

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500300

研究課題名（和文） 大脳皮質神経細胞上の興奮性及び抑制性シナプス入力の密度分布解析

研究課題名（英文） Excitatory and Inhibitory synapse distribution on cortical neurons

研究代表者

窪田 芳之 (KUBOTA YOSHIYUKI)

生理学研究所・大脳皮質機能研究系・准教授

研究者番号：90192567

研究成果の概要（和文）：

大脳皮質の非錐体細胞上の抑制性シナプスと興奮性シナプスの密度を測定した。抑制性終末は、樹状突起や細胞体のどこにおいても、異なるサブタイプ間でも、シナプス入力密度に差は認めなかった。興奮性神経終末は、非錐体細胞のサブタイプ間で入力密度に有意に差があった。また、parvalbumin 陽性神経細胞にどのような興奮性入力分布しているかを計測した。その結果、視床-皮質終末は、樹状突起にはほとんどシナプスを形成しない一方、皮質由来の終末は頻度高くコンタクトしている事がわかった。

研究成果の概要（英文）：

Understanding the brain's circuit architecture is critical to elucidating its function. Recently, the inhibitory components of cortical circuits have received increased attention. We have found no significant difference of the GABA positive synapse density among different subtype of cortical nonpyramidal cells, although excitatory synapse inputs are found to distribute in different density among cortical nonpyramidal cell subtypes. We also found that excitatory thalamo-cortical afferent fibers are rarely innervated cortical parvalbumin positive cell dendrites and intra-cortical afferent fibers are richly innervated them.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：Neuroscience

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：大脳皮質、非錐体細胞、GABA、3次元再構築、樹状突起、シナプス

1. 研究開始当初の背景

大脳新皮質には、基本的な単位である局所神経回路が存在し、それらが一団となって動作する事で高次脳機能が表現される事がこれ

までの研究で明らかとなった。例えば、2種類のバスケット細胞（parvalbumin 陽性の FS バスケット細胞と CCK 陽性の大型バスケット細胞）の機能的な違いをあきらかにした一

連の研究等 (*Nature Neurosci*, 8: 1319 (2005), *Nature Neurosci*, 9: 807 (2006), *Nature Neurosci*, 10: 1128 (2007)), 有用な研究が近年多く報告されている。とは言え、その回路がどのような配線構造をとるのか、どのような動作原理で機能するのか、未だ理解されるには至っていない。大脳皮質を構成する神経細胞の種類は 20-30 種類以上とかなり多く、他の領域との入出力も豊富である事から、非常に複雑な神経回路が構築されており、その複雑さ故に、局所回路の動作原理が解明されるには、まだ数多くの課題が残されている。それを明らかにする為の非常に有効な戦略として、信頼できる実験的な詳細データと単なる数値計算でない基礎理論の共同戦線が考えられる。今後、大脳皮質の局所神経回路の機能的な構築を明らかにする上での最優先すべき課題として、大脳皮質を構成する神経細胞の種類を特定した上で、それらで構成される局所回路の構築を解剖学的に詳細に研究する事が考えられる。本研究で得られるこの信頼できる詳細データが基本となり、回路の機能構築に関する生理学実験等で得られる実験データや、理論でのシミュレーション研究を加えて、近い将来、皮質の局所神経回路の動作原理を理解する日が来る事は間違いない。申請者は、これまで 20 年近くの間、皮質の局所神経回路の分野に多くの寄与をなし、論文も数多く報告して来た (*Cerebral Cortex* 1997, 7: 476, *J. Neurosci* 2007, 27: 1139-1150 他)。引き続き、皮質の局所回路解明の為に研究を積み重ね、この分野に貢献をしていきたい。

2. 研究の目的

本研究では、その解析の一貫として、錐体細胞と非錐体細胞への興奮性シナプス入力と抑制性シナプス入力の密度分布を、細胞体及び樹状突起上で解析する。単一神経細胞をスライス標本電気生理実験の手法を使って染色し、*NeuroLucida* で樹状突起の 3 次元的な広がり記録解析した後、電子顕微鏡の連続切片 3 次元再構築法を用いて、樹状突起や細胞体を再構築し、シナプス密度解析を行う。樹状突起に関しては、細胞体からの距離やその太さ別に解析する事がこの手法では可能である。また、興奮性のシナプス入力に関しては、2つの大きなソースである皮質錐体細胞由来の終末と視床-皮質神経終末に区分して解析できれば大変面白い結果が得られる。シナプス小包グルタメートトランスポーターの 2つのサブタイプ (VGLUT1, VGLUT2) が、それぞれ皮質錐体細胞由来の終末と視床-皮質神経終末に別々に使われている性質を利用して、免疫電子顕微鏡染色法を駆使して解析可能であると考えている。また、抑制

性神経終末に関しては、時間が許せば、非錐体細胞のどのサブタイプ由来のものが、どの皮質細胞のどこにシナプス接着しているのかを解析して行く予定である。

3. 研究の方法

皮質の代表的な 3 種類の非錐体細胞 (FS basket cell, Martinotti (MA) cell, double bouquet (DB) cell, large basket cell) と錐体細胞が、局所神経回路の配線にどう関わっているか、その詳細を形態的に明らかにし、それらのシナプス結合の機能的な意義を検討する。ラットの大脳皮質の切片を使って、それぞれのサブタイプを免疫組織化学法で染色し、*NeuroLucida* で、細胞体から伸展する樹状突起を 3 次元的に計測する。そして、電子顕微鏡観察用に連続超薄切片を作成し、*Postembedding GABA* 免疫組織化学法によりその樹状突起や細胞体に入力する GABA 陽性神経終末と GABA 陰性神経終末を同定し、3 次元再構築し詳細な形態特性を見る。実験 A) *Postembedding GABA* 免疫組織化学法によるシナプス入力の解析

- (1) 成熟した rat を実験動物に用いた。麻酔の後、*glutaldehyde*, *paraformaldehyde* 混合固定液で還流固定し、脳を取り出し、スライサーで前頭皮質の切片を作成した。
- (2) 細胞の同定には、免疫組織化学法で下記のようにサブタイプを選択的に染色した。すなわち、FS basket 細胞や *chandelier* 細胞のサブタイプは *parvalbumin* 陽性細胞、Martinotti 細胞は *somatostatin* もしくは *substance P receptor* 陽性細胞、*double bouquet* 細胞や *small basket* 細胞は *calretinin* もしくは *VIP* 陽性細胞、*large basket* 細胞は *CCK* 陽性細胞であると考えても良い。以上の神経細胞のサブタイプを *Nickel-DAB* 染色法を用いて、あまり反応が強くない程度の薄めに反応する。この調整により、樹状突起や細胞体の電子密度が上がらないため、*PSD* 構造が *DAB* 反応に隠れるという弊害が無いというメリットがある。
- (3) 染色した各種神経細胞を *NeuroLucida* を使って、3 次元的に再構築した。この作業により、樹状突起の長さや空間的な広がりを測定する事ができ、電子顕微鏡で観察する部位が、その細胞のどの部分に相当するのかわかる事ができる。
- (4) *NeuroLucida* を使って 3 次元的に再構築した各種神経細胞を電子顕微鏡下で観察する。その際、*postembedding* 免疫染色法を使って、GABA 陽性神経終末と GABA 陰性神経終末に区別して、樹状突起及び細胞体上へのシナプス入力密度を解析する。おそらく、神経細胞のサブタイプにより、抑制性入力の空間分布が異なると予想される。例えば、海馬では抑制細胞からの入力が多いとされている

calretinin陽性細胞であるが、皮質でも同様な結果が得られるであろう。細胞体や近位樹状突起、遠位樹状突起に区別して解析し、各サブタイプ毎の特性を同定したい。また、各種シナプスの間隔を測定する事で、GABA神経終末支配がどれくらいの間隔をおいて形成されているのか等の未知の情報を手に入れる事ができる。

実験B) レーザーコンフォーカル顕微鏡による解析

皮質の興奮性の神経終末に関しては、intra-cortical afferents と thalamocortical afferentsの2種類が主であると考えられる事から、どちらの入力をより強く受けているのかを知る事は、回路構築を明らかにする上で、非常に大切な事である。これらをVGLUT1, VGLUT2 (vesicular glutamate transporter 1, 2)の4重蛍光免疫染色法を使ってレーザーコンフォーカル顕微鏡観察により解析する。intra-cortical afferents は選択的にVGLUT1を発現している事、thalamocortical afferentsは選択的にVGLUT2を発現している事が知られているので、それぞれの興奮性神経終末のマーカーとして用いる。これに加えて、GABA作動性神経終末の同定にVGAT抗体を使う。

(1) 成熟したratを実験動物に用いる。麻酔の後、glutalaldehyde、paraformaldehyde混合固定液で還流固定し、脳を取り出し、スライサーで前頭皮質の切片を作成する。

(2)細胞を染めるには、fixed tissue injection法を用いた。この方法を使えば、棘突起まできれいに染め出す事が可能である。これに加えて、VGLUT1, VGLUT2の合計2種類の抗体を選択し、ターゲットの樹状突起の染色と合わせて3重染色をする。第2抗体は、Molecular Probes社のAlexa 350, 488, 594, 633を使った。これを、レーザーコンフォーカル顕微鏡で観察し、各サブタイプの神経細胞上のどの部分にどの種類の神経終末が多くついているか、計測した。神経細胞は樹状突起を含めて立体的に撮影し、Neurolucidaのコンフォーカルユニットを使い、3次元的に再構築すれば、神経細胞上での各種シナプスの空間分布を押さえた上で解析する事ができる。

(3)レーザーコンフォーカル顕微鏡では、コンタクトを確認できるだけで、それがシナプス接着かどうかを反映している訳ではない。一部の試料を使い、各種神経細胞と各種神経終末から1種類ずつを選択し、それぞれNickel-DAB 反応とコロイダルゴールドの銀増感反応法を使って二重染色し、電子顕微鏡で観察し、本当にシナプス接着があるかどうかを一部の神経細胞で確認した。

4. 研究成果

皮質の代表的な非錐体細胞 (FS basket cell,

Martinotti (MA) cell, double bouquet (DB) cell, large basket cell) 等の樹状突起や細胞体上に認められる GABA 陽性シナプスと GABA 陰性シナプスの密度を測定した。ラットの大脳皮質の切片を使って、それぞれのサブタイプを、免疫組織化学法(FS 細胞: parvalbumin、MA 細胞: somatostatin、DB 細胞: calretinin、それ以外のサブタイプ: substance P receptor)で染色し、Neurolucida で、細胞体から伸展する樹状突起を3次元的に再構築し、細胞体からの距離等を計測した。そして、電子顕微鏡観察用に連続超薄切片を作成し、Postembedding GABA 免疫組織化学法によりその樹状突起や細胞体に入力する GABA 陽性神経終末と GABA 陰性神経終末を同定し、それぞれのサブタイプの樹状突起を3次元的に再構築し、2種類のシナプスの入力密度を測定した。結果、面白い事に、GABA 陽性神経終末は、非錐体細胞の樹状突起や細胞体のどこにおいても、また、異なるサブタイプ間でも、シナプス入力密度に差は認めなかった。その一方で、GABA 陰性(おそらくそのほとんどが興奮性と考えられる)の神経終末は、非錐体細胞のサブタイプ間で入力密度に有意に差があり、parvalbumin 陽性細胞、substance P receptor 陽性細胞、somatostatin 陽性細胞、calretinin 陽性細胞の順に大きかった。これは、大脳皮質の非錐体細胞のサブタイプが機能的に異なる事を示唆する所見と考える。

皮質の興奮性の神経終末は、intra cortical afferents と thalamocortical afferents の2種類が主であると考えられる事から、皮質細胞の各サブタイプがどちらの入力をより強く受けているのかを知る事は、回路構築を明らかにする上で非常に大切な事である。非錐体細胞のサブタイプの一つである parvalbumin 陽性神経細胞にどのような興奮性入力が分布しているかをレーザーコンフォーカル顕微鏡を使って計測した。その結果、thalamo-cortical afferent は、parvalbumin 陽性神経細胞の樹状突起にはほとんどコンタクトを形成しない事がわかった。その一方で、intra-cortical afferent は、parvalbumin 陽性神経細胞の樹状突起に頻度高くコンタクトしている事がわかった。さらに、一部の試料を使って、レーザーコンフォーカル顕微鏡で観察したシナプス結合と思われるコンタクトが、実際に、シナプス接着しているかどうかを、電子顕微鏡を使って確認したが、その約8割が、parvalbumin 陽性神経細胞にシナプスを作っている事が確認できた。したがって、レーザーコンフォーカル顕微鏡に基づく本研究で得られた観察結果は、シナプス入力を反映していると考えている。

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 2 件)

1) Kubota Y., Shigematsu N, Karube F, Sekigawa A, Kato S, Yamaguchi N, Hirai Y, Morishima M, Kawaguchi Y, Selective Coexpression of Multiple Chemical Markers Defines Discrete Populations of Neocortical GABAergic Neurons (2011) 査読有、Cerebral Cortex, in press

2) Kubota Y., Hatada S, Kawaguchi Y. Important factors for the three-dimensional reconstruction of neuronal structures from serial ultrathin sections. (2009) 査読有、Frontiers in Neural Circuits, Volume 3, Article 4.

[学会発表] (計 16 件)

1) Kubota Y. 大脳皮質非錐体細胞へのシナプス入力分布, 第88回日本生理学会、第116回日本解剖学会 合同大会日中韓シンポジウム、2011.3.29、パシフィコ横浜 (神奈川県)

2) Kubota Y., Karube F, Nomura M, Gullledge A, Mochizuki A, Kawaguchi Y, Dendritic dimensions and signal conduction properties of cortical nonpyramidal cells. Annual Meeting Society For Neuroscience. 2010.11.15 サンディエゴ (アメリカ)

3) Kubota Y. Dendritic dimensions and signal conduction properties of cortical nonpyramidal cells, 第33回日本神経科学大会 シンポジウム, 2010.9.2, 神戸国際会議場 (兵庫県)

4) Kubota Y., Karube F, Nomura M, Gullledge A, Mochizuki A, Kawaguchi Y. Dendritic dimensions and signal conduction properties of cortical nonpyramidal cells. 第5回国際神経回路会議 JST international meeting "Microcircuitry of Cortex" 2010.6.30 未来館 (東京都)

5) Kubota Y., Karube F, Nomura M, Gullledge A, Mochizuki A, Kawaguchi Y. Dendritic dimensions and signal conduction properties of cortical nonpyramidal cells. 第4回国際神経回路会議 JSPS international meeting "Signal Processing Mechanisms of Cortical Neurons" 2010.6.25 カヌチャリゾート (沖縄県)

6) Kubota Y., Hatada S, Kawaguchi Y, Important factors for the three-dimensional reconstruction of neuronal structures from serial ultrathin sections. Annual Meeting Society For Neuroscience. 2009.10.19 シカゴ (アメリカ)

7) Kubota Y., Karube F, Nomura M, Aoyagi T, Kawaguchi Y. Dendritic shape and EPSP conduction of cortical nonpyramidal cells, 第32回日本神経科学大会, 2009.9.16 名古屋国際会議場 (愛知県)

8) Kubota Y., Karube F, Nomura M, Aoyagi T, Kawaguchi Y. Dendritic morphology and signal conduction property of cortical nonpyramidal cells.

第 36 回国際生理学大会 IUPS2009 シンポジウム "Mechanisms of dendritic signaling" 京都国際会議場 (京都府) 2009 年 7 月

9) Kubota Y., Karube F, Nomura M, Hatada S, Sekigawa A, Kawaguchi Y. Dendritic dimension and synapse density on dendrites and soma of various cortical nonpyramidal cells. 京都大学国際シンポジウム "Cellular Approaches to Neuronal Signal Processing" 京都大学 (京都府) 2009 年 7 月

10) Kubota Y. Dendritic dimension and synapse density on dendrites and soma of various cortical nonpyramidal cells. EMBO Workshop, 2009.6.23.マヨルカ (スペイン)

11) 窪田芳之 大脳皮質非錐体細胞への GABA 陽性陰性シナプス入力 第114回日本解剖学会総会 2009.3.29 岡山理科大学 (岡山県)

12) Kubota Y. Dendritic dimension and synapse density on dendrites and soma of various cortical nonpyramidal cells. 脳と心のメカニズム 第9回冬のワークショップ 2009.1.14 ルスツリゾート (北海道)

13) Kubota Y. The excitatory and inhibitory synapse densities on various GABAergic nonpyramidal cells in the rat cerebral cortex. Annual Meeting Society For Neuroscience. 2008.11.18 ワシントン (アメリカ)

14) Kubota Y., Hatada S, Sekigawa A, Shigematsu N and Kawaguchi Y. An excitatory and inhibitory synapse density on various GABAergic nonpyramidal cells in the rat cerebral cortex. 第39回生理研国際シンポジウム "Frontiers of Biological Imaging Synergy of the Advanced Techniques" 生理研 (愛知県) 2008 年 11 月

15) Kubota Y., Hatada S, Sekigawa A and Kawaguchi Y. Excitatory and Inhibitory Synapse Densities on Various GABAergic Nonpyramidal Cells in the Rat Cerebral Cortex. 理研 BSI-統合脳シンポジウム "Recent Advances in the Neural Circuit Analysis" 理化学研究所 (埼玉県) 2008 年 7 月

16) 窪田芳之 非錐体細胞の樹状突起の形態と機能的意義、第31回日本神経科学大会シンポジウム「大脳皮質と線条体の局所神経回路と神経細胞」東京国際フォーラム (東京都) 2008 年 7 月

〔図書〕（計 1 件）

- 1) 窪田芳之 皮質局所神経回路の興奮性抑制性
入力特性 “ブレインサイエンス・レビュー
2008” p45-72, 2008（伊藤正男・川合述史編
集）クバプロ、東京

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nips.ac.jp/circuit/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

窪田芳之（KUBOTA YOSHIYUKI）

生理学研究所・大脳皮質機能研究系・准教
授

研究者番号：90192567