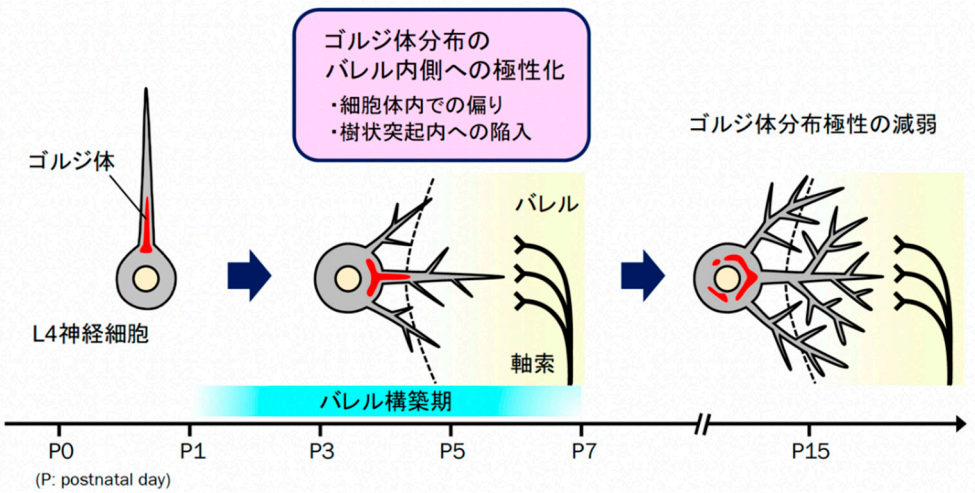
157　大脳皮質モジュール構築におけるゴルジ体局在動態	中川　直樹

【目的】哺乳類大脳皮質の感覚野第 4 層（Layer 4 : L4）では、視床を経由して伝達される末梢感覚器からの入力を受けて、機能的に独立したモジュール（単位回路）の並列構造が構築され、成体での高度な情報処理の回路基盤となる。例えば、マウス体性感覚野（バレル皮質）においてヒゲ触覚情報処理を担うモジュールである「バレル」では、視床皮質軸索（Thalamocortical axon : TCA）が大脳皮質 L4 神経細胞に入力し、各頬ヒゲからの個別の触覚情報を伝達する。L4 神経細胞は、生後一週間の間に、所属するバレルの TCA 終末に向けて選択的に樹状突起を伸長することで、単一ヒゲ触覚の特異的な受容を可能にする。したがって、バレル皮質 L4 神経細胞の樹状突起選択的伸長を制御する細胞内機構の解明は、大脳皮質モジュール構築機構の理解に繋がると考えられる。樹状突起の伸長には、細胞膜成分や接着分子、シナプス関連分子などの供給が必要であり、特定の樹状突起への選択的な物質輸送が樹状突起の選別に関与すると考えられることから、細胞内小胞輸送のハブであるゴルジ体に着目した。本研究では、バレル構築過程における L4 神経細胞内のゴルジ体局在動態を生体内で解明することを目的とした。

【方法】ICR マウスを使用し、子宮内電気穿孔法を用いて、ゴルジ体移行性 GFP（Golgi-EGFP）と樹状突起観察用の RFP をバレル皮質 L4 神経細胞に発現させた。単一細胞形態解析を行うため、Supernova 法を用いて神経細胞をまばらに標識した。バレル構築開始前（生後 1 日齢 : P1）、バレル構築期（P3、5、7）、およびバレル構築完了後（P11、15）の各時点で大脳皮質組織切片を作製し、vesicular glutamate transporter 2（vGlut2）抗体染色によって TCA 終末を可視化した後、単一神経細胞レベルでゴルジ体局在と樹状突起形態の同時解析を行った。

【結果】上記の方法を用いて、発達段階での樹状突起形態の成熟に伴うバレル皮質 L4 神経細胞のゴルジ体局在変化を解析した。まず冠状断切片を用いて解析した。バレル皮質 L4 神経細胞のゴルジ体局在は、バレル構築開始前の P1 では、主に尖端樹状突起（apical dendrite : AD）内部に局在していたが、P3 から P5 へと発達が進むにつれて細胞体へと局在が変化した。P5 では、一部の細胞において、細胞体に加えて基底樹状突起（basal dendrite : BD）内部にゴルジ体が陥入していた。接線方向の組織切片を用いて、L4 神経細胞のゴルジ体局在とバレルとの空間関係を詳細に解析したところ、P5 の L4 神経細胞では、細胞体のバレル内側領域にゴルジ体が偏って分布していた。さらに、バレル内側に向けて伸長した、長く複雑な BD の内部に特異的にゴルジ体が陥入していることが明らかとなった。このゴルジ体の極性化した分布（細胞体でのバレル内側への偏りと、バレル内側に伸びた BD への陥入）は、P5、7 で顕著に見られた一方で、バレル構築完了後の P11 から P15 にかけて徐々に減弱した。したがって、L4 神経細胞のゴルジ体分布極性は、バレル構築期のみにみられる一過性の現象であり、樹状突起の選択的伸長に寄与する可能性が示唆された。

バレル構築期 L4 神経細胞のゴルジ体局在動態



157. 大脳皮質モジュール構築におけるゴルジ体局在動態

中川　直樹

情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所 遺伝形質研究系

Key words：大脳皮質神経回路，バレル皮質，樹状突起，ゴルジ体，単一細胞解析

緒　言

哺乳類大脳皮質の感覚野第 4 層（Layer 4：L4）では、生後発達期に、視床を経由して伝達される末梢感覚器からの入力を受け、機能的に独立したモジュール（単位回路）の並列構造が構築される。感覚情報の並列処理に寄与するモジュール構造は、成体での高度な情報処理の回路基盤となる。例えば、マウス体性感覚野（バレル皮質）においてヒゲ触覚情報処理を担うモジュールである「バレル」では、各ヒゲからの触覚情報を伝達する視床皮質軸索（Thalamocortical axon：TCA）が大脳皮質 L4 に入力し、頬ヒゲと一対一で対応したバレル地図を形成する［1，2］。L4 の興奮性神経細胞は TCA 終末のクラスターを取り囲むように配置し、所属する一つのバレルの TCA 終末に向けて選択的に樹状突起を伸長することで、単一ヒゲからの触覚情報を特異的に受容する。L4 神経細胞の樹状突起のバレル内側（TCA 終末の方向）への方向性は、生後一週間の間に、神経活動依存的に獲得される［2］。バレル皮質 L4 神経細胞の樹状突起方向性はバレルの情報伝達特異性の構造基盤であることから、この樹状突起選択的伸長メカニズムの解明が、大脳皮質モジュール構築機構の理解に繋がると考えられる。樹状突起の伸長には、細胞膜成分や接着分子、シナプス関連分子などの供給が必要であり、特定の樹状突起への選択的な物質輸送が樹状突起の選別に関与すると考えられる。そこで本研究では、細胞内小胞輸送のハブであるゴルジ体に着目し、バレル構築過程における L4 神経細胞内のゴルジ体局在動態を生体内で解明することを目的とした。

本研究では、生体内での単一細胞標識技術を用いてバレル皮質 L4 神経細胞の樹状突起形態とゴルジ体局在の同時可視化解析を行った。本解析により、生後第一週の間に、L4 神経細胞においてゴルジ体局在が尖端樹状突起（apical dendrite：AD）から細胞体および基底樹状突起（basal dendrite：BD）へと変化し、バレル内側に向けて極性化した分布を示すことが明らかとなった。このゴルジ体分布極性はバレル構築期のみにみられる一過性の現象であり、バレル構築の完了とともに減弱することが判明した（図 1）。以上の結果は、L4 神経細胞の生後発達に伴うゴルジ体の特徴的な局在変化を明らかにしたものであり、樹状突起選択的伸長におけるゴルジ体の関与が示唆される。

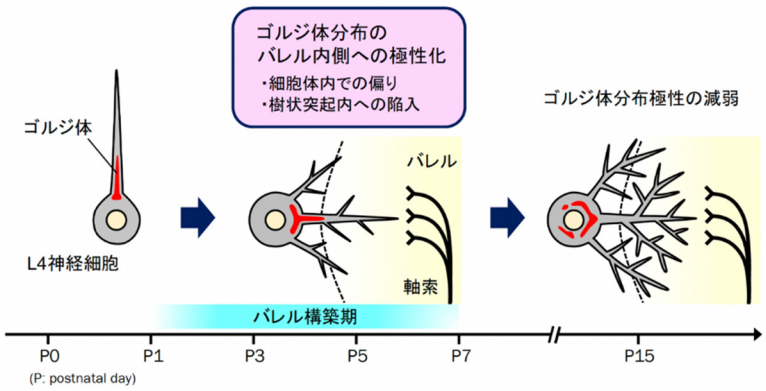


図 1. 本研究で明らかとなったバレル構築期 L4 神経細胞のゴルジ体局在動態

方　法

1. バレル皮質 L4 神経細胞への遺伝子導入

バレル皮質 L4 神経細胞を選択的に標識するため、ICR マウス胎生 14 日目（E14）の胎仔に子宮内電気穿孔法を用いて遺伝子導入を行った。単一細胞形態解析を行うため、Supernova 法［3, 4］を用いて神経細胞をまばらに標識した。本手法によりゴルジ体移行性 GFP（Golgi-EGFP）と樹状突起観察用の RFP をバレル皮質 L4 神経細胞に発現させた。

2. 組織学的解析

遺伝子導入したマウスについて、バレル構築開始前（生後 1 日齢 ; P1）、バレル構築期（P3、5、7）、およびバレル構築完了後（P11、15）の各時点で、深麻酔下において 4% paraformaldehyde（PFA）含有リン酸緩衝液（pH 7.4）を用いて灌流固定し、脳を摘出した。4% PFA 含有リン酸緩衝液（pH 7.4）を用いて後固定した後、大脳皮質組織切片を作製し、TCA 終末を可視化する目的で vesicular glutamate transporter 2（vGlut2）抗体を用いた免疫組織染色を行った。得られた組織切片について、共焦点顕微鏡を用いて観察および画像取得を行った。

結　果

1. バレル皮質 L4 神経細胞における生後発達初期のゴルジ体局在変化

まず冠状断切片を用いて、生後発達初期（P1～5）におけるバレル皮質 L4 神経細胞のゴルジ体局在変化を解析した。この期間には、脳室帯からの放射状移動を終えた L4 神経細胞は、先導突起（将来の AD）と軸索を持つ双極性形態から分化し、複数の BD を形成する。P1 では、ゴルジ体は L4 神経細胞の AD 内部、特に細胞体近傍に主に局在していた（図 2A、B）。P3 では、AD に加えて、細胞体内部にもゴルジ体局在が観察された（図 2A、B）。P5 では、細胞体に加えて基底樹状突起（basal dendrite : BD）内部にゴルジ体をもつ細胞が認められた（図 2A、B）。

成体マウスのバレル皮質 L4 神経細胞には、AD を持たない有棘星状（spiny stellate）細胞、および AD を持つ星状錐体（star pyramid）細胞の 2 つの細胞種が存在する［5］。Spiny stellate 細胞は BD を一つのバレルに向けて選択的に伸長する一方で、star pyramid 細胞は BD 形態に特定の方向性を持たないことが知られている。P5 での RFP 陽性細胞を、AD の有無をもとに spiny stellate 細胞（AD 無し）と star pyramid 細胞（AD 有り）に分けて解析した。その結果、spiny stellate 細胞は、ゴルジ体が AD から細胞体に完全に移行し、さらに BD 内部の細胞体近傍に陥入していた（図 2A、C）。これに対して star pyramid 細胞では、ゴルジ体が細胞体に完全には移行せず一部が AD に局在しており、BD 内への陥入割合が spiny stellate 細胞よりも顕著に低かった（図 2A、C）。

以上の結果から、生後発達初期（P1～5）の L4 神経細胞においてゴルジ体局在が AD から細胞体・BD へと変化すること、さらにこの局在変化は spiny stellate と star pyramid 細胞で異なることが明らかとなった。

2. Spiny stellate 細胞におけるゴルジ体分布の極性化とその発達に伴う変化

次に、脳表面に対して接線方向に薄切した組織切片を用いて、vGlut2 の免疫組織染色によってバレル（TCA 終末のクラスター）を可視化し、L4 神経細胞のゴルジ体局在とバレルとの空間関係を詳細に解析した。Spiny stellate 細胞のなかでも、バレル辺縁部に位置する細胞は BD のバレル内側への方向性を顕著に示すが、バレル中心部に位置する細胞は BD 方向性を示さない。樹状突起の選択的伸長におけるゴルジ体の役割を明らかにするという本研究の目的から、本解析ではバレル辺縁部に位置する spiny stellate 細胞に絞って解析を行った。

P5 の spiny stellate 細胞では、細胞体のバレル内側領域（バレルに面した部分）にゴルジ体が偏って分布していた（図 3A）。さらに、BD 内部へのゴルジ体陥入は、バレル内側に向けて伸長した、長く複雑な BD に特異的にみられ、バレル外側に向けて伸長した BD には認められなかった（図 3A）。このゴルジ体の極性化した分布（細胞体でのバレル内側への偏りと、バレル内側に伸びた BD への陥入）を定量的に解析するため、spiny stellate 細胞の細胞質領域を①バレル内側の細胞体、②バレル内側の BD、③バレル外側の細胞体、および④バレル外側の BD、の 4 画分に分け、各画分に局在するゴルジ体の体積を計測した。その後、細胞全体のゴルジ体体積に対するバレル内側画分（①+②）のゴ

ルジ体体積を、ゴルジ体分布のバレル内側への偏り指数として算出した（Golgi apparatus distribution bias index : GA-DBI）。その結果、P5 の spiny stellate 細胞において、ゴルジ体はほぼバレル内側の細胞体あるいは BD に局在しており、GA-DBI は 0.98±0.01 と非常に高い値を示した（図 3B）。

次に、P5 の spiny stellate 細胞にみられたゴルジ体分布極性の発達に伴う変化を明らかにするため、P7、P11、および P15 での spiny stellate 細胞のゴルジ体分布を解析した。P7 の spiny stellate 細胞では、P5 と同様に、ゴルジ体が細胞体のバレル内側に偏って分布しており、バレル内側に向けて伸長した BD 内部にゴルジ体の陥入が認められた（図 3A）。P7 では、GA-DBI および BD 内部へのゴルジ体陥入部分の長さは P5 と同程度であった（図 3B、C）。P11 では、細胞体におけるゴルジ体のバレル内側への偏り、および BD 内部への陥入が P5 と比較して減弱していた（図 3A～C）。P15 では、P11 よりもさらに顕著に減弱していた（図 3A～C）。

以上の結果から、バレル構築期（P5、7）の spiny stellate 細胞において、ゴルジ体がバレル内側に向けて極性化した分布を示すことが明らかとなった。さらに、このゴルジ体分布極性はバレル構築期のみにみられる一過性の現象であり、バレル構築の完了とともに減弱することが明らかとなった。

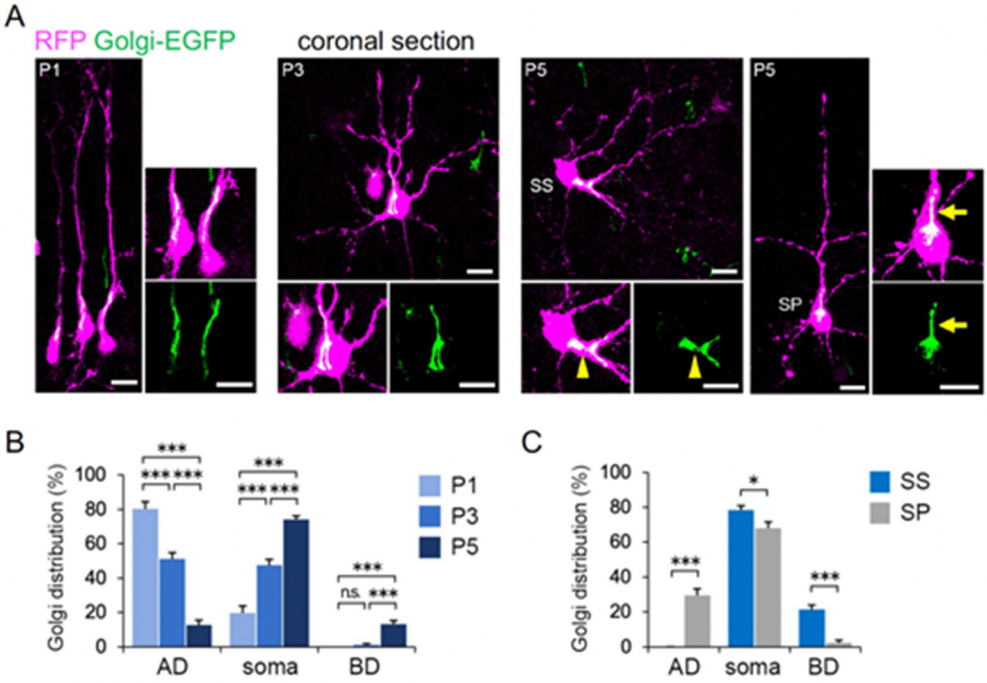


図 2. 生後発達初期のゴルジ体局在変化

A) P1、P3、P5 での大脳皮質冠状断切片における L4 神経細胞の共焦点画像および細胞体付近の拡大図。P5 では spiny stellate（SS）とおよび star pyramid（SP）細胞を示した。SS 細胞の矢尻および SP 細胞の矢印はそれぞれ BD および AD 内のゴルジ体局在を示す。スケールバー：10 μm。

B) P1、P3、P5 での各細胞内画分におけるゴルジ体の分布割合（One-way ANOVA with Tukey's HSD test、***p＜0.001）。

C) P5 での SS および SP 細胞の各細胞内画分におけるゴルジ体の分布割合（two-tailed Welch's t test、*p＜0.05、***p＜0.001）。

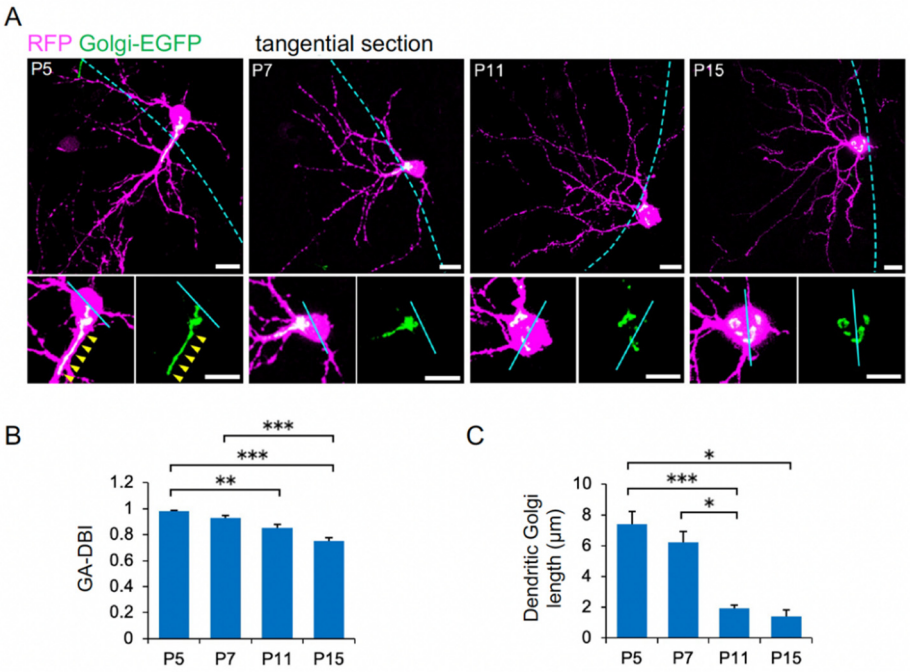


図 3. ゴルジ体分布の極性化とその発達に伴う変化

A) P5、P7、P11、P15 での大脳皮質接線方向切片における spiny stellate 細胞の共焦点画像および細胞体付近の拡大図。破線はバレルの境界線を示す。実線は細胞体をバレル内側と外側に二分割する境界線を示す。P5 画像の矢尻は BD 内部へのゴルジ体陥入を示す。スケールバー：10 μm。

B) P5、P7、P11、P15 における GA-DBI の変化（One-way ANOVA with Tukey's HSD test、**p＜0.01、***p＜0.001）。

C) P5、P7、P11、P15 における BD 内部のゴルジ体の長さの変化（One-way ANOVA with Tukey's HSD test、*p＜0.05、***p＜0.001）。

考　察

本研究では、バレル皮質 L4 の spiny stellate 細胞において、バレル構築の時期と一致して、ゴルジ体がバレル内側、すなわち標的軸索方向に偏った局在を示すことを明らかにした。また、バレル内側に伸長した、長く複雑化な BD に特異的にゴルジ体が陥入することを見出した。このゴルジ体分布極性は、バレル構築完了後には減弱した。これらのことから、発達期の spiny stellate 細胞において、ゴルジ体が“適切な時期に・適切な樹状突起に”局在することで、伸長させるべき樹状突起の選別に関与することが示唆される。ゴルジ体は小胞輸送のハブであることから、細胞膜成分、接着分子、神経伝達物質受容体、イオンチャネルやシナプス関連分子などの選択的輸送によって、特定の樹状突起の選択的な伸長と安定化に寄与する可能性が考えられる。実際に、培養神経細胞においてゴルジ体からの小胞輸送を阻害すると、樹状突起の形成不全が生じることが報告されている［6, 7］。今後、ゴルジ体の局在および小胞輸送機能を独立して操作する実験系によって、バレル内側に極性化したゴルジ体分布あるいはゴルジ体からの小胞輸送が、spiny stellate 細胞の樹状突起方向性およびバレルモジュール構築にどのような役割を果たすかが明らかとなることが期待される。

共同研究者・謝辞

本研究は国立遺伝学研究所神経回路構築研究室にて行われたものであり、岩里琢治先生をはじめ研究室構成員のご協力に深く感謝いたします。本研究の遂行にあたり、上原記念生命科学財団からのご支援に深く感謝申し上げます。

文　献

1) Woolsey TA, Van der Loos H. The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. Brain Res. 1970 Jan 20;17(2):205-42. PMID: 4904874 DOI: 10.1016/0006-8993(70)90079-x.

2) Erzurumlu RS, Gaspar P. Development and critical period plasticity of the barrel cortex. Eur J Neurosci. 2012 May;35(10):1540-53. PMID: 22607000 DOI: 10.1111/j.1460-9568.2012.08075.x.

3) Mizuno H, Luo W, Tarusawa E, Saito YM, Sato T, Yoshimura Y, Itohara S, Iwasato T. NMDAR-regulated dynamics of layer 4 neuronal dendrites during thalamocortical reorganization in neonates. Neuron. 2014 Apr 16;82(2):365-79. PMID: 24685175 DOI: 10.1016/j.neuron.2014.02.026. Epub 2014 Mar 27.

4) Luo W, Mizuno H, Iwata R, Nakazawa S, Yasuda K, Itohara S, Iwasato T. Supernova: A Versatile Vector System for Single-Cell Labeling and Gene Function Studies in vivo. Sci Rep. 2016 Oct 24;6:35747. PMID: 27775045 DOI: 10.1038/srep35747.

5) Staiger JF, Flagmeyer I, Schubert D, Zilles K, Kötter R, Luhmann HJ. Functional diversity of layer IV spiny neurons in rat somatosensory cortex: quantitative morphology of electrophysiologically characterized and biocytin labeled cells. Cereb Cortex. 2004 Jun;14(6):690-701. PMID: 15054049 DOI: 10.1093/cercor/bhh029.

6) Horton AC, Rácz B, Monson EE, Lin AL, Weinberg RJ, Ehlers MD. Polarized secretory trafficking directs cargo for asymmetric dendrite growth and morphogenesis. Neuron. 2005 Dec 8;48(5):757-71. PMID: 16337914 DOI: 10.1016/j.neuron.2005.11.005.

7) Ye B, Zhang Y, Song W, Younger SH, Jan LY, Jan YN. Growing dendrites and axons differ in their reliance on the secretory pathway. Cell. 2007 Aug 24;130(4):717-29. PMID: 17719548 DOI: 10.1016/j.cell.2007.06.032.