

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5月28日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700409

研究課題名（和文）嗅球における抑制性ニューロンのサブタイプに基づいた情報処理機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of inhibitory interneuron subtypes with distinct subcellular domain innervation to projection neurons in the mouse olfactory bulb

研究代表者

成塚 裕美 (NARITSUKA HIROMI)

東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員

研究者番号：00511388

研究成果の概要（和文）：これまで、齧歯類の嗅球における情報処理機構の研究は、主に投射ニューロンと、その樹状突起に抑制をかける dendritic-targeting タイプの抑制性介在ニューロンの解析を中心に行われてきた。本研究では、嗅球情報処理機構の解明を目指し、投射ニューロンの細胞体近傍に抑制をかける perisomatic-targeting タイプの抑制性介在ニューロンの解析も加え、抑制性介在ニューロンサブタイプの機能分化を明らかにすることを目的に研究を進めた。その結果、サブタイプ特異的な生理学的性質や神経新生の様式、入力依存的な可塑的変化を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Previous studies of neuronal circuits in the rodent olfactory bulb focused mainly on the interplay between projection neurons and dendritic-targeting inhibitory interneurons. In this study, in addition to the dendritic-targeting subtype, we studied the perisomatic-targeting subtype of inhibitory interneurons to identify the functional differentiation of these subtypes to elucidate the information processing in the olfactory bulb. We found that granule cells show subtype specific electrophysiological properties, timing of cell generation and sensory input-dependent morphological changes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経・筋肉生理学

キーワード：嗅球、抑制性介在ニューロン、成体神経新生

1. 研究開始当初の背景

多くの局所神経回路では、抑制性介在ニューロンは、形態や生理学性質が異なる非常に

多様なサブタイプから構成されている。これらのサブタイプの個々の機能を解明する上で特に重要なのが、抑制を送る投射ニューロ

ンの部位である。海馬や大脳新皮質といった脳領域の抑制性介在ニューロンには、投射ニューロンの樹状突起に抑制をかけるサブタイプ (dendritic-targeting タイプ) と、細胞体や axon hillock に抑制をかけるサブタイプ (perisomatic-targeting タイプ) が存在し、異なる抑制様式や機能を持つことが明らかになっている。特に、perisomatic-targeting タイプの抑制性介在ニューロンによる投射ニューロンの細胞体近傍への抑制は、そのスパイク出力の有無を決定する重要な機能を持つ (Miles et al., Neuron, 1996)。海馬での in vivo の実験から、抑制性介在ニューロンの個々のサブタイプが統合的に働くことは、特定の行動に伴う学習や記憶形成に重要であると考えられている (Klausberger et al., Nature, 2003)。以上のように、投射部位の異なる抑制性介在ニューロンのサブタイプを同定し、形態や機能を明らかにすることは、回路内での情報処理を解明する上で極めて重要である。

嗅覚系の一次中枢である嗅球においては、投射ニューロンの数百倍の抑制性介在ニューロンが存在するにも関わらず、これまでは dendritic-targeting タイプの抑制性介在ニューロンしか報告されていなかった。我々の研究室では、perisomatic-targeting タイプの抑制性介在ニューロンを嗅球で初めて発見し、以下の点を明らかにしてきた (Naritsuka et al., The Journal of Comparative Neurology, 2009)。

嗅球では、顆粒細胞が主要な抑制性介在ニューロンであり、この細胞は軸索を持たない無軸索細胞である。既知の顆粒細胞は、その樹状突起上で、投射ニューロンである僧帽細胞や房飾細胞の樹状突起と双方向性のシナプスを形成する、dendritic-targeting タイプの細胞である。我々の研究室では、成体の嗅覚系における神経新生を観察する為に、未分化な神経細胞に発現する nestin 遺伝子のプロモーターの制御下に GFP を発現する遺伝子改変マウスを作製した。このマウスの成体嗅球における顆粒細胞層では、弱く GFP を発現する新生細胞に加え、より強く GFP を発現する細胞が観察された (便宜上この細胞を” type S cell” と呼んでいる ; S は strong GFP の略)。type S cell は、樹状突起上の多数のスパインや分子発現から、nestin を発現しているものの例外的に成熟した顆粒細胞であると考えられた。電顕解析から、type S cell の樹状突起先端には巨大な球状構造が存在し (この球状構造を便宜的に” dendritic bouton” と呼ぶ)、この構造

内には、僧帽細胞の細胞体近傍への抑制性シナプスと、僧帽細胞の細胞体近傍から type S cell 側への興奮性シナプスから成る双方向性シナプスが観察された。このように、嗅球には type S cell という perisomatic-targeting タイプの顆粒細胞が存在することが明らかになった。約 9 割の僧帽細胞に type S cell からの投射があることから、type S cell は嗅球情報処理において重要な機能を担っていると予想された。以上の解析から、嗅球情報処理を理解する為には、抑制性介在ニューロンの投射部位に着目して分類したサブタイプごとに、その解析を行うことが重要であるとの考えに至った。

2. 研究の目的

本研究では、嗅球における情報処理機構の解明を目標に、抑制性介在ニューロンを抑制部位に着目してサブタイプ分けし、それぞれの機能分化を明らかにすることを目的に研究を進めた。本研究では特に、以下の 4 点に着目した解析を行った。

(1) 顆粒細胞のサブタイプごとの電気生理学的性質を明らかにする為に、嗅球切片上でのパッチクランプレコーディングを行い、その結果から各サブタイプの機能に迫る。

(2) 嗅球顆粒細胞の各サブタイプによる匂い情報の統合や修飾様式を知る為に、単一顆粒細胞が抑制する僧帽細胞群の空間的配置を明らかにする。

(3) 嗅球神経回路の特徴は、個体の発生段階に加えて、成体においても抑制性介在ニューロンの神経新生が継続している点である。これまでの解析は dendritic-targeting タイプの抑制性介在ニューロンに限られており、抑制部位の異なるサブタイプに着目した神経新生についての解析は行われていなかった。perisomatic-targeting タイプの顆粒細胞である type S cell による投射ニューロンへの perisomatic inhibition がどのように形成されるかを明らかにする為に、type S cell が新生される時期を明らかにする。

(4) dendritic-targeting 顆粒細胞では、嗅覚遮断によって形態や電気生理学的性質が変化することが報告されている。このことから、匂い入力に応じた嗅球情報処理に、抑制性介在ニューロンがサブタイプ特異的に形態や生理学的性質を可塑的に変化させることが重要であると予想している。

perisomatic-targeting タイプの顆粒細胞である type S cell も匂い入力に応じた dendritic bouton の形成を行っているかと仮説を立てている。この仮説を検証する為に、匂い入力を個体の発生段階で操作し、type S cell の dendritic bouton を観察する。

3. 研究の方法

(1) スライスパッチクランプレコーディングによる電気生理学的性質の解析

これまでの先行研究において、dendritic-targeting 顆粒細胞の電気生理学的性質に関する解析は行われていることから、本研究では type S cell の解析を行った。type S cell の電気生理学的性質を明らかにする為に、type S cell が GFP で標識されている nestin-promoter GFP マウスの嗅球から切片を作製し、GFP を指標にパッチクランプレコーディングを行った。

(2) retrovirus による細胞標識を用いた形態解析

これまでの解析において、単一の type S cell は、互いに近傍に位置する少数の僧帽細胞に dendritic bouton を投射していることが明らかになっている。

単一の dendritic-targeting 顆粒細胞が抑制する僧帽細胞群の空間的配置を明らかにする為に、dendritic-targeting 顆粒細胞のスパインと僧帽細胞のコンタクト様式を調べた。顆粒細胞の樹状突起とスパインの可視化は、GFP をコードする retrovirus を成体野生型マウスの脳室下帯に injection し、新生顆粒細胞を標識することで行った。僧帽細胞はマーカー分子である PGP9.5 の抗体による免疫染色で標識した。

嗅球の顆粒細胞は成体においても新生されていることから、嗅球には新生時期が異なる未成熟な細胞と成熟した顆粒細胞が混在している。本研究では、retrovirus を用いて新生顆粒細胞を標識した後、異なるタイムポイントで解析する。成熟した顆粒細胞になると考えられている4週の時点の細胞に加え、新生後10日の未成熟な細胞や8週の時点での細胞も解析した。

また、成体の野生型マウスで新生される顆粒細胞を retrovirus で標識し、type S cell 様の形態を持つ細胞が生まれているかを調べることで、perisomatic-targeting タイプの顆粒細胞が成体において新生しているかを検証した。

(3) 匂い入力操作による形態変化の解析

perisomatic-targeting タイプの顆粒細胞である type S cell が、匂い入力に応じた dendritic bouton の形成を行っているかを調べる為に、生後1日目の nestin-promoter GFP マウスを用いて、麻酔下で片鼻の鼻腔焼灼を行い、嗅覚入力を遮断した。生後8週齢の時点で、type S cell が投射ニューロンに形成する dendritic bouton を、入力が遮断された嗅球と遮断されていない嗅球の間で比較した。

4. 研究成果

(1) type S cell の電気生理学的性質の解析

嗅球において perisomatic targeting タイプの抑制性介在ニューロンとして発見された type S cell の電気生理学的性質を明らかにする為に、嗅球切片上でのパッチクランプレコーディングを行った。

dendritic-targeting 顆粒細胞については、先行研究のパッチクランプレコーディング実験から、脱分極性の電流注入に反応して、活動電位を発生させることが明らかになっていた。それに対し、type S cell では脱分極性の電流注入による活動電位の発生は見られなかった。これは、type S cell が non-spiking neuron であり、dendritic-targeting 顆粒細胞とは異なる様式で僧帽細胞とのシナプス入出力のやりとりをしていることを示唆している。

(2) Dt 顆粒細胞の形態観察

新生後8週の dendritic-targeting 顆粒細胞は、樹状突起を広範囲に広げ、多数のスパインを形成していることから、多くの投射ニューロンに抑制をかけていると予想される。

さらに、この解析において、dendritic-targeting 顆粒細胞には僧帽細胞の樹状突起にコンタクトする dendritic-targeting スパインに加え、僧帽細胞の細胞体にコンタクトする perisomatic-targeting スパインがあることを発見した。これまで、成体で新生された dendritic-targeting 顆粒細胞において perisomatic-targeting スパインの報告はなかったことから、より詳細に dendritic-targeting 顆粒細胞の perisomatic-targeting スパインを解析した。新生後8週に加え、新生後10日、4週の dendritic-targeting 顆粒細胞においても perisomatic-targeting スパインは観察された。特に、新生後10日の dendritic-targeting 顆粒細胞のうち、僧帽細胞層にまで樹状突起を伸ばす細胞の多くのものが

perisomatic-targeting スパインを持つことから、この perisomatic-targeting スパインは、新生後の比較的早い段階から形成されると推測される。

perisomatic-targeting スパインは dendritic-targeting スパインよりもそのサイズが大きい傾向が見られた為、次に dendritic-targeting 顆粒細胞のスパインを dendritic-targeting スパインと perisomatic-targeting スパインに分類し、そのサイズを各タイムポイントで調べた。perisomatic-targeting スパインのサイズは、新生後 4 週までにその成熟が完了するのに対し、dendritic-targeting スパインのサイズは 4 週から 8 週にかけて増大することを発見した。この結果は、dendritic-targeting 顆粒細胞では、「perisomatic-targeting スパインが dendritic-targeting スパインに先行して発達する」という成熟タイムコースを持つことを示唆している。

スパインサイズは、その形態の安定性やシナプス伝達の性質を反映する重要な特性であるが、成体で新生される dendritic-targeting 顆粒細胞のスパインのサイズを各発達段階で明らかにしたのは本研究が初めてである。また、dendritic-targeting 顆粒細胞のスパインを、投射ニューロンの細胞体や樹状突起といった投射先の部位ごとに着目して解析した研究も本研究が初めてである。

これまで、dendritic-targeting 顆粒細胞による投射ニューロンの活動調節は、「樹状突起への抑制」を中心に議論されてきた。しかし本研究の結果は、dendritic-targeting 顆粒細胞は投射ニューロンの異なる部位に異なるタイムコースで抑制性シナプスを発達させながら、その活動を制御する事を強く示唆している。本研究により、dendritic-targeting 顆粒細胞の機能を明らかにする上で、今後は投射ニューロンへの部位特異的な抑制と、それらの統合的な働きを考えることが重要であることが明らかになった。

(3) type S cell の新生時期

成体野生型マウスの脳室下帯に retrovirus を注入して 8 週後に GFP 陽性の顆粒細胞を観察したところ、多くの標識細胞が dendritic-targeting タイプの顆粒細胞であり、type S cell 様の形態を持つ顆粒細胞は観察されなかった。この結果は、perisomatic-targeting タイプの顆粒細胞が成体においては新生されず、個体の発生段階において新生されることを示唆している。

dendritic-targeting 顆粒細胞は、成体においても嗅球回路に組み込まれる一方、type S cell は個体の発生段階において新生したものが組み込まれることから、嗅球の情報処理において異なる役割を持つと推察される。

(4) type S cell の匂い入力に応じた変化
perisomatic-targeting タイプの顆粒細胞である type S cell が、匂い入力に応じた dendritic bouton の形成を行っているかを調べる為に、生後 1 日目のマウスにおいて、の片鼻の鼻腔焼灼を行い、生後 8 週齢の時点で、type S cell が投射ニューロンに形成する dendritic bouton を観察した。その結果、入力が遮断された嗅球では、遮断されていない嗅球に比べて、type S cell からの dendritic bouton は少なく、そのサイズも小さい傾向が見られた。

先行研究から、大脳新皮質の視覚野や聴覚野に存在する perisomatic-targeting 抑制性介在ニューロンは、個体発生の特定の時期に入る末梢入力に依存して、投射ニューロンへの perisomatic inhibitory synapse を形成することが知られている。特に、視覚野の臨界期の制御には、この perisomatic inhibitory synapse が重要な役割を果たすことが明らかになっている。一方、嗅覚系では、我々の研究室が初めて perisomatic-targeting タイプの抑制性介在ニューロンを同定しており、本研究の成果は、嗅覚系においても、perisomatic targeting synapse が、末梢からの入力に依存して、特定の回路形成に重要な役割を持つ可能性を示唆している。

本研究では、投射ニューロンへの抑制部位によって分類した顆粒細胞のサブタイプに着目してきた。これまで嗅球の情報処理は、dendritic-targeting 抑制性介在ニューロンによる「投射ニューロンの樹状突起への抑制」という側面でしか捉えられてこなかった。嗅球における匂い情報処理の解明を、抑制部位が異なる顆粒細胞のサブタイプの機能解析から目指す本研究のアプローチは、これまでに無かった視点である。本研究により今後は、嗅球での情報処理が、「投射ニューロンの異なる部位への抑制や、それらの統合的な働き」という観点からも論じられるようになる予想される。特に、投射部位の異なる抑制性介在ニューロンの新しいサブタイプ例えば、嗅球のもう一つの投射ニューロンである房飾細胞を担当する perisomatic-targeting 抑制性介在ニューロンなども発見され、今まで不明だった情報処理機構が解

明されると期待している。本研究の視点は、嗅球の perisomatic-targeting 顆粒細胞の機能を明らかにするだけでなく、抑制性介在ニューロンの機能分化のさらなる解明にもつながると予想している。

嗅球の情報処理機構の解明を、抑制性介在ニューロンのサブタイプの機能分化という視点から解析する研究の今後の展開として、本研究をもとに、①各サブタイプの顆粒細胞における、投射ニューロンへの抑制様式の分化、②サブタイプ特異的な新生様式と組み込みのメカニズム、異なる時期に新生される機能的意義、③嗅球情報処理における各サブタイプの統合的な働き、などの研究が予想される。

これまで、投射部位の異なる抑制性介在ニューロンのサブタイプの解析は、海馬や大脳新皮質で重点的に行われてきた。嗅球は明確な層構造を持つ為に入出力の様式がわかりやすく、鼻腔焼灼による入力遮断や、特定の匂い分子をかかせることによる嗅覚入力の促進といった感覚入力の操作が容易である。このような利点を備えた嗅球は、抑制性介在ニューロンのサブタイプ特異的な解析を行う上で優れたモデル系になると考えている。嗅球における抑制性介在ニューロンのサブタイプの研究で得られた知見は、他の系の抑制性介在ニューロンの機能を明らかにする上でも、役立つものになると期待している。

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3件)

(1) Mizuguchi R, Naritsuka H, Mori K, Yoshihara Y “Tbr2 Deficiency in Mitral and Tufted Cells Disrupts Excitatory-Inhibitory Balance of Neural Circuitry in the Mouse Olfactory Bulb” *Journal of Neuroscience*. 掲載確定 (印刷中) 査読有り

(2) Yoshihara S, Takahashi H, Nishimura N, Naritsuka H, Shirao T, Hirai H, Yoshihara Y, Mori K, Stern PL, Tsuboi A. “5T4 glycoprotein regulates the sensory input-dependent development of a specific subtype of newborn interneurons in the mouse olfactory bulb” *Journal of Neuroscience*. 2012;32(6):2217-2226. DOI:

10.1523/JNEUROSCI.5907-11.2012 査読有り

(3) Matsumura S, Takagi K, Okuda-Ashitaka E, Lu J, Naritsuka H, Yamaguchi M, Ito S. “Characterization of nestin expression in the spinal cord of GFP transgenic mice after peripheral nerve injury” *Neuroscience*. 2010 170(3):942-953. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2010.07.034 査読有り

[学会発表] (計1件)

(1) Hiromi Naritsuka, Kensaku Mori, Masahiro Yamaguchi “Synaptic connection of adult-born interneurons to distinct subcellular domains of projection neurons in the mouse olfactory bulb” 第34回日本神経科学大会 2011年9月16日 パシフィコ横浜 (神奈川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成塚 裕美 (NARITSUKA HIROMI)
東京大学・大学院医学系研究科・
特任研究員
研究者番号: 00511388

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし