

平成22年 3月 29日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007年度～2008年度
 課題番号：19500295
 研究課題名（和文）
 嗅球系球体シナプス神経回路情報処理機構の構造解析
 研究課題名（英文）
 Structural basis for information processing in the synaptic circuit
 of the olfactory bulb glomeruli
 研究代表者
 樋田 一徳（TOIDA KAZUNORI）
 川崎医科大学・教授
 研究者番号：40253405

研究成果の概要（和文）：

本研究は、報告者のこれ迄の解析結果を基盤として、形態的特徴のみならず、化学的、電気生理学的側面からの機能を同定した嗅球ニューロンのシナプス結合を解析したものである。具体的には、米メリーランド大学・Michael T. Shipley 教授の研究グループと共同実験により、tyrosine hydroxylase (TH)、glutamic acid decarboxylase (GAD)といった、嗅球ニューロンの代表的な化学マーカーを GFP 標識したトランスジェニックマウスを用い、パッチクランプ法により各ニューロンの刺激反応性を比較検討した。その結果、入力の嗅神経を刺激した結果、スライス嗅球における介在ニューロン、投射ニューロンの電気生理学的・薬理学的特性が多様であり、また同じ化学的性質を有するニューロン群の中でも、嗅神経刺激に対する反応性に少なくとも2つのタイプがある事などがわかった。更に記録後に biocytin を注入してニューロンの全体像を明らかにし、更に TH、GAD65 ニューロンについて、抗 GFP 抗体を用いて免疫電顕によりシナプス結合を解析し、シナプス入力の頻度が異なることがわかった。遺伝学的に同定された化学的性質、形態的特徴、シナプスなどを対応し、異種のニューロン間での違いを明らかにする事により、ニューロンの多様性に基づく嗅覚神経回路の精巧さが示された。

研究成果の概要（英文）：

We have reported neuronal heterogeneity underlying olfactory information processing in the olfactory bulb glomeruli. By means of combined electrophysiology, light and electron microscopy, bulbar neurons were identified both chemically (by GFP transgenic mice) and morphologically (by NeuroLucida). Patch clamp to TH- and GAD-GFP neurons exhibited two types of response to olfactory input, ON-direct and ON-indirect driven types. These finding were confirmed by electron microscopy revealing heterogeneous synaptic contact with special focus on input to then, and suggested elaborate architecture of synaptic circuit based on neuronal heterogeneity chemically, physiologically and morphologically.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：三次元構造、神経回路、シナプス、嗅球、GFP、介在ニューロン、電子顕微鏡

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

嗅覚の一次中枢嗅球は、情報の入力と出力の伝達経路が独立し、また比較的少数のニューロン種による単純明瞭な層構造に、豊富な生理活性物質を含有するという特徴を有することから、脳神経回路の基本的な構造と機能を理解するための魅力的な解析モデルと考えられている。

1990年代初めのAxelらの分子生物学的解析、及びその後の一連の研究によって嗅受容細胞の匂い分子受容体遺伝子がクローニングされ、同じ受容体遺伝子を発現する嗅受容細胞からの軸索は嗅球表層の同じ糸球体に特異的に収束することがわかった(2004年ノーベル医学生理学賞)。特定な匂い刺激に対し特定な糸球体が反応することは内因性信号検出等の機能的画像解析により確かめられ、嗅球糸球体は嗅覚の機能的構造単位として考えられるようになった。

注目すべきは、無数の嗅受容細胞(マウスで数百万)が少数の嗅球糸球体(マウスで約2千個)に特異的に収束した後、より多数の投射ニューロンにシナプス結合し、高次中枢に匂い情報を伝えるという解剖学的な収束・開散パターンである。このことは、無数の化学的刺激源によってもたらされる嗅覚情報が一旦糸球体でいわば圧縮・解凍される、複雑な匂い情報を処理する精巧な神経回路が嗅球に存在すると推測される。しかし嗅球神経回路について一般的に信じられていた従来の定説は極めて単純で、分子レベルの嗅覚受容メカニズムを十分説明できるものではなかった。このため申請者らは、より確度の高いニューロンの同定に基づいたシナプス神経回路の解明の必要性を感じ、これまで一貫して電子顕微鏡による三次元構造解析を行ってきた。その結果、嗅球を構成するニューロンは化学的性質と形態的特徴の面で極めて多様であり、化学的・形態的に同定された異種のニューロンはまた異なるシナプス結合を形成することが明らかとなった(Toida 2008; 後掲業績(3))。申請者らの形態学的知見は、専門書(“The Rat Nervous System” Paxinos 2004; “The Synaptic Organization of the Brain” Shepherd 2004)に引用され、また多様なシナプス結合を形成するニューロンは機能的にも異なる役割を神経回路内で演じていることが示唆された。申請者らの一連の形態学的知見によって、多様なシナプス結合を形成するニューロンは機能的にも異なる役割を神経回路内で演じていることが示唆され、嗅球神経回路を構築するニューロンの多様性がシナプス結合の面からも初めて明らかとなった。しかし嗅球神経回路の情報処理機構解明には、多様性に富むニューロンのシナプス結合の実際の神

