

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16112

研究課題名（和文）大脳皮質パルプアルブミン発現細胞ネットワークの結合則

研究課題名（英文）Synaptic connection rule between cortical parvalbumin-positive interneurons

研究代表者

岡本 和樹 (Okamoto, Kazuki)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：90865205

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：脳回路を構成する神経細胞の一部はGABA作動性細胞であり、回路の抑制を担う。これらシナプス結合の測定には形態学と生理学の双方からのアプローチが要求されるが、GABAを介した抑制性シナプスの場合、生理的に測定できる範囲に限界があり、未解明な部分も多い。本研究は、形態学手法と生理学手法を組み合わせ、軸索形態の「てがかり」からGABA細胞、特にパルプアルブミン発現細胞（PV細胞）の生理的結合を予測できるモデルを構築することを目的とした。生理測定で得られたシナプス入力を形態的なシナプス位置に基づいて解析することで、結合形成のパターン抽出、およびシナプス強度の算出を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮質のGABA作動性細胞は、高次機能発現や各種精神疾患との深い関連が指摘されている。形態学的解析と論理モデルの構築を通じて、その中でも最も数の多いPV細胞のシナプス結合様式と同期特性を解明した。PV細胞は、その活動が大脳皮質の脳波に反映されることから明らかのように、神経回路全体を支配する抑制機構である。この結果は、大脳新皮質の動作原理を解明する一助となると期待できる。

研究成果の概要（英文）：Neocortical GABAergic interneurons have an important role to maintain cortical balanced activities. Their synaptic connection patterns are highly complexed and most of the patterns remain to be elucidated. Here we aimed to reveal the connection features between parvalbumin-positive (PV) interneurons using both morphological and electrophysiological techniques. We performed double patch-clamp recordings in PV interneurons simultaneously and recorded inhibitory synaptic transmissions. Then, we post hoc visualized their axon arborization. Based on the morphological synaptic contact, we estimated the pattern of synaptic connections in inhibitory networks.

研究分野：神経生理学

キーワード：シナプス結合

1. 研究開始当初の背景

脳回路構造の解明は脳研究を進めるうえで基礎的かつ重要な課題である。シナプス結合の形成は、細胞が伸ばす神経突起の及ぶ範囲でしか生じないため、神経細胞の形態と強くかかわっている。しかしながら、神経突起のコンタクトした場所で実際にシナプスが形成され、どれほどの強度の伝達を担うかということ形態学的な手がかりだけで推測することはできない。また、活動グループを作るような選択的な結合形成がなされることもあり、形態学と生理学の双方からのアプローチが要求される。

シナプス回路研究の多くは興奮性回路を対象としており、**GABA** 細胞が構成する抑制性回路についてはほとんど未解明である。特に **GABA** 細胞同士の繋がりについての報告が少ない。これには、**GABA** 細胞の結合は軸索伸張からほぼ予想できるようなランダム的なものと考えられ、生理的な検証までが行われてこなかったことや、錐体細胞と比べ **GABA** 細胞が少数であり、無作為に探し当てるのは非効率であることなどの現状があった。

2. 研究の目的

大脳皮質 **GABA** 細胞の大部分を占めるパルプアルブミン発現 (**PV** 細胞) 同士の結合に着目する。**PV** 細胞の軸索の形態解析とその生理的結合測定を同時に行うことで、形態的なシナプス単位 (形態的結合) での生理的重みづけを予測する。その過程で、**PV** 細胞のネットワークのパターン性を調べ、モデル構築に適用する。

3. 研究の方法

PV 細胞が緑色に蛍光標識された **PV-GFP** マウスを用いる (**Kameda et al., 2012**)。急性スライス標本の第一次運動野 (**M1**) 第 **2/3** 層にて 2 つの **PV** 細胞から同時パッチクランプ記録を行う。パッチクランプ記録は一細胞レベルの膜電位変化や活動操作を可能とする手法であり、これを 2 細胞から同時に行うことで、微小な抑制シナプス伝達 (生理的結合) を測定できる。記録した細胞の内部にはバイオサイチンが充填され、後ほど組織透明化技術を利用して形態を観察する。これにより神経突起の交わり (形態的結合) を解析する。

単一の **PV** 細胞の軸索がつくる抑制シナプスを観察するため、**juxtacellular** 記録を併用した電気穿孔法 (**electroporation**) を行う。生体マウスの脳へガラス電極を刺入し、**PV** 細胞に特徴的な **fast-spiking** 様の発火を示す細胞を選び、プラスミド (**pAAV-SynTetOff-RFP-Halo**) を導入する。これにより、単一 **PV** 細胞の軸索形態が赤色で可視化される。この処置を **PV-GFP** マウスで行えば、他の **PV** 細胞の細胞体と樹状突起を **GFP** で観察できる (**Kameda et al., 2012**)。軸索 (赤) と樹状突起 (緑) の交わりから形態的結合を観察する。**PV** 細胞の軸索は細胞体へ強い抑制をかけることで有名だが (**Tamas et al., 2000**)、遠位の樹状突起にも多くの **PV** 由来シナプスがある (**Gulyas et al., 1999; Hioki et al., 2013**)。そこで、一つの **PV** 細胞の軸索が作る形態的結合が、下流の **PV** 細胞のどこに位置するかというパターン性を解析する。

後シナプスマーカー (**gephyrin**) との共同在により、形態的結合とみなした場所に **GABA** シナプスが存在することを光学顕微鏡レベルで検証する (**Hioki et al., 2018**)。その後、必要に応じて電子顕微鏡でシナプスを観察する。シナプスサイズのばらつきについても解析する。

4. 研究成果

PV-FGL マウスの脳から冠状断の急性スライス標本作製し、第一運動野の第 **2/3** 層において緑色蛍光タンパクを発現した神経細胞へ標的パッチクランプ記録法を行った。記録電極の内液に充填した赤色蛍光色素 **Alexa Fluor 568** の浸透と蛍光タンパク質の重なりから **PV** 陽性細胞に標的記録できていることを確認したのち、記録した細胞に電流注入することで **fast-spiking** の発火特性を確かめ、**PV** 陽性 **fast-spiking** インターニューロンであるとみなした。

同時ペア記録で結合を調べる前に、これらの記録で軸索形態が再構築できるかを検討した。グルコースオキシダーゼの活性を利用した **TSA** 法 (**BT-GO** 法) により、記録の際に細胞内充填したピオシチンを足場とした蛍光シグナルを増幅させ、細い構造である軸索形態を高いシグナル・ノイズ比で観察できるようになった。

次に、同時ペア記録により抑制性シナプスの検出を行った。5 ミリ秒の電流注入を行い、記録中の細胞に単発の発火を交互に与え、その際のもう一方の膜電位応答を記録した。これを **10** 秒に **1** 回の間隔で **50** 回繰り返した。検出できた抑制性シナプス入力伝達の確率が高く、**PV** 細胞

のシナプスの特徴を反映していた。結果として検出できた抑制性シナプス結合は細胞体が距離的に近い関係にある **PV** 細胞ペアのみであり、遠位における **PV** 細胞同士の結合の測定までは至らなかった。記録した細胞ペアの標本は抑制性伝達を確認できるか否かにかかわらず **BT-GO** 法による細胞形態の解析を行った。得られた結果をもとに論文の執筆を進めており、近日中に投稿する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okamoto Kazuki, Ebina Teppei, Fujii Naoki, Konishi Kuniaki, Sato Yu, Kashima Tetsuhiko, Nakano Risako, Hioki Hiroyuki, Takeuchi Haruki, Yumoto Junji, Matsuzaki Masanori, Ikegaya Yuji	4. 巻 7
2. 論文標題 Tb3+-doped fluorescent glass for biology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabd2529
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abd2529	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Zhou Zhiwen, Okamoto Kazuki, Onodera Junya, Hiragi Toshimitsu, Andoh Megumi, Ikawa Masahito, Tanaka Kenji F., Ikegaya Yuji, Koyama Ryuta	4. 巻 118
2. 論文標題 Astrocytic cAMP modulates memory via synaptic plasticity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2016584118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/PNAS.2016584118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柳下晴也、岡本和樹、郷康広、池谷裕二、佐々木拓哉
2. 発表標題 A method to identify gene expression profiles from an extracellularly recorded neuron in vivo
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡本和樹、上窪裕二、山内健太、岡本慎一郎、高橋慧、石田葉子、櫻井隆、小池正人、池谷裕二、日置寛之
2. 発表標題 Hippocampal CA2 labeling with an AAV2/PHP.eB vector
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳下晴也、岡本和樹、郷康広、池谷裕二、佐々木拓哉
2. 発表標題 成体動物において発火活動を記録した神経細胞の遺伝子発現解析
3. 学会等名 第145回薬理学会関東部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳下晴也、岡本和樹、郷康広、池谷裕二、佐々木拓哉
2. 発表標題 In vivo条件で発火活動を記録した神経細胞の遺伝子発現解析法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡本和樹、上窪裕二、山内健太、岡本慎一郎、高橋慧、石田葉子、小池正人、池谷裕二、櫻井隆、日置寛之
2. 発表標題 AAV-PHP.eBベクターによる海馬CA2野特異的遺伝子導入
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------