

ギャップ結合による神経細胞ネットワーク Neuronal Network Linked by Gap Junctions

福 田 孝 一

Takaichi Fukuda

^a九州大学大学院医学研究院神経形態学分野

要 旨 神経細胞の中で、通常の化学シナプスによる間接的な結合だけでなく、ギャップ結合による直接的な結合をも利用している例があることが近年注目されている。しかし方法論的な制約から、神経細胞におけるギャップ結合の研究は長くその存在の証明にとどまり、ネットワークとしての具体的な姿は不明なままであった。ごく最近の形態学・生理学・分子生物学研究は、神経細胞間ギャップ結合の解明に大きな進展をもたらしている。特に電子顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡を組み合わせた新しい方法によって、光学顕微鏡レベルでギャップ結合を確実に同定することが可能となり、ギャップ結合ネットワークの3次元構造を広い視野で解析することが実現した。ギャップ結合を介して大脳皮質 GABA ニューロンが形成するネットワークは、側方に密で連続的な結合を形成し、脳における情報表現の機序における重要性が示唆される。

キーワード：ギャップ結合、インターニューロン、コネクション 36、大脳皮質

1. はじめに

話は 100 年前にさかのぼる。1906 年 11 月 11 日、ストックホルムで行われたノーベル医学生理学賞の受賞講演は、異例の展開となった。受賞者である二人の解剖学者、イタリアのカミロ・ゴルジとスペインのラモニ・カハールは、神経細胞のネットワークの様式について全く異なる立場をとっていたため、二人は真っ向から対立する二つの説をそれぞれ披露して講演を終えたのである。ゴルジは彼の講演のほとんどを、既に時代遅れとなりつつあった網状説の頑強な擁護と、カハールらが唱えるニューロン説への攻撃に宛てた。ゴルジの主張によれば、神経細胞から伸びる軸索は互いに直接連絡しながら複雑な網目を形成し、信号はそのネットワーク内を様々な方向に伝播することになる。一方カハールが考えた神経細胞は脳を形作る単位構造（ニューロン）としての存在であり、信号は樹状突起・細胞体から軸索へと一方向に流れて軸索終末に達すること、そして軸索終末と信号の受け手である細胞体・樹状突起との間にはすきまがあり、信号は何らかの方法でそのすき間を越えて次のニューロンに伝達される特徴を持つことを提唱した。脳の顕微鏡の構造を知っている読者ならすぐお分かりのように、カハールは現在われわれが知っている神経細胞のあり方を、驚くほどの正確さを持って見通していたわけである。実は現在の最高水準の光学顕微鏡

の解像力（約 0.2 μm ）をもってしても、そのすき間（約 0.02 μm ）を見ることは不可能である。しかし彼は脳のあらゆる場所から美しい標本作製し、おびただしい数の神経細胞を観察し、また発生の過程で脳の中を伸びていく軸索の形態を詳細に検討した結果から、ニューロン説を確信する啓示を得たのであった。

カハールの考えたニューロン説が正しかったことは、約 50 年後の 1950 年代に、電子顕微鏡がシナプスの微細構造を明瞭に描き出したことにより、最終的な決着をみた。以後今日に至るまで、あらゆる神経科学は、単位構造であるニューロンが、シナプスによる間接的な結合を仲立ちとしてネットワークを形成しているというセントラルドグマを基盤として発展してきたといっても過言ではない。このことは、たとえば神経生理学はシナプスにおける電気的応答を調べ、神経薬理学はシナプスにある受容体を主な標的とし、また精神医学はシナプス伝達の異常の是正を薬物治療の核心としてきたことから、容易に理解できるであろう。

しかしいつも単純なコースをたどるわけではないというのが、われわれの科学のあゆみの、むしろ一般的な姿である。電子顕微鏡によるシナプス構造の同定からさらに 50 年の時を経た今日、現代の形態学と生理学は、ゴルジが完全に間違っていたわけではなく、網状説が部分的には正しいかもしれないことを、しだいに明らかにしつつある¹⁻⁴⁾。中枢神経内にはもうひとつのネットワークがあり、それは驚くほどの密度と広がりをもって、既知のニューロンネットワークと空間を共有している可能性が示されつつある^{3,4)}。本稿においては、われわれの最近の成果も含めながら、このギャップ結合が形成する新しいネットワークの構造と機能的意義について概説

^a 〒 812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1
TEL: 092-642-6053; FAX: 092-642-6059
E-mail: fukuda@a3rd.med.kyushu-u.ac.jp
2008 年 5 月 19 日受付

を試みたい。(なお文中で大脳皮質という言葉を用いる際には、新皮質と海馬を主な対象としている。)

2. 化学シナプスとギャップ結合 (電気シナプス)

電子顕微鏡が明らかにした通常のシナプス(化学シナプス)の構造の詳細は成書に譲り、ギャップ結合との対比を理解する上で重要なポイントのみここで述べる。神経細胞から伸びる軸索は、標的細胞の上に接着する際に軸索終末(シナプス前終末)と呼ばれる膨らみを形成し、約20nmのごく狭いすき間(シナプス間隙)を隔てて相手と結合する(図1a)。軸索終末の中にある小さな袋(シナプス小胞)に含まれているグルタミン酸やGABAなどの神経伝達物質は、軸索を伝わってきた活動電位が終末に達するとシナプス間隙に放出され、拡散の後、シナプスを受けるニューロン(シナプス後細胞)の細胞膜上にある特異的な受容体に結合する。これにより Na^+ などの特定のイオンを通すチャンネルが開き、シナプス後細胞における電位変化が生じる。これが神経細胞間のシグナル伝達における素過程であるが、そこでは終末に到来する電気シグナルがいったん化学物質によるシグナルに変換された後、再びシナプス後細胞で電気シグナルに変えられることになる。重要な点は、ニューロン間の信号伝達がこのように間接的であること、さらに信号伝達の際には物質の放出・拡散・受容体結合・チャンネル閉鎖などの過程により時間がかかることである。すなわち、通常のシナプス伝達においては、数ミリ秒の遅れ(シナプス遅延)が生じる。

一方、電子顕微鏡を生物の組織構造の観察に応用しはじめた開拓者の中に、以上のような構造とは全く異なる結合様式が神経細胞間に存在する可能性を追究した者たちがいた。当時生理学者によって、二つの神経細胞間を極めて早く電気シグナルが伝わる例があることが知られており、そのような信号伝達を可能にする特殊なシナプス(電気シナプス)の存在が予言されていた。1959年、九州大学(当時)の濱清は、渡米先のワシントン州立大学において、電気シナプスがあるに違いないと考えられていたミミズの巨大神経線維から標本作製し、二つの神経細胞の軸索間に、対向する細胞膜がギリギリまで接近しながらもある一定距離を隔てて対峙する特別な領域が存在していることを、電子顕微鏡により突き止めた⁵⁾。さらに帰国後、同じように早い伝達が知られていたザリガニの神経細胞間にも同様の構造を見いだした⁶⁾。濱がこれらの仕事で提示した電子顕微鏡写真は、電気シナプスの存在を、世界で初めて目に見える形でとらえたものであった。

向かい合う細胞膜が接近して作るこの特殊構造は、現在ギャップ結合として知られているものである(図1b)。ギャップ結合は、コネクシンと呼ばれる膜タンパク質分子が会合して作られる。6個のコネクシンが集まって、中央に孔を持つチャンネルタンパク(コネクソン)を作る。隣合う細胞膜に埋め込まれたコネクソンどうしが、その頭と頭をくっつけ合うように会合して、一つのチャンネルを形成する。これにより、二つの細胞の細胞質がコネクソンを通して直接連絡する

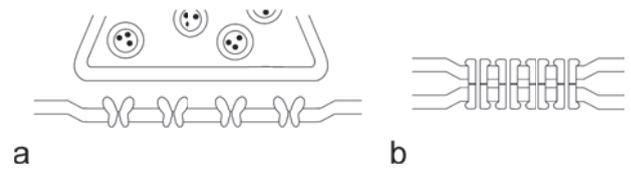


図1 2種類のシナプスの模式図。化学シナプス(a)の軸索終末内にはシナプス小胞があり、その中に神経伝達物質(小さな黒丸)が含まれる。シナプス後膜に受容体タンパクが並ぶ。ここでは受容体タンパクがイオンチャンネルそのものである例を示す。ギャップ結合(b)では、隣接する2細胞の細胞膜をコネクソンが架橋し、中央の小孔を通じて細胞質が直接連絡する。図4に実際の電子顕微鏡写真を示す。

ことになる。head to headに会合したコネクソンが多数集まって、細胞膜内にパッチ状の特殊な領域を形成したものがギャップ結合である。ギャップ結合は全身の様々な組織の細胞に認められ、分子量が約1000 Da以下の物質を通すことから、各種のイオンや代謝産物を隣接細胞間で共有することが可能になる。特に神経細胞や心筋・平滑筋のような興奮性細胞においては、電気信号がギャップ結合を通じて、直接的に、遅延なく伝達されることになる。さらに中枢神経系の神経細胞の場合は、後に述べるようにギャップ結合で連結したネットワークの電気的活動がタイミングをそろえて行われる可能性が出現してくる(活動の同期化; synchronization)。神経細胞集団の発火のタイミングの同期性は、「情報」が神経細胞活動の「何」に担われているかという現在の神経科学の根本問題に関わるテーマであり、ギャップ結合の機能的意義の項であらためて触れることにする。

3. 神経細胞におけるギャップ結合研究の初期の発展

濱^{5,6)}らによる初期の研究は、無脊椎動物や魚類などの下等な脊椎動物の神経系におけるギャップ結合の存在を明らかにした。それに続く70年代は中枢神経系の電子顕微鏡研究の隆盛期であり、哺乳類の脳においても、いくつかの領域で神経細胞間のギャップ結合が証明された⁷⁾。たとえば齧歯類の下オリーブ核、前庭神経核、霊長類の新皮質⁸⁾で、ギャップ結合の存在を明瞭に示す美しい電顕写真が誌上をにぎわした。しかし神経細胞間に存在するギャップ結合を電子顕微鏡でとらえることは、世界中でもわずか数名の先端的な研究者たちによる、一種の職人芸的な要素が強かった。これは化学シナプスが脳の組織のいたるところにあり、誰にでもすぐ見つかるのとはかなり趣を異にする。さらに注意すべきことは、ギャップ結合が、決して神経細胞一般に広く見られる結合様式ではなかったことである。ギャップ結合は、脳の特定の領域のある決まった種類の神経細胞に限って存在しているのである(その意義については4章で後述)。これらの事情から、一連の見事な電顕像によって飾られた70年代の業績は、化学シナプスとは異なった神経細胞連絡のあり方が、下等動物のみならずは哺乳類の脳においても存在することを広く知らしめることには貢献したが、どちらかといえば例外的な現象と

して受け止められたようである。より進んで、ギャップ結合が神経回路の中で果たす役割を具体的に考えるまでの材料となるような知識は、まだ得られなかった。

このことには、電子顕微鏡研究それ自体が持つ制約が大きく関係している。技術的な問題から、電子顕微鏡で観察するための標本は、非常に小さくしなければならない。さらに電子線を透過させてコントラストの良い像を得るために、切片の厚さを60～70 nmにする必要があり、そのことは必然的に、奥行き方向に長い距離にわたって構造をとらえていくことを、物理的に非常に困難にする。これらの事情から、電子顕微鏡観察はその高い解像力と引き換えに局所的なものとならざるを得ず、神経細胞のネットワークを大きく3次元的に見ていくことは、電子顕微鏡研究単独ではほとんど不可能なのである。

80年代にはいり、そのような問題点を克服するべく、あらかじめゴルジ鍍銀法で染めた神経細胞を光学顕微鏡で観察し全体像を把握した後に、その神経細胞の局所を再度電子顕微鏡で直接見ていく手法（ゴルジ電顕法）が、生理学研究所（当時）の小坂俊夫によりラット海馬におけるギャップ結合の研究に応用された^{9,10}。小坂が見いだした重要な所見として、(1)海馬と歯状回の神経細胞の中で、ギャップ結合の形成が形態学的に確認できるのは、いわゆる抑制性インターニューロンのみであり、興奮性の投射ニューロンである錐体細胞や顆粒細胞には認められないこと、(2)ギャップ結合は軸索ではなく樹状突起間に存在すること、(3)樹状突起間の結合は2細胞間にとどまらず、それぞれの樹状突起がさらに他の神経細胞とギャップ結合を形成することにより、複数の神経細胞が連鎖を形成していることがあげられる。さらに当時神経組織への応用が本格化されつつあった免疫組織化学染色を援用し、海馬の代表的なインターニューロンであるバスケット細胞が、樹状突起間にギャップ結合を形成していることが見いだされた¹¹。すぐあとで、同様の所見が基底核の線条体においても示された¹²。

80年代の研究が明らかにした、ギャップ結合が抑制性ニューロンの樹状突起間に豊富に存在しているという事実は、現在大きな発展を見せている大脳皮質でのギャップ結合性ネットワークの根幹とも言うべき性質である。しかしながら中枢神経系におけるギャップ結合の解明は、現在の急速な展開期を迎えるまでの間、いったん10年の眠りにつくのである。

4. ギャップ結合研究の新たな展開

脳におけるギャップ結合研究のre-startは、新しい電気生理学と電子顕微鏡研究、そして神経細胞に特異的に発現するコネキシン遺伝子のクローニングという三つの方向から軌を一にして、しかもお互いが独立して、突如という感じで始まった。

4.1 電気生理学からのアプローチ

既に90年代から、赤外線 CCD カメラでとらえた微分干

渉顕微鏡像をモニター上に映すことにより、脳スライス内で生きている無染色の神経細胞を、直視下に一個ずつパッチ電極をあてることが可能になっていた。この方法のおかげで、大脳皮質のインターニューロンのような、多数の神経細胞の中に散在性に混じる少数の神経細胞から効率良く細胞内記録を得ることが初めて実現した。やがて単一細胞からの記録は2細胞の同時記録へと進み、そこから二つのインターニューロン間に電気シナプスが存在することの「発見」に至る過程は、ある意味で必然であった。生理学者が二つのインターニューロンに電極をあてた時、Sloper⁸が70年代に電子顕微鏡で示していた構造が始めからそこにあったからである。技術の進歩を待ち受けていたかのように、大脳皮質インターニューロン間の電気シナプスの同定は、時をそろえて、二つのