

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23300124

研究課題名(和文) 嗅球における情報処理の構造的基盤解明：新たな視点からのニューロン構成の再考

研究課題名(英文) The neuronal organization of the olfactory bulb revisited

## 研究代表者

小坂 俊夫 (Kosaka, Toshio)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00126054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,300,000円

研究成果の概要(和文)：顆粒細胞GC、傍糸球体細胞PGは嗅球内の主要な2種のGABA性介在ニューロンである。従来、GCは無軸索、PGは軸索突起を糸球体層に伸ばし、側方抑制に重要とされてきた。しかし、軸索初節部分子マーカーの検討で、PGサブグループは無軸索であることが示唆された。更に、カルシウム結合タンパクsecretagoginの解析で、新たなニューロンtransglomerular cellを発見し、糸球体近傍ニューロングループを再考する必要性を示した。また、僧帽・房飾細胞の糸球体内tuftの解析で両者の差異を示し、特にこれまでPGに特徴的とされてきたスパインが房飾細胞のtuftにも存在することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In the olfactory bulb, granule cells (GCs) and periglomerular cells (PGs) are 2 major types of GABAergic interneurons. Classical studies showed that GCs were anaxonic, whereas PGs have axons extending in the glomerular layer and were considered to play a role in the lateral inhibition. We examined the localization of molecular markers of the axon initial segments on various types of olfactory bulb neurons and found that most of chemically defined subpopulations of PGs were anaxonic. In addition we examined the neurons immunopositive for the newly found calcium-binding protein secretagogin. In the glomerular layer we found some secretagogin positive neurons were a new type of juxtglomerular neurons, which we named transglomerular cells. We also found that mitral cells and external tufted cells were different in the structural features such as spines of their intraglomerular dendritic tufts.

研究分野：神経解剖学

キーワード：神経科学 解剖学 脳・神経

## 1. 研究開始当初の背景

近年、嗅覚系は、匂い分子レセプターのクローニングから飛躍的に解析が進み、分子認識システムモデルとして重要視されている。特に、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すること、嗅細胞の軸索終末は嗅覚一次中枢嗅球の表面に二次元的に分布する特殊なシナプス野、糸球体に停止し、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内外側一対の糸球体へ軸索を収束させることが解明された。これらのことは、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的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を示唆している。更に、近年の生理学的解析はこれまでほとんど区別されなかった房飾細胞特に外房飾細胞と僧帽細胞とがかなり異なる生理学的性質を示すこと、従来重視されてきた糸球体間の抑制と同様にあるいはそれ以上に糸球体内での抑制が嗅覚情報処理に極めて重要であることを明らかにしつつある。このことは個々の嗅球糸球体で行われている情報処理が、嗅覚情報処理において極めて高い重要性を占めていることを示唆している。我々は、これまでのラットでの解析を基礎として、遺伝子改変動物の中心であるマウスの嗅球のニューロン構成の体系的解析をスタートさせ、従来信じられてきた嗅球のニューロン構成とは異なる、次のような新所見を明らかにしてきた。

- 1) 糸球体のコンパートメント構造。
- 2) 傍糸球体細胞(periglomerular cell PG cell)の化学的・構造的多様性。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 グループを提唱。
- 3) 古典的な Golgi 染色で軸索を有するとされてきた傍糸球体細胞の少なくとも一部は無軸索である可能性があること。
- 4) type 1 PG cell グループのメンバーである tyrosine hydroxylase (TH) 陽性 GABA 陽性 PG cell (DA-GABA PG cell) の多様性。細胞体のサイズから2つのサブグループに分けられ、大型の DA-GABA PG cell が糸球体間相互結合の主たる役割を担っていること。更に、BrdU での細胞の発生時期を決定する実験で大型の DA-GABA PG cell はほとんど pre~perinatal に発生し、いわゆる成体での神経新生していないことを示した。一方小型の DA-GABA PG cells は成体でも新生していることを明らかにした。この所見は DA-GABA PG cells が成体でも新生していると包括的に記載されていることに疑問を呈したものであった。これまでの我々の所見は傍糸球体細胞の化学的性質、糸球体内樹状突起・嗅神経入力での多様性を、軸索結合の面、発生時期の面にも拡

張するとともに、これまで考えてきた以上に傍糸球体細胞が多様であることを示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究ではこれまでの嗅球のニューロン構成を見直すことに主眼を置く。特に、焦点を当てるのは以下の点である。1) 新たな化学的性質とも考えられ近年注目されている transcription factors Sp8 及び Tbx21 の嗅球ニューロンでの発現。2) 近年新たなカルシウム結合タンパクとして報告された secretagoin 含有ニューロン (SCGN ニューロン) は、嗅球では顆粒細胞と傍糸球体細胞に含まれているとの報告があるので、このニューロングループのより詳細を検討する。3) 傍糸球体細胞における軸索の有無の検討。この問題は傍糸球体細胞の主たる役割と考えられていた糸球体間相互結合に大きな疑問を呈することである。もし、傍糸球体細胞の大部分が無軸索であるとすればその主たる役割は個々の糸球体内のみで関与すると考えざるを得なくなる。これに関してはこれまでの予備的所見でその可能性がかなり高いので、より詳細な検討でいくつかのタイプの傍糸球体細胞において明確な結論を得る。4) 生理学的に差異が示されている外房飾細胞と僧帽細胞の構造的差異、特に嗅神経入力の差異を検討する。これは生理学的に嗅神経の刺激による発火の容易さが両者で大きく異なることから糸球体内での樹状突起での入力に大きな違いがある可能性が示唆されているからである。光学顕微鏡での3次元構造解析と電子顕微鏡による定量的シナプス解析でこの問題を解明できると考える。

## 3. 研究の方法

上記の4点の目的を解明するため、以下の方法で検討を進める。

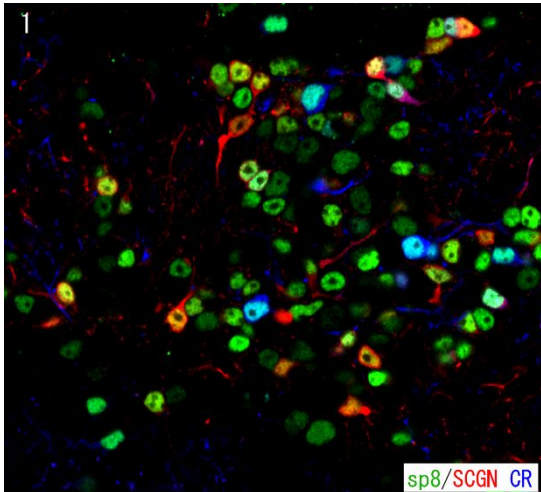
- 1) Sp8 特異抗体及び Tbx21 特異抗体を他のニューロンマーカーと免疫多重染色した標本を共焦点レーザー顕微鏡で観察。
- 2) 免疫細胞化学的手法で secretagoin ニューロンを染色し、蛍光標識標本の共焦点レーザー顕微鏡による形態解析、及び ABC-DAB 染色による光学顕微鏡 カメラルシダによる解析。更に、これまで我々が明らかにしてきたいくつかの化学的に同定された傍糸球体細胞・顆粒細胞との関係を蛍光多重染色・共焦点レーザー顕微鏡観察で検討。3) 軸索初節部 AIS の分子マーカー及び傍糸球体細胞各グループの化学的マーカーを用いたレーザー顕微鏡による検討。
- 4) Golgi 鍍銀染色標本、及び biotinylated dextran amine (BDA) 標識標本を用いた外房飾細胞と僧帽細胞の糸球体内樹状突起 tuft の画像解析システムによる3次元解析。更に、

combined CLSM-EM 法での電顕でのシナプス入力解析。

#### 4. 研究成果

##### (1) Sp8 及び Tbx21 の発現.

transcription factors, Sp8とTbx21はともにあるニューロン群の核に限局して免疫染色が見られた。Sp8陽性細胞は全層に分布していた。顆粒細胞層では表層におおく深層では少なかった。糸球体層ではGABAニューロンと考えられる傍糸球体細胞のサブタイプで transcription factors Sp8とTbx21 の発現は大きく異なった。calretinin陽性ニューロン、secretagogin陽性ニューロンはほとんどすべてSp8陽性Tbx21陰性、calbindin陽性ニューロンはすべてSp8陰性Tbx21陰性であった(図1)。tyrosine hydroxylase陽性GABAドーパミンニューロンはほとんどSp8陽性Tbx21陰性であった。また、一酸化窒素合成酵素NOS陽性傍糸球体細胞はタイプにより異なり、樹状突起が明確に染色されていない小型の傍糸球体細胞はSp8陽性Tbx21陰性、樹状突起が明確に染色されている傍糸球体細胞はSp8陰性Tbx21陰性であった。外房飾細胞 external tufted cellsと考えられる比較的大型の糸球体近傍NOS陽性ニューロンはSp8陰性Tbx21陽性であった。一方、Tbx21陽性細胞は

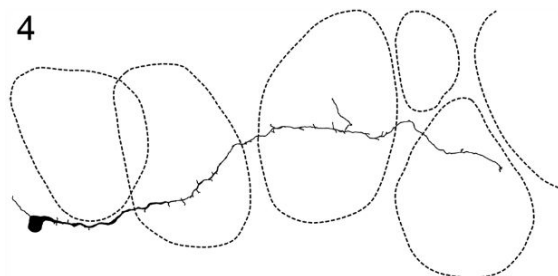
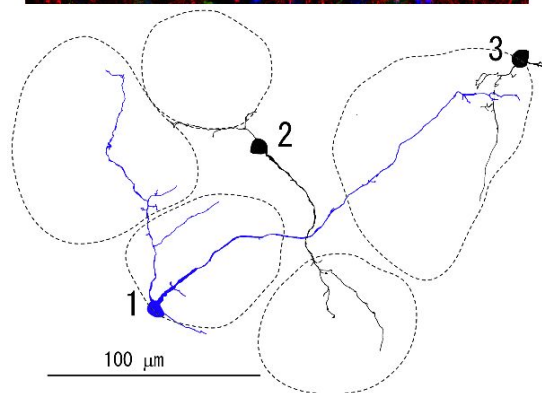
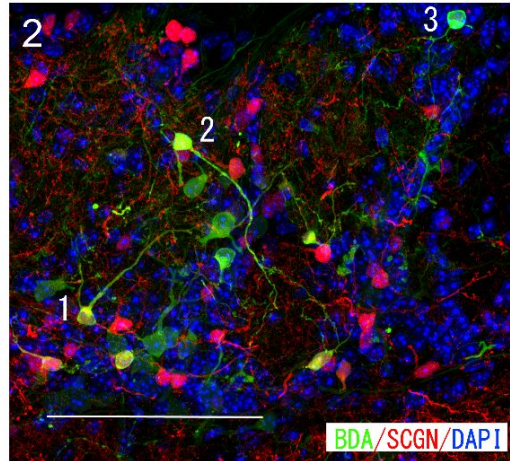


僧房細胞層、外網状層及び糸球体層と外網状層の境界部に見られた。このような transcription factors という視点から糸球体近傍ニューロン群の多様性が更に明確になった。

##### (2) secretagogin 陽性ニューロンの解析

SCGN ニューロンは嗅球全層に分布し、特に糸球体層と顆粒細胞層に多数分布し、全層において calretinin との共存がかなり見られた。糸球体層では calretinin 陽性ニューロ

ンとは一部重複しているが、calbindin 陽性ニューロンとは重複がなく、また、tyrosine hydroxylase 陽性 GABA ドーパミンニューロンとも一部重複することが明らかにできた。糸球体近傍のニューロンで SCGN と calretinin との共存を示したニューロンは糸球体内にタフト様の樹状突起を伸ばし、古典的な傍糸球体細胞の特徴をしめしていたが



(図2、図3)、calretinin との共存を示さない SCGN ニューロンのあるグループは、その突起が一つの糸球体から隣の別の糸球体へと延びていた。これは新たに見出されたタイプの糸球体近傍ニューロンと考え、糸球体貫通細胞 transglomerular cell (図2 cell 1, 図4) と命名した。しかし、このような糸球体貫通細胞と類似の形態を示すニューロンが、BDA 標識標本においても見いだされ、少なくともそのあるものは SCGN 陰性であった。このことは、我々が新たなニューロンとして見出した糸球体貫通細胞も化学的な性質の面では多様であることを示唆している。更に、糸球体貫通細胞の発見は糸球体近傍ニューロンを外房飾細胞、傍糸球体細胞、表層短軸索細胞の3種に分けることはあまりに単純化していることを示唆しており、今後この領域のニューロングループを再考する必要性を示している。

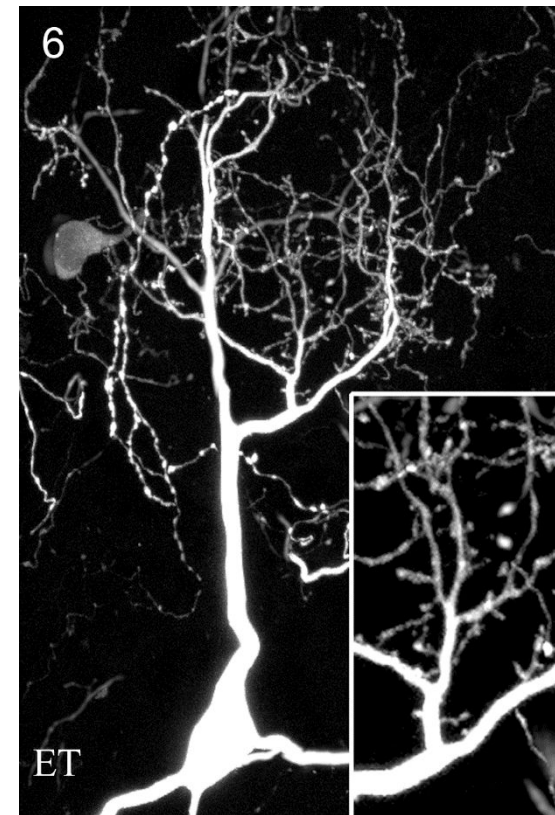
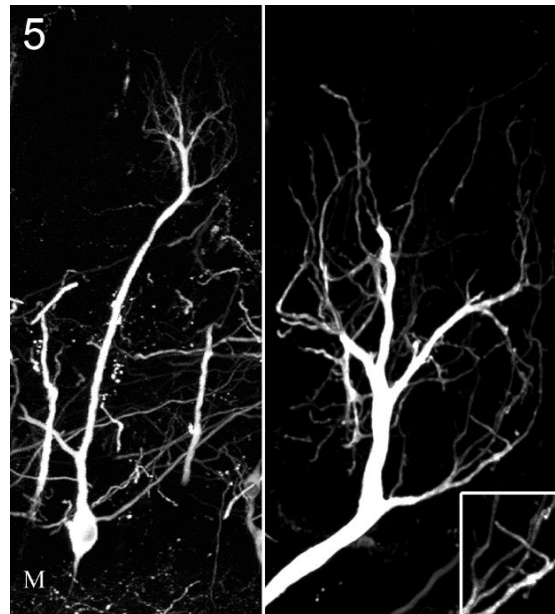
(3)軸索初節部AISの分子マーカー及び傍糸球体細胞各グループの化学的マーカーを用いたレーザー顕微鏡による検討。

軸索初節部 AIS の分子マーカーとして  $\beta$ IV-spectrin, ankyrinG, Na channel subunits を用い、傍糸球体細胞各グループの化学的マーカー calbindin, calretinin, neurocalcin, secretagogin, TH, NOS を用いて、蛍光多重染色標本・レーザー顕微鏡により検討した。また、僧帽細胞と房飾細胞を BDA で標識し、AIS の分子マーカーの局在をレーザー顕微鏡により検討した。明らかに軸索初節部 AIS と同定できる突起を示したのは僧帽細胞・房飾細胞・NOS 陽性房飾細胞・大型 DA-GABA PG cell 及び化学的に同定できた何種類か比較的大型の短軸索細胞 short-axon cells であった。これらの所見はこれまで化学的に同定してきた多くのいわゆる傍糸球体細胞が無軸索であることを強く示唆していた。更に、このことは Golgi 鍍銀法で示されてきた軸索突起を主に糸球体層に伸ばし糸球体間結合の役割を担っているとされてきた古典的な傍糸球体細胞は化学的に同定されている傍糸球体細胞とは異なることも示唆している。

(4)外房飾細胞と僧帽細胞の糸球体内樹状突起 tuft

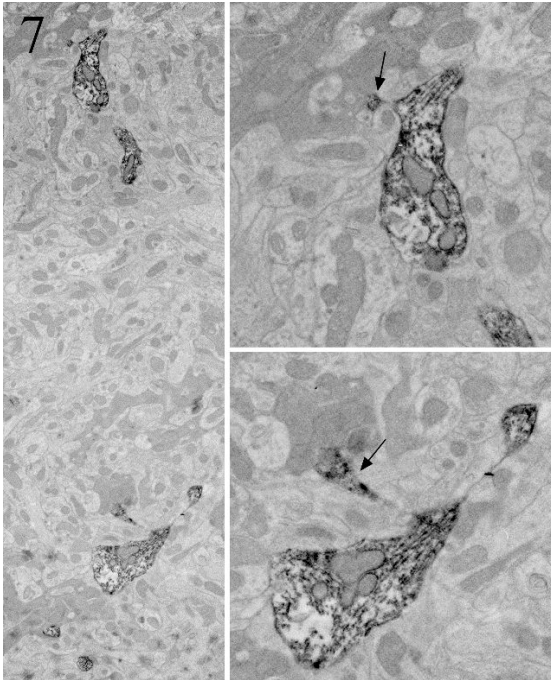
Golgi 鍍銀染色標本の光学顕微鏡観察・カメラルシダ解析、及び biotinylated dextran amine (BDA)標識標本のレーザー顕微鏡観察で外房飾細胞と僧帽細胞の糸球体内樹状突起 tuft を解析した。僧帽細胞ではかなりスムーズな突起が枝分かれして全体として糸球体全体に広がる tuft を形成していた(図5)。

一方、二次樹状突起を有する明らかな外房飾細胞ではスパインと考えられる小突起がかなり多数の枝に見られた(図6)。更に、BDA



標識標本を電子顕微鏡用に処理し微細形態・シナプス結合の解析を進めた。現在までの電子顕微鏡による所見では、光学顕微鏡でスパインと同定できた突起は、円筒状の樹状突起から超薄切片 1-2 枚程度にしか観察できない細いシャフトとして生じ、先端は球状に膨らんで嗅神経終末部に接触し、シナプスを受けていると思われた(図7: 矢印はスパインを示す)。

これまでスパインは傍糸球体細胞に特徴的とされてきた。しかし、我々の所見はこれまでのように糸球体内の樹状突起をスパイ



ンの有無で外房飾細胞と傍系球体細胞に分類することができないことを示している。更に、外房飾細胞と僧帽細胞が系球体内樹状突起 tuft の形態において明らかに相違していることが、どのような機能的差異に結び付きうるのかの解明には、今後それぞれのタフトにおけるシナプス結合・ギャップ結合等の詳細な解析が必要であると思われる。

#### 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6件)

1. 小坂俊夫、小坂克子 (2015) 嗅覚一次中枢嗅球のニューロン構成とシナプス結合. 福岡医学雑誌 査読有
2. 小坂克子、小坂俊夫 (2014) げっ歯目嗅球において新たに確認された3種類の介在ニューロンに関する考察 日本味と匂学会誌 21, 423-424. 査読有
3. T. Kosaka and K. Kosaka (2014) Olfactory bulb anatomy. Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier. 21-Oct-2014 doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.04705-X 査読有
4. K. Kosaka and T. Kosaka (2013) Secretagogin-containing neurons in the mouse main olfactory bulb. Neurosci Res.77, 16-32. 査読有
5. T. Kosaka and K. Kosaka (2012) Further characterization of the juxtglomerular neurons in the mouse main olfactory bulb by transcription factors, Sp8 and Tbx21. Neurosci

Res.73, 24-31. 査読有

6. K. Motomura and T. Kosaka (2011) Medioventral part of the posterior thalamus in the mouse. J. Chem. Neuroanat. 42, 192-209. 査読有
7. T. Kosaka and K. Kosaka (2011) "Interneurons" in the olfactory bulb revisited. Neurosci Res. 69, 93-99. 査読有

##### [学会発表](計3件)

1. 小坂克子、小坂俊夫 げっ歯目嗅球において新たに確認された3種類の介在ニューロンに関する考察, 味と匂学会第48回大会, 2014年10月3日 静岡
2. 小坂克子、小坂俊夫 マウス嗅球におけるCa結合蛋白 secretagogin 陽性ニューロンの解析 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会 2013年3月30日 高松
3. 小坂克子、小坂俊夫 マウス嗅球におけるCa結合蛋白 secretagogin 陽性ニューロンの特徴 日本解剖学会第68回九州支部学術集会 2012年10月13日 久留米

##### [図書](計0件)

##### [その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

小坂 俊夫 (KOSAKA TOSHIO)  
九州大学・医学研究院・教授  
研究者番号: 00126054

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号: