

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：82648

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700373

研究課題名（和文） 大脳皮質の錐体細胞間抑制を担う神経回路微細構造の解明

研究課題名（英文） Neural ultrastructure for inhibitory synaptic transmission between pyramidal cells

研究代表者

足澤 悦子（TARUSAWA ETSUKO）

大学共同利用機関法人自然科学研究機構（岡崎共通研究施設）・岡崎統合バイオサイエンスセンター・特別協力研究員

研究者番号：00446262

研究成果の概要（和文）：錐体細胞の単発発火が、抑制性細胞の活動電位を伴わずに近傍の錐体細胞に抑制性反応を引き起こすことが報告されている。これは、錐体細胞の軸索終末が抑制性細胞の軸索終末に直接作用し、GABA の放出を引き起こしていることを示唆していた。本課題では、その形態学的基盤を免疫電子顕微鏡技術の SDS-FRL 法により明らかにすることを目的とし、この抑制性伝達の関連分子である AMPA 型受容体およびカイニン酸型受容体が抑制性軸索終末には局在するかどうかを調べた。その結果、それらの分子は抑制性軸索終末には存在せず、錐体細胞のシナプス後部に局在していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：It has reported that there is a inhibitory synaptic transmission between pyramidal cells without action potential of inhibitory neurons in visual cortex. To reveal the ultrastructure for the inhibitory synaptic transmission, we analyzed the localization of AMPA and kainate receptors, which are related molecules to the inhibitory synaptic transmission using SDS-FRL technique. These receptors were localized in the postsynaptic sites of pyramidal cells but not the inhibitory synaptic terminals.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：神経解剖学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経微細形態学

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系における神経回路網は、興奮性細胞と抑制性細胞の相互連絡によって成り立っており、その神経細胞間の相互連絡は化学シナプスを介して行われている。化学

シナプスを介した伝達には、通常シナプス前神経細胞で生じる活動電位が必要であり、その活動電位が軸索終末へ伝播して、シナプス小胞から伝達物質が放出されることによって行われる。大脳皮質においても、錐

体細胞への抑制性の入力、抑制性介在神経細胞の活動電位の発生を伴って起こることが知られている。しかし、最近我々の研究室では、マウス大脳皮質の切片標本を用いた電気生理学的実験で、抑制性介在神経細胞の活動電位の発生を伴わず、興奮性であるはずの錐体細胞の活動が近傍の錐体細胞に抑制性反応を引き起こし、しかもそれはイオン透過型グルタミン酸受容体の AMPA 型およびカイニン酸型受容体の活性化を介していることを発見した(Ren et al., 2007)。これは、錐体細胞の軸索終末から放出されたグルタミン酸が、抑制性軸索終末上に発現するグルタミン酸受容体を活性化することで脱分極を引き起こし、GABA の放出が起きていることを示唆している。しかし、これまでの電子顕微鏡を用いた先行報告では、興奮性のシナプス終末が抑制性シナプス終末にシナプス結合している構造は報告されておらず、今だこの信号伝達機構の解剖学的基盤は明らかになっていない。

この解剖学的基盤を明らかにすることは、中枢神経系における神経回路網の解明に必要な情報であり、脳の情報処理機構の理解を深めることにつながる重要な課題である。

2. 研究の目的

大脳皮質における通常の抑制性伝達は、抑制性神経細胞が活動電位を発生した結果、軸索終末から GABA の放出が起こることによって行われる。しかし、最近我々の研究室では、大脳皮質切片標本を用いた実験で、興奮性であるはずの錐体細胞の単発発火が、近傍の錐体細胞に短潜時の抑制性反応を引き起こし、それは抑制性細胞の活動電位を伴わずに起こりうることを見出した(Ren et al., 2007)。これは、錐体細胞の軸索

終末が抑制性細胞の軸索終末に直接作用し、GABA の放出を引き起こしていることを示唆していた。本計画では、その形態学的基盤を免疫電子顕微鏡技術の SDS-FRL 法と pre-embedding 法により明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

大脳皮質における神経回路網の微細構造は、電子顕微鏡レベルで網羅的に研究されてきたが、新たに提唱された錐体細胞間抑制性伝達を裏付けるような構造、すなわち興奮性軸索終末が抑制性軸索終末にシナプス結合している構造は未だ報告されていない。そこで本研究では、新たに開発された SDS-FRL 法を用いて、マウス大脳皮質一次視覚野の抑制性軸索終末における AMPA 型およびカイニン酸型受容体の発現様式を明らかにする。さらに、この抑制性伝達に関わる介在神経細胞の種類を pre-embedding 法により同定し、新たに提唱された錐体細胞間抑制性シナプス伝達機構の解剖学的基盤を明らかにする。

4. 研究成果

平成 22 年度は、大脳皮質の錐体細胞間に引き起こされる抑制性伝達の形態学的基盤を解明することを目的とし、その伝達に関与するカイニン酸型受容体の局在解析のための抗体スクリーニングを行った。具体的には、カイニン酸型受容体サブユニットのうち、KA2 と GluR6/7 に対する抗体を市販の抗体や共同研究者から入手し、SDS-FRL 法を用いてレプリカ上で特異的な免疫標識が得られるかどうかの検討を行った。その結果、KA2 および GluR6/7 両サブユニットにおいて市販の抗体が有効であることが、海馬組織から作製されたレプリカ上で確認された。さらに、得られた免疫標識が特異性を共同研究者から入手した

KA2 ノックアウトマウス、および **GluR6** ノックアウトマウスの組織を用いて確認したところ、野生型マウスの組織において両抗体から得られた免疫標識はノックアウトマウスの組織からは検出されず、その標識の特異性が確認された。これらのカイニン酸型受容体抗体による標識検出を効率よく行うために、レプリカ作製条件の最適化を行った。具体的には、マウスの灌流固定に用いるパラホルムアルデヒドの濃度検討と SDS 溶液による組織の溶解条件の最適化を行った。その結果、2%パラホルムアルデヒドが有効であり、また SDS 溶液による組織の溶解条件は、カイニン酸型受容体の検出には、オートクレーブで 105 度 15 分が最適であることがわかった。以上の検討により、SDS-FRL 法を用いて大脳皮質におけるカイニン酸型受容体の局在解析を行うための準備が整った。平成 23 年度は、大脳皮質における AMPA 型およびカイニン酸型受容体の局在解析に成功した。AMPA 型受容体、GluR6 および KA2 に対する免疫標識は大脳皮質神経細胞のポストシナプスに集積して観察された(図 1、2)。今後カイニン酸型受容体を発現するシナプス結合を形成する神経細胞種の同定することにより、錐体細胞間抑制性伝達におけるカイニン酸型受容体の機能的役割の推定に役立つことが期待される。

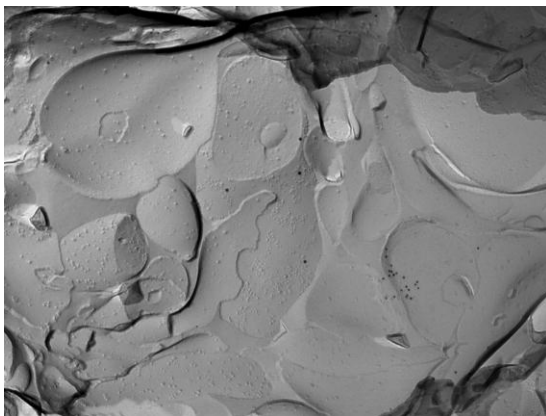


図 1. 抑制性軸索終末 (15 nm: vGAT) とシナプス後部 (10 nm: GluR1, GluR2/3, GluR6/7, NR1)



図 2. 樹状突起上のシナプス後部 (10 nm: PSD95) に局在する GluK6/7 (5 nm)

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)

[学会発表] (計 1 件)

発表者: 足澤 悦子

発表表題: immunohistochemical localization of kainate receptors, GluK2/3 (GluR6/7) and GluK5 (KA2) in the mouse hippocampus

学会名: 日本神経科学大会 NEURO 2010

発表年度: 2010年

発表場所: 神戸コンベンションセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足澤 悦子 (TARUSAWA ETSUKO)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構

(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイ

エンスセンター・特別協力研究員

研究者番号: 00446262