

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500309

研究課題名(和文) 嗅球糸球体近傍ニューロン群の体系的解析：2タイプの傍糸球体細胞を中心として

研究課題名(英文) Analyses on the juxtglomerular neurons of the olfactory bulb: 2 types of periglomerular cells

研究代表者

小坂 克子 (KOSAKA KATSUKO)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：60202058

研究成果の概要(和文)：

嗅覚一次中枢嗅球の糸球体は機能的ユニットと考えられ、嗅覚情報処理において極めて重要であると考えられている。本研究では以下の3点を明らかとした。(1)我々が提唱している type 1 PG cell、type 2 PG cell における軸索の有無の検討を軸索初節部のマーカーである ankyrinG、Na チャネル、 β IV-spectrin の局在により検討した。その結果、糸球体近傍におけるニューロン群 tyrosine hydroxylase (TH)、calbindin、calretinin、NOS 陽性ニューロンで軸索初節部が認められたのは大型の TH 陽性ニューロン、明らかに tufted cell と考えられる大型の NOS 陽性ニューロン及び従来 short-axon cells と呼ばれてきた大型の PV、calbindin 陽性ニューロンであった。所謂 PG cells と考えられるニューロンの大部分では軸索初節部が認められなかった。このことは、granule cells との違いとされてきた PG cells の特徴である軸索の存在が必ずしも当てはまらないことを示唆していた。(2) 糸球体近傍 TH 陽性 GABA ニューロンの発生時期、成体でのニューロン新生を BrdU を胎生期(E13、E17)、新生時期(P3)、成体(P4w、8w)の様々な時期に投与して検討した。胎生期、新生時期に BrdU 投与したグループでは小型 TH 陽性ニューロンと大型 TH 陽性ニューロンが標識され、細胞体のサイズの分布は正規分布せず、2つの正規分布を合成することで説明出来た。P4w 及び P8w に BrdU 投与したグループでは小型 TH 陽性ニューロンのみの標識であり、細胞体のサイズの分布は正規分布した。これらのことから、成体で新生している TH 陽性ニューロンは小型のものであり、嗅球糸球体間結合を担う大型 TH 陽性ニューロンはこのグループとは異なると考えられる結論を得た。(3) 無軸索ニューロンである外網状層 PV 陽性ニューロンの樹状突起に ankyrinG がパッチ状に集積し、まさにその部位に Na チャネルや β IV-spectrin が局在していた。また、電子顕微鏡によりこの EPL の PV 陽性ニューロンの樹状突起のパッチ状の特殊な部位は軸索初節部及びランビエ絞輪に特異的とされている形質膜の裏打ち構造 membrane undercoating を有していることが明らかとなった。従って、この樹状突起の特殊な部位は分子構成的にも微細構造的にも軸索初節部及びランビエ絞輪に類似しており、スパイク発生部位 "hot spots" である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

In the olfactory bulb, the first center of the olfaction, the glomerulus is considered as a functional unit and thus to be important in the olfactory information processing. In the present study we examined following three points. (1) Do the periglomerular cells, type 1 and type 2, have axons? We applied multiple fluorescent immunostaining using antibodies of chemical markers for type 1 and 2 periglomerular cells as well as for axon initial segments, such as AnkyrinG, Nav, and β IV-spectrin. The confocal laser scanning observations revealed that large type of tyrosine hydroxylase (TH) positive GABAergic juxtglomerular neurons, nitric oxide synthase (NOS) positive external tufted cells and short-axon cells expressing NOS, calbindin and parvalbumin (PV). However, most of

periglomerular cells did not show the chemically identified axon initial segments, indicating those periglomerular cells are anaxonic. (2) As well known TH positive GABAergic juxtglomerular neurons are one of major groups of neurons generated even in adult period. On the other hand, there two types of TH positive neurons, large and small ones, and as we previously revealed the large type of TH positive neurons show long extending axonal processes to distant glomeruli making the inhibitory association system. In the present study we determined when both types of TH positive neurons are born and whether adult-generated TH positive neurons include both types. BrdU were injected at various developmental stages; prenatal period (E13, E17), neonate (P3) and juvenile or adult (P4w or 8w). This analysis revealed that both large and small TH positive neurons generated during prenatal and neonate periods. But only small type of TH positive neurons are adult-generated neurons. (3) We found particular axon initial segment-like or node of Ranvier-like sites “hot spots” on the dendritic segments of anaxonic PV positive GABAergic neurons in the external plexiform layer. These hot spots expressed chemical markers for axon initial segments and furthermore showed the ultrastructural feature characteristic to axon initial segment, membrane undercoating. Thus these hot spots are supposed to be the spike generating sites.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経解剖学

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学・神経組織学

キーワード：①解剖学 ②神経科学 ③脳・神経 ④共焦点レーザー顕微鏡 ⑤免疫細胞化学

1. 研究開始当初の背景

近年、嗅覚系は、分子認識システムのモデルとして重要視され始めている。一つの嗅細胞(ON)はただ一種類の匂い分子レセプターのみを発現し、嗅細胞の軸索終末は嗅覚一次中枢嗅球の表面付近にある特殊なシナプス野、糸球体に停止する。同じ匂い分子レセプターを発現した嗅細胞は特定位置に存在する糸球体へ軸索を収束させる。更に、異なった匂い分子は異なった組み合わせの嗅細胞群に認識されるという **combinatorial receptor codes for odors** が提唱されている。即ち、糸球体が機能的ユニットであり、匂い分子の化学的性質が二次元の糸球体層での特定位置の糸球体群の組み合わせにコードされてい

ること、即ち **combinatorial glomerular code for odors** を示唆している。更に、生理学的解析で糸球体層がリズムを発生し、また、投射ニューロンである僧帽・房飾細胞(M/T cell)一次樹状突起 tuft の糸球体侵入基部でのスパイク発生が入力によって制御されていることが示されている。このことは嗅球糸球体での情報処理が、嗅覚情報処理において極めて重要であることを示唆している。更に、糸球体は系統発生的に脊椎動物全般を通じて嗅球に見られ、それに加え、基本的に異なる神経系を有する無脊椎動物においても嗅覚系には糸球体が存在していることも嗅覚情報処理における糸球体の普遍的な重要性を示唆している。更に、機能的だけでなく構

造的にも各糸球体はそれに関与している細胞群がほぼそこに限局した樹状突起を伸ばし、主要なシナプス結合もその糸球体に限局しているという大きな特徴をもっている。即ち、一つの糸球体について詳細を解析することで嗅覚情報処理の初期段階の本質的に重要な部位を解析することができるという極めて有利な特徴をもっているといえる。我々は、糸球体がコンパートメント構造をしており、更にそのコンパートメントとの関連で従来単一の GABA 系ニューロンであるとされてきた傍糸球体細胞(PG cell)が化学的にも構造的にも多様であり、嗅入力を直接受ける type 1 PG cell グループと嗅入力を受けない type 2 PG cell グループ (PG1,PG2) に分れることを世界で初めて示した。

更に、糸球体内における M/T cell 間及び M/T cell と介在ニューロン間のギャップ結合、及び M/T cell 細胞体・近位樹状突起における介在ニューロンとの間のギャップ結合、嗅球からの投射ニューロンの多様性、多様な短軸索ニューロンの存在等、従来考慮されていなかった多くの新たな所見を明らかにしてきた。このような最近の新たな所見は嗅球の機能を考える上で、新たな問題点を浮かび上がらせるとともに、基盤となる構造をより詳細に解析する必要性を示している。

2. 研究の目的

本研究では、嗅覚の一次中枢嗅球における嗅覚情報処理の初段階の構造的基盤を解明することを目的としており、次の3点の解明をめざす。

(1)申請者らが提唱している **type 1 PG cell**、**type 2 PG cell** は樹状突起の分布のみでなく軸索の有無・広がり・ターゲットの点で差異があるかどうかを明らかにする。

(2) **type 1 PG cell** の1グループとした **tyrosine hydroxylase(TH)**陽性ニューロンのサブグループの形態学的解析。

(3) 最近我々が示唆した外網状層のカルシウム結合蛋白 **parvalbumin** 含有介在ニューロンの樹状突起におけるスパイク発生に対応する特殊な部位のより詳細の検討、及び、他のニューロンでの同様の特殊部位の存在の検討。

3. 研究の方法

(1) **type 1 PG cell**、**type 2 PG cell** における軸索の有無の検討。

スパイク発生部位である軸索初節部（及びランビエ絞輪）に集積して発現している Na チャネルや **ankyrinG**、**βIV-spectrin** 等の細胞骨格・裏打ち蛋白に対する抗体と **type 1 PG cell**、

type 2 PG cell のマーカーである **tyrosine hydroxylase(TH)**、**calbindin**、**calretinin**、**NOS** に対する抗体を用いた多重蛍光抗体染色標本を作製した。共焦点レーザー顕微鏡による観察で軸索初節部の有無を検討した。

(2)**type 1 PG cell** の1グループとした **tyrosine hydroxylase(TH)**陽性ニューロンのサブグループの形態学的解析。

糸球体周辺部の **TH** 陽性ニューロンはその細胞体のサイズから2つのサブグループからなることが明らかとなっている。我々の逆行性トレーサー実験により嗅球連合性ニューロンと考えられる糸球体近傍 **TH** 陽性 **GABA** ニューロンは大型のタイプであることが明らかとなってきた。一方、糸球体近傍 **TH** 陽性 **GABA** ニューロンは成体でも **SVZ** でニューロン新生し、**RMS** により嗅球糸球体層に組み込まれるとされている。このことに基づき、連合ニューロンと考えられる大型の **TH** 陽性 **GABA** ニューロンと、おそらく細胞体近傍での作用が主と考えられる小型の **TH** 陽性 **GABA** ニューロンの発生時期、成体でのニューロン新生の有無を検討した。**BrdU** を胎生期 (**E13**, **E17**)、新生児期 (**P3**)、**juvenile** (**4w**)、成体 (**8w**) に投与し、生後 **8w** または **12**, **16w** に固定し、2重蛍光抗体染色標本を作製した。共焦点レーザー顕微鏡による観察で、それぞれの時期に **BrdU** を投与した場合の **BrdU** 陽性 **TH** 陽性ニューロンの細胞体のサイズを計測した。

(2) 樹状突起におけるスパイク発生に対応する特殊な部位のより詳細の検討。

上記の(1)を検討する過程で、我々は外網状層のカルシウム結合蛋白 **parvalbumin** 含有介在ニューロンの樹状突起におけるスパイク発生に対応する特殊な部位の存在を示唆する所見を得た。これに対するより詳細の検討を免疫細胞化学、共焦点レーザー顕微鏡及び電子顕微鏡により検討した。スパイク発生部位である軸索初節部及びランビエ絞輪に集積して発現している **Na** チャネルや **ankyrinG**、**βIV-spectrin** 等の細胞骨格・裏打ち蛋白に対する抗体と **PV** 抗体との2重蛍光染色を用いて検討した。更に、**NOS**、**calbindin**、**calretinin** に対する抗体との多重蛍光抗体染色によって、他のニューロンでの同様の特殊部位の存在の検討をした。

4. 研究成果

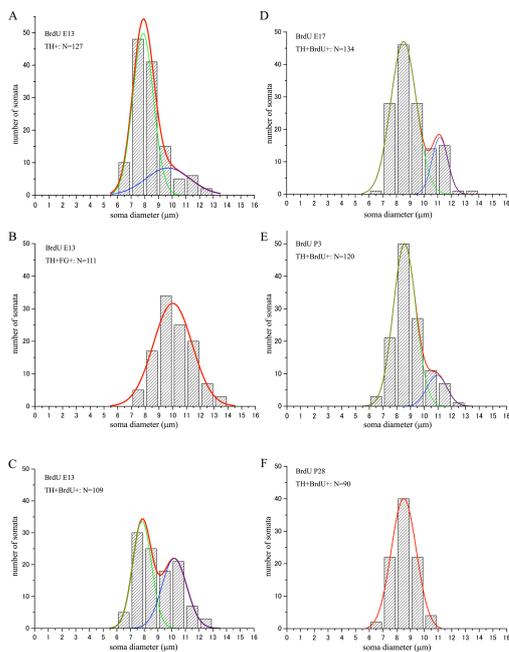
(1) **type 1 PG cell**、**type 2 PG cell** における軸索の有無の検討。

糸球体近傍におけるニューロン群 **tyrosine hydroxylase(TH)**、**calbindin**、**calretinin**、**NOS** 陽性ニューロンで軸索初節部が認められたのは大型の **TH** 陽性ニューロン、明らかに **tufted cell** と考えられる大型の **NOS** 陽性

ニューロン及び従来 short-axon cells と呼ばれてきた大型の PV, calbindin 陽性ニューロンであった。所謂 PG cells と考えられるニューロンの大部分では軸索初節部が認められなかった。このことは、granule cells との違いとされてきた PG cells の特徴である軸索の存在が必ずしも当てはまらないことを示唆していた。

(2) type 1 PG cell の 1 グループとした tyrosine hydroxylase (TH) 陽性ニューロンのサブグループの形態学的解析。

E13 に BrdU 投与したグループでは小型 TH 陽性ニューロンとかなり多数の大型 TH 陽性ニューロンが標識され、細胞体のサイズの分布は正規分布せず、2 つの正規分布を合成することで説明出来た。E17, P3 でも同様であったが、大型 TH 陽性ニューロンの標識の比率は E17, P3 ではかなり減った。一方、P4w 及び P8w に BrdU 投与したグループでは小型 TH 陽性ニューロンのみの標識であり、細胞体のサイズの分布は正規分布した。これらのことから、成体で新生している TH 陽性ニューロンは小型のものであり、嗅球系球体間結合を担う大型 TH 陽性ニューロンはこのグループとは異なると考えられる結論を得た。

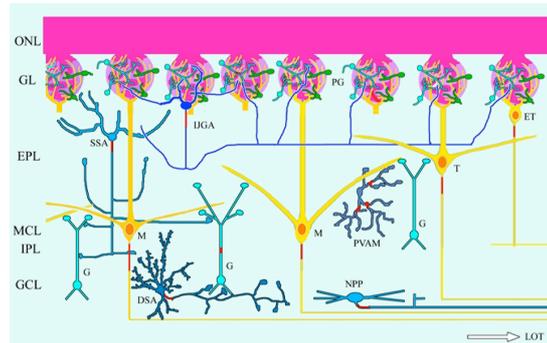


(3) 樹状突起におけるスパイク発生に対応する特殊な部位のより詳細の検討。

蛍光免疫多重染色ー共焦点レーザー顕微鏡解析により、無軸索ニューロンである外網状層 PV 陽性ニューロンの樹状突起に ankyrinG がパッチ状に集積し、まさにその部位に Na チャネルや β IV-spectrin が局在していた。また、電子顕微鏡によりこの EPL の PV 陽性ニューロンの樹状突起のパッチ状の特

殊な部位は軸索初節部及びランビエ絞輪に特異的とされている形質膜の裏打ち構造 membrane undercoating を有していることが明らかとなった。従って、この樹状突起の特殊な部位は分子構成的にも微細構造的にも軸索初節部及びランビエ絞輪に類似しており、スパイク発生部位”hot spots”である可能性が示唆された。更に、PV 陽性ニューロン以外でも、また NOS 陽性 PG cell の樹状突起に軸索初節部及びランビエ絞輪様 hot spots を発見した。また、calretinin 陽性 granule cells の一部に同様の樹状突起 hot spots の存在を認めた。

以上の所見を総合して下図に示す新たな神経回路を提唱した (red patches: hot spots and axon initial segments)。



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 6 件)

1. T. Kosaka and K. Kosaka (2011) “Interneurons” in the olfactory bulb revisited. *Neurosci Res.* 69, 93-99. 査読有
2. T. Kosaka and K. Kosaka (2010) Heterogeneity of calbindin-containing neurons in the mouse main olfactory bulb: I. General description. *Neurosci Res.* 67, 275-292 査読有
3. K. Kosaka, K. Sawai, C. Tanaka, M. Imafuji, A. Kamei and T. Kosaka (2009) Distinct domainial and lamellar distribution of clustered lipofuscin granules in microglia in the main olfactory bulb of young mice. *Neurosci Res.* 65, 286-295. 査読有
4. T. Kosaka and K. Kosaka (2009) Two types of tyrosine hydroxylase positive GABAergic juxtglomerular neurons in the mouse main olfactory bulb are different in their time of origin. *Neurosci Res.* 64, 436-441. 査読有
5. T. Kosaka, M. Komada and K. Kosaka

(2008) Sodium channel cluster, β IV-spectrin and ankyrinG positive “hot spots” on dendritic segments of parvalbumin-containing neurons and some other neurons in the mouse and rat main olfactory bulbs. *Neurosci Res* 62, 176-186. 査読有

6. T. Kosaka and K. Kosaka (2008) Tyrosine hydroxylase-positive GABAergic juxtglomerular neurons are the main source of the interglomerular connections in the mouse main olfactory bulb. *Neurosci Res* 60, 349-354. 査読有

[学会発表] (計2件)

1. 小坂克子、小坂俊夫, 若年令マウス主嗅球に見られた老化色素リポフスチンの分布: 層特異性と背腹領域間における顕著な差異, 第115回日本解剖学会総会, 2010. 3. 29. 盛岡
2. 小坂克子、小坂俊夫, マウス嗅球における parvalbumin 陽性ニューロン樹状突起にパッチ状に分布する軸索初節部様 hot spots, 第114回日本解剖学会総会, 2009. 3. 30. 岡山

[図書] (計1件)

T. Kosaka and K. Kosaka (2009) Olfactory bulb anatomy. In: Larry Squire (Ed.) *Encyclopedia of Neuroscience*, Elsevier, Amsterdam, vol. 7 (total pages 1269), pp. 59-69. Oxford: Academic Press. 査読有

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小坂 克子 (KOSAKA KATSUKO)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号: 60202058

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: