

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2006 ～ 2008
 課題番号：18300108
 研究課題名 (和文) 大脳皮質連合野における抑制性神経細胞のギャップ結合ネットワーク
 研究課題名 (英文) Gap junction-coupled network of inhibitory neurons in the association cortex
 研究代表者
 福田 孝一 (TAKAICHI FUKUDA)
 九州大学・大学院医学研究院・准教授
 研究者番号：50253414

研究成果の概要：神経細胞どうしの連絡は通常化学シナプスで行われますが、その連絡は間接的です。ギャップ結合（電気シナプス）は細胞質どうしを直接連結するため、結合した神経細胞の電氣的活動が同期し、そのことが脳の高次機能にも重要と考えられています。本研究では大脳皮質連合野や線条体において、ギャップ結合による密なネットワークの存在を初めて実証しました。特にギャップ結合ネットワークの三次元構造やダイナミックな性質を、世界で初めて目に見える形で示しました。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	9,200,000	2,760,000	11,960,000
平成 19 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
平成 20 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	12,000,000	3,600,000	15,600,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：神経情報処理・ギャップ結合、大脳皮質、GABA

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質連合野は認知、記憶、学習など様々な高次神経活動に関わり、その機能を解明することは、我々人間の脳を理解する上で必須の課題である。連合野の機能について、ヒト

を含めた霊長類で、さまざまな行動実験や fMRI などのイメージング研究が盛んに行われている。しかしこのようないわゆるトップダウン的な解析が大きな成果を挙げている反面、連合野を構成する個々のニューロンや神経回

路レベルでの研究は、一次感覚野での非常に詳細な解析に比べて立ち遅れている。

これまで私は海馬や新皮質の GABA 作動性インターニューロンが作る新しいネットワーク構造、すなわち抑制性ニューロンがギャップ結合（電氣的シナプス）を介して広範なネットワークを形成していることを明らかにしてきた。通常の化学シナプスと異なり、ギャップ結合は神経細胞どうしの細胞質を直接連絡するので、ネットワークを構成するニューロン群の同期的活動が可能となる。同期的活動は、集団としての神経細胞活動の時間的空間的構造（そこに脳が扱う「情報」が表現されていると考えられている）を束ねる役割が想定されており、ギャップ結合ネットワークの解明は、脳における情報処理の理解に必須である。

2. 研究の目的

本研究課題では、これまで私が海馬や一次感覚皮質における研究で確立した方法論を用い、高次機能と関わりの深い脳領域におけるギャップ結合ネットワークの存在を実証し、かつその詳細な特徴を解明することを目指して研究を行った。

3. 研究の方法

深麻酔下に灌流固定した動物の脳を用い、神経細胞に特異的なギャップ結合蛋白であるコネキシン (Cx) 36 と代表的な抑制性ニューロンを同定するマーカー蛋白パルブアルブミン (PV) に対する特異抗体を用いて蛍光多重染色を行い、本研究助成で整備した共焦点レーザー顕微鏡で観察する。ネコにおける視覚性連合野の各領域 (19野、AMLS、ALLS、PMLS、PLLS) と多感覚性連合野 (AES) において PV 陽性ニューロンの樹状突起間に存在する Cx36 陽性の微細な点状構造を同定する。これらを初期視覚野 (17野、18野) と比較する。既に

以前の研究で、Cx36陽性の微細な点状構造が電子顕微鏡的にギャップ結合に対応することを確かめてある (Fukuda et al., 2006) が、さらに詳しい電顕観察を行う。PVニューロンの樹状突起コンタクト部位に一致する Cx36陽性のギャップ結合の分布を、単一の PV ニューロンから伸びる樹状突起に沿って3次元的に解析する。

各領域におけるギャップ結合ネットワークを比較する際に重要なポイントは、ネットワークを構成する PV 含有 GABA ニューロンの形態や分布様式自体に顕著な部位差が存在していることである。その点についての解析も併せて行う。

4. 研究成果

(1) 連合野のギャップ結合ネットワーク

ネコ視覚関連皮質を主な研究対象とし、以前に私が 18野でギャップ結合の存在を証明したパルブアルブミン (PV) 含有 GABA ニューロンが、各皮質領域で実際にギャップ結合ネットワークを形成している可能性を検討した。17野、18野、19野、AMLS野、ALLS野、PMLS野、PLLS野、AES野のいずれにおいても、PVニューロンの樹状突起間にギャップ結合が豊富に存在することを形態学的に実証した。さらに2層から6層の各層で樹状突起間ギャップ結合が認められた。すなわち抑制性ニューロンのギャップ結合ネットワークが、これまで私が1次の感覚野（視覚、聴覚、体性感覚）で得てきたものに匹敵するほど密な編み目を連合野でも作っていることが明らかになった。次にギャップ結合ネットワークと層構造との関連を検討した。ここでは4層を確実に同定することが重要であり、視床由来のグルタミン酸作動性終末を可視化する vGluRT2 の免疫染色の利用が有効であった。4層とその上下にある supragranular layer, infragranular

layer の3区分でギャップ結合の密度を比較すると、4層で大きな値を認めた。このことは、ギャップ結合の意義を考える上で示唆的である(線條体の項で詳しく述べる)。一方、大脳皮質の横方向への広がりについては、以前に1次視覚野でdiffuseで連続的なつながりがあることを示したが、基本的には連合野でも同様である一方で、後者で顕著に認められた性質として、非常に大きなPVニューロンが存在し、それらは横方向へ初期視覚野よりも大きく樹状突起を広げ、その遠位部にもギャップ結合が存在していることを確かめた。特に多感覚性連合野AESで顕著であった。これは恐らくAESニューロンが各種感覚入力への受容野特性を失い外界全体からの刺激に応答することに対応し、ギャップ結合により連結するPVニューロンが、AESにおける幅広い性質の入力の統合機能にマッチしたネットワーク構造を構築していると考えられる。対照的に、1次視覚野のPVニューロンの樹状突起の走向は縦方向に向かっており、一次視覚野の特徴である視覚要素抽出機能に対応すると思われる。

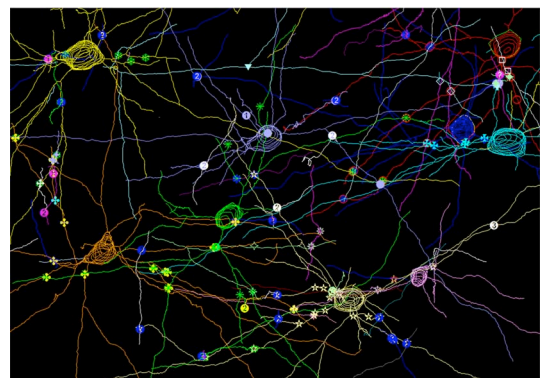
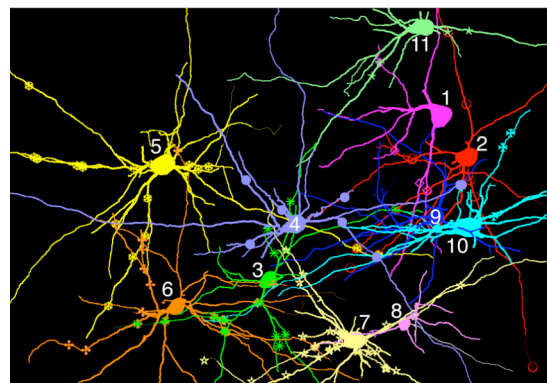
以上の研究結果は、ギャップ結合ネットワークが皮質全体に一樣な網の目として広がっているわけではないという重要な事実を意味する。PVニューロンの樹状突起は領野・層ごとに特徴的な3次元的広がりを示しており、必然的にギャップ結合ネットワークの空間構成もそれに規定される。原理的構成の共通性と、各皮質野構造の独自性という両面からギャップ結合ネットワークを理解すべきであることが結論づけられた。

(2) 線條体のギャップ結合ネットワーク

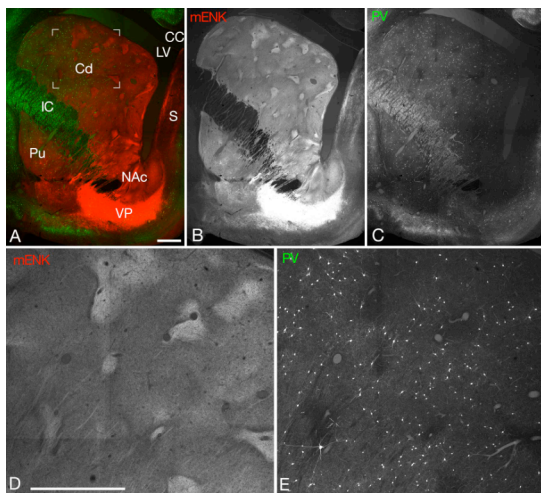
連合野についての解析を進める過程で、同じ切片内に存在する線條体(ネコでは被殻と淡蒼球)のPVニューロンが作るネットワークについて興味深い事実気がついた。線條

体のPVニューロンは大脳皮質におけるものとよく似た性質を持つが、大脳皮質では樹状突起が各方向に折り重なりながら、密でdiffuseなネットワークを形成しているのに対して、線條体内部で明らかにモザイク状の不均一な広がりがうかがわれた。さらに脳の前後方向(rostrocaudal)に見ても不均一さが存在する可能性に気づいた。従来線條体におけるギャップ結合の研究は形態学・生理学でそれぞれ一報あるのみで、大脳皮質の機能発現と不可分の関係にある線條体において、ギャップ結合ネットワークの詳しい検討が急務となり、それにも取り組んだ。

まず免疫蛍光染色により、PVニューロンの樹状突起間コンタクト部位に、大脳皮質同様のCx36の点状構造を確認した。次に同じ標本を電子顕微鏡用に処理し、Cx36陽性の点状構造を再度電顕で観察し、間違いなくギャップ結合に対応していることを確かめた。そこで線條体のPVニューロンが作るギャップ結合ネットワークを詳細に解析し、非常に



密な連結様式の存在を世界で初めて目に見える形で実証した。さらに上記のモザイク状の分布様式が意味するものを検討した結果、線条体に内在する patch/matrix 構成のうち matrix にネットワークが選択的に広がっていることを見だし、定量的にも実証した。



また線条体の rostro-caudal 方向での分布においても差が見られたが、ギャップ結合の密度を定量的に検討した結果、caudal 寄りの背外側領域が最も高い密度であることが判明した。興味深いことに、この領域は、ネコの生理学的研究において多感覚性を入力を受ける場所として知られている部分に合致していた。

基底核をマクロに見ると、線条体が大脳皮質と視床からの入力部であり、一方淡蒼球が出力部である。線条体にある PV ニューロンは feedforward 抑制を担っているが、そのような PV ニューロンが matrix 選択的に分布してギャップ結合ネットワークを形成しているのに対して、淡蒼球ではギャップ結合を認めなかった。このことを、大脳皮質ではギャップ結合が 4 層に多い所見と総合すると、システムとして見た場合の入力部にギャップ結合ネットワークが良く発達していることを意味する（未発表であ

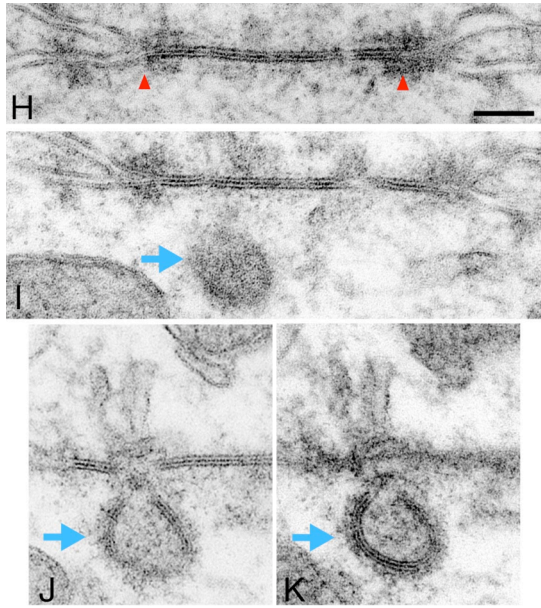
るが扁桃体でも入力部である基底外側領域にギャップ結合は豊富であるが、出力部である中心核では認めがたい。) また、特に線条体では多感覚性入力を受ける場所でギャップ結合ネットワークが顕著に発達していることを示した。ごく最近の線条体における計算論的研究において、私の成果も取り入れたモデル研究で、大脳皮質からの入力の同期性を検出する役目 (いわゆる coincidence detector) が PV ニューロン樹状突起間ギャップ結合に示された (Hjorth et al., 2009)。つまり、ギャップ結合の本来的機能として、従来想定されていた活動電位の同期化よりも、樹状突起にやってくる同時多発性スパイク列に内在する同期性の検出に寄与している可能性が、本研究を通じて浮かび上がってきたといえる。これは元来ギャップ結合が電気生理学的にはむしろ kinetics の遅いシグナルを通しやすい性質を備えていることにも符合する。本研究の成果を元に、ギャップ結合の本来的機能に迫る、新たな研究の展開の道筋が見えてきたわけであり、この点について是非今後追究していきたいと考えている。

(3) 神経細胞間ギャップ結合の動的性質・新しい可塑性概念の可能性

電子顕微鏡による解析の過程で、世界で初めて神経細胞間ギャップ結合のダイナミックな性質を示す証拠となる電子顕微鏡像を得た (下の連続切片写真)。

細胞表面からのエンドサイトーシスによるギャップ結合の回収は、ギャップ結合の turn over の機構としてこれまで in vitro の神経組織以外の系で観察されてきた。生体のしかも中枢神経系ニューロンが同じ機構でギャップ結合をダイナミックに制御していることがわかり、このことは特に神経系では新しいタイプの可塑性としての意味

を持ちうる。この成果も今後大きく発展させていきたい。



(4) 総括

以上のように、新皮質連合野・線条体という高次機能の発現に欠かすことのできない領域において、GABA ニューロンが濃密なギャップ結合ネットワークを形成していることを実証し、ネットワークの3次元構造を目に見える形で提示した。ギャップ結合ネットワークを形成するPVニューロンは、元々主ニューロンの神経活動の制御に中心的役割を持つと考えられるポピュレーションであり、PVニューロン相互を直接電氣的に連結するギャップ結合ネットワークの存在は、大脳皮質や線条体の神経回路の制御に大きな関わりを持つことが想定できる。また連合野、線条体いずれにおいても複数の感覚性入力収束してくる領域で、主ニューロン活動を時間的空間的に束ねるPVニューロンがギャップ結合による樹状突起ネットワークを密に形成していることが明らかになった。これは局所回路におけるギャップ結合ネットワークの位置づけとして、異なった性質からなる入力情報の統

合過程に意味を持つ構造と考えることが可能である。

ギャップ結合が動的な性質を示すことをin vivo の中枢神経系で初めて実証した。この発見は新しい可塑性概念につながる可能性を秘めている。特に今回ギャップ結合ネットワークの存在を追究したネコAES野では、単一ニューロンが視覚、聴覚、体性感覚への多感覚性応答を示す性質が知られているが、そのようなニューロンは子ネコの行動発達とともに生後数ヶ月をかけてゆっくりと出現してくることが近年明らかにされた。人間の子供の成長期における連合機能の発達の良いモデルとなると考えており、今後ギャップ結合ネットワークの生後発達にも取り組む予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1. Fukuda T. Network architecture of gap junction-coupled neuronal linkage in the striatum. *Journal of Neuroscience* 29: 1235-1243, 2009. (査読有り)
2. Fukuda T. Structural organization of the gap junction network in the cerebral cortex. *Neuroscientist* 13: 199-207, 2007. (査読有り)
3. 福田 孝一: ギャップ結合による神経細胞ネットワーク 顕微鏡 43: 188-197, 2008. (査読有り)

[学会発表] (計6件)

1. 福田孝一 小坂俊夫
線条体のパルブアルブミン含有GABA作動性神経細胞間に形成されるギャップ結合の形態学

的特徴, 日本解剖学会第64回九州支部学術集会, 2008. 10月25日 福岡大学

2. 福田孝一

Correlated CLSM-EM法による神経細胞間ギャップ結合ネットワークの解明.

第113回日本解剖学会「神経解剖学方法論: 壁を越えるための技術の創造」2008年3月27~29日
大分大学

3. 福田孝一、小坂俊夫

ギャップ結合を介して線条体のパルブアルブミン含有 GABA ニューロンが形成する樹状突起ネットワーク 日本解剖学会 2007 年 3 月 27~29日

4. 福田孝一

皮質下 GABA ニューロンがギャップ結合を介して形成する樹状突起ネットワーク, 日本解剖学会九州地方会 2006 年 10 月 21 日

5. Fukuda T., Kosaka T

Gap junctions linking dense and wide-ranging networks of neurons in the cerebral cortex and striatum. The 16th International Microscopy Congress, 2006 年 9 月 3~8 日 (Sapporo)

6. Fukuda T.

Dendritic network of cortical interneurons linked by gap junctions. The 35th SEIRIKEN international symposium - Recent advances in cortical and hippocampal microcircuits. 2006 年 7 月 24~26 日 (Okazaki)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 孝一 (FUKUDA TAKAICHI)
九州大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号: 50253414

(2) 研究分担者

該当無し

研究者番号:

(3) 連携研究者

該当無し

研究者番号: