた画像を TEMography (System In Frontier, Japan), Composer (System In Frontier, Japan), Visualizer-kai (System In Frontier, Japan) の3種類の画像解析ソフトを用いて立体再構成し、ボクセルデータから  $1^{\circ}$  ステップの  $360^{\circ}$  ローテーションイメージと  $1.5\text{ nm}$  ステップの再スライスイメージを得た。

#### セロトニンニューロンの神経伝達物質の解析

Vesicular glutamate transporter (VGLUT) はグルタミン酸をシナプス小胞に取り込むトランスポーターであり、グルタミン酸を神経伝達物質に持つニューロンのマーカーとして用いられる<sup>18)</sup>。VGLUT3は、モノアミンや GABA を含有するニューロンに発現すると考えられており<sup>19)</sup>、セロトニンニューロンにおいて VGLUT3 が共存しているかを調べるために多重蛍光免疫染色を行った。ピプラトームによる  $50\text{ }\mu\text{m}$  スライス を BSA でブロッキングした後、抗セロトニン抗体と抗 VGLUT3 抗体 (guinea pig, 1:200, 京都大学より供与) を5日間反応させた。2次抗体は FITC 標識された抗ウサギ抗体 (donkey, 1:200, Jackson, USA) と Cy3 標識された抗モット抗体 (donkey, 1:200, Jackson) を2時間反応させた。その後、染色した切片を VECTA SHIELD Mounting Medium (Vector, USA) で封

入し、共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon A1R-MP, Japan, x25/NA 1.1 apochromat objective lens) で解析した。

#### 画像解析

解析対象であるセロトニンニューロン、嗅神経、僧帽/房飾細胞の3種類のニューロンの各シナプスについて、得られた立体再構成画像を用いて、シナプス間隙の最大幅、PSDの最大厚、シナプスの直径、シナプス小胞の直径を、Visualizer-kaiの測定機能を用いて測定した。統計解析は、分散の検定には両側 F 検定を用い、平均の検定には分散に有意差がある場合は Welch 検定を用い、有意差がない場合は Student's t 検定を用いた。それぞれ、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

#### 結果

##### 光学顕微鏡による観察

セロトニンニューロンは中脳の縫線核にある細胞体から軸索が広範囲にわたって脳内に分布していた (図 2 a)。嗅球では表層で特に密に存在し、嗅球内の各層によって分布の違いが認められた。最も密に軸索が観察されたのが糸球体層で、次いで顆粒細胞層に多く、外網状層ではまばらに分布しているに留まっていた (図 2 b)。糸球体層では、数多くの分枝があり、複雑に走行しており、糸球体内だけでなく、傍糸球体領域にも分布していた。外網状層では分枝が少なく、層に対して比較的垂直に糸球体層に向かって軸索を伸ばしていた。分枝は主に外網状層の深層に認められた。顆粒細胞層では、層に対して平行に軸索が走行し、所々で糸球体層に向かって分枝を出していた。軸索は走行過程で数珠玉状の小さな膨らみを形成していた (varicosity)。セロトニンニューロンのシナプスの解析は、これら軸索と varicosity の密度の最も高い糸球体層で行うこととした。

##### 電子顕微鏡による解析

これまでの報告<sup>14)</sup>と同様に、セロトニン

ニューロンは, varicosity 構造の約 3 割でシナプスを形成していた. 一方, シナプスが観察されたのは, 全て varicosity の部位に一致していた. シナプス小胞は様々な大きさのものがああり, ほとんどが 30 nm ほどの球形であったが, 一部扁平なものも見られた. また, より径の大きい球形の有心性小胞を持つものもあった. PSD は厚いものから薄いものまであり多様性が見られた. シナプス間隙は 20~25 nm 程度で, 典型的な非対称性シナプス程広くないもの

が多かった(図 2 c). これらの所見は, セロトニンニューロンが非対称性シナプスを形成するという従来の報告<sup>16)</sup>を支持するものである. 嗅神経と僧帽/房飾細胞は, その特徴的な電子顕微鏡像から形態学的に同定可能である<sup>20)</sup>. 即ち, 嗅神経は小胞外の細胞質が高い電子密度を示す一方, 僧帽/房飾細胞は 1~2  $\mu\text{m}$  の断面像を示し, 規則的に走行した微細管などの典型的な樹状突起の形態を示す. 嗅神経と僧帽/房飾細胞が形成するシナプスは, 軸索-樹状突起間

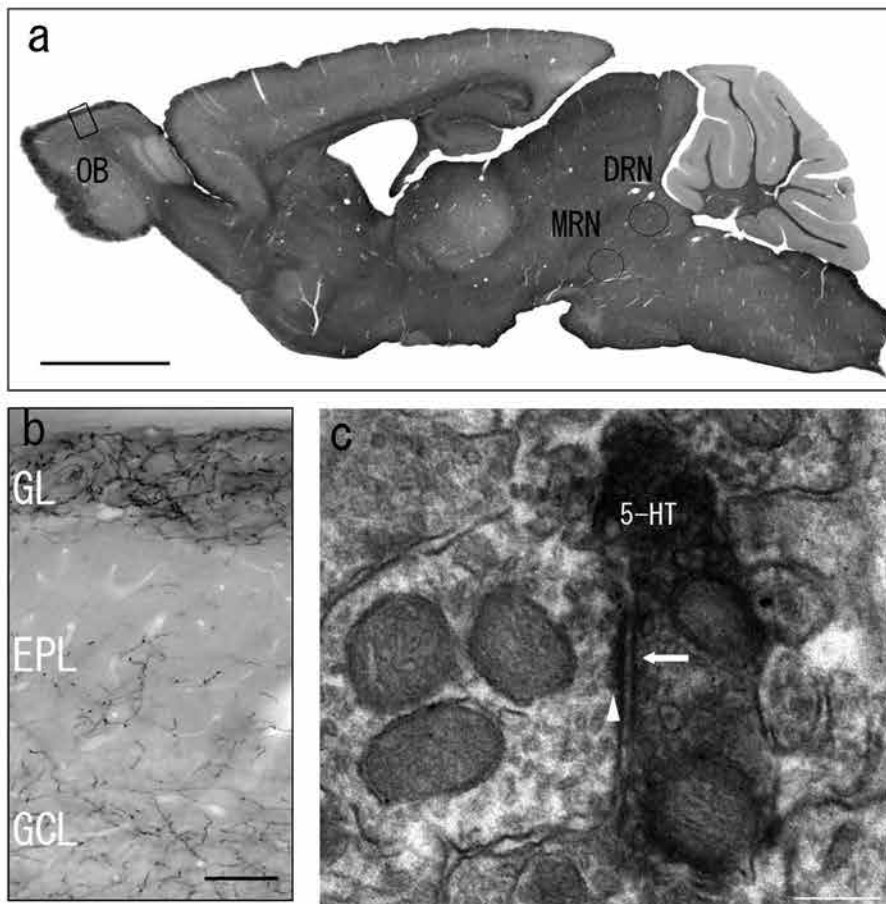


図2 嗅球におけるセロトニンニューロン

a) マウス脳の傍矢状断面スライス. 脳の広範囲にわたり, 抗セロトニン抗体によって染色されている. 嗅球(OB)では, 表層で特に濃く染まっている. b) 嗅球の拡大像. 糸球体層(GL)で軸索が枝を出しながら複雑に密に走行している. 外網状層(EPL)では比較的まっすぐ糸球体層に向かって軸索が伸びている. 顆粒細胞層(GCL)では層に平行に走行し, 糸球体層に向かって分枝をだす. c) 嗅球におけるセロトニンニューロンのシナプスの電子顕微鏡画像写真. 比較的厚めのシナプス後肥厚を持つ非対称性シナプスを形成している(矢印). 高い電子密度を示している部分がシナプス後肥厚(postsynaptic density, PSD)である(矢頭). Abbreviation: DNR; dorsal raphe nucleus(背側縫線核), MRN; medial raphe nucleus(正中縫線核), bar: a; 2 mm, b; 50  $\mu\text{m}$ , c; 200 nm

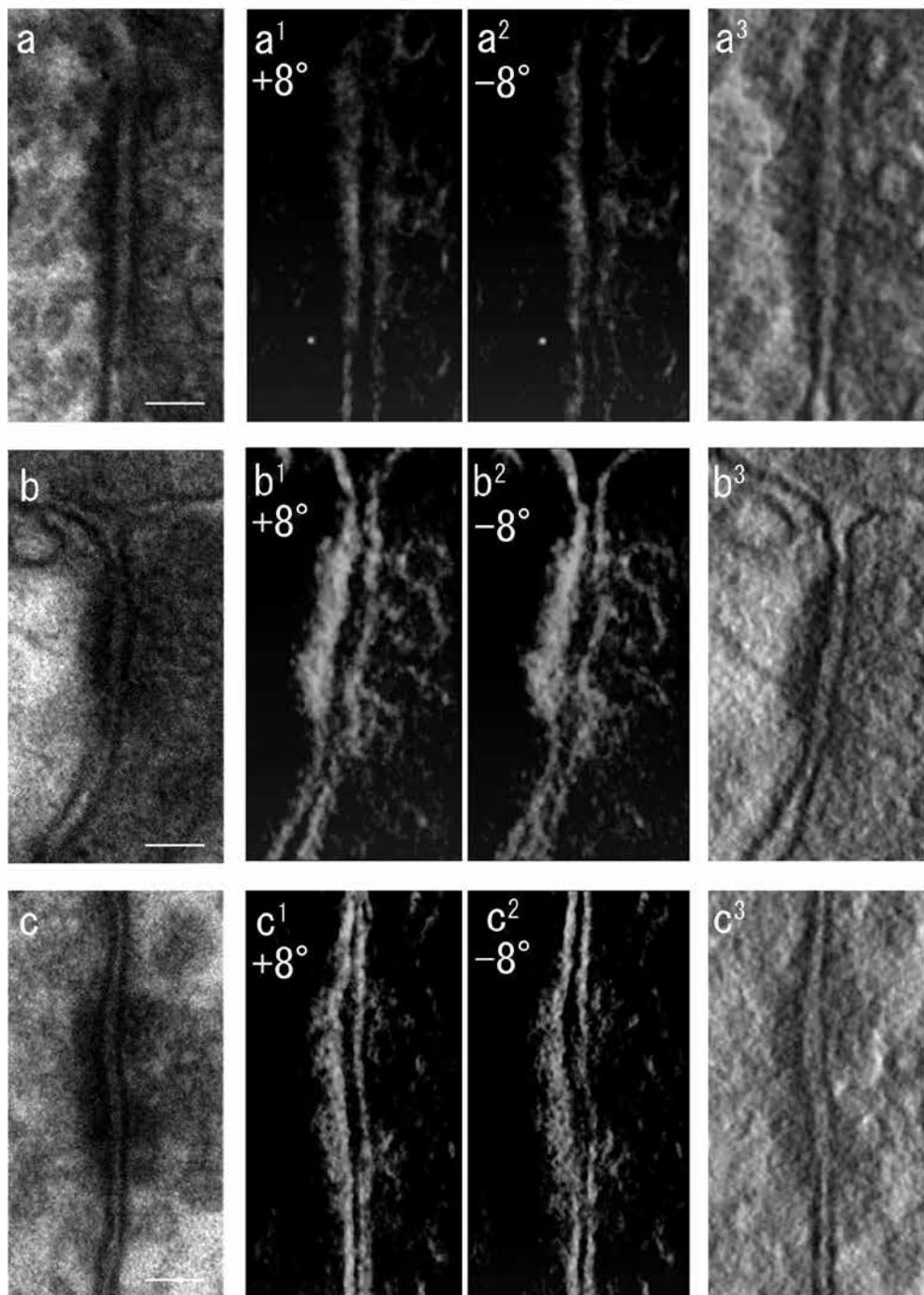


図3  
セロトニンニューロン(a ~ a<sup>3</sup>), 嗅神経(b ~ b<sup>3</sup>), 僧帽/房飾細胞(c ~ c<sup>3</sup>)のシナプスの電子顕微鏡画像と電子線トモグラフィーによる再構成画像。(a, b, c)各ニューロンの電子顕微鏡画像。厚いPSDを持ち、シナプス間隙の広い非対称性シナプスを形成している。(a<sup>1</sup>, a<sup>2</sup>, b<sup>1</sup>, b<sup>2</sup>, c<sup>1</sup>, c<sup>2</sup>)それぞれ±8°傾斜をつけたステレオ画像。シナプスを立体視することができる。(a<sup>3</sup>, b<sup>3</sup>, c<sup>3</sup>)1.5 nmステップの再スライ像。bar: 50 nm

(axo-dendritic), 樹状突起-樹状突起間(dendro-dendritic)の, 共に典型的な非対称性シナプスを形成することが知られており<sup>3)</sup>, シナプス小胞は球形で, PSDは厚く, 広いシナプス間隙を持つ(それぞれ図3 b, 3 c). シナプスの密度は, セロトニンニューロンによるシナプスの密度が, 嗅神経と僧帽/房飾細胞によるシナプスの密度に比べて著しく低かった.

電子線トモグラフィーによる解析

従来, 既に形態学的同定がなされ, 機能的解析も進んでいるグルタミン酸作動性の嗅神経と投射ニューロンの非対称性シナプスと比較するために, 電子線トモグラフィーによって得られた立体再構成像を用いて, 各シナプスのPSDの厚さ, シナプス間隙の幅, シナプスの直径, シナプス小胞の直径を精細に測定した(表1). セロトニンニューロンのシナプス形

表1 シナプスの構成要素の測定

	5-HT	ON	MC
PSD	22.6±8.1	32.0±2.1	31.8±2.6
シナプス間隙	21.6±3.6	23.8±2.4	27.2±1.3
シナプスの直径	198.6±26.5	273.2±45.6	165±20.4
シナプス小胞の直径	32.2±5.9	32.6±5.7	34.8±6.1

5-HT: 5-hydroxytryptamine, ON: olfactory receptor neuron, MC: mitral/tufted cell  
単位は nm

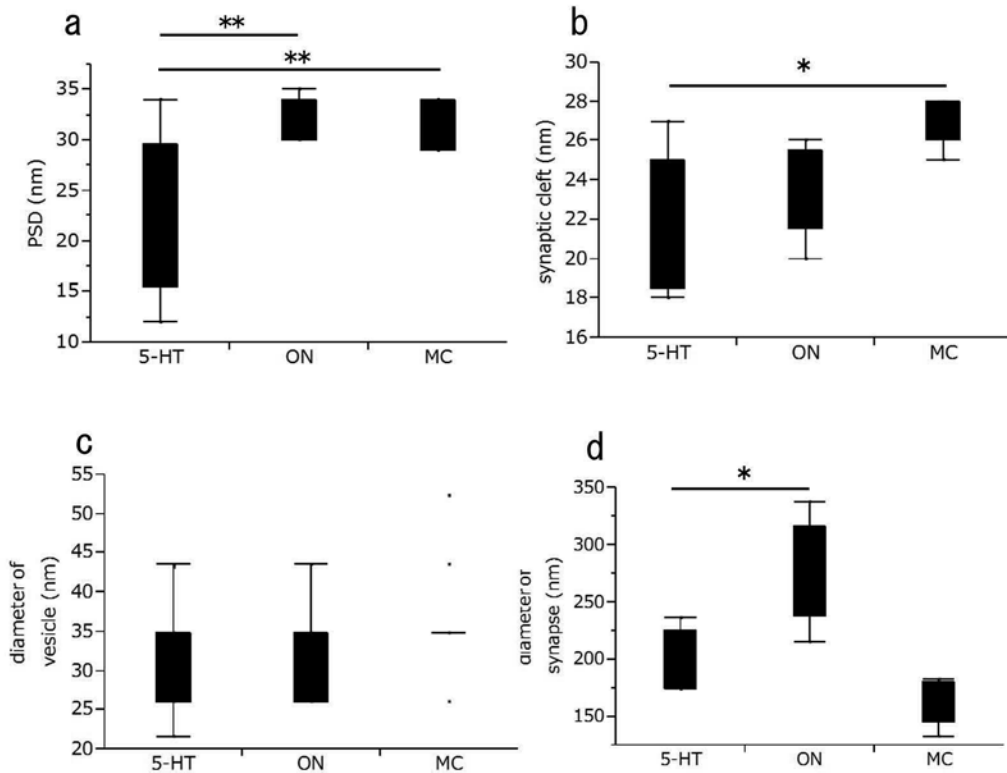


図4 セロトニンニューロン(5-HT), 嗅神経(ON), 僧帽/房飾細胞(MC)のPSD, シナプス間隙, シナプス小胞の直径, シナプスの直径の定量解析(各n=5). PSDにおいて, 5-HTの分散が他のニューロンより有意差を持って大きい(a, \*\*: F検定, p < 0.05). シナプス間隙において, 5-HTの平均が有意差を持ってMCより小さい(b, \*: t検定, p < 0.05). シナプスの直径において, 5-HTの平均が有意差を持ってONより小さい(d, \*: t検定, p < 0.05).

態の多様性を調べるためにセロトニンニューロンと嗅神経、セロトニンニューロンと僧帽/房飾細胞の各ペア間で両側 F 検定と、Welch 検定または Student's t 検定を行った。PSD に関しては、セロトニンニューロンと嗅神経、セロトニンニューロンと僧帽/房飾細胞それぞれのペア間で、分散に統計学的な有意差があったが(それぞれ  $F = 14.5, p = 0.024$ ;  $F = 9.7, p = 0.049$ )、平均に有意差はなかった(それぞれ  $p = 0.058$ ;  $p = 0.061$ ) (図 4 a)。シナプス間隙に関しては、どちらのペア間にも分散に統計学的な有意差はなかった(それぞれ  $F = 2.2, p = 0.45$ ;  $F = 7.5, p = 0.076$ )。平均では前者では有意差はなかったが ( $p = 0.29$ )、後者では有意差があった ( $p = 0.02$ ) (図 4 b)。シナプス小胞の直径に関しては、両ペアの間で分散には統計学的な有意差はなく(それぞれ  $F = 1.1, p = 0.88$ ;  $F = 1.1, p = 0.86$ )、平均でも有意差はなかった(それぞれ  $p = 0.8$ ;  $p = 0.08$ ) (図 4 c)。シナプスの直径に関しては、どちらのペアにおいても分散に統計学的な有意

差はなかったが(それぞれ  $F = 2.9, p = 0.32$ ;  $F = 1.7, p = 0.62$ )、平均では前者に有意差があり ( $p = 0.018$ )、後者には有意差がなかった ( $p = 0.06$ )。 (図 4 d)。それぞれのニューロンのシナプスの特徴を表 2 にまとめた。セロトニンニューロンのシナプスは、グルタミン酸作動性の嗅神経や投射ニューロンが形成する典型的な非対称性シナプスと比べると、嗅神経より直径の小さいシナプスで、シナプス間隙が投射ニューロンより狭く、嗅神経と投射ニューロンと比べ特に PSD において多様性の著しいシナプスであるといえる。

#### セロトニンニューロンと VGLUT3 の共存

共焦点レーザー顕微鏡による解析で、約半数程度のセロトニンニューロンが VGLUT3 免疫陽性を示した。VGLUT3 は、セロトニンニューロンの軸索の varicosity の部位に一致して見られた (図 5)。このことからセロトニンニューロンには、神経伝達物質としてのグルタミン酸を

表 2 各ニューロンのシナプスの特徴

	5-HT	ON	MC
シナプス小胞の形状	多くが球形	球形	球形
シナプス小胞の大きさ	中等度	中等度	中等度
シナプスの直径	小さい	大きい	小さい
PSD	様々な厚さ	厚い	厚い
有心性小胞	約半数にあり	無し	無し

PSD: postsynaptic density

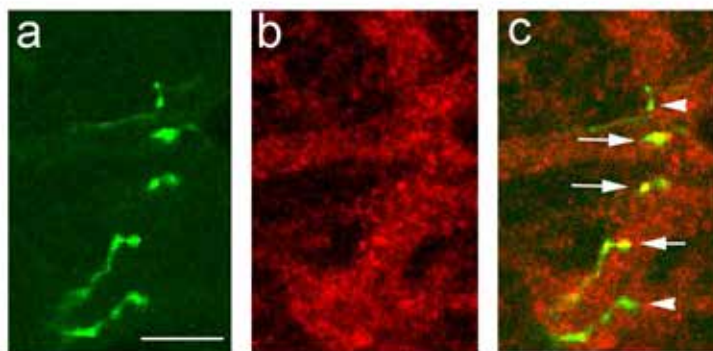


図 5  
セロトニン(緑, a)と VGLUT3(赤, b)による多重蛍光染色による共焦点レーザー顕微鏡画像。  
(c) merge 画像。セロトニンと VGLUT3 が共発現している varicosity (矢印) と共発現していない varicosity (矢頭) を認める。bar: 1  $\mu\text{m}$



持つものもあると考えられる。また、VGLUT3陽性であるが、セロトニンが陰性のニューロンも見られ、VGLUT3がセロトニンニューロン以外のニューロンにも存在することが示唆された。これらVGLUT3陽性/セロトニン陰性のニューロンは、VGLUT3陽性/セロトニン陽性のニューロンよりも突起が多く見られるが、現時点での形態学および化学的同一性はなされていない。

### 考察

本研究では我々は、免疫電子顕微鏡法と電子線トモグラフィー法を用いて、セロトニンニューロンのシナプスの詳細な微細形態学的解析を行った。その結果、様々な厚さのPSDを持ち、嗅神経より直径が小さく、シナプス間隙が投射ニューロンより狭い、多様性のある非対称性シナプスであることが明らかとなった。また、免疫組織化学法により、嗅球内セロトニンニューロンにグルタミン酸が共存することを示した。

### 電子線トモグラフィーについて

一般に透過型電子顕微鏡画像では、70-80 nm厚の超薄切片内の情報が二次元に投影されるため、切片内の垂直な方向については切片の厚み未満の解像度は得られない。これに対し、電子線トモグラフィーを用いれば、連続傾斜画像を撮影することにより、二次元の投影像から理論的に三次元の像を得られるため切片内の情報を得ることができる。これによりナノメートルレベルでの水平・垂直両軸の立体的高解像度が得られ、微細構造をより詳細に解析することができる<sup>21)</sup>。電子線トモグラフィー法は、その装置・解析ソフトの普及度の低さから、同法を用いたシナプス解析の有用性や実際の解析結果の報告は限られており<sup>22)</sup>、シナプスの構成要素を比較検討した研究はない。本研究では、この電子線トモグラフィーを用いることにより、セロトニンニューロンのシナプス形態について初めて詳細な比較検討を行ったものである。その結果、

従来認められた“多様性”という定性的観察所見に対し、初めて精細な形態計測に基づいた数値による定量的証明を得ることができた。

### PSDの多様性について

本研究の結果で、セロトニンニューロンのシナプスが特に多様性を示したPSDは、グルタミン酸の刺激でその厚さを増すことが報告されている<sup>23)</sup>。この現象はPSDを構成する主要なタンパクであるカルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII (CaMK II)<sup>24,25)</sup>が、グルタミン酸の刺激に反応して一時的にPSDに蓄積するためであることが示されている<sup>23)</sup>。つまり、PSDはグルタミン酸によるシナプスの活性を反映していると考えられる。セロトニンニューロンは、グルタミン酸だけでなくセロトニンなど複数の神経伝達物質を持つことから、グルタミン酸だけを神経伝達物質として持つニューロンとは受容体が異なるためシナプス後部への刺激の様式が異なり、PSDに多様性が認められ、更にこのことが、セロトニンが神経修飾(neuromodulation)を行っている<sup>26)</sup>ことの形態学的裏付けとなると考えられる。

### セロトニンニューロンの伝達様式について

セロトニンニューロンは背側縫線核、正中縫線核を起始核とし、嗅球を含めた脳全体に広範囲に投射し、中枢神経の機能調節を行っている<sup>7-12)</sup>。セロトニンニューロンが、投射ニューロンと傍糸球体細胞をそれぞれ脱分極させることを報告した電気生理学的解析で<sup>11,15)</sup>、それぞれ5-HT<sub>2A</sub>受容体(5-HT: 5-hydroxytryptamine, serotonin)、5-HT<sub>2C</sub>受容体を介したものであることが報告されている。セロトニンニューロンの伝達様式には、グルタミン酸によるシナプス伝達の他にセロトニンによる拡散性伝達(volume transmission)もあり、シナプス放出部位から離れた標的ニューロンへ伝達物質を到達させることができる。これらの受容体への結合が、シナプス伝達にどのように関わっているのかは依然として明らかとなっていない。セロト

ニンニューロンの刺激が脱分極を起こすという事実の一方、その化学的・分子的基盤が未だ推測の域にあり、故にシナプス伝達においてセロトニンの役割とその存在意義の解明はなされておらず、今後検討すべき課題である。

#### セロトニンニューロンの神経伝達物質について

脳内の非対称性シナプスにおいて用いられる神経伝達物質はグルタミン酸であることが一般的である<sup>27)</sup>。VGLUT1, 2はグルタミン酸作動性ニューロンのマーカーとしてよく用いられるが、両者は大脳における局在が異なる<sup>18)</sup>。実際に嗅球において非対称性シナプスを形成する代表的なニューロンである投射ニューロンと嗅神経では、VGLUT1, 2がそれぞれ免疫陽性である<sup>28)</sup>。一方、セロトニンニューロンにおいては、モノアミン系の神経伝達物質の小胞性トランスポーターである小胞性モノアミントランスポーター2(vesicular monoamine transporter 2, VMAT2)が免疫陽性であり<sup>29)</sup>、セロトニンが神

経伝達物質として用いられると考えられる。

しかし、*in situ hybridization*による解析で、背側縫線核において約60%のセロトニンニューロンがVGLUT3遺伝子を発現しているという報告があり<sup>30)</sup>、嗅球においてもシナプスを形成する varicosity の部位においてVGLUT3が免疫陽性である報告がある<sup>31)</sup>。我々の免疫組織化学的解析は同様の結果を示していることから、セロトニンニューロンはセロトニンとグルタミン酸の両方を神経伝達物質として用いると推測される。更に、セロトニンニューロンのシナプスに存在する有心性小胞は神経ペプチドを含んで、これを放出していると考えられる<sup>32)</sup>。セロトニンニューロンは複数の神経伝達物質や神経ペプチドを持って非対称性シナプスを形成するため、シナプス後部の受容体の構成が異なり、受容体を介したシナプス後部への刺激が異なることにより典型的な非対称性シナプスに比べ、より多様なPSDを示すと考えられる。このセロトニンニューロンは、嗅球において複数の介在

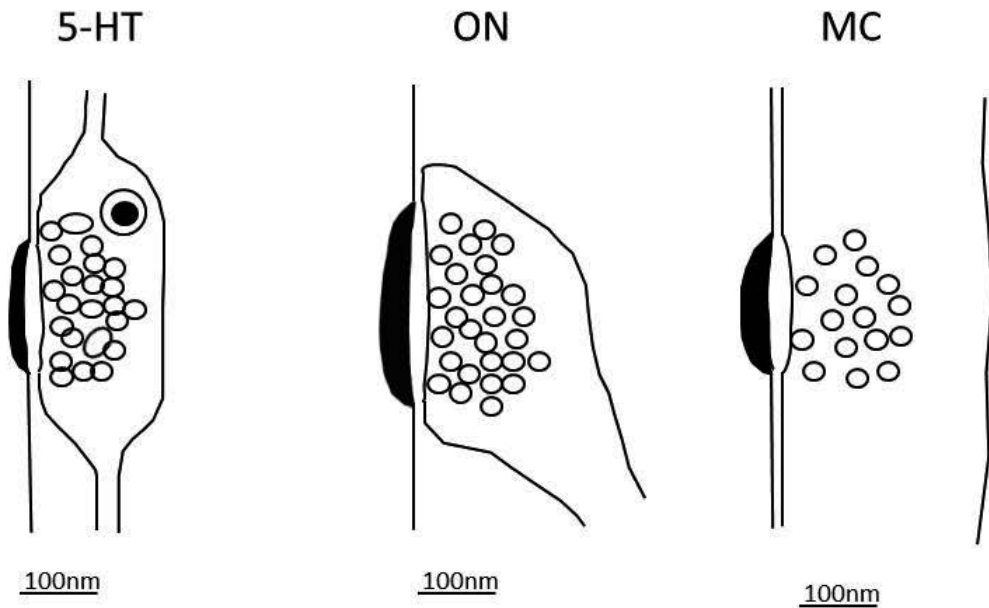


図6

セロトニンニューロン(5-HT), 嗅神経(ON), 僧帽/房飾細胞(MC)のシナプスの scheme. 5-HTはシナプスの直径が小さく、PSDが薄い。シナプス小胞は多くが球形だが扁平なものもあり、有心小胞を持つものもある。ONはシナプスの直径が大きく、PSDが厚く、球形のシナプス小胞を持つ。MCはシナプスの直径が小さく、PSDが厚く、球形のシナプス小胞を持つ。 bar: 100 nm

ニューロンと非対称性シナプスを形成すると報告されており<sup>16)</sup>, セロトニンニューロンの形成するシナプス, 含有する神経伝達物質, シナプスの標的ニューロンの多様性を考えると, セロトニンニューロンは嗅球において一様な調節ではなく, 標的ニューロンの神経回路内の特異性<sup>3)</sup>に対応し, より複雑な調節機構を持って嗅球の機能に関わっていると考えられる。

## 結語

本研究で解析した, セロトニンニューロン, 嗅神経, 僧帽/房飾細胞の各ニューロンのシナプスの scheme を図6に示す。嗅球において, セロトニンニューロンのシナプスは, 典型的なグルタミン酸作動性の嗅神経と僧帽/房飾細胞の非対称性シナプスと比べて, 特にPSDにおいて多様性の著しい形態を示した(図4 a)。これは, セロトニンとグルタミン酸との共存が関わっており, セロトニンとグルタミン酸, 更に有心性小胞から神経ペプチドが放出されることによって, シナプス後部への刺激が嗅神経や投射ニューロンと異なるためであろうと考えられる。

本研究の結果を基盤として今後, セロトニンを特異的に標識する動物を用いて嗅球と他領域との関係を解析すること, セロトニンの分泌が概日リズムを持っている<sup>33)</sup>ことから, これがPSDの多様性にどのように影響するのかを解析すること, 縫線核を破壊したときの電気生理学的, 行動生理学的影響を解析することなどを通して, セロトニンニューロンの嗅球神経回路における役割をより精緻に, より正確に解明したいと考えている。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり, 統計学的手法のご指導をいただいた自然科学教室の桶井 一秀博士, 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, 組織・電子顕微鏡センターの須田 泰司主任技術員, 松田 宣昭技術員, 抗VGLUT3抗体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, 日置 寛之博士に深謝いたします。また, 英文抄録の校正を頂いた Renee E. Cockerham 博士(Department of anatomy & Neurobiology, University of Maryland, School of Medicine, Baltimore, USA)に心より感謝いたします。

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(23基-1), (25整-56), (25大-5)の援助を受けて行われた。

## 引用文献

- 1) Halász N, Shepherd GM: Neurochemistry of the vertebrate olfactory bulb. *Neuroscience* 10: 579-619, 1983
- 2) Shipley MT, Ennis M: Functional organization of olfactory system. *J Neurobiol* 30: 123-176, 1996
- 3) Toida K: Synaptic organization of the olfactory bulb based on chemical coding of neurons. *Anat Sci Int* 83: 207-217, 2008
- 4) Shipley MT, Halloran FJ, de la Torre J: Surprisingly rich projection from locus coeruleus to the olfactory bulb in the rat. *Brain Res* 329: 294-299, 1985
- 5) Záborszky L, Carlsen J, Brashear HR, Heimer L: Cholinergic and GABAergic afferents to the olfactory bulb in the rat with special emphasis on the projection neurons in the nucleus of the horizontal limb of the diagonal band. *J Comp Neurol* 243: 488-509, 1986
- 6) McLean JH, Shipley MT: Serotonergic afferents to the rat olfactory bulb: I. Origins and laminar specificity of serotonergic inputs in the adult rat. *J Neurosci* 7: 3016-3028, 1987
- 7) Jones BJ, Blackburn TP: The medical benefit of 5-HT research. *Pharmacol Biochem Behav* 71: 555-568, 2002
- 8) Hurley LM, Devilbiss DM, Waterhouse BD: A matter of focus: monoaminergic modulation of stimulus coding in mammalian sensory networks. *Curr Opin Neurobiol* 14: 488-495, 2004
- 9) Ptak K, Yamanishi T, Aungst J, Milescu LS, Zhang R, Richerson GB, Smith JC: Raphé neurons stimulate respiratory circuit activity by multiple mechanisms via endogenously released serotonin and substance P. *J Neurosci* 29: 3720-3737, 2009
- 10) McLean JH, Darby-King A, Sullivan RM, King SR: Serotonergic influence on olfactory learning in the neonate rat. *Behav Neural Biol* 60: 152-162, 1993
- 11) Hardy A, Palouzier-Paulignan B, Duchamp A, Royet JP, Duchamp-Viret P: 5-Hydroxytryptamine action in the rat olfactory bulb: in vitro electrophysiological patch-

- clamp recordings of juxtglomerular and mitral cells. *Neuroscience* 131: 717-731, 2005
- 12) Moriizumi T, Tsukatani T, Sakashita H, Miwa T: Olfactory disturbance induced by deafferentation of serotonergic fibers in the olfactory bulb. *Neuroscience* 61: 733-738, 1994
- 13) Ohmura Y, Kumamoto H, Tsutsui-Kimura I, Minami M, Izumi T, Yoshida T, Yoshioka M: Tandospirone suppresses impulsive action by possible blockade of the 5-HT1A receptor. *J Pharmacol Sci* 122: 84-92, 2013
- 14) 吉田隆行: セロトニン関連分子をターゲットにした臨床応用. *Clinical Neuroscience* 32巻 6号: 604-605, 2014
- 15) Liu S, Aungst JL, Puche AC, Shipley MT: Serotonin modulates the population activity profile of olfactory bulb external tufted cells. *J Neurophysiol* 107: 473-483, 2012
- 16) Gracia-Llanes FJ, Blasco-Ibáñez JM, Náchter J, Varea E, Liberia T, Martínez P, Martínez-Guijarro FJ, Crespo C: Synaptic connectivity of serotonergic axons in the olfactory glomeruli of the rat olfactory bulb. *Neuroscience* 169: 770-780, 2010
- 17) Dong HW, Heinbockel T, Hamilton KA, Hayar A, Ennis M: Metabotropic glutamate receptors and dendrodendritic synapses in the main olfactory bulb. *Ann N Y Acad Sci* 1170: 224-238, 2009
- 18) Freneau RT Jr, Voglmaier S, Seal RP, Edwards RH: VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci* 27: 98-103, 2004
- 19) Freneau RT Jr, Burman J, Qureshi T, 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
- 20) Toida K, Kosaka K, Heizmann CW, Kosaka T: Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb: III. Structural features of calbindin D28K-immunoreactive neurons. *J Comp Neurol* 392: 179-198, 1998
- 21) 唐原一郎, 須田甚将, 峰雪芳宣: 電子線トモグラフィとは何か ナノスケールでの3Dバイオイメージング (解説) *細胞工学* 26巻 6号: 696-701, 2007
- 22) Burette AC, Lesperance T, Crum J, Martone M, Volkman N, Ellisman MH, Weinberg RJ: Electron tomographic analysis of synaptic ultrastructure. *J Comp Neurol* 520: 2697-2711, 2012
- 23) Dosemeci A, Tao-Cheng JH, Vinade L, Winters CA, Pozzo-Miller L, Reese TS: Glutamate-induced transient modification of the postsynaptic density. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10428-10432, 2001
- 24) Kennedy MB, Bennett MK, Erondu NE: Biochemical and immunochemical evidence that the "major postsynaptic density protein" is a subunit of a calmodulin-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 7357-7361, 1983
- 25) Kelly PT, McGuinness TL, Greengard P: Evidence that the major postsynaptic density protein is a component of a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 945-949, 1984
- 26) Shomrat T, Feinstein N, Klein M, Hochner B: Serotonin is a facilitatory neuromodulator of synaptic transmission and "reinforces" long-term potentiation induction in the vertical lobe of *Octopus vulgaris*. *Neuroscience* 169: 52-64, 2010
- 27) Armstrong N, Sun Y, Chen GQ, Gouaux E: Structure of a glutamate-receptor ligand-binding core in complex with kainate. *Nature* 395: 913-917, 1998
- 28) 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
- 29) Narboux-Nême N, Sagné C, Doly S, et al.: Severe serotonin depletion after conditional deletion of the vesicular monoamine transporter 2 gene in serotonin neurons: neural and behavioral consequences. *Neuropsychopharmacology* 36: 2538-2550, 2011
- 30) Hioki H, Nakamura H, Ma YF, Konno M, Hayakawa T, Nakamura KC, Fujiyama F, Kaneko T: Vesicular glutamate transporter 3-expressing nonserotonergic projection neurons constitute a subregion in the rat midbrain raphe nuclei. *J Comp Neurol* 518: 668-686, 2010
- 31) Shutoh F, Ina A, Yoshida S, Konno J, Hisano S: Two distinct subtypes of serotonergic fibers classified by co-expression with vesicular glutamate transporter 3 in rat forebrain. *Neurosci Lett* 432: 132-6, 2008
- 32) De Potter WP, Partoens P, Schoups A, Llona I, Coen EP: Noradrenergic neurons release both noradrenaline and neuropeptide Y from a single pool: the large dense cored vesicles. *Synapse* 25: 44-55, 1997

- 33) Corthell JT, Stathopoulos AM, Watson CC, Bertram R, Trombley PQ: Olfactory bulb monoamine concentrations vary with time of day. *Neuroscience* 247: 234-241, 2013

## Ultrastructural analysis of serotonergic synapses in the mouse olfactory bulb

Yoshinori SUZUKI, Emi KIYOKAGE, \*Kazunori TOIDA

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

**ABSTRACT** Because of its simple and distinct layers organized by a few types of neurons and its diverse chemical neuroactive substances, the olfactory bulb (OB) is one of the most desirable regions in which to analyze neuronal organization of the brain. The OB is the primary region that processes odor information and consists of olfactory receptor neurons, projection neurons, interneurons and centrifugal neurons. It is well known that the OB is regulated not only by interneurons but also by centrifugal afferents from other brain regions. Serotonergic fibers derived from the raphe nucleus, one of the centrifugal afferents from other brain regions, the OB is highly innervated by serotonergic fibers. These terminals make asymmetrical synapses onto the target neurons in various synapse formations. However, how different these synapses are from typical asymmetrical and how these differences are related to serotonergic function remains to be clarified. The aim of the present study is to accurately assess the morphometry of the synaptic fine structure of serotonergic neurons as compared with olfactory receptor neurons and projection neurons such as mitral/tufted cells. The synapses were analyzed by pre-embedding immuno-electron microscopy and electron tomography which enables analysis of the synapses in more detail. Additionally, the neurotransmitters of serotonergic neurons were analyzed by immunofluorescence. It was shown that the most common shape of synaptic vesicles of serotonergic fibers was round; the synaptic vesicles of olfactory nerves and dendrites of projection neurons were only round. Synaptic clefts of serotonergic fibers were narrower than that of projection neurons. Postsynaptic density (PSD) of serotonergic synapses was very different from that of olfactory receptor neurons and projection neurons. The diameter of serotonergic synapses, the width of the PSD, was smaller than that of the olfactory receptor neurons. Immunofluorescent study revealed that serotonergic varicosities occasionally co-expressed vesicular glutamate transporter 3 (VGLUT3). This indicates that serotonergic neurons have at least two neurotransmitters, serotonin and glutamate. Dense-core vesicles were characterized as containing monoamines and neuropeptides. In contrast, olfactory receptor neurons and projection neurons, which have been well known to exhibit typical asymmetrical synapses, may have use only one transmitter. PSD is reported to be thickened by

stimulation of glutamate. Together with findings of previous studies, the present study suggests that serotonergic synapses might release multiple substances: serotonin, glutamate, and a neuropeptide. Due to these multiple substances, serotonergic neurons may various forms of synapses.

*(Accepted on September 22, 2014)*

**Key words : Serotonin, Synapse, Electron Tomography, Olfactory bulb, Neural circuit**

---

\*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