

川口 泰雄

自然科学研究機構生理学研究所・教授

大脳領域間結合と局所回路網の統合的解析

§1. 研究実施の概要

本研究チームでは、大脳の局所回路構築原理を理解するために、大脳皮質では、皮質外投射する錐体細胞サブタイプと、それらが作る出力モジュールの同定、ニューロンタイプごとの樹状突起構造とシナプス入力分布の定量解析を行い、代表的な皮質下投射先である大脳基底核では、内部回路が多様な皮質・視床入力に依存してどのように組織化されているかを調べる。これらを合わせて、ニューロンタイプ・局所回路・大脳システムという、3つの異なる階層を繋いでいる構造ルールを明らかにするとともに、局所回路の機能発現への関与を理解するように努力する。平成21年度で、研究対象とする皮質領野同定法、皮質間結合細胞からのホールセル記録、皮質 GABA 細胞の振動特性とその伝達物質による修飾、樹状突起微細形態パラメーターの収集、ウイルスを使った基底核単一ニューロン軸索標識法の確立、線条体介在ニューロンが選択的に蛍光標識された遺伝子改変動物の作成を行った。22年度は、これらに基づいて、反対側の新皮質へ投射する5層錐体細胞のサブタイプの同定や結合選択性、新皮質 GABA 細胞サブタイプの階層的構成、それらのサブクラスでの分子発現・形態分化の相関、線条体出力の投射先の組み合わせ特異性を明らかにした。今後は、残りの錐体細胞投射クラスを同定し、これらの間の結合特性を調べるとともに、その後、視床皮質間振動におけるサブネットワークの役割分担、線条体介在細胞への入力様式などを調べ、ニューロンタイプ・局所回路・大脳システムという3つの異なる階層を繋ぐ構造基盤を明らかにしていきたい。

§ 2. 研究実施体制

(1) 川口グループ

① 研究分担グループ長: 川口 泰雄 (自然科学研究機構生理学研究所、教授)

② 研究項目

- ・錐体細胞の出力多様性と結合選択性の解析
- ・新皮質 GABA 細胞のサブタイプ同定

(2) 窪田グループ

① 研究分担グループ長: 窪田 芳之 (自然科学研究機構生理学研究所、准教授)

② 研究項目

- ・非錐体細胞樹状突起構造の定量化
- ・非錐体細胞樹状突起構造のモデル化

(3) 藤山グループ

① 研究分担グループ長: 藤山 文乃 (京都大学大学院医学研究科、准教授)

② 研究項目

- ・大脳基底核単一ニューロンの軸索投射解析
- ・視床の入出力解析

§3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

「脳の局所回路構築原理を理解するために、新皮質では皮質外投射する錐体細胞サブタイプと出力モジュールの同定、シナプス結合様式の定量解析を行い、大脳基底核では内部回路が多様な皮質・視床入力に依存してどのように組織化されているかを調べる。これらを合わせて、ニューロンタイプ・局所回路・大脳システムという異なる階層を繋いでいる構造ルールを明らかにし、各局所回路の大脳機能発現への関与を理解するように努力する。」という全体研究目標に従って、今年度は以下の研究を実施した。

(a) 交連錐体細胞の多様性と結合特異性

対側の新皮質へ投射する錐体細胞(交連細胞)は、左右半球の機能的協調を担っており、2層から6層にわたって広く分布している。交連細胞の機能的構成やそれらが作る局所サブネットワークを明らかにするために、ラット前頭皮質5層で、逆行性標識で同定した交連細胞の電氣的・形態的性質を調べ、それらの間の結合やレイヤー間入力を解析した。5層交連細胞は、脱分極に対して発火が順応しにくいタイプ(SAタイプ)としやすいもの(FAタイプ)に分かれた。先端樹状突起タフトは、前者の方で発達していた。(図1,2)¹⁾

5層交連細胞は、5層内では同じ発火タイプどうしでよく結合しており、2/3層からのレイヤー間結合では、2/3層細胞の中でも同じ交連細胞からの入力を受けやすかった。

2個の5層交連細胞の単一2/3層交連細胞からのシナプス入力パターンをみると、同じ発火タイプのもので共通入力を受ける確率が高かった。一方、5層の橋核投射細胞と交連細胞では、交連細胞が橋核投射細胞と同様の発火様式(SAタイプ)の時に、2/3層交連細胞からの共通入力により見られた。後部頭頂野などの同側遠隔皮質にも投射する交連細胞はFAタイプであった。交連細胞のサブタイプである対側線条体投射細胞がFAタイプであることを考えると、

交連結合は、同側皮質連合投射や皮質下投射が異なる複数のサブネットワークからできていることが分かった。¹⁾

(b) 新皮質 GABA 作働性ニューロンの階層的構成

新皮質 GABA 作働性細胞は極めて多様であるが、私たちは、(1) その多くがカルシウム結合蛋白質のパルブアルブミン、カルレチニン、ペプチドのソマトスタチン、VIP、コレシストキニン、アクチ

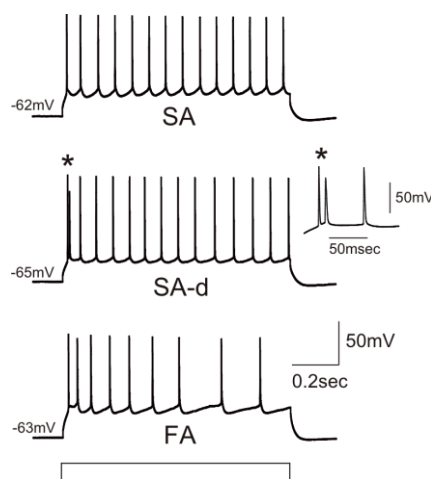


図1 交連細胞の3種類の発火様式 (SA, SA-d, FA)

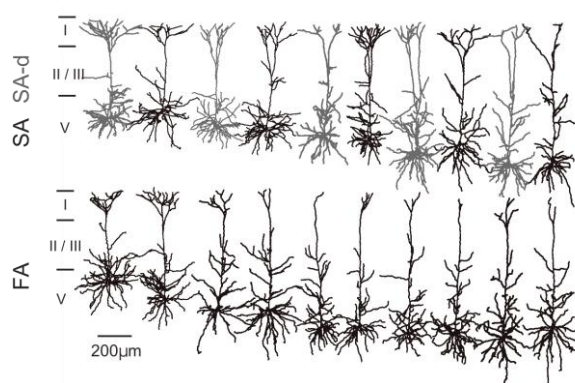


図2 交連細胞サブタイプの樹状突起形態分化

ン結合蛋白質のアルファアクチニン2の内、少なくとも一つを発現し、(2) それらの発現様式と形態・発火特性の間に相関が見られ、(3) これらの性質の違いを基に皮質局所回路における機能的サブタイプが同定できると考えている。しかし、新皮質ニューロン研究者の間では、GABA 細胞に限られた数の特徴的なニューロンクラスに分けられるのか、生理的・形態的に連続分化した極めて多様なニューロン群からできているのかについて未だに議論されている。皮質 GABA 細胞には、上記の基本的マーカーの他に、ニューロペプチド Y、CRF、サブスタンス P 受容体、一酸化窒素合成酵素が発現する。本研究では、新皮質 GABA 細胞の構成やその中の階層性を更に理解するために、これらのマーカーと6種の基本的マーカーとの関係を調べた。その結果は、新皮質 GABA 細胞は限られた数の基本的クラスからできており、その中が更に階層的に組織化されているという考えを支持した。(図 3)⁵⁾

(c) 新皮質 GABA 作働性ニューロンの主要サブタイプ内の分子発現・形態分化の相関

皮質ニューロンタイプの形態分化と分子発現の対応を更にみるために、ソマトスタチン細胞の NOS (NADPH-diaphorase)陽性・陰性グループの形態を比較したところ、スパイン密度に大きな差が見られた。分子発現と形態の多様性に強い相関があるという私たちの考えを積極的に支持した。⁵⁾

(d) 線条体細胞の投射様式のコンパートメント依存性

線条体は、パッチ/マトリックスの二つのコンパートメントから成る。マトリックスに比べて、パッチ出力については不明な点があった。今回、単一軸索染色を用いて、パッチからの出力も間接路/直接路に分かれることを明らかにした。パッチ直接路は、黒質緻密部にいくばかりでなく、淡蒼球外節/内節/黒質網様

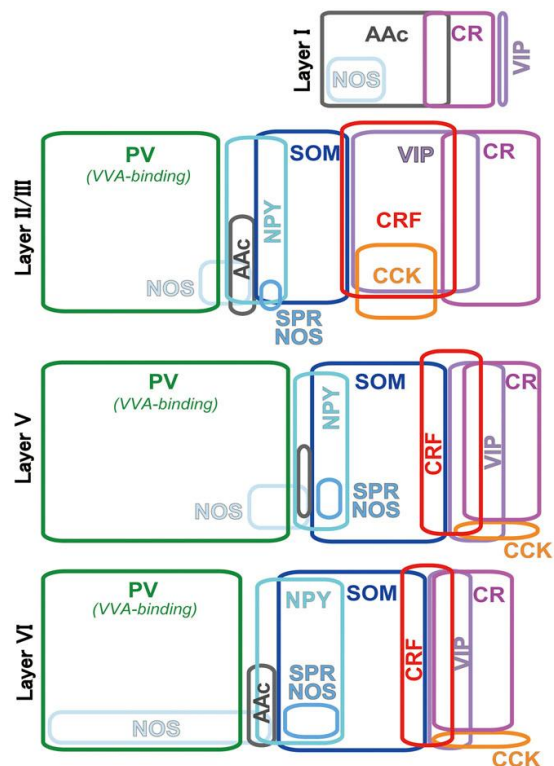


図3 ラット前頭皮質 GABA 細胞の構成
AAc (NCBI gene symbol, Actn2); CCK (Cck);
CR (Calb2); CRF (Crh); NOS (Nos1); NPY
(Npy), PV (Pvalb), SOM (Sst), SPR (Tacrl);
VIP (Vip).
VVA, Vicia villosa.
濃青と淡青の NOS: 前者で発現が強い。

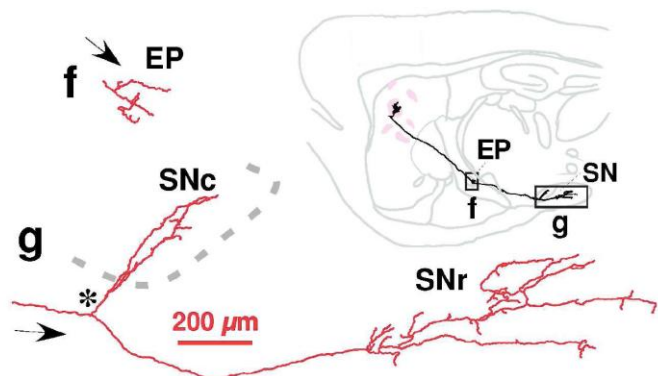


図4 線条体パッチ領域の直接路ニューロン
脚内核 (EP)、黒質緻密部(SNc)、黒質網様部 (SNr)すべてに軸索側枝を出している。

部にも側枝を出すことがわかった (図4)。パッチ領域が線条体投射ドーパミン細胞を選択的に抑制するだけでなく、淡蒼球/黒質網様部でマトリックス出力と相互作用する可能性が明らかになった。

3)

(e) 第5回 神経局所回路国際会議 JST セッション “Microcircuitry of Cortex” の開催

大脳皮質に存在する局所神経回路は、神経細胞の種類も多く、他の領域からの神経線維の出入力も複雑で、未だにその構築が理解されていない。この局所神経回路の解明に近づく最良の戦略の一つとして、この研究に携わる各分野の研究者達が、より緊密な協力関係の元で、解明のためのアプローチを行う事が考えられる。その為にも、各分野の最先端の情報を共有する事が、必要不可欠であると考え。そのような目的の下、2010年06月29日と30日に、東京のお台場の日本科学未来館を会場に、CREST 研究参加者に加えて、世界各地の神経科学研究者 16 名が集い、大脳皮質、海馬、線条体の神経回路に関する最新の研究成果を2日間にわたり発表し、議論を重ねた。参加者の総数は55名で、うち13名の外国人(米国、ドイツ、オーストリア、オーストラリア、フランス、中国の6カ国)と42名の日本人研究者であった。いずれも未発表データを躊躇なく報告し、各発表に対して数多くのするどい質問があり、とても興味深い会議となった。参加者達からの反響はとても良く、質の高い国際研究集会となった。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

- 1). Otsuka T, Kawaguchi Y. Cell diversity and connection specificity between callosal projection neurons in the frontal cortex. *Journal of Neuroscience* 31:10 (2011) doi: 10.1523/JNEUROSCI.5795-10.2011.
- 2) Kuramoto E, Fujiyama F, Nakamura KC, Tanaka Y, Hioki H, Kaneko T. Complementary distribution of glutamatergic cerebellar and GABAergic basal ganglia afferents to the rat motor thalamic nuclei. *Eur J Neuroscience* 33 (2011) DOI: 10.1111/j.1460-9568.2010.07481.x
- 3) Fujiyama F, Sohn J, Nakano T, Furuta T, Nakamura KC et al. Exclusive and common targets of neostriatofugal projections of rat striosome neurons: A single neuron-tracing study using a viral vector. *Eur J Neuroscience* 33: (2011) DOI: 10.1111/j.1460-9568.2010.07564.x.
- 4) Jerry L Chen, Walter C Lin, Jae Won Cha, Peter T So, Yoshiyuki Kubota & Elly Nedivi: Structural basis for the role of inhibition in facilitating adult brain plasticity. *Nature. Neuroscience* (2011) DOI:10.1038/nn.2799 (in press).
- 5) 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. *Cerebral Cortex*
first published online January 10 (2011) DOI:10.1093/cercor/bhq252. (in press).