

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25290012

研究課題名(和文) 大脳皮質神経細胞へのシナプス入力 of 定量的解析

研究課題名(英文) Quantitative analysis of synaptic contacts on cortical pyramidal cells

研究代表者

窪田 芳之 (Kubota, Yoshiyuki)

生理学研究所・基盤神経科学研究領域・准教授

研究者番号：90192567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：大脳皮質はヒトが生きて行く上で必要な脳機能を司る。しかしながら、その局所神経回路の構築はいまだ謎のままである。本研究では、電子顕微鏡観察により、ラットの5層の錐体細胞に入力するシナプスを定量的に解析したところ、約2万個のシナプス入力があることを推定できた。それらのうちおよそ2割は抑制性の入力であるが、抑制性シナプスの大きさはターゲットの大きさに依存しており、効率的な抑制効果をターゲットにもたらしめていることが想像できる。また、棘突起に入力するものは出現消失を繰り返すものがあり、可塑的に興奮性入力を調整していると考えている。固定的な神経回路は常に可変的変化を示していることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Understanding the brain's circuit architecture is critical to elucidating its function. We quantitatively analyzed synapse distribution on layer 5 pyramidal cell of rat cortex and found the cell receive totally about 20,000 synapses. About 20% of them are inhibitory synapse. The inhibitory synapse junction size is varied and correlated with their target size. It probably acts for an efficient inhibition. We found that inhibitory synapses on dendritic spines are exceptionally dynamic as compared to other synaptic populations, due to the fact that a large proportion of them disappear and recur again in the same location on a timescale of days. Inhibitory synapses are often found on dendritic spines which receive direct thalamic input. Thus, the function of inhibitory synaptic remodeling at this locale may serve as a mechanism for gating feedforward excitation, rather than, as proposed for excitatory synapses, as a mechanism to remodel circuitry and exchange partners.

研究分野：神経科学

キーワード：大脳皮質 神経回路 錐体細胞 非錐体細胞 抑制 可塑性 in vivo imaging シナプス

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質の局所神経回路は、多種類の神経細胞と他の領域からの入力線維から構成されており、それらが作る神経回路は非常に複雑である。神経細胞の概念を見つけた偉大な研究者であるカハールが大脳皮質の神経細胞をこの世に紹介して100年以上経ったが、大脳皮質の局所神経回路は、いまだ未知の事だらけである。最近、研究機器が大幅に精度を上げた事により、少しの光が見えて来た。そこでわかった事は、大脳皮質の局所神経回路は、かつて誰もが想像したよりもずっと複雑な事である。一つの神経が有する出力シナプス結合は数万個、入力結合も数万個あると言われている。また、一つの神経は、受け手の神経細胞に十個単位のシナプス結合を使って信号を伝えると考えられている。これらをあわせ考えると、一つの神経細胞が信号を渡す受け手の神経細胞はおよそ数千個という事になる。我々の脳には百兆以上のシナプス結合部位があり、気の遠くなるような神経回路を作っているという事になる。ただし、その神経回路は、おそらく、同じような構造をした局所神経回路の繰り返しユニット構造が基本になっていると考えられており、現在、その局所神経回路ユニット構造を明らかにする為に、世界中の神経科学者が協力して解析を進めている。

2. 研究の目的

大脳皮質の細胞の8割は信号を他の領野に伝える役割をもつ錐体細胞で、残りの2割はその錐体細胞の活動を、抑制作用で制御する非錐体細胞である。非錐体細胞の種類は少なくとも十種類以上あり、神経終末のターゲットの部位がそれぞれ異なる事から、局所神経回路ユニットでの抑制機能が異なると考えられている (E. G. Jones, *Cereb Cortex* 3, 361 (1993), Y. Kawaguchi, Y. Kubota, *Cereb Cortex* 7, 476 (1997), H. Markram et al., *Nature Rev. Neurosci.* 5, 793 (2004))。この機能構築を理解するには、ニューロンタイプを同定した上で、主に遺伝的に決定されている回路要素と、外部入力によって修飾される要素を分け、形態的および機能的結合則を明らかにしていく必要がある。本研究では、大脳皮質のマイクロサーキットに数あるシナプス結合の中から、錐体細胞及び、視床からの興奮性入力、非錐体細胞からの抑制性入力、錐体細胞や非錐体細胞上にどのような様式で入力しているかを解析する。さらに、抑制性シナプス入力に関しては、ターゲットのコンパートメント部位毎に異なる抑制機能が推測されているが、その可塑的な動態や、抑制機能に関する解析を進めたい。さらに精度の高いモデル細胞を作成し、シミュレーション解析で抑制シナプス機能の解析にもトライしたい。

3. 研究の方法

実験(A):大脳皮質5層にある反対側の線条体に投射するサブタイプであるCCS細胞を手始めに解析したい。一般的に錐体細胞上のシナプス接着を受けるのは棘突起と言われている。その分布密度を、基底樹状突起、尖端樹状突起、タフト樹状突起に区分し解析する。また、樹状突起の形態的な特性に関しても解析する。

実験(B):5層の錐体細胞であるCCS細胞とFSバスケット細胞をダブル電気整理スライス記録し、FS細胞からCCS細胞への抑制性シナプス電流とシナプスジャンクションの面積の関係を、電気生理、電子顕微鏡、シミュレーション解析法を使って解析し、抑制原理を導く。

実験(C):興奮性と抑制性のシナプスが、in vivo でどのような動態を示すのか、cranial window越しに二光子顕微鏡で脳を直接観察し解析する。特に抑制性シナプスと興奮性シナプスが同時に一つの棘突起に入力している興味深い結合組合せに着目して、片眼遮蔽時に、その結合した2つの神経終末の可塑的变化に注目して観察解析したい。

実験(D):ラットの大脳皮質の非錐体細胞(FS basket細胞、Martinotti細胞、double bouquet細胞、large basket細胞)の樹状突起に入力する興奮性シナプス入力と抑制性シナプス入力の分布を細胞体や樹状突起のサブコンパートメント毎に詳細に観察解析する。これらの結果を元に、解析した4種類の非錐体細胞にシナプス結合する神経終末の種類毎の総数を推定する。

4. 研究成果

実験(A):神経細胞は、枝分かれして長く伸びる樹状突起や細胞体で、数千から数万個のシナプス入力を受取り、その入力信号を樹状突起で統合し細胞体に伝搬させ、最終的に細胞体の電位を閾値以上に上げてスパイクを発生させる。樹状突起の分岐部分の形態が、この興奮性信号の統合処理に、大きく影響を与える事が知られている。分岐部分での親樹状突起と2つの娘樹状突起の断面積は保存されている事、また、それはRallの3/2乗則と同等である事を、錐体細胞を電子顕微鏡観察することで確認した。また、棘突起の分布から、およそ20,000個のシナプス入力を受けていることが推測できた。

実験(B)

大脳皮質の多様な抑制性細胞で、軸索終末の微細構造を定量解析したところ、シナプス接合部面積とシナプス後標的の大きさは非常にきれいな相関を示していた。一方、

単一の抑制性細胞の軸索が多様な構造にシナプスを作る場合が多く見られた。実際、主要な抑制性非錐体細胞である FS バスケット細胞は細胞体ばかりでなく、樹状突起シャフト、スパインのいずれにもシナプスしていた。FS バスケット細胞の標的多様性と、シナプス前後部のサイズ整合性の機能的意味を理解するために、まず、5層の錐体細胞へのシナプス結合様式を、スライスを使ったダブルレコーディング法で解析し、単位接合部面積あたりの抑制性コンダクタンスを求めた。これと、シナプス後錐体細胞の樹状突起分枝・シナプス位置と、各シナプス部位の後構造の大きさ・接合部面積を定量化して、抑制作用の空間的広がりを検討した。その結果、細胞体抑制が極めて強いことや、樹状突起シャフト・スパインへの抑制作用は弱く、それぞれ近傍や棘突起頭部のみに限局されることが分かった。

実験(C)

マウスの大脳皮質視覚野の表層の錐体細胞の樹状突起上の抑制性シナプスを Teal-gephyrin で、また、興奮性シナプスを mCherry-PSD95 でラベルし、棘突起の動態変化も加味し、in vivo で、2光子レーザー共焦点顕微鏡で観察し、それらの動態を明らかにした。その結果、樹状突起の幹にある抑制性シナプスよりも棘突起に存在する抑制性シナプスに、より可塑的な動態変化を見つけた。数日の単位で抑制性シナプスが出現したり消失したりを繰り返すシナプスを、消失直後に電子顕微鏡を使った3次元再構築法で確認した。シナプスとしての形態的な条件を完全には満たしていないものの、前神経終末の膨らみや少数のシナプス小包、ごく小さいクレフト構造等を確認した。たとえシナプスが消失しても、次のシナプス形成に即対応できるように、ある程度、形態的構造を保持している事が推測できた。

実験(D)

ラットの大脳皮質の非錐体細胞 (FS basket 細胞、Martinotti 細胞、double bouquet 細胞、large basket 細胞) の樹状突起に入力する興奮性シナプス入力と抑制性シナプス入力の分布を細胞体や樹状突起のサブコンパートメント毎に詳細に観察解析した。その結果、FS basket 細胞に 5000 個、Martinotti 細胞に 5000 個、double bouquet 細胞に 2500 個、large basket 細胞に 1500 個のシナプス入力の総数を認めた。興味深いことに、抑制性シナプス入力の総数はほぼどれも同じで 700-1000 個であった。

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 11 件)

1) Villa KL, Berry KP, Subramanian J, Cha JW, Oh WC, Kwon HB, Kubota Y, So PT, Nedivi E Inhibitory synapses are repeatedly assembled and removed at persistent sites in vivo.

Neuron. 89(4):756-69 (2016)

doi: 10.1016/j.neuron.2016.01.010 【査読有】

2) Shigematsu S, Ueta Y, Mohamed AA, Hatada S, Fukuda T, Kubota Y, Kawaguchi Y Selective thalamic innervation of rat frontal cortical neurons

Cerebral Cortex, 26, 2689-270 (2016)

doi: 10.1093/cercor/bhv124 【査読有】

3) Kubota Y, Karube F, Nomura M, Kawaguchi Y. The Diversity of Cortical Inhibitory Synapses.

Frontiers in Neural Circuits. 10:27 (2016)

doi: 10.3389/fncir.2016.00027_ 【査読有】

4) Barth A, Burkhalter A, Callaway EM, Connors BW, Cauli B, DeFelipe J, Feldmeyer D, Freund T, Kawaguchi Y, Kisvarday Z, Kubota Y, McBain C, Oberlaender M, Rossier J, Rudy B, Staiger JF, Somogyi P, Tamas G, Yuste R, Comment on "Principles of connectivity among morphologically defined cell types in adult neocortex".

Science. 353(6304):1108 (2016)

doi: 10.1126/science.aaf5663 【査読有】

5) Kubota Y, Kondo S, Nomura M, Hatada S, Yamaguchi N, Mohamed A, Karube F, Luebke J, Kawaguchi Y

Functional effects of distinct innervation styles of pyramidal cells by fast spiking cortical interneurons

eLife, eLife.07919 (2015)

doi: 10.7554/eLife.07919 【査読有】

6) Kubota Y

New developments in electron microscopy for serial image acquisition

Microscopy. 64(1): 27-36 (2015)

doi: 10.1093/jmicro/dfu111 【査読有】

7) Kubota Y

Untangling GABAergic wiring in the cortical microcircuit.

Current Opinion in Neurobiology. 26, 7-14 (2014)

doi: 10.1016/j.conb.2013.10.003 【査読有】

8) Kamijo TC, Hayakawa H, Fukushima Y, Kubota Y, Isomura Y, Tsukada M, Aihara T Input integration around the dendritic branches in hippocampal dentate granule cells.

Cognitive Neurodynamics, 1-10 (2014)

doi: 10.1007/s11571-014-9280-6 【査読有】

9) 窪田芳之

大脳皮質の神経細胞と局所神経回路

日本神経回路学会誌、第 21 巻 122-131 (2014) 【査読有】

10) Tricoire L, Kubota Y, Cauli B*

Cortical NO interneurons: from embryogenesis to functions.

Front Neural Circuits. 7:105 (2013)

doi: 10.3389/fncir.2013.00105 【査読無】

11) DeFelipe J, López-Cruz PL, Benavides-Piccione R, Bielza C, P Larrañaga, Anderson S, Burkhalter A, Cauli B, Fairén A, Feldmeyer D, Fishell G, Fitzpatrick D, Freund TF, González-Burgos G, Hestrin S, Hill S, Hof PR, Huang J, Jones EG, Kawaguchi Y, Kisvárdy Z, Kubota Y, Lewis DA, Marín O, Markram H, McBain CJ, Meyer HS, Monyer H, Nelson SB, Rockland K, Rossier J, Rubenstein JLR, Rudy B, Scanziani M, Shepherd GM, Sherwood CC, Staiger JF, Tamás G, Thomson A, Wang Y, Yuste R & Ascoli GA

New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons.

Nature Reviews Neuroscience, 14, 202-216 (2013)

doi: 10.1038/nrn3444 【査読有】

[学会発表](計 30 件)

1) Kubota Y, Sohn S, Hatada S, Schurr M, Straehle J, Gour AG, Neujahr R, Mikula S, Kawaguchi Y, A conductive novel tape material and a new staining protocol for volume electron microscopy applications, 47th Annual meeting of the Society for Neuroscience, 2017.11.14

2) Kubota Y, Kawaguchi Y, The Diversity of Cortical Inhibitory Synapses The 48th NIPS International Symposium, 2017.11.2

3) Kubota Y. A novel conductive material for ATUMtome tape -Carbon Nanotube- Max Planck/HHMI Connectomics Conference Berlin 2017, 2017.4.11,

4) 窪田芳之、孫在隣、畑田小百合、川口泰雄、ATUMtome 用の新開発テープと高解像画像用組織処理法、第 73 回日本顕微鏡学会学術集会シンポジウム、2017.6.1

5) 窪田芳之、関川明夫、Mohamed A Alsayed, 根東覚、苅部冬紀、田中泰裕、川口泰雄、Synapse density and estimated number on various neurons of the rat frontal cortex、第 94 回生理学会大会シンポジウム、2017.3.28

6) Kubota Y, The Diversity of Cortical Inhibitory Synapses

The 7th International Neural Microcircuit Conference - Recent advances in the analysis of cortical microcircuits -, 2016.12.9

7) Kubota Y, Kawaguchi Y

GABAergic/non-GABAergic synaptic inputs to striatal medium spiny neurons

46th Annual meeting of the Society for Neuroscience, 2016.11.14

8) Kubota Y, Sekigawa A, Alsayed A Mohamed, Kondo S, Karube F, Tanaka Y, Kawaguchi Y

An excitatory and inhibitory synapse density on various neurons in the rat frontal cortex EMBO Dendrites 2016 meeting, 2016.6.20

9) Kubota Y

Structurally authentic model pyramidal and non-pyramidal cells

OIST workshop 2016: Digital Representation of Neuronal Morphologies and Tissue, 2016.4.12

10) 窪田芳之、ATUMtome/SEM を使った神経組織の 3 次元再構築解析

第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、シンポジウム「走査型電子顕微鏡による 3 次元超微形態解析の進展と展望～試料作製からデータ解析まで～」2016.3.28,

11) 窪田芳之、神経科学における電頭の役割 第 5 回大脳基底核機能研究会、2016.3.18

12) 窪田芳之

大脳皮質 FS バスケット細胞による 5 層錐体細胞神経支配の様式

平成 27 年度生理研研究会「シナプス・神経ネットワークの機能ダイナミクス」

2015.12.3

13) Kubota Y

An excitatory and inhibitory synapse density on various nonpyramidal cells in the rat cerebral cortex

The 2nd East-Asia Microscopy Conference, Symposium “Connectomics”, 2015. 11.25

14) Kubota Y, Kondo S, Nomura M, Hatada S, Yamaguchi N, Mohamed AA, Karube F, Lübke J, Kawaguchi Y, Functional effects of distinct innervation styles of fast spiking cortical interneurons on pyramidal cells

45th Annual meeting of the Society for Neuroscience, 2015.10.19

15) Kubota Y, Villa KL, Berry KP, Subramanian J, Cha JW, So PTC, Nedivi E, Kawaguchi Y

Correlative light and electron microscopy of brain tissue using two-photon microscope and FIB/SEM

Microscopy & Microanalysis 2015, 2015.8.3,

16) 窪田芳之

Functional effects of distinct innervation styles of pyramidal cells by fast spiking cortical interneurons. 第 38 回日本神経科学学会大会 シンポジウム “Wiring Inhibitory Synapses and Circuits” 2015.7.29

17) 窪田芳之

ATUMtome を使った脳組織観察法、第 10 回自然科学研究機構技術研究会、2015.6.18、

18) 窪田芳之、ATUMtome および SBEM を使った脳組織観察法

日本顕微鏡学会「SEM 連続断面観察による生物組織 3 次元再構築法研究部会」第 3 回研究会、2015.3.25

19) 窪田芳之、Dynamic behavior of inhibitory

synapse on pyramidal cell
第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 シンポジウム、2015.3.22

20) 窪田芳之
大脳皮質錐体細胞棘突起へ入力する抑制性シナプスの動態
自然科学研究機構プロジェクト 合同シンポジウム「脳神経情報の階層的研究」機能生命科学における揺らぎと決定」、2015.3.11

21) Kubota Y, Mohamed AA, Yamaguchi N, Hatada S, Lübke J, Kawaguchi Y
Conserved dimensional properties of dendritic trees in cortical pyramidal cell
44th Annual meeting of the Society for Neuroscience, 2014.11.16

22) Kubota Y
"Cortical fast spiking basket cell inhibition on pyramidal cells through multiple modalities and innervation styles"
4th Joint CIN – NIPS Symposium, 2014. 10. 6

23) 窪田芳之
TEM, FIB/SEM, DiK-SEM を使った神経組織の電子顕微鏡連続切片作製
第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会シンポジウム、2014.3.28

24) 窪田芳之
TEM, FIB/SEM, DiK-SEM を使った神経組織の電子顕微鏡連続切片作製
第 91 回日本生理学会大会シンポジウム、2014.3.18

25) Kubota Y, Kondo S, Nomura M, Karube F, Lübke J, Kawaguchi Y
Differences in size of cortical synapses underlying distinct modes of inhibitory control
43rd Annual meeting of the Society for Neuroscience, 2013.11.11

26) 窪田芳之
樹状突起分岐部の微小管の FIB/SEM による観察 日本顕微鏡学会「様々な極微イメージング技術研究部会」第 1 回研究会、2013.10.20

27) 窪田芳之
大脳皮質非錐体細胞の樹状突起の形態解析
第 54 回日本組織細胞化学会総会・学術集会ワークショップ「新しい 3 次元電顕解析法と組織細胞化学の接点を探る」、2013.9.27

28) Kubota Y
Locally limited conductance of IPSC elicited by fast spiking interneurons synapsing onto cortical pyramidal cell
The 6th International Microcircuit Conference, -Functional Mechanism of Cortical Microcircuit-, 2013. 6. 24

29) 窪田芳之
Locally limited conductance of IPSC elicited by fast spiking interneurons synapsing onto cortical pyramidal cell
第 36 回日本神経科学学会大会 シンポジウム、2013. 6.20

30) 窪田芳之
電子顕微鏡連続切片の再構成による大脳皮質

抑制性神経細胞の特徴抽出
第 9 回 IIRS セミナー、2013. 6. 1

〔図書〕(計 2 件)

- 1) Kubota Y
Morphological and neurochemical characterization of electrophysiologically identified cells. Receptor and Ion Channel Detection in the Brain: methods and protocols
Eds: Rafeal Luján, Francisco Ciruela
Springer, New York, U.S.A. Volume 110, pp277-309 (2016)
- 2) Kubota Y, Nomura M, Karube F, Kawaguchi Y
Functional significance of Rall's power of three halves law in cortical nonpyramidal cells.
Advances in Cognitive Neurodynamics (III),
Eds: Yoko Yamaguchi, Springer, New York, U.S.A., pp 45-51, (2013)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

窪田 芳之 (KUBOTA, Yoshiyuki)
生理学研究所・基盤神経科学研究領域・
准教授

研究者番号: 90192567

(2) 研究分担者 ()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号:

(4) 研究協力者 ()