

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580423

研究課題名(和文)爬虫類、鳥類、哺乳類における大脳皮質の進化：グルタミン酸ニューロンによる証明

研究課題名(英文)Evolution of the cerebral cortex in mammals, birds, reptiles

研究代表者

阿閉 泰郎 (Atoji, Yasuro)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：90151084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本年度は鳩の脳内に存在するグルタミン酸作動性神経細胞を形態的に調べ、その神経連絡回路を解明することとした。実験の結果、聴覚神経節にvGluT2 mRNAが発現しており、AMPA型、カイニン酸型とMND A型の3種類のグルタミン酸受容体も聴覚神経節細胞に発現していた。蝸牛核も3種類の受容体が強く発現していることから、聴覚神経節細胞はグルタミン酸作動性神経細胞の可能性が高い。vGluT3発現神経細胞は脳では縫線核に、網膜ではアマクリン細胞に発現している事を見出した。これらの結果をこれまでに得られたデータと総合すると、鳥類の神経系ではvGluT2とvGluT3が存在していることがわかった。

研究成果の概要(英文)：In this fiscal year, the aim is carried out to examine neuronal circuits of glutamatergic neurons in the pigeon brain. VGluT2, a marker gene for glutamatergic neurons, is expressed in the auditory ganglion and three types of glutamatergic receptor (AMPA, kainate, NMDA) are also expressed. The cochlear nucleus expresses three glutamatergic receptor subunits as well. These findings suggest that neurons in the auditory ganglion are glutamatergic. VGluT3 is expressed in the raphe nucleus of the brain and amacrine cells of the retina in the pigeon. Together with these results, it appears that vGluT2 and vGluT3 exist in the nervous system of birds.

研究分野：神経解剖学

キーワード：グルタミン酸神経細胞 鳥 比較神経解剖学

1. 研究開始当初の背景

羊膜類（爬虫類、鳥類、哺乳類）における大脳皮質の進化は、各綱の相同性の変化を比較すればよく、Reinerら（2004）の提案が大枠で受け入れられている。しかし個々の部位で解決しなければならない大きな問題が3つ残っている。

- (1) 外套の相同性
- (2) 巢外套の相同性
- (3) 海馬の相同性

研究の目的は3つの問題が相互に関連し合っているため、一まとめにして解決することである。

2. 研究の目的

(1) 外套の相同性

哺乳類の大脳皮質の基本回路は興奮性ニューロンのグルタミン酸作動性神経細胞と抑制性ニューロンのGABA作動性神経細胞から構成されるという仮説がある。私達はグルタミン酸作動性神経細胞が鳥類外套のみに存在することを証明した(Islam and Atoji, 2008)。しかし爬虫類以下の脊椎動物についてはまだ確かめられておらず、今回の目的は2型小胞性グルタミン酸運搬体(VGLUT2)を指標として、爬虫類の大脳を用いてグルタミン酸作動性神経細胞の局在を系統解剖学的に解析することである。

(2) 巢外套および中外套の相同性

巢外套は哺乳類大脳皮質に相当する考え(Karten, 1997)と前障・内梨状核に相当する考え(Puelles, 2001)がある。哺乳類の皮質はグルタミン酸作動性神経細胞であるから、研究目的は巢外套のグルタミン酸神経細胞の投射様式を解明することに加え、大脳皮質マーカー遺伝子発現を検索することでどちらの仮説が正しいのか検討する。

(3) 海馬の相同性

鳥類と哺乳類海馬の相同性は位置に関してはほぼ確立したが、詳細な部位は線維連絡

の観点から対立している。例えば海馬を哺乳類のアンモン角に、海馬傍野は歯状回にそれぞれ相当するという考えと(Kahn et al. 2003)、海馬は歯状回に当たり、海馬傍野はアンモン角に相当するという意見である(Atoji and Wild, 2004)。現在のところ後者の仮説がもっともらしい。しかし哺乳類の錐体細胞と顆粒細胞がグルタミン性作動性神経細胞であることから、鳥類海馬でグルタミン酸作動性神経細胞の存在を証明しなければならない。今回の目的は哺乳類海馬グルタミン酸ニューロンが外側中隔核に投射することから、VGLUT2のin situ hybridizationと逆行性標識法の二重染色法で、海馬傍野のニューロンがグルタミン酸作動性の投射ニューロンであることを証明する。

3. 研究の方法

- (1) 外套は哺乳類の大脳皮質マーカー遺伝子をin situ hybridization法で調べる。
- (2) 巢・中外套は哺乳類の大脳皮質マーカー遺伝子の発現を調べる。
- (3) 海馬はin situ hybridizationと逆行性標識法の二重染色法を行う。

4. 研究成果

(1) 外套の相同性

鳥類の脳内のグルタミン酸作動性神経細胞の局在を解明した。また末梢神経である聴覚神経節と網膜のグルタミン酸作動性神経細胞を調べた。グルタミン酸作動性神経細胞を同定するためにVGLUT2を選び、受容体細胞を確認するためにイオンチャネル型グルタミン酸受容体も用いた。投射は逆行性トレーサーを利用した。また3型小胞性グルタミン酸運搬体(VGLUT3)の解析も行った。

実験の結果、VGLUT2神経細胞は大脳では外套に局在するが、外套下には認められない。小脳では顆粒細胞に強い陽性が見られる。

脳幹では視覚系や聴覚系に強い反応が見られる。聴覚神経節は VGLUT2 が発現しており、3 種類のグルタミン酸受容体も発現している。脳幹の蝸牛核にも 3 種類の受容体が強く発現していることから、聴覚神経節細胞はグルタミン酸作動性神経細胞の可能性が高い。VGLUT3 神経細胞は縫線核に（図 1）網膜ではアマクリン細胞に発現していた（図 2）これまで得られたデータと総合すると、鳥類の神経系では VGLUT2 と VGLUT3 が存在していることがわかった。哺乳類では VGLUT1, 2, 3 が存在していることから、鳥類では VGLUT2 が哺乳類の VGLUT1 と VGLUT2 の役割を果たしていると考えられる。しかし爬虫類は良いプローブが得られなかったため、今後解析を進める必要がある。

（ 2 ） 巢外套および中外套の相同性

哺乳類大脳皮質のマーカー遺伝子の ROR β と CCK を利用して成鶏脳内での発現を調べた。ROR β は巢外套と L 野に限局して発現している。CCK は中外套に一致して陽性が認められる。この所見から巢外套は哺乳類大脳皮質の第 4 層に相当し、中外套は 2 ~ 3 層に相当する可能性がある。

（ 3 ） 海馬の相同性

海馬-中隔核のグルタミン酸投射路を証明するために二重染色を行った。逆行性色素は CTB, B-CTB, BDA, B-WGA を選び中核核に投与した。染色を行い観察したところ、CTB は抗原性が失われ、ほとんど染まっていない。BDA では標識神経細胞数が非常に少なく、海馬の腹側の一部にとどまり相同性を判断するには不十分であった。B-CTB と B-WGA を注入した例では陽性を示す神経細胞がまったく認められなかった。おそらく注入濃度が低すぎたのであろう。

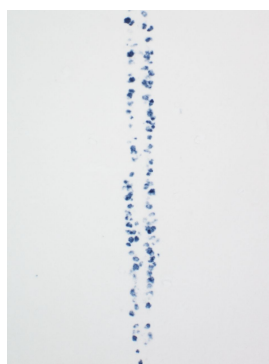


図 1 . 鳩脳の縫線核の vGluT3 発現

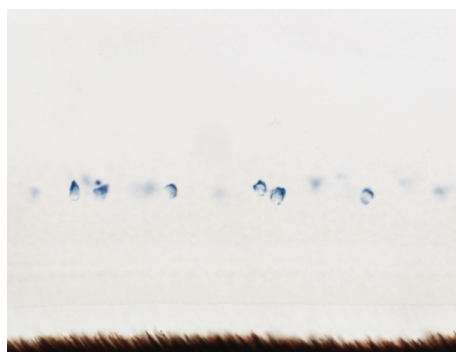


図 2 . 鳩網膜の vGluT3 陽性アマクリン細胞

< 引用文献 >

- Atoji, Y., Wild, J.M. Fiber connections of the hippocampal formation and septum and subdivisions of the hippocampal formation in the pigeon as revealed by tract-tracing and kainic acid lesions. *J. Comp. Neurol.* 475:426-461, 2004.
- Islam, M.R., Atoji, Y. Distribution of the vesicular glutamate transporter 2 and glutamate receptor 1 mRNAs in the central nervous system of the pigeon (*Columba livia*). *J. Comp. Neurol.* 511:658-677, 2008.
- Kahn, M.C. et al. Internal connectivity of the homing pigeon (*Columba livia*) hippocampal formation: an anterograde and retrograde tracer study. *J. Comp. Neurol.* 459:127-141, 2003.
- Karten, H.J. Evolutionary developmental biology meets the brain: the origins of

mammalian cortex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94:2800-2804.

- Puelles, L. Thoughts on the development, structure and evolution of the mammalian and avian telencephalic pallium. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 356:1583-1598, 2001.
- Reiner A. et al. Revised nomenclature for avian telencephalon and some related brainstem nuclei. J. Comp. Neurol. 473:377-414, 2004.

5 . 主な発表論文等

[学術雑誌] (計 10 件)

1. Atoji, Y. Expression of ionotropic glutamate receptors, AMPA, kainite and NMDA, in the pigeon retina. Exp. Eye Res. 136:72-77, 2015. DOI:10.1016/j.exer.2015.05.005 (査読あり)
2. Karim, M.R., Atoji, Y.: Distribution of vesicular glutamate transporter 2 and ionotropic glutamate receptors in the auditory ganglion and cochlear nuclei of pigeons (*Columba livia*). Anat. Histol. Embryol. 2015 (in press). DOI: 10.1111/ahe.12173 (査読あり)
3. Atoji, Y., Wild, J.M. Efferent and afferent connections of the olfactory bulb and prepiriform cortex in the pigeon (*Columba livia*). J. Comp. Neurol. 522:1728-1752, 2014. DOI: 10.1002/cne.23504 (査読あり)
4. Karim, M.R., Saito, S., Atoji, Y. Distribution of vesicular glutamate transporter 2 in auditory and song control brain regions in the adult zebra finch (*Taeniopygia guttata*). J. Comp. Neurol. 522:2129-2151, 2014. DOI: 10.1002/cne.23522 (査読あり)
5. Atoji, Y., Karim, M.R. Homology of the mesopallium in the adult chicken identified by gene expression of the neocortical marker cholecystokinin. Neurosci. Lett. 562:85-89, 2014. DOI:10.1016/j.neulet.2014.01.011 (査読あり)
6. Atoji, Y., Karim, M.R. Glutamatergic thalamopallial projections in the pigeon identified by retrograde labeling and expression of vGluT2 mRNA. Neurosci. Res. 84:43-46, 2014. DOI:10.1016/j.neures.2014.03.002 (査読あり)
7. Atoji, Y., Karim, M.R. Expression of vesicular glutamate transporter 3 mRNA in the brain and retina of the pigeon. J. Chem. Neuroanat. 61-62: 124-131, 2014. DOI:10.1016/j.jchemneu.2014.08.002 (査読あり)
8. Islam, M.R., Abdullah, J.M., Atoji, Y. Distribution of prosaposin mRNA in the central nervous system of the pigeon (*Columba livia*). Anat. Histol. Embryol. 42:257-265, 2013. DOI: 10.1111/ahe.12009 (査読あり)
9. Atoji, Y., Wild, M.J. Afferent and efferent projections of the mesopallium in the pigeon (*Columba livia*). J. Comp. Neurol. 520:717-741, 2012. DOI: 10.1002/cne.22779 (査読あり)
10. Atoji, Y., Karim, M.R. Expression of the neocortical marker, RORB, in the entopallium and field L2 of adult chicken. Neurosci. Lett. 521:119-124, 2012. DOI:10.1016/j.neulet.2012.05.068 (査読あり)

[学会発表](計 10 件)

1. 阿閉泰郎 . ハトの網膜における vGluT2, GluR, GAD65 の mRNA の局在. 第 120

- 回日本解学会。J. Physiol. Sci., 65, Suppl. 1, S231, 2015. 神戸国際会議場 (神戸・兵庫)
2. Atoji, Y., Karim, M.R. Localization of vesicular glutamate transporter 3 mRNA in the brain and retina of pigeons. 第 119 回日本解剖学会・抄録集 p.118, 2014. 自治医科大 (栃木・下野)
 3. 阿閉泰郎 . コレキストキニン発現による鳥類の中間外套の相同性。第 37 回日本神経科学大会 2014. パシフィコ横浜 (神奈川・横浜)
http://www.jnss.org/abstract/neuro2014/meeting_planner/sessiondetail.php?id=2014010783&u=1410569211
 4. 阿閉泰郎、Mohammad Rabiul Karim . ニワトリ終脳の entopallium と L 野における RORbeta の局在。第 118 回日本解剖学会・抄録集 p.123, 2013. かがわ国際会議場 (高松・香川)
 5. Karim, M.R., Saito, S., Atoji, Y. Molecular sequence and distribution of vesicular glutamate transporter 3 mRNA in the zebra finch brain (*Taeniopygia guttata*)。第 118 回日本解剖学会・抄録集 p.124, 2013. かがわ国際会議場 (高松・香川)
 6. Karim, M.R., Saito, S., Atoji, Y. Molecular sequence and distribution of vesicular glutamate transporter 3 mRNA in the brain of pigeons and chickens. 第 36 回日本神経科学大会 2013. 京都国際会議場 (京都・京都)
<http://www.jnss.org/abstract/neuro2013/sessiondetail.php?id=10603&u=1372063500>
 7. 阿閉泰郎 . 鳩における前梨状皮質の投射様式。第 36 回日本神経科学大会 2013. 京都国際会議場 (京都・京都) <http://www.jnss.org/abstract/neuro2013/sessiondetail.php?id=10216&u=1372063500>
 8. Mohammad Rabiul Karim, 齋藤正一郎、阿閉泰郎 . ハト脳におけるカイニン酸受容体 GluK1 および GluK2 の遺伝子配列と発現。第 35 回日本神経科学大会 2012. 名古屋国際会議場 (名古屋・愛知)
<http://www.jnss.org/abstract/neuro2012/sessiondetail.php?id=11096&u=1348273981>
 9. 阿閉泰郎 . 鳩の嗅球の脳内における投射様式。第 35 回日本神経科学大会 2012. 名古屋国際会議場 (名古屋・愛知)
<http://www.jnss.org/abstract/neuro2012/sessiondetail.php?id=10990&u=1348273982>
 10. 齋藤正一郎、カリム モハマド ラビウル、阿閉泰郎 . ハト聴覚受容器におけるグルタミン酸レセプターおよび小胞性グルタミン酸トランスポーターについて。第 35 回日本神経科学大会 2012. 名古屋国際会議場 (名古屋・愛知)
<http://www.jnss.org/abstract/neuro2012/sessiondetail.php?id=11411&u=1348274028>
- 6 . 研究組織
- (1) 研究代表者
阿閉 泰郎 (ATOJI, Yasuro)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号 : 9 0 1 5 1 0 8 4
 - (2) 研究分担者
齋藤 正一郎 (SAITO, Shouichiro)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号 ; 6 0 3 2 5 3 7 1
 - (3) 研究協力者
KARIM, Mohammad Rabiul