

〈原著論文〉

ラット嗅球神経回路における非 GABA 系介在ニューロンのシナプス結合の微細構造解析

野津 英司, 樋田 一徳

川崎医科大学解剖学, 〒701-0192 岡山県倉敷市松島577

抄録 嗅球は比較的少数のニューロン種から構成される明瞭な層構造を持つ脳の領域である。投射ニューロンである僧帽細胞/房飾細胞は嗅球の表層の糸球体で匂い情報を受け、細胞体に至る過程で種々の介在ニューロンからの調整を受け、処理された情報を高次中枢へ投射する。情報入力部である糸球体には傍糸球体細胞 (JG ニューロン) が多数分布しており、形態のおよび化学的性質から type 1 JG ニューロンと type 2 JG ニューロンの2種の介在ニューロン群に分類される。γ-アミノ酪酸免疫陽性ニューロン (GABA ニューロン) と calbindin 免疫陽性ニューロン (CB ニューロン) および calretinin 免疫陽性ニューロン (CR ニューロン) はそれぞれの type 1 JG ニューロンと type 2 JG ニューロンの代表的なニューロン群である。これらのニューロンは対称性シナプスを形成し、抑制性に働くと考えられているが、神経回路内でシナプス形成するニューロンが異なることから、匂い情報の処理過程において異なる働きをしていることが考えられる。また、ラット嗅球の type 2 JG ニューロンは抑制性の神経伝達物質である GABA に免疫陰性を示すが、その伝達物質の詳細は不明である。そのため本研究では電子線トモグラフィにより GABA 免疫陽性ニューロンと GABA 免疫陰性ニューロンが形成するシナプスの詳細な解析を行った。今回解析したシナプスでは、GABA ニューロンと CB ニューロンのシナプス間隙の大きさに有意差が認められ、GABA ニューロンと CB および CR ニューロン間でシナプス小胞の大きさに有意差がみられた。また、CB ニューロンと CR ニューロンの間においても小胞に形態的な違いがみられた。以上の結果から、同じ GABA 免疫陰性ニューロンでも含有する化学物質によってシナプスの形状が異なり、機能的特性が異なることが示唆された。 doi:10.11482/KMJ-J41(2)103 (平成27年6月20日受理)

キーワード: ラット嗅球, 電子線トモグラフィ, GABA, calbindin, calretinin

緒言

嗅球は嗅上皮からの匂い情報を受容し、その情報を処理した後、より高次の中枢へと投射する脳の領域である。嗅球のニューロン構成はこれまでにラットおよびマウスで研究がなされており、明瞭な層構造を持ち、比較的少数のニューロンで構成されることが知られている¹⁻⁴⁾。嗅

球の投射ニューロンである僧帽細胞および房飾細胞 (M/T cells) は、糸球体において樹状突起上で嗅上皮の嗅受容細胞 (ORN) からの軸索投射を受け、嗅皮質へ匂い情報を軸索投射する⁵⁾。この情報の投射過程において、嗅球に存在する介在ニューロンが投射ニューロンとの間にシナプス結合し、神経回路を形成し、嗅覚情

別刷請求先
樋田 一徳
〒701-0192 倉敷市松島577
川崎医科大学解剖学

電話: 086 (462) 1111
ファックス: 086 (462) 1199
Eメール: toida@med.kawasaki-m.ac.jp

報の処理および伝達を行っている^{3,4,6,7}。これらの介在ニューロンは、形態学的特徴や含有する化学物質によって subpopulation を形成する多様な細胞群であり、嗅球全層に広く分布している^{3,4,8,9,10}。従来、ラットの嗅球浅層に存在する糸球体層 (GL) に分布する介在ニューロン群である傍糸球体細胞 (JG ニューロン) の解析が詳細に進められており、化学的性質から、 γ -アミノ酪酸 (GABA) 免疫陽性ニューロン、glutamic acid decarboxylase (GAD) 免疫陽性ニューロン、tyrosine hydroxylase (TH) 免疫陽性ニューロン、calbindin (CB) 免疫陽性ニューロン、calretinin (CR) 免疫陽性ニューロンなどのグループが分類され、その神経回路の研究がなされてきた⁸⁻¹⁷。糸球体は特定の嗅覚刺激に反応する嗅覚の機能的な構造体として注目されており、その糸球体の嗅覚情報の調節に上述の介在ニューロンが関与している^{4,14}。また、糸球体における樹状突起の分布様式と ORN との接触様式の違いにより、ORN の軸索との近接度が高い type 1 JG ニューロンと、近接度が低い type 2 JG ニューロンの2種類に分類できることが報告され^{18,19,20}。現在広く受け入れられている。Type 1 JG ニューロンに分類される代表的なニューロンは GABA 免疫陽性ニューロンおよび TH 陽性ニューロンであり、我々の電子顕微鏡による解析から、ORN からの入力を直接受け、M/T cells に対して抑制性のシナプスを形成していることが示されている^{10,17}。Type 2 JG ニューロンには CB 免疫陽性ニューロンや CR 免疫陽性ニューロンが含まれており、このうち CB 免疫陽性ニューロンは、ORN からの直接の入力はほとんど受けず、投射ニューロン (M/T cells) の樹状突起からの入力を受け、同時に M/T cells へと出力する相反性シナプス (reciprocal synapse) を形成することが明らかになっており¹⁶。より精緻な神経回路を形成していると考えられる¹⁰。これらの介在ニューロン群が形成するシナプスはいずれも形態学的には対称性シナプス (2型シナプス) であり、機能的には M/T cells に対して抑制性の働きをし

ていることが示唆される。しかし、ラットの CB および CR 免疫陽性ニューロンは、GABA 免疫陰性を示し、同時に GABA 合成酵素である GAD やドーパミン合成酵素である TH などの GABA 系マーカーに対しても免疫陰性を示す細胞種であり¹⁸、どのような神経伝達物質を用いているのかは明らかではない。そのため、形態学的に抑制性が示唆される対称性シナプスでありながら GABA 免疫陰性であることから、GABA 免疫陽性ニューロンと CB, CR 免疫陽性ニューロンとの間に機能的な違いがあることが示唆される。我々は共に嗅球内で非対称性のシナプスを形成するセロトニンニューロンと glutamate ニューロンが形成するシナプスに形態的な違いがあることを報告しており²¹、これまで対称性シナプスであること以上に解析が進んでいなかった type 2 JG ニューロンが形成するシナプスの構造にも違いがあることが示唆される。

本研究では、非対称性シナプスで微細な差違を明らかにした²¹電子線トモグラフィーの手法を用い、GABA 免疫陰性ニューロンである CB および CR 免疫陽性ニューロンのシナプス形態を解析し、GABA 免疫陽性ニューロンのシナプスと比較することにより、これらのシナプスに形態的な違いが存在しているかどうかを明らかにすることを目的としたものである。また、CB 陽性ニューロンは GL に分布する JG ニューロンとは別に、嗅球の深層である顆粒細胞層 (GCL) に分布するものが少数存在している¹⁶。この嗅球深層の CB 陽性ニューロン (CB-GCL ニューロン) についてはほとんど研究がなされていないが、僧帽細胞の細胞体および軸索起始部の近傍に分布しており、僧帽細胞の出力の調節に関与していることが考えられる。このような、同様の化学的性質を持つが、分布の異なる CB 免疫陽性ニューロンのシナプスについての解析もなされていない。そこで本研究では、嗅球深層の CB-GCL ニューロンも解析対象に加え、嗅球浅層に分布する JG ニューロンと比較し、その違いの有無も検証した。

本研究で用いる電子線トモグラフィーは、電

電子顕微鏡の試料を回転させ、傾きを変更した電子顕像を撮影し、コンピューター上で再構築することによって、従来は透過像しか観察できなかった電子顕微鏡標本の立体再構築像を得ることが可能な手法であり、近年この手法を用いたシナプスの詳細な解析が報告されている^{21, 22, 23, 24, 25)}。最近我々は非対称性シナプスにおいて、含有する化学物質によってシナプスの構造（シナプス後肥厚、シナプス間隙、シナプス直径）に差があることを示した。シナプスを構成する要素であるシナプス間隙、シナプス小胞は20–50 nm 程度の微細構造であり、通常の80 nm 厚の電子顕微鏡標本では詳細な観察をすることは困難であるが、電子線トモグラフィ法で立体像を再構築し、80 nm 厚の切片の立体像をコンピュータ上で再スライスすることにより、精細な微細構造を観察することが可能である。本研究は最新の電子線トモグラフィによって、これまで解析がなされていなかった非 GABA 系の介在ニューロンが形成する対称性シナプスの微細構造について初めて詳細に解析を行ったものである。

材料と方法

動物

本研究には Wistar Rat (雄, 5 週齢) 8 匹を使用した。実験に使用した動物は日本クレア及びチャールズリバーから購入した。全ての実験は川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け (13-034, 14-012), 川崎医科大学動物実験指

針に基づいて実施した。

ラットはペントバルビタールナトリウム (共立製薬, Japan) を腹腔内に注射し (0.1 mL / 100 mg) 深麻酔下においた後、4% パラホルムアルデヒド、1% グルタルアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.4 (PB) を心臓からカニューレにより灌流し固定した。灌流固定後のラットは固定液につけた状態で一晚浸漬固定した後、脳を頭蓋から取り出し、嗅球を摘出した。ビプラトーム (Leica VT1200s, Germany) を使用して、摘出した嗅球から 50 μ m 厚の冠状断連続スライスを作製し、0.1 M リン酸緩衝生理食塩水 pH 7.4 (PBS) に保存した。

免疫組織化学

連続薄切したスライスから、GABA 免疫陽性ニューロン、CB 免疫陽性ニューロンおよび CR 免疫陽性ニューロンを従来の我々の方法に従い¹⁷⁾, free floating 法で以下のように免疫染色した。

ビプラトーム切片は 1% bovine serum albumin (BSA) in 0.1 M PBS で 1 時間ブロッキングし、非特異的な反応を抑制した。一次抗体として、抗 GABA 抗体 (rabbit anti-GABA IgG, Dia Sorin, 1:2,500, mouse anti-GABA IgG, Swant, 1:2,500), 抗 CB 抗体 (mouse anti-CB IgG, Swant, 1:5,000), 抗 CR 抗体 (rabbit anti-CR IgG, Swant, 1:2,500, goat anti-CR IgG, Chemicon, 1:2,500) を組合せて多重染色を行った。多重免疫染色の組合せを表 1 に示す。組合

表 1 免疫染色に用いた抗体とその組合せ

抗原	動物種	希釈倍率	会社名	標識	組合せ
GABA	rabbit	1 : 2500	Dia sorin	biotin-stFITC	1
				Cy3	2
				Alexa Fluor 647	4
CB	mouse	1 : 2500	Swant	Cy3	3
	mouse	1 : 5000	Swant	biotin-stFITC	2
CR	rabbit	1 : 2500	Swant	Cy3	1, 4
				biotin-stFITC	3
				goat	1 : 2500

biotin-stFITC: biotin 標識二次抗体と FITC 結合 streptavidin 多重染色で同時に使用した抗体を、組み合わせ欄の番号で表す。同じ番号の抗体を使用して多重染色を行った。

せの番号が同じ抗体を同時に使用し、4種類の組合せで多重染色を行った。一次抗体に20℃で4-7日間反応させた後、PBSで洗浄し、電子顕微鏡解析の対象であるニューロンのマーカーに対して biotin 標識された二次抗体 (horse anti-mouse IgG, Vector Laboratories, 1:200, goat anti-rabbit IgG, Vector Laboratories, 1:200) のいずれかを20℃で2時間反応させた。次に fluorescein isothiocyanate (FITC) が結合した streptavidin (Vector Laboratories, 1:200) と、以下の蛍光標識二次抗体: Cy3標識抗ウサギ IgG 抗体 (donkey anti-rabbit IgG, Jackson immunoresearch, 1:200), Cy3標識抗マウス IgG 抗体 (donkey anti-mouse IgG, Jackson immunoresearch, 1:200), FITC 標識抗ヒツジ IgG 抗体 (horse anti-goat IgG, Jackson immunoresearch, 1:200), Alexa Fluor 647 標識抗ウサギ IgG 抗体 (donkey anti-rabbit IgG, invitrogen, 1:200) を組み合わせて20℃で2時間反応させて多重蛍光標識を施した。蛍光標識した切片は Vectashield (Vector Laboratories, Inc) で封入した後、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700, Zeiss) で観察し、ニューロンの連続光学断面像を取得した。

免疫電子顕微鏡解析

レーザー顕微鏡で取得した画像と電子顕微鏡解析を確実に対応させるため、蛍光標識標本のカバーガラスを剥がし、切片をPBSで洗浄した。洗浄した切片は avidin-biotin complex 法を用いて (ABC standard, Vector Laboratories, 1:200, 20℃, 2時間), streptavidin が結合した細胞に horseradish peroxidase (HRP) を結合させ、酵素標識を行った。次に、0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Dojindo, Japan) 及び過酸化水素を反応させ、HRP に DAB の沈殿を生じさせることにより、電子顕微鏡下で観察可能な標識に置換した (DAB 発色)。DAB 発色後の標本は3%グルタルアルデヒドおよび1%四酸化オスミウムによる固定をそれぞれ20分および40分間氷温下で行い、2%酢酸ウラン水溶液によるブロック電

子染色を30分間室温で行った。電子染色後の切片は昇順エタノール系列 (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%) で脱水し、100%に達した後、酸化プロピレンに置換した。酸化プロピレンにエポキシ系樹脂 (Epon-Araldite) を1:1で混合した溶液を4時間浸透させた後、エポキシ系樹脂を更に一晚浸透させ、剥離剤を塗布したスライドガラスおよびカバーガラス間にエポキシ系樹脂で封入した。

封入した標本は光学顕微鏡で観察したのち、目的とするニューロンが多数分布している領域を選び、カバーガラスを剥離し切り出した。切り出した部位は同様の樹脂で再包埋し、目的となる細胞を含むようにトリミングを行い、超ミクロトーム (Reichert-Nissei Ultra-cuts, Leica, Germany) を使用して80 nm厚の超薄連続切片を作製した。

超薄切片は透過型デジタル電子顕微鏡 (JEM-1400, JEOL, Japan) で観察し、GABA免疫陽性ニューロン、CB免疫陽性ニューロン、CB-GCLニューロンおよびCR免疫陽性ニューロンのそれぞれが形成するシナプスの解析を行った。

電子線トモグラフィー解析

電子顕微鏡で観察したそれぞれのニューロンのシナプスについて電子線トモグラフィー解析を行い、より詳細な形態を観察した。トモグラフィー解析では高傾斜試料ホルダーに超薄切片を装着し、連続傾斜像撮影ソフトである Recorder (System In Frontier, Japan) を使用し1°刻みで傾斜角を変更した連続傾斜像を撮影した。撮影範囲はシナプスによって異なるが、+50°から-50°までの傾斜角で、合計100°以上を目安として撮影した。撮影倍率は約20 nmのシナプス間隙、シナプス小胞が十分に確認できる20,000倍 (1.275 nm/pixel) を使用した。撮影した連続傾斜像は Composer (System In Frontier) によって三次元再構成を行い、Visualizer-kai (System In Frontier) を使用して約1.3 nmステップの再スライス像をデジタル作製し、画像解析を行った。

画像解析

作成したデジタル再スライス像から, GABA 免疫陽性ニューロン, CB 免疫陽性ニューロン, CB-GCL ニューロンおよび CR 免疫陽性ニューロンが形成するシナプスの計測を行った. シナプスは同一のラットから切り出した $50 \mu\text{m}$ 切片を, 各ニューロングループ (GABA, CB, CB-GCL および CR 免疫陽性ニューロン) 数枚ずつ DAB で発色させ, ラット 1 個体から各ニューロングループ 5ヶ所, 4匹のラットを使用し各ニューロングループあたり計20ヶ所のシナプスを計測した. 計測項目は, 以前の報告²¹⁾を参照し, シナプス間隙, シナプス小胞および切片上でのシナプスの長さとした. 計測には

Visualizer-kai の測定機能を使用した. 計測したデータは両側 F 検定で分散の検定を行い, 平均の検定は, 分散に有意差がある場合は Welch 検定を使用し, 有意差が無い場合は Student's t 検定を使用した. 検定結果は $p < 0.05$ を有意差有りと判定した.

結果

ニューロンの分布: レーザー顕微鏡解析

ラット嗅球冠状断において, GABA 免疫陽性ニューロンは細胞体および顆粒状を呈する突起の末端が嗅球全層に認められ, 糸球体周囲に位置する細胞体と糸球体内の突起が確認できる. EPL にも免疫陽性反応が認められたが, 僧帽細胞

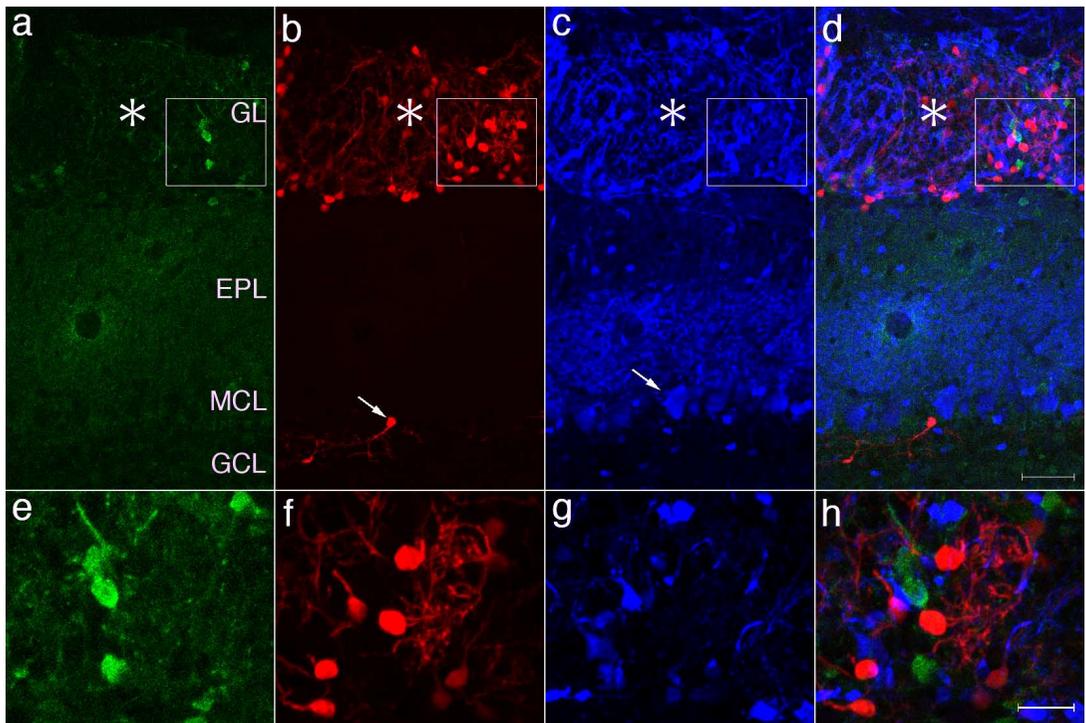


図1 蛍光多重染色標本の共焦点レーザー顕微鏡像.

a) GABA 免疫陽性ニューロンの分布 (緑) を示す. 糸球体 (*) の周囲に GABA 免疫陽性ニューロンがみられる. EPL, MCL には GABA 免疫陽性ニューロンはみられない. b) CB 免疫陽性ニューロンの分布 (赤) を示す. 糸球体 (*) の周囲に CB 陽性ニューロンが複数分布し, MCL-GCL に単独で CB-GCL ニューロンが確認できる (矢印). c) CR 免疫陽性ニューロンの分布 (青) を示す. 糸球体 (*) の周囲に CR 免疫陽性ニューロンがみられ, EPL および MCL にも CR 免疫陽性ニューロンが疎らに分布し, MCL には約 $30 \mu\text{m}$ の細胞が確認できる (矢印). d) GABA, CB, CR の merge 画像: GABA, CB および CR 免疫陽性ニューロンのいずれも糸球体周囲に分布しているが, 同時に発現するニューロンは確認できない. e-h) a-d 内の四角部分の拡大像を示す. 各ニューロングループ間で細胞体の形態には違いは見られない. GABA, CB および CR 免疫陽性ニューロンのいずれかを同時に発現するニューロンは確認できない. Abbreviation: GL; 糸球体層, EPL; 外網状層, MCL; 僧帽細胞層, IPL; 内網状層, GCL; 顆粒細胞層, bar: a-d; $50 \mu\text{m}$, e-h; $20 \mu\text{m}$

胞層 (MCL) は陰性を示した (図 1 a). 一方で, CB 免疫陽性ニューロンの分布は明瞭な局在を示した. すなわち, 糸球体周囲に細胞体が散在し, 嗅球深層の MCL-GCL 領域に CB-GCL ニューロンの細胞体が疎らに認められるのみである (図 1 b). 糸球体内には周囲の CB 免疫陽性ニューロンから伸びた突起が確認できる. また, CB-GCL ニューロンは, 嗅球の層構造に沿って細胞体が配列しており, 水平方向へ伸長した樹状突起が認められた. 外網状層 (EPL) には CB 免疫陽性ニューロンはほとんど確認されなかった. CR 免疫陽性ニューロンは, GL に多数の細胞体が認められ, 糸球体内へ伸びた突起が確認できる. GL に加え, EPL 深層側に顕著にその突起や染色強度の低い細胞体の分布がみられ, EPL を浅層と深層に 2 分しており, 表層側にも疎らに細胞体および突起が認められた (図 1 c). また, MCL に染色強度の低い $30\mu\text{m}$ 程度の巨大な細胞体を持つ CR 免疫陽性ニューロンが認められ, GCL には $10\mu\text{m}$ 程の小型の細胞体が確認できる. 各ニューロングループの糸球体層に分布するニューロンをより詳細に観察すると, いずれのニューロンも卵円形の細胞体を持ち, 細胞体のサイズもほぼ同程度であることが確認でき (図 1 e-g), 各ニューロングループ間で形態的な違いは認められなかった. また, 深層に分布する CB-GCL ニューロンの細胞体も同様の形態を示した (図 1 b). 糸球体周囲のニューロンは, いずれのニューロングループとも, 糸球体に突起を延ばしており, これまでの報告から樹状突起であると考えられる^{16,19)}. GABA, CB, CR の共存関係を確認すると (図 1 d, h), GABA, CB, CR を複数含有しているニューロンは認められなかった. この結果は, これまでに報告されている JG ニューロンの化学的性質と一致する結果であり^{8,9,10)}, GABA, CB および CR 免疫陽性ニューロンが異なるニューロングループを形成していることが確認できる. また, 糸球体周囲以外に分布する深層の CB-GCL ニューロンや, EPL, MCL に分布している細胞でも, GABA, CB, CR を

同時に含有するニューロンは確認できなかった (図 1 d).

介在ニューロンの微細構造とシナプス

蛍光多重染色によって共存関係を確認した後, 各切片で GABA, CB, CR のいずれかのニューロンを DAB で可視化し, エポキシ樹脂に包埋して電子顕微鏡標本とした. 図 2 に示

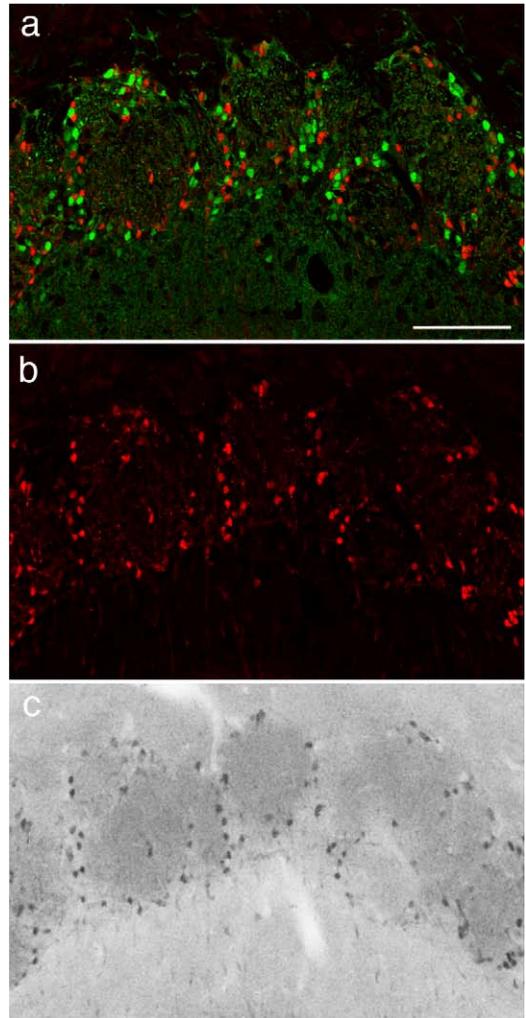


図2 蛍光2重染色から DAB 標識への置換.

a) 蛍光2重染色 merge 像: GABA 免疫陽性ニューロン (赤) と CR 免疫陽性ニューロン (緑) が糸球体の周囲を取り囲むように分布している. GABA と CR の両方を発現する細胞はみられない. b) a の画像の GABA 免疫陽性ニューロン (赤) のみを表示したもの. c) DAB 置換像: b で示した GABA 免疫陽性ニューロン (赤) のみが DAB に置換されていることが確認できる. bar: $100\mu\text{m}$

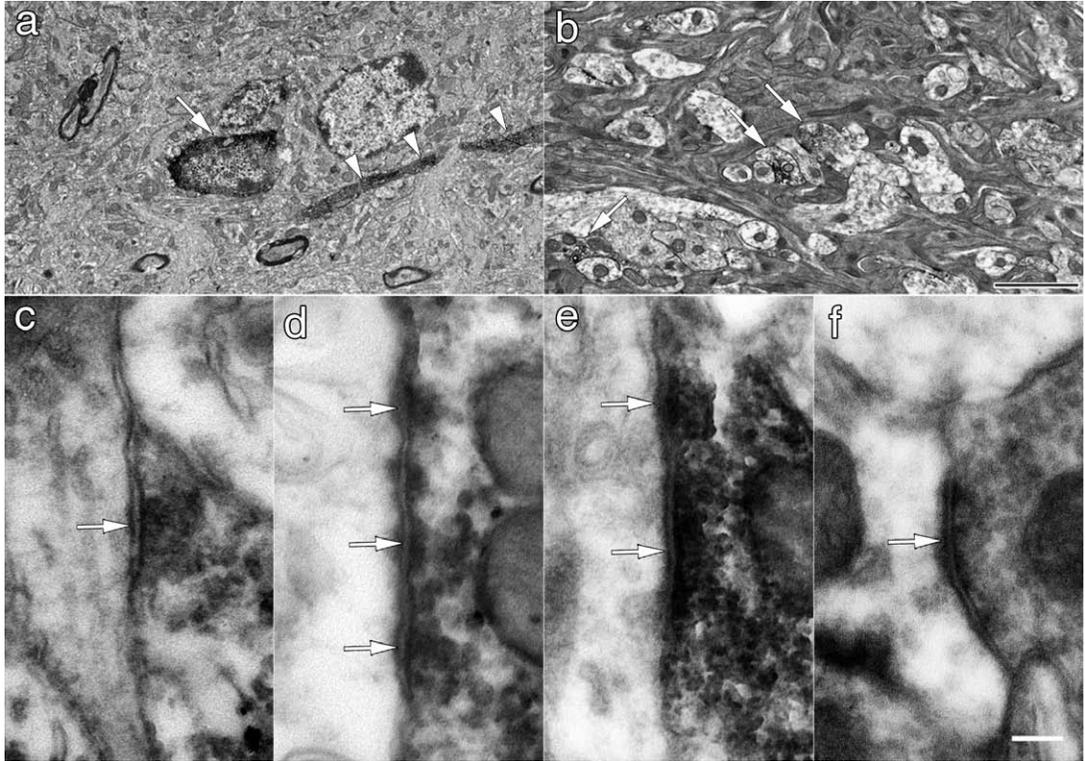


図3 免疫電子顕微鏡像.

a) CB 免疫染色像:CB 免疫陽性ニューロンの細胞体(矢印)と突起(矢頭)がDABで標識されていることが確認できる. b) GABA 免疫染色像:電子密度の高いORNの間にDAB標識されたGABA免疫陽性ニューロンの突起が確認でき、DABで標識されたニューロンの要素を識別することが可能である(矢印). c) GABA免疫陽性ニューロンが形成するシナプス(矢印). d) CB免疫陽性ニューロンが形成するシナプス(矢印). e) CB-GCLニューロンが形成するシナプス(矢印). f) CR免疫陽性ニューロンが形成するシナプス(矢印). これらのシナプスでは、シナプス間隙と、楕円形もしくは扁平形のシナプス小胞が確認できる. GABA, CBおよびCR免疫陽性ニューロンとも対称性シナプスを形成しており、シナプス後肥厚は顕著ではない. bar: a, b; 2 μ m, c-e; 200 nm

した例では、GABAとCRで二重染色を行い、GABAとCRが共存していないことを確認し(図2a)、GABAのみをDAB標識した電顕標本作製した(図2b, c). この手法で任意のニューロンが形成するシナプスのみを対象として電子顕微鏡による解析を行った. 電子顕微鏡では、電子密度の高いDAB反応産物が沈殿した細胞体および突起が明瞭に確認でき(図3a, b)、GABA, CBおよびCR免疫陽性ニューロンを同定することが可能であった. また、糸球体内で分岐した終末を形成するORNの軸索は、それ自体が高い電子密度を持っており、容易に識別することができる¹⁹⁾. 同時に、ORNの軸索が集束する糸球体も明瞭に同定できる.

GABA免疫陽性ニューロンは糸球体の周囲に細胞体が見られ、糸球体内に分布するORNの間に、突起の断面が散在してみられた(図3b). 細胞体は核が占める割合が高く、薄い細胞質が確認できる. 突起の断面においては、多くの場合ミトコンドリアを含んでおり、樹状突起の形態的特徴を示した. GABA免疫陽性ニューロンの樹状突起は、光学顕微鏡で解析した通り、電子顕微鏡レベルでもORNと直接接触していることが確認された. GABA免疫陽性ニューロンが形成するシナプスは、前述の通り対称性シナプスであることが報告されており¹⁷⁾、本研究で観察したGABA免疫陽性ニューロンが形成するシナプスも同様に、シナプス前後の膜の

肥厚に差が見られない対称性のシナプスを形成していた (図 3 c)。GABA 免疫陽性ニューロンで観察されたシナプス小胞は扁平形もしくは楕円形をしており、有芯小胞はみられなかった。シナプス間隙は、周囲の非対称性シナプスと比較して狭く、シナプス後肥厚はほとんど確認できなかった。CB 免疫陽性ニューロンの細胞体も GABA 免疫陽性ニューロンと同じく、細胞体に占める核の割合が大きく、糸球体内にみられる樹状突起の断面にはミトコンドリアが含まれていた。Type 2 JG neuron である CB 免疫陽性ニューロンは、ORN との間に直接のコンタクトは確認されなかったが、M/T cells と考えられる突起、すなわち、電子密度が低く、比較的滑らかで大きな断面を呈し、配列した微小管が確認できる突起断面⁷⁾との間に相反性シナプスを形成しているものが比較的よくみられた。この相反性シナプスは、M/T cells から CB 免疫陽性ニューロンへ非対称性のシナプスが形成され、CB 免疫陽性ニューロンから M/T cells に対して対称性のシナプスを形成するもので、CB 免疫陽性ニューロンの特徴的なシナプスである¹⁶⁾。このシナプスにおける CB 免疫陽性ニューロンのシナプス小胞は、GABA 免疫陽性ニューロンと同様に扁平形もしくは楕円形で、大きな違い認められないが、大きさについては様々なものがみられた。シナプス間隙については、GABA 免疫陽性ニューロンと同様に、非対称性シナプスと比較して狭く、シナプス後肥厚はほとんど認められなかった (図 3 d)。これらのシナプス形態は、深層に分布する CB-GCL ニューロンでも同様であるが (図 3 e)、CB-GCL ニューロンはシナプスを形成する細胞については明らかではなく、相反性シナプスはほとんどみられなかった。また、どちらの CB 免疫陽性ニューロンでも有芯小胞は認められなかった。CR 免疫陽性ニューロンは、CB 免疫陽性ニューロンと同じく type 2 JG ニューロンであり、ORN との間には直接の接触は確認されなかった。CR 免疫陽性ニューロンも対称性のシナプスを形成しており (図 3 f)、楕円形、扁平径のシナプス

小胞の集積がみられた。これまでの GABA、CB 免疫陽性ニューロンと比較して、CR 免疫陽性ニューロンでは、径の小さいシナプス小胞の割合が高い傾向にあった。また、CR 免疫陽性ニューロンが形成するシナプスの多くで有芯小胞が認められ、シナプスの形態に何らかの差違が存在していることが示唆される結果が得られた。

シナプス構造の立体解析：電子線トモグラフィ

以上のシナプス間隙やシナプス小胞についての微細な構造の違いを正確に比較することは通常の電子顕微鏡解析では困難であるため、電子線トモグラフィ解析を用いてシナプス形態の詳細な立体形態計測を行った。電子線トモグラフィは、通常の一方向からの透過像だけではなく、試料を回転させることにより、連続して傾斜角の異なる透過像を取得し、コンピュータ上で再構築する手法である²¹⁾。図 4 に一例を示すが、図 4 a は 1° 刻みで傾斜角を変更して撮影した連続像の中から、 -60° 、 -40° 、 -20° 、 0° 、 $+20^\circ$ 、 $+40^\circ$ 切片を傾斜させた像を示している。 -60° では、切片の傾きが大きいため、電子線が通過する切片の厚みが増しているために暗い像となっている。これらの連続傾斜画像データをコンピュータに入れ、再構築ソフトである Composer (System In Frontier) によって、一次元フーリエ変換し、フィルタリングした後に逆フーリエ変換を行う再構成アルゴリズムの原理により再構築した立体画像データを図 4 b に示す。立体画像データは任意に回転させ (図 4 c) あるいは 1.3 nm ごとの z 軸方向の再スライス像を得ることができる。図 4 d¹⁻³⁾ は立体画像データを、表面から約 -5.2 nm 、 -26.0 nm 、 -45.5 nm z 軸方向に移動した位置で再スライスした像を示す。この再スライスにより、通常の電子顕微鏡観察では超薄切片の厚み (通常 $70 \sim 80 \text{ nm}$) に埋もれ、重なりあうことにより正確な断面像を確認することができないシナプス小胞を明瞭に観察することが可能となっ

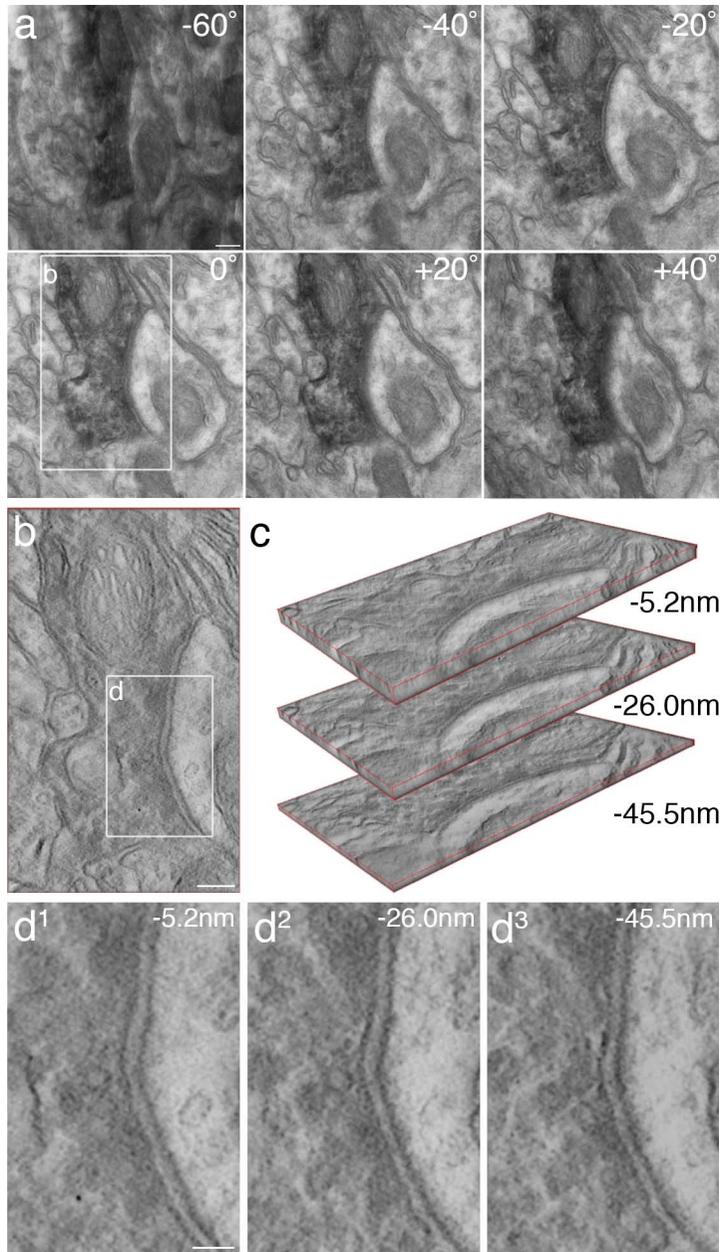


図4 電子線トモグラフィーによる立体構築像の作製.

a) CB 免疫陽性ニューロンのシナプスを 1° 刻みで傾斜角を変更して撮影した連続像から、 -60° 、 -40° 、 -20° 、 0° 、 $+20^\circ$ 、 $+40^\circ$ 傾けた画像を示す. b) 連続傾斜像から構築した立体像. a) の 0° 画像内に示した四角で囲んだ領域を再構築した. c) の画像を任意の傾きに回転させた立体像. d) b) の四角で示した範囲を再スライスした像を示す. d¹ は表面から約 5.2 nm 深層で再スライスした像, d² は約 26.0 nm , d³ は約 45.5 nm での再スライス像を示す. bar: a, b; 100 nm , d; 50 nm

た. また, DAB の発色による免疫電子顕微鏡法では, DAB 反応産物の沈殿によって, 細胞体内の微細な構造が不明瞭になる場合がある

が, 再スライス像ではその影響が軽減され, DAB 反応産物内の小胞も確認することができた. また, シナプス前後の膜が垂直になるよう

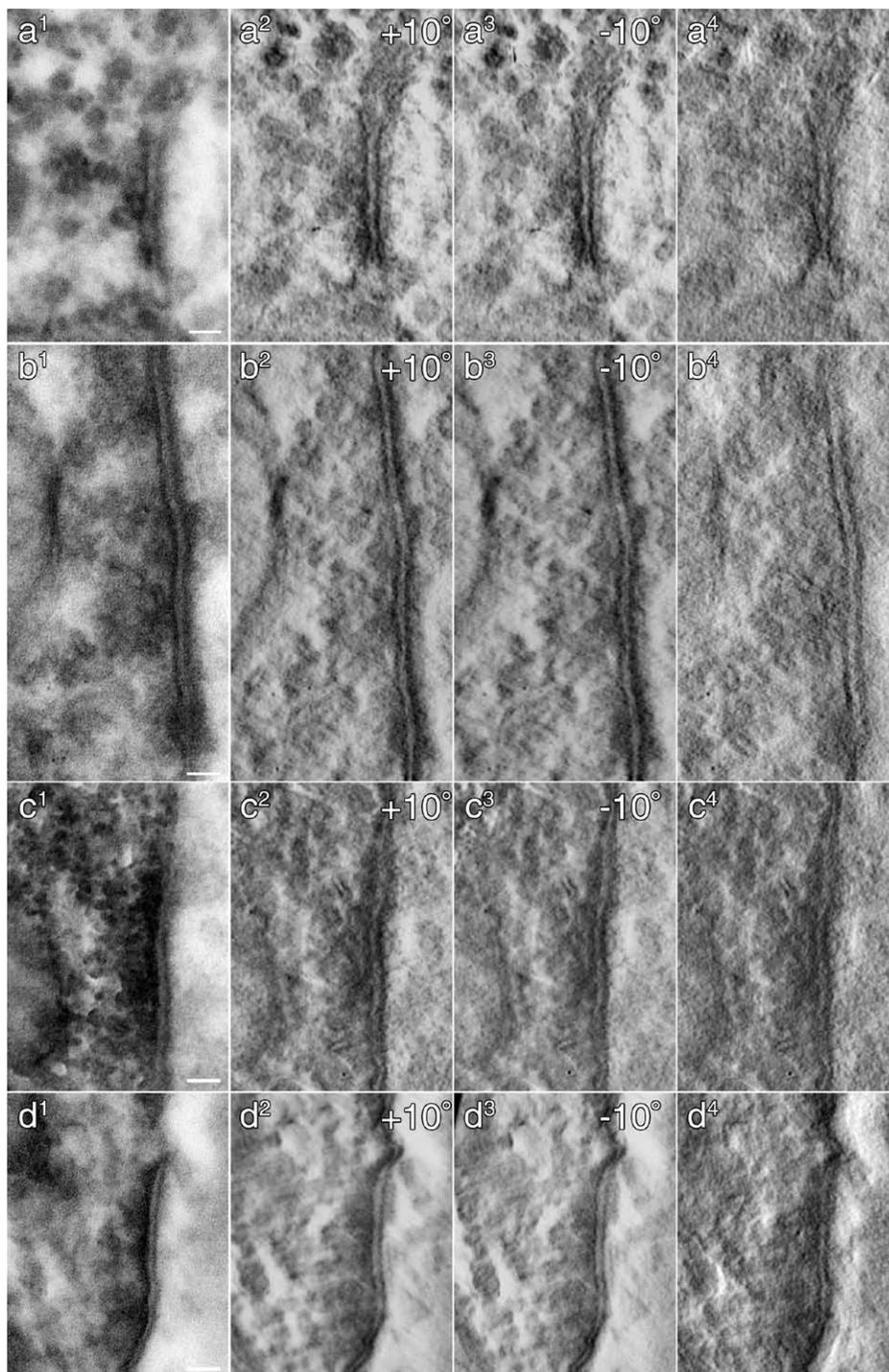


図5 電子線トモグラフィーによるシナプス解析像。

a) GABA 免疫陽性ニューロン, b) CB 免疫陽性ニューロン, c) CB-GCL ニューロン, d) CR 免疫陽性ニューロン: a¹, b¹, c¹, d¹は通常の電子顕微鏡画像. a²⁻³, b²⁻³, c²⁻³, d²⁻³は電子線トモグラフィーによって再構築した立体構築像のステレオペア. a³, b³, c³, d³は立体構築像からの再スライス像. 元の電顕像と比較してシナプス小胞およびシナプス間隙の輪郭を明瞭に観察することが可能である. bar: 50 nm

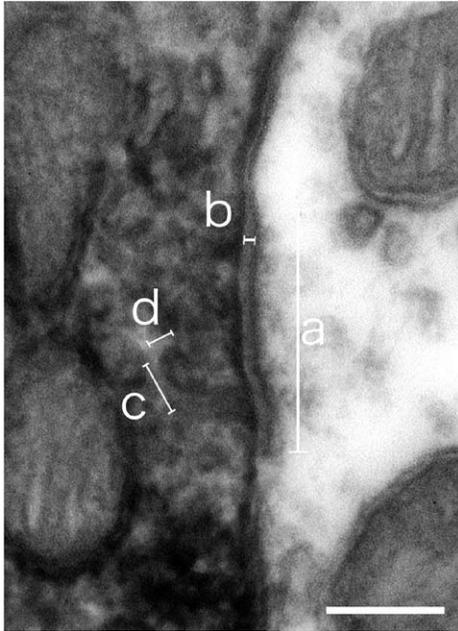


図6 シナプスの計測項目。
計測したシナプスの項目を示す。a) 切片上のシナプスの長さ。b) シナプス間隙の広さ。c) シナプス小胞の長軸。d) シナプス小胞の短軸。bar: 200 nm

に立体像を自由に回転させることが可能であるため、通常の透過像では不鮮明なシナプス間隙を鮮明に観察し、シナプス間隙を正確に測定することができる。この手法を用いて、GABA免疫陽性ニューロン、CB免疫陽性ニューロン、CB-GCLニューロンおよびCR免疫陽性ニューロンが形成しているシナプスを再構築した(図5)。図5のa¹はGABA、b¹は糸球体層のCB、c¹は深層のCB-GCLニューロン、d¹はCR免疫陽性ニューロンが形成するシナプスを通常の電子顕微鏡撮影した像である。これらのシナプスを電子線トモグラフィーによって立体再構築した画像を図5a^{2,3}、b^{2,3}、c^{2,3}、d^{2,3}に示す。a^{2,3}-d^{2,3}はステレオペアであり、立体構築したシナプスを確認することができる。この立体再構築像を再スライスすることによってシナプス間隙およびシナプス小胞が明瞭に確認できる再スライス像が得られた(図5a⁴、b⁴、c⁴、d⁴)。再スライス像では、通常の電子顕微鏡像では輪郭が不明瞭なシナプス小胞が明瞭に確認できた。こ

れらの再スライス像からシナプスの計測を行った(図6)。計測項目は、我々の以前の研究法に準じ²¹⁾、シナプスを構成する要素であるシナプス間隙(図6a)およびシナプス小胞およびシナプス結合の長さ(図6b)を精細に計測した。シナプス小胞は、いずれのニューロングループにおいても扁平形もしくは楕円形を呈していたため、シナプス小胞の長軸(図6c)と短軸(図6d)のそれぞれの長さを測定した。測定した値は統計学的に検証し、有意差の有無を確認した(図7)。シナプス間隙についてはGABA免疫陽性ニューロンが最も狭く、糸球体のCB免疫陽性ニューロンが最も広い値を示し、統計学的有意差がみられた($P=0.039$)。シナプス小胞の長軸では、GABA免疫陽性ニューロンが長く、CR免疫陽性ニューロンは特に短い形態を示し、GABA免疫陽性ニューロンのシナプス小胞が、CB、CR免疫陽性ニューロンと比較して有為に長いことが示された(GABA-CB: $P=0.048$, -CB(GCL): $P=0.00051$, -CR: $P<0.0001$)。また、同じtype 2 JGニューロンである糸球体層CB免疫陽性ニューロンとCR免疫陽性ニューロンの間にも長軸の長さに有意な差がみられた(<0.0001)。一方、分布域が異なるCB免疫陽性ニューロン間では有為な違いは認められなかった。シナプス小胞の短軸では、長軸と同様に、GABA免疫陽性ニューロンが長く、CR免疫陽性ニューロンが特に短い形態を示しており、CR免疫陽性ニューロンとGABAおよびCB免疫陽性ニューロンとの間に有為差がみられた(CR-GABA: $P<0.0001$, CR-CB(GC): $P<0.0001$, CR-CB(GCL): $P=0.0003$)。また、GABA免疫陽性ニューロンとCB-GCLニューロンとの間にも有意差がみられた($P=0.015$)。シナプス小胞の長軸と短軸からもとめた扁平率では、GABA、CB、CR免疫陽性ニューロンのいずれのグループでも類似した値となり、有意な違いは認められなかった。切片上でのシナプスの長さは、糸球体層のCB免疫陽性ニューロンが他のグループと比較して大きな値を示したが、統計学的な有意差は認められなかった。

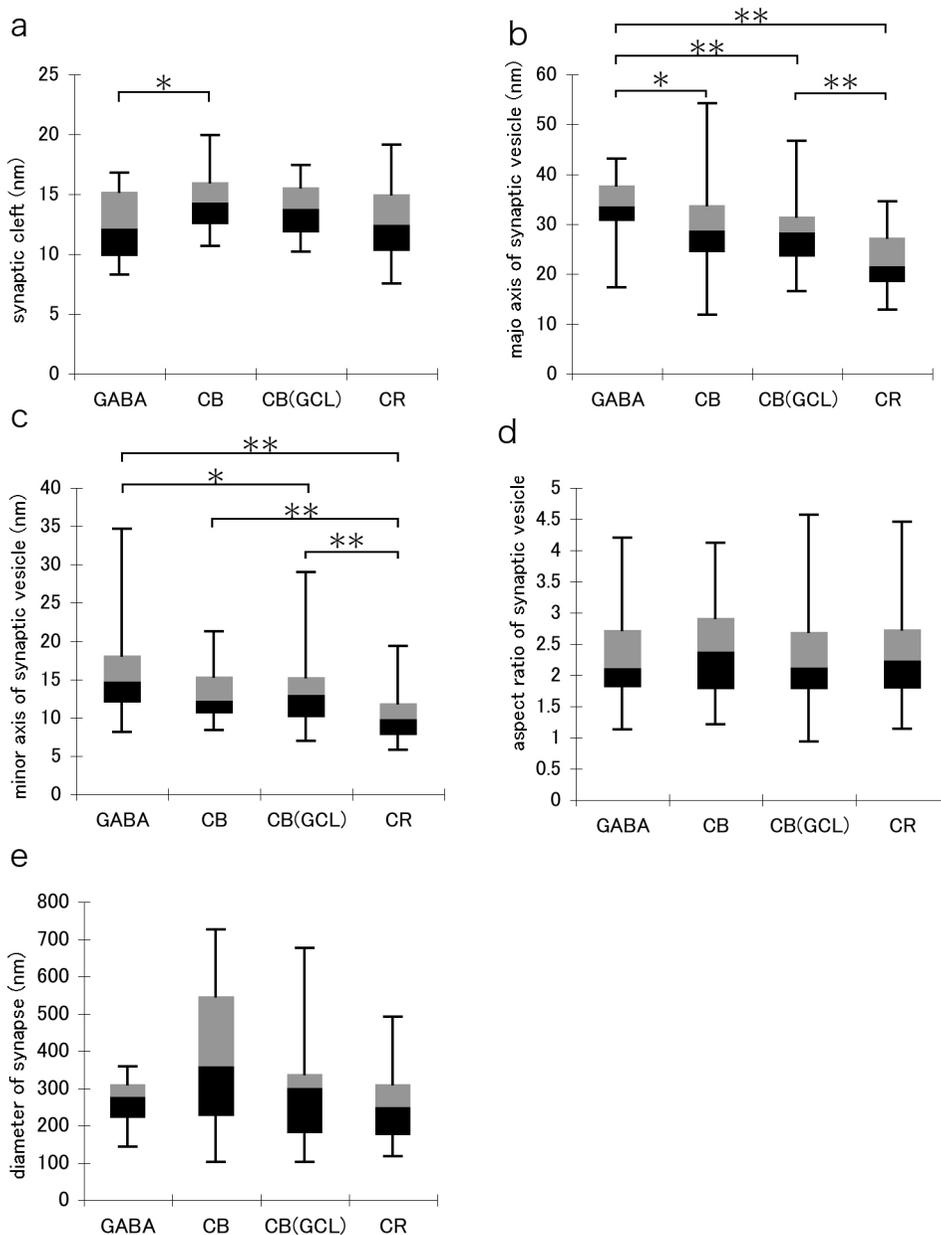


図7 GABA 免疫陽性ニューロン, CB 免疫陽性ニューロン (GL), CB-GCL ニューロン, CR 免疫陽性ニューロンの計測結果

測定したデータの箱ひげ図を示す。垂直線の両端は最大値と最小値を示す。a) シナプス間隙。CB 免疫陽性ニューロン (GL) のシナプス間隙が GABA 免疫陽性ニューロンと比較して有意に広い ($P < 0.05$)。b) シナプス小胞長軸。GABA 免疫陽性ニューロンのシナプス小胞長軸長は他のニューロンの小胞と比較して長いことが示された。また、CR 免疫陽性ニューロンのシナプス小胞は CB 免疫陽性ニューロンとの間にも有為な差がみられた。c) シナプス小胞短軸。CR 免疫陽性ニューロンは他のニューロンと比較して有意に小さい短軸長を示した ($P < 0.01$)。また、CB-GCL ニューロンと GABA 免疫陽性ニューロンとの間にも有意差がみられた ($P < 0.05$)。e) 切片上でのシナプスの長さを示す。各ニューロン群間で有意差は見られなかった。* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$

考 察

本研究は、ラットの嗅球で解析されてきた主要な介在ニューロンである JG ニューロンのなかで、化学的性質の異なる、GABA 免疫陽性および GABA 免疫陰性を示すグループが形成しているシナプスについてデジタル電子顕微鏡を用いた電子線トモグラフィ解析を行うことにより、対称性シナプスとして従来認識されていたシナプスの微細構造にニューロン間で違いがあるとこを初めて明らかにしたものである。また、今回の解析結果は、これまでにフィルムを用いた電子顕微鏡で報告されていたラット嗅球の所見について^{16,17)}、デジタル電子顕微鏡による解析でも同様の所見が得られた初めての報告で、デジタル電子顕微鏡でもフィルムで得られたデータと同等のクオリティが得られることを示したものである。更に、デジタル電子顕微鏡では、電子線トモグラフィのような連続処理が必要な解析を効率的に行うことが可能であり、その結果、従来明らかにすることができなかったシナプスの微細構造の差違を明らかにすることができた。

シナプスの微細構造の立体解析

嗅球の介在ニューロンは化学的性質や形態的特徴によって分類されており、従来の知見では、嗅球浅層の主要な介在ニューロンである JG ニューロンは、化学的性質および形態的特徴によって type 1 JG ニューロンと type 2 JG ニューロンに分類されてきた^{18,19,20)}。本研究で解析対象とした GABA, CB, CR 免疫陽性ニューロンは、JG ニューロンでも存在数が多く、それぞれの化学物質を含有するニューロンが重複することのない独立した化学的サブpopulationを形成しており、type 1 および type 2 JG ニューロンの主要なニューロン群である^{4,10,14)}。本研究はこれまでに報告されてきたこれらの違いに加え、形成するシナプスの微細構造という、新たな相違点の存在を示したもので、介在ニューロンの持つ多様性を新しい観点から明らかにしたものである。

電子顕微鏡で観察した GABA, CB, CR 免疫陽性ニューロンが形成するシナプスはいずれも対称性シナプスであり、それぞれのニューロングループが形成しているシナプスは形態的には同一のものと考えられてきた。しかし、通常の電子顕微鏡観察は、超薄切片を一方から透過した像を観察したものであり、水平方向については非常に高い分解能を持つが、一般的に60-80 nm の厚みを持つ超薄切片内の垂直方向の情報を全て含んだ透過像であるため、数 nm レベルの構造を正確に観察することは難しい。シナプスを構成する要素であるシナプス小胞は20-50nm 程度の構造で、シナプス間隙は20 nm 程度である。そのため、本研究では、近年シナプスの構造の解析に用いられ^{22,23,24,25)}、非対称性シナプスの解析でその有用性を示した²¹⁾電子線トモグラフィ解析を使用した。本研究で用いた電子線トモグラフィは、傾斜角を1°刻みで変更した透過像を撮影し、コンピュータ上で超薄切片内の構造を立体再構築するものであり、立体像に加えコンピュータ上で超薄切片を更に再スライスすることが可能である。これにより、垂直方向にも高い分解能が得られ、これまで検出することができなかった数 nm の形態的な違いの有無を検出することが可能である²¹⁾。

測定項目とした切片上でのシナプスの長さは、1切片上での測定であり、連続切片を用いたものではないため、そのシナプスの正確な大きさを示すものではないが、複数のシナプスで計測することにより、ある程度全体の大きさを反映した結果が得られると考えられる。測定した長さについては分散が大きく、測定結果に有意差は見られなかったが、糸球体層の CB 免疫陽性ニューロンでは特に長いものが観察され、安定して機能した強力なシナプスが含まれていることが示唆される²⁶⁾。シナプス小胞は解析対象としたニューロンが DAB で標識されているため、DAB の沈殿によって不鮮明である場合がみられたが、電子線トモグラフィで再スライスした像では明瞭にみられる場合があり、免疫電顕標本の解析には有用な手法であるといえ

る。観察した小胞はいずれのニューロングループにおいても扁平形から楕円形をしたものがよく見られ、対称性シナプスによく見られるシナプス小胞の形態を示している²⁷⁾。計測した小胞の形態では、長軸、短軸ともに GABA 免疫陽性ニューロンが他のニューロングループと比較して有意に長い形態を示し、GABA 免疫陽性ニューロンと GABA 免疫陰性ニューロン (CB, CR 免疫陽性ニューロン) で形態的に違いが認められた。また、同じ GABA 免疫陰性ニューロンである CB 免疫陽性ニューロン (GCL) と CR 免疫陽性ニューロンとの間でも違いが見られた。しかし同じ化学的性質を持ち、分布域が異なる CB 免疫ニューロン間では違いは見られなかった。一方、計測した長軸と短軸の長さから求めた扁平率では、各ニューロン群間で違いは無く、いずれもほぼ同じ値となり、その形については有意な差はないと考えられる。すなわち、シナプス小胞の形態については、含有している化学物質によってその大きさに違いが生じていることが示唆される結果が得られた。シナプス間隙については、GABA 免疫陽性ニューロンと糸球体層の CB 免疫陽性ニューロンの間で有意差がみられたが、傾向としては、GABA 免疫陽性ニューロンのシナプス間隙がほかと比較して狭い値を示した。

シナプスの微細構造と機能的意義

以前からシナプスの微細構造は機能によって異なると考えられており²⁸⁾、本研究で認められたシナプス間隙とシナプス小胞の違いも何らかの機能的な違いを反映していると考えられる。シナプス間隙の幅の違いが機能的にどのような違いをもたらすかは未だ明らかではないが、違いが生じた理由としてはシナプス間隙に存在するシナプス前細胞と後細胞の結合に関わるタンパクに違いがあることが考えられる。興奮性のシナプスでは、シナプス後膜に発現している細胞接着分子である neuroligin や ephrin-B がシナプス後膜の受容体と結合することが報告されており^{29,30)}、これらの細胞接着タ

ンパクの構成が異なるのであれば、シナプス後細胞の受容体の構成にも違いがあることが示唆される。Miyata は α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 受容体と N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体の構成が異なる glutamatergic synapse の発火のパターンに違いがあることを報告しており³¹⁾、今回シナプス間隙に有意差がみられた GABA 免疫陽性ニューロンと CB 免疫陽性ニューロンは、同じ対称性シナプスを形成するが、シナプス後細胞の反応には違いがあることが考えられる。

シナプス小胞については、代表的な抑制性ニューロンである GABA ニューロンのシナプス前部は扁平形で、一方、代表的な興奮性ニューロンである Glutamate ニューロンは球形であることがこれまでに知られている。本研究で解析したラット嗅球の CB および CR 免疫陽性ニューロンは、GABA 以外にも GABA 合成酵素である GAD、ドーパミン合成酵素である TH のいずれも発現しておらず¹⁸⁾、どのような伝達物質を使用しているのかは明らかではない。CR 免疫陽性ニューロンには有芯小胞が確認されたが、CB 免疫陽性ニューロンでは確認されておらず、CB 免疫陽性ニューロンと CR 免疫陽性ニューロンの間では異なる伝達物質が用いられていることが示唆され、その作用にも差違があることが考えられる。本研究で得られた結果からは、電子線トモグラフィーで確認されたシナプス小胞の形態的な違いは、含有する化学物質の違いを反映したものである可能性が示唆される。また、CB および CR はカルシウム結合タンパクであり、カルシウムイオンのバッファーとして作用してニューロンの発火パターンへ関与することが報告されており^{32,33)}、含有する化学物質の違いによって形態とともに、電気生理学的特性にも違いが生じていると考えられる。一方で、非対称性のシナプスでは、グルタミン酸の刺激によってシナプス後膜の厚みが変化することが報告されており³⁴⁾、それぞれのニューロンの活性の違いによってシナプスに形態的な違いが生じた可能性も考えられるが、

本研究で解析対象とした, 分布域の異なる CB 免疫陽性ニューロンについては, シナプスの形態において顕著な違いは認められなかった。Kikuta らは, 嗅球の浅層に位置する介在ニューロンは深層のニューロンより多くの嗅い分子に反応することを報告しており³⁵⁾, 浅層と深層で活性が異なることが示唆される。この結果は, シナプス形態の違いはその分布域や形成する神経回路の違いより, 発現する化学物質の違いが影響していることを示唆する結果であると考えられる。本研究の結果は嗅球に存在する介在ニューロンが形成するシナプスが一樣ではなく, 形態的な多様性を持つことを示唆している。

今後の課題

以上の結果から, GABA 免疫陽性ニューロンと免疫陰性ニューロン, および同じ GABA 免疫陰性ニューロン間であっても, 含有する化学物質によってシナプスの形状が異なり, 機能的特性が異なることが示された。しかし, CB および CR 免疫陽性ニューロンがどのような神経伝達物質を用いているか, またそのシナプス神経回路を形成する細胞については未解明あるいは依然として推測の域にあり, 現在 virus injection 法による単一ニューロンの標識と種々の抗体を用いた免疫染色を行い, その解析を進めている。

謝辞

本研究を遂行するにあたり, 電子顕微鏡における技術的な補助と助言をいただいた中央研究センターバイオイメージングユニットの須田泰司主任技術員, 松宣昭技術員に深甚なる感謝を表す。また, 英文抄録の校正をいただいた Renee E. Cockerham 博士 (Department of Anatomy and Neurobiology, University of Maryland, School of Medicine, Baltimore, USA) に深甚なる感謝を表す。

本研究は科学研究費 (24500418), (15K06748), 川崎医科大学プロジェクト研究費 (25整-56) (25基-53) の援助を受けて行われた。

引用文献

- 1) Pinching AJ, Powell TPS : The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 9: 305-345, 1971
- 2) Pinching AJ, Powell TP: The neuropil of the periglomerular region of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 9: 379-409, 1971
- 3) Shipley MT, Ennis M, Puche A : Olfactory system. In *The rat nervous system*, 3rd edn (Paxinos G, eds). San Diego, USA, Elsevier Academic Press 2004, pp923-964
- 4) Shepherd GM, Chen WR, Greer CA : Olfactory bulb. In *The synaptic organization of the brain*, 5th edn (Shepherd GM, eds). New York, USA, Oxford University Press. 2004, pp165-216
- 5) Aberly LB, Price JL: The axonal projection patterns of the mitral and tufted cells of the olfactory bulb in the rat. *Brain Res* 129: 152-157, 1977
- 6) Price JL, Powell TP: The synaptology of the granule cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 7: 125-155, 1970
- 7) Price JL, Powell TP: The mitral and short axon cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 7: 631-651, 1970
- 8) Kosaka K, Aika Y, Toida K, Heizmann CW, Hunziker W, Jacobowitz DM, Nagatsu I, Streit P, Visser TJ, Kosaka T : Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb. *Neurosci Res* 23: 73-88, 1995
- 9) Nagayama S, Homma R, Imamura F : Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Front Neural Circuits* 8: 98, 2014
- 10) Toida K : Synaptic organization of the olfactory bulb based on chemical cording of neurons. *Anat Sci Int* 83: 207-217, 2008
- 11) Mugnaini E, Oertel WH, Wouterlood FF: Immunocytochemical localization of GABA neurons and dopaminergic neurons in the rat main and accessory olfactory bulbs. *Neurosci Lett* 47: 221-226, 1984
- 12) Kosaka T, Hataguchi Y, Hama K, Nagatsu I, Wu JY : Coexistence of immunoreactivities for glutamate decarboxylase and tyrosine hydroxylase in some neurons in the periglomerular region of the rat main olfactory bulb: Possible coexistence of gamma-aminobutyric acid (GABA) and dopamine. *Brain Res* 343: 166-171, 1985
- 13) Kosaka T, Kosaka K, Heizmann CW, Nagatsu I, Wu Jy, Yanaihara N, Hama K: An aspect of the organization of the GABAergic system in the rat main olfactory bulb: Laminar distribution of immunohistochemically defined

- subpopulations of GABAergic neurons. *Brain Res* 411: 373-378, 1987
- 14) Kosaka K, Kosaka T : Synaptic organization of the glomerulus in the main olfactory bulb: compartments of the glomerulus and heterogeneity of the periglomerular cells. *Anat Sci Int* 80: 80-90, 2005
 - 15) Toida K, Kosaka K, Heizmann CW, Kosaka T : Synaptic contacts between mitral/tufted cells and GABAergic neurons containing calcium-binding protein parvalbumin in the rat olfactory bulb, with special reference to reciprocal synapses between them. *Brain Res* 650: 347-352, 1994
 - 16) Toida K, Kosaka K, Heizmann CW, Kosaka T : Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb: III. Structural features of calbindin D28k-immunoreactive neurons. *J Comp Neurol* 392: 179-198, 1998
 - 17) Toida K, Kosaka K, Aika Y, Kosaka T : Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb-- IV. Intraglomerular synapses of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons. *Neuroscience* 101: 11-17, 2000
 - 18) Kosaka K, Kosaka T : Chemical properties of type 1 and type 2 periglomerular cells in the mouse olfactory bulb are different from those in the rat olfactory bulb. *Brain Res* 1167: 42-55, 2007
 - 19) Kosaka K, Toida K, Margolis FL, Kosaka T : Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb, II. Prominent differences in the intraglomerular dendritic arborization and their relationship to olfactory nerve terminals. *Neuroscience* 76: 775-786, 1997
 - 20) Kosaka K, Toida K, Aika Y, Kosaka T : How simple is the organization of the olfactory glomerulus? The heterogeneity of so-called periglomerular cells. *Neurosci Res* 30: 101-110, 1998
 - 21) 鈴木良典, 清藤恵美, 樋田一徳 : マウス嗅球神経回路におけるセロトニンニューロンのシナプスの微細構造解析. *川崎医学会誌* 40: 89-102, 2014
 - 22) Burette AC, Lesperance T, Crum J, Martone M, Volkman N, Ellisman MH, Weinberg RJ: Electron tomographic analysis of synaptic ultrastructure. *J Comp Neurol* 520: 2697-2711, 2012
 - 23) Imig C, Min SW, Krinner S, Arancillo M, Rosenmund C, Südhof TC, Rhee J, Brose N, Cooper BH: The morphological and molecular nature of synaptic vesicle priming at presynaptic active zones. *Neuron* 84: 416-431, 2014
 - 24) Perkins GA, Jackson DR, Spirou GA : Resolving presynaptic structure by electron tomography. *Synapse* 69: 268-82, 2015
 - 25) Siksou L, Triller A, Marty S : Ultrastructural organization of presynaptic terminals. *Curr Opin Neurobiol* 21: 261-268, 2011
 - 26) Katagiri H, Pallotto M, Nissant A, Murray K, Sassoè-Pognetto M, Lledo PM: Dynamic development of the first synapse impinging on adult-born neurons in the olfactory bulb circuit. *Neural Syst Circuits* 1: 6, 2011
 - 27) Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ : Synaptic integration in the central nervous system In *Principles of Neural Science*, 5th edn McGraw-Hill Professional 2012, pp210-236
 - 28) Uchizono K : Characteristics of excitatory and inhibitory synapses in the central nervous system of the cat. *Nature* 207: 642-643, 1965
 - 29) Irie M, Hata Y, Takeuchi M, Ichtenchenko K, Toyoda A, Hirao K, Takai Y, Rosahl TW, Südhof TC: Binding of neuroligins to PSD-95. *Science* 277: 1511-1515, 1997
 - 30) Dalva MB, Takasu MA, Lin MZ, Shamah SM, Hu L, Gale NW, Greenberg ME : EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell* 103: 945-956, 2000
 - 31) Miyata M : Distinct properties of corticothalamic and primary sensory synapses to thalamic neurons. *Neurosci Res* 59: 377-382, 2007
 - 32) Blatow M, Caputi A, Burnashev N, Monyer H, Rozov A : Ca²⁺ buffer saturation underlies paired pulse facilitation in calbindin-D28k-containing terminals. *Neuron* 38: 79-88, 2003
 - 33) Burnashev N, Rozov A : Presynaptic Ca²⁺ dynamics, Ca²⁺ buffers and synaptic efficacy. *Cell Calcium* 37: 489-495, 2005
 - 34) Dosemeci A, Tao-Cheng JH, Vinade L, Winters CA, Pozzo-Miller L, Reese TS : Glutamate-induced transient modification of the postsynaptic density. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10428-10432, 2001
 - 35) Kikuta S, Fletcher ML, Homma R, Yamasoba T, Nagayama S : Odorant response properties of individual neurons in an olfactory glomerular module. *Neuron* 77: 1122-1135, 2013

〈Original Article〉

Ultrastructural analysis of synaptic contacts of non-GABAergic interneurons in the rat main olfactory bulb.

Eiji NOTSU, Kazunori TOIDA

Department of Anatomy, Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan

ABSTRACT The olfactory bulb (OB) is a brain region with distinct layers organized by projection neurons, mitral/tufted cells and different kinds of interneurons. Mitral/tufted cells extend their dendrites to glomeruli in the superficial part of the OB. Here they receive odor information and send it to higher brain regions through their axons. Mitral/tufted cells are regulated by juxta-glomerular (JG) neurons in the glomeruli. JG neurons, which surround the glomerulus, have been classified into two types, type 1 and type 2, based on morphological and chemical characteristics. Type 1 neurons are γ -amino butyric acid (GABA)-immunoreactive neurons, and type 2 neurons are calbindin (CB) and calretinin (CR)-immunoreactive neurons. Type 1 2 interneurons might play different roles in odor information processing due to their synaptic contacts onto different neuronal types. Although both types of interneurons form symmetrical synapses morphologically and because of this are expected to function as inhibitory, these synapses could have distinct functions. Interestingly, type 2 interneurons in the rat OB have been shown to be immunonegative for GABA, which is the major neurotransmitter of inhibitory synapses; their transmitter remains to be identified. Therefore, in the present study, we have conducted ultrastructural analysis of synapses formed by GABA-immunopositive and -immunonegative JG neurons by electron microscopic tomography. Results indicate statistical differences in the width of synaptic clefts between GABA- and CB-immunopositive neurons and in the size of synaptic vesicles between GABA-, CB-, and CR-immunopositive neurons. In addition, we have found some differences in the shape of synaptic vesicles between CB- and CR-immunopositive neurons. Together with the findings of our previous studies, we have shown distinct structural differences of synapses in subgroups of type 2 neurons and differences between type1 and 2 interneurons. These structural differences differ with the different proteins expressed in the interneurons and could indicate different functional properties of the subgroups of interneurons.

(Accepted on June 20, 2015)

Key words : Rat olfactory bulb, Electron tomography, GABA, Calbindin, Calretinin

Corresponding author

Kazunori Toida

Department of Anatomy, Kawasaki Medical School, 577
Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan

Phone : 81 86 462 1111

Fax : 81 86 462 1199

E-mail : toida@med.kawasaki-m.ac.jp