経回路内機能を知る必要があるが、それは依然推測の域であり、そのためには多様な嗅球ニューロン種の個別の電気生理学的・薬理学的特性の同定が、研究開始当時の時点で次に解明すべき焦点の課題として提起された。

2. 研究の目的

以上のような背景から、本研究は、申請者のそれまでの解析結果を基盤として、化学的性質・形態的特徴のみならず電気生理学・薬理学的特性を同定したニューロンのシナプス結合の定量を行ない、一連の研究をより発展的に展開したものである。複雑な匂い情報を処理する嗅球シナプス神経回路機能をより正確に理解する為に、微細構造レベルでの確かな形態学的基礎を構築すること必要である。このため本研究は、特に海外共同研究者と密接に連携し、嗅球糸球体神経回路を構成するニューロンのうち、申請者がこれ迄の一貫して電子顕微鏡レベルで明らかにした形態解析結果を基盤として、形態的特徴のみならず、化学的性質や、電気生理学的特性、また薬理学的側面からの機能を同定した嗅球ニューロンのシナプス結合について統合的な定量解析を行うものである。これにより、複雑な匂い情報処理機構の解明の構造的基盤を築く事が本研究の目的である。

3. 研究の方法

前述の研究目的を達成するため、以下の具体的計画に基づいて、研究を遂行した。

[動物]: 動物は主に以下のマウスを用いた。

- (1) tyrosine hydroxylase (TH)-GFP transgenic mouse (provided from Dr. Kobayashi K., J Neurochem 2002 (82):295-304)
- (2) glutamate decarboxylase65 (GAD65)-GFP transgenic mouse (provided from Dr. Szabou G., Cereb Cortex 2004 (14):1122-1133)
- (3) glutamate decarboxylase (GAD)-67-GFP transgenic mouse (provided from Dr. Yanagawa Y., J Comp Neurol 2003 (467):60-7)
- (4) C57BL/6系 mouse

[方法]: 以下1)～4)の解析法を用いた。

1) 嗅球ニューロンの電気生理学的・薬理学的同定: 米メリーランド大学との共同実験

(平成19年11月9日～同年12月3日、及び20年10月10日～同年10月21日に渡り)

(Angust JL et al, Nature 2003; Puche AC et al, J Neurosci Methods. 2004; Hayar A et al J. Neurosci. 2004)

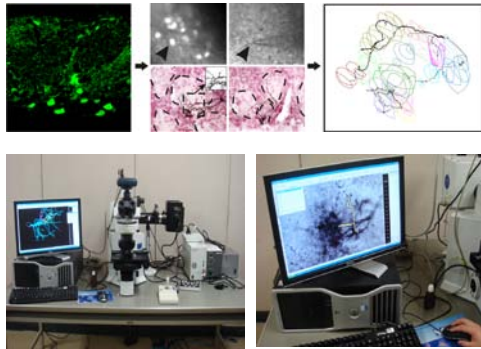
3～5週マウス嗅球の300mm厚の迅速新鮮スライスを作製し、パッチクランプ蛍光顕微鏡台上の培養液を満たしたチャンバーにスライスを載せた。その後、蛍光顕微鏡直視下

で GFP 蛍光標識された TH, GAD65, GAD67 ニューロンを同定した後、それらのニューロンにパッチクランプを行ない、電気生理学的特性を記録した。同時に、嗅受容細胞に刺激電極を設置し、刺激後の上記ニューロン群の反応を見た。(whole cell/patch clamp 法)

電気学的には、嗅受容細胞と TH, GAD65, GAD67 の各種ニューロンの反応性を解析した。電気的特性を同定した後、biocytinにより記録ニューロンを標識した。標識後、記録・標識ニューロンの固定液に浸した。

2) 電気生理学的・薬理的に同定されたニューロンの形態学的同定

固定されたスライスを、バイブラトームにて 50 μ m 厚の連続スライスを作製し、free float 法で ABC-DAB 発色し染色した。DAB にて標識されたニューロンを、NeuroLucida でトレースしたが、その際、連続スライスにわたって存在するニューロンは、切片越えに追跡し、トレースしたニューロン NeuroLucida で三次元的に立体計測を行なった。(下図)



3) 電気生理学的・薬理的に同定されたニューロンの免疫細胞化学的同定

・TH, GAD65, GAD67 の各種 GFP マウスを灌流固定し、嗅球を取り出した後にバイブラトームで 50 μ m 厚の連続スライスを作製し、free float 式に免疫多重染色を行なった。多重染色には、TH, GAD65, GAD67 の他、既知の嗅球ニューロンマーカーの GABA, calbindin (CB), calretinin (CR), parvalbumin (PV), olfactory marker protein (OMP) などに対する特異的抗体を用いた。

染色標本を共焦点レーザー顕微鏡による三次元観察し、電気生理学的・薬理的に同定したニューロンの形態学的・化学的同定を行った。特に免疫細胞化学的に同定された他の種類のニューロンとの形態比較、三次元的な位置関係(近接度合い)について注目した。

4) 同定された各種ニューロンのシナプス結合の電子顕微鏡(電頭)による解析:
TH-GFP, GAD65-GFP, GAD67-GFP の各 transgenic mice については、anti-GFP 抗体を用いて ABC-DAB or ABC-nanogold/silver 増感法を用いて免疫染色し、電頭用にエポキシ包埋し、マイクロトームにて 80nm 厚の超薄連

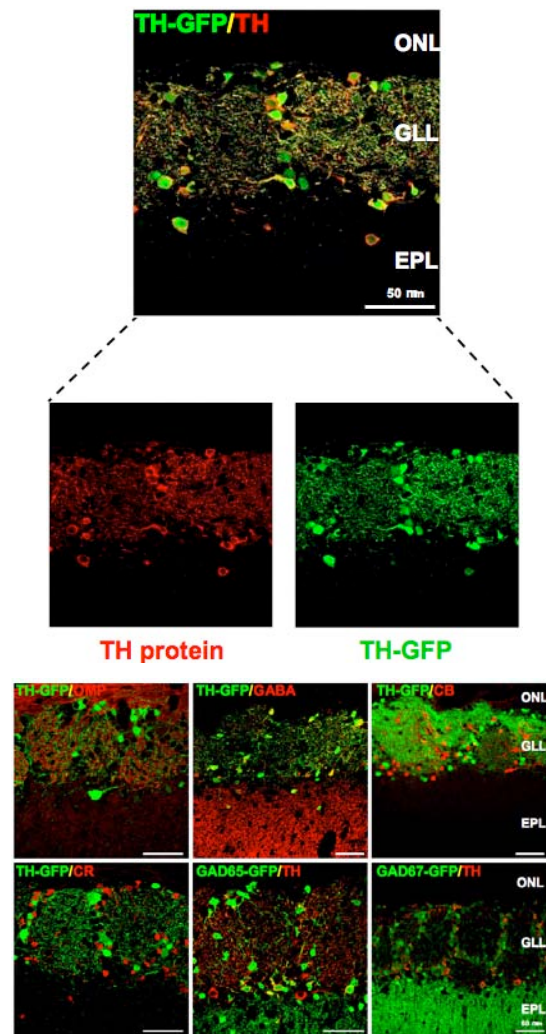
続切片を作製した。

電頭解析では、電気生理学的解析より TH, GAD65, GAD67 の各種ニューロンへの入力が推測される嗅受容細胞 (ON)、投射ニューロン (M/T) とのシナプス結合を注目した。

4. 研究成果

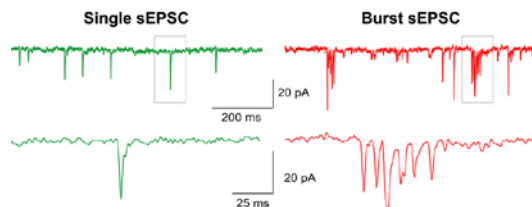
1) 化学的性質

まず、トランスジェニックマウスにより標識された GFP ニューロンが、従来の免疫組織化学法による抗体マーカー標識と同一である事を確かめた。一例として TH-ニューロンについての検討を下図に示す。



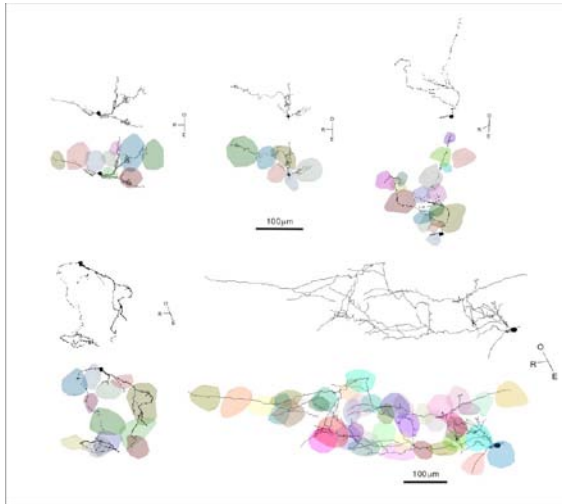
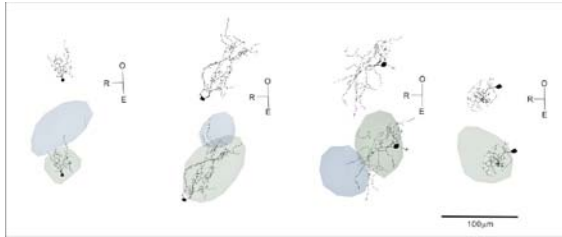
2) 機能的特性

次に、単一細胞パッチクランプ法により、嗅受容細胞 (ON) を刺激後の各種 GFP ニューロンの反応性を検討した。反応性は単一の EPSC を示す群と複雑な反応性の混在を示す群の 2 つに大別された。(下図)



3) 形態的特徴

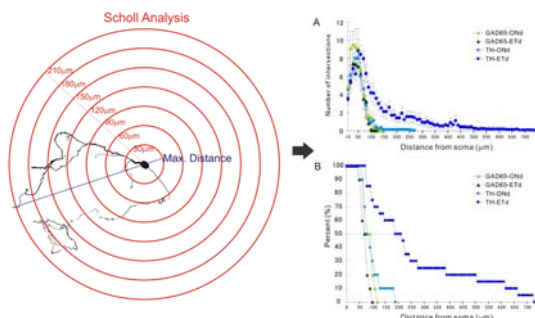
電氣的反応性を記録した後、色素を注入して、主に GAD65 ニューロンと TH ニューロンの三次元形態について解析をした。その結果、GAD65 ニューロン (下図上) は 1、2 個の糸球体にその突起を伸長しているが、対照的に TH ニューロン (下図下) は 5、6 個から数十個の糸球体に長く突起を伸長していることが明らかとなった。



上図に示すそれぞれのニューロン群の突起の伸展状況を比較する為に、三次元的に計測し、比較した。

Scholl analysis: distribution of processes as function of 3D distance from soma.

Intersections: the number of intersections the processes make at the given 3D radius.



これらの形態計測からも、GAD65 ニューロン野突起の伸長は限局的に留まるが、TH ニュー

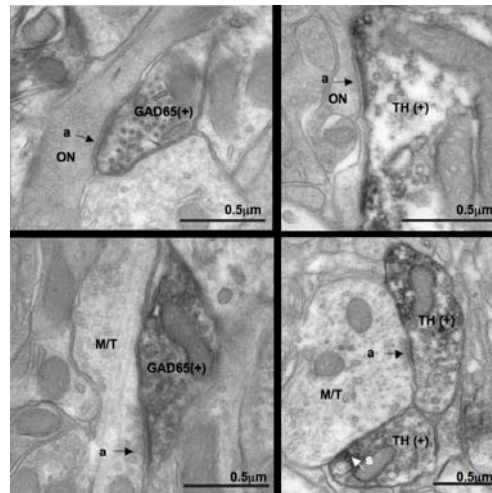
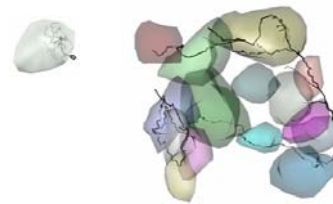
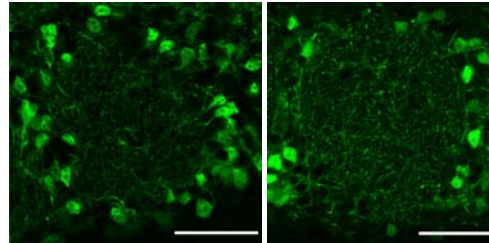
ロンは突起の伸長は長く、形態も多様性に富むことがわかる。

4) シナプス結合

次に GAD65 ニューロンと TH ニューロンが形成するシナプス結合について解析をした。

GAD65-GFP

TH-GFP



GAD65 ニューロンと TH ニューロンの典型的な例を示す。上図上段は、共焦点レーザー顕微鏡像、中段は単一の GAD65 ニューロンと TH ニューロンの三次元形態を示す。このような形態を示す GAD65 ニューロンと TH ニューロンのシナプスは前頁下段に示す。GAD65 ニューロンと TH ニューロン共に、嗅受容細胞 (ON) からの非対称性シナプス (a) を受ける。また同時に、投射ニューロン (M/T) からも非対称性シナプス (a) を受ける。GAD65 ニューロンと TH ニューロンを比べた場合、TH ニューロンの方が ON からのシナプス入力を受ける頻度がより高く、GAD65 ニューロンは ON から M/T からほぼ同頻度にシナプス入力を受ける。一方、GAD65 及び TH ニューロンは投射ニューロン (M/T) へも対称性シナプス (s) シナプス結合を形成している。投射ニューロ

ンとのシナプス結合は、mitral cell と tufted cell の識別は難しいが、報告者の最近の解析で、ウイルスベクター (sindbis virus) を用いた遺伝子導入による単一の mitral cell 又は tufted cell の標識法によれば、THニューロンは tufted cell からのシナプス入力に認められる。(未発表データ) この見解はより解析例数を増やして上で慎重な検討を要するが、少なくとも THニューロンの多くは ON からの直接的なシナプスが多いものの、電気生理学的には直接的な刺激効果を示す頻度は、形態的なシナプスの頻度ほど多くはない。これは ON からの直接のシナプス以外に、ON→M/T→TH といったように、段階的なシリーズシナプスを形成していることを示唆、あるいは裏付けていると思われる。一方 GAD65 ニューロンは電気生理学的所見と形態的なシナプスの解析所見は、より一致していると思われる。これは THニューロンは形態がより多様であり、突起のあらゆる部分での ON からのシナプスは多いものの、細胞体で記録する電気生理学的なデータには認められる頻度ほど反映しないものと考えられる。一方、GAD65 ニューロンはその突起の伸長は 1、2 個の糸球体に留まる為に、突起のあらゆる部分へのシナプス入力も細胞体での電気生理学的所見に直接的に影響するものと考えられる。

このような電気生理学的所見、形態的所見、電顕によるシナプス所見の対応に基づき、今後は投射ニューロンの識別をした上でのシナプス結合の定量、ON、M/T 以外のシナプスの検討などを行ないたいと考えている。

更に、GAD67 ニューロンに関しては、三次元形態とシナプスについて未解析であり、現在、光顕レベルでの予備的な検証・解析を進めている。

なお、電顕解析の傍ら、嗅球への高次中枢からの遠心性入力成分について免疫電顕にて解析を行っており、特にセロトニンニューロンに注目し解析を行なっている。

5. 主な発表論文等

〔著書〕(計 2 件)

(1) 樋田一徳

共焦点顕微鏡の原理と応用

組織細胞化学 2009

日本組織細胞化学会、131-137、(2009)

(2) 樋田一徳

超高压電子顕微鏡の生物学的応用

日本顕微鏡学会第 18 回電顕サマースクール

テキスト (小澤一史編)

日本顕微鏡学会、125-138、(2007)

〔論文〕(計 13 件)

(1) Ozaki S., Toida K., (他 9 名 2 番目)

Impaired olfactory function in mice with allergic rhinitis. *Auris Naris Larynx* (2010 in press)、査読有

(2) Kiyokage E., Pan Y., (他 10 名 7 番目)

Molecular Identity of Periglomerular and Short Axon Cells. *J. Neurosci.* 30 (23), 1185-1196, (2010), cover image、査読有

(3) Suzuki-Yamamoto T., Toida K., Sugimoto Y, and Ishimura K.

Co-localization of prostaglandin F_{2a} receptor and prostaglandin F synthase-I in the rat spinal cord. *J. Lipid Research* 50, 1996-2003, (2009), cover image、査読有

(4) 樋田一徳、清蔭恵美、西田直樹

環境センサーとしての嗅覚 臨床環境医学 第 18 巻 1 号: 76-82, (2009)、査読有

(5) 清蔭恵美、樋田一徳、(他 2 名 2 番目)

嗅球の神経ステロイド 顕微鏡、第 44 巻 3 号: 215-218, (2009)、査読有

(6) Kosodo Y., Toida K., (他 9 名 2 番目)

Cytokinesis of neuroepithelial cells can divide their basal process before anaphase. *EMBO J.*, 27(23):3151-63 (2008)、査読有

(7) 樋田一徳、清蔭恵美、有井達夫

超高压電子顕微鏡による嗅球のニューロンとグリアの三次元構造解析. 顕微鏡、第 43 巻 4 号: 20-23, cover image (2008)、査読有

(8) Takami S., Toida K.

The structure and function of the olfactory system: an overview *Anat. Sci. Int.* 83 (4), 183-185, cover image (2008)、査読有

(9) Toida K.

Synaptic organization of the olfactory bulb based on chemical coding of neurons. *Anat. Sci. Int.* 83 (4), 207-217, (2008)、査読有

(10) Tominaga K., (他 8 名 4 番目)

Evidence for cancer-associated expression of NADPH oxidase 1 (Nox1)-based oxidase system in the human stomach. *Free Radic. Biol. Med.* 43(12):1627-38 (2007).、査読有

(11) Ohashi T., Toida K., (他 9 名 2 番目)

Effects of experimentally induced allergic rhinitis on the mouse olfactory system; electrophysiological and histological studies. *Nagoya Medical Journal* 48 (3): 219-232 (2007)、査読有

(12) Bovetti S., (他 5 名 5 番目)

Blood vessels form a scaffold for neuroblast migration in the adult olfactory bulb. *J. Neurosci.* 27(22)

:5976-80. (2007)、査読有
(13) Tsutsumi T, (他6名3番目)
Vesicular acetylcholine transporter-
immunoreactive axon terminals enriched in
the pontine nuclei of the mouse.
Neuroscience 146(4):1869-78(2007)、査読有

[学会発表] (計 11件)

(1) 清蔭恵美、樋田一徳

マウス嗅球糸球体における TH ニューロンの
シナプス解析 第 115 回日本解剖学会総会、
2010 年 3 月、於盛岡

(2) 樋田一徳

嗅球ニューロン・グリアの三次元構造解析
平成 21 年度生理研研究会「生理研超高压電子
顕微鏡の 30 年」、2010 年 3 月、於岡崎

(3) 樋田一徳

超高压電子顕微鏡によるバイオイメージング
第 50 回日本組織細胞化学会 (シンポジウム)、
2009 年 3 月、於京都

(4) 樋田一徳

共焦点レーザー顕微鏡の原理と応用
第 34 回日本組織細胞化学会講習会 (教育講
演)、2009 年 7 月、於徳島大学

(5) 樋田一徳

環境センサーとしての嗅覚
第 18 回日本臨床環境医学会 (シンポジウム)、
2009 年 7 月、於岡山

(6) 樋田一徳

嗅球シナプス神経回路の三次元微細構造解析
第 4 回中国四国電子顕微鏡技術研究会 (特別
講演)、2009 年 7 月、於川崎医科大学

(7) 樋田一徳

嗅球シナプス神経回路の三次元微細構造解析
第 114 回日本解剖学会総会・第 10 回解剖技術
研究・研修会 (教育講演)、2009 年 3 月、於
岡山理科大学

(8) 樋田一徳

嗅球グリアの三次元微細構造解析
第 114 回日本解剖学会総会、2009 年 3 月、於
岡山理科大学

(9) 樋田一徳

超高压電子顕微鏡及び電顕連続切片による嗅
球シナプス構成の三次元構造解析
第 113 回日本解剖学会総会 (シンポジウム)、
2008 年 3 月、於大分大学

(10) 樋田一徳

超高压電子顕微鏡の生物学的応用
日本顕微鏡学会・第 18 回電顕サマースクール
(教育講演)、2007 年 7 月、於日本医科大学

(11) Houtani T, (他5名2番目)

Characterization of cholinergic
terminal-like structures in the mouse

pontine nuclei. The 7th IBRO World
Congress of Neuroscience held in Melbourne,
Australia, July 12-17, 2007

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋田 一徳 (Toida Kazunori)

川崎医科大学・解剖学・教授

研究者番号: 40253405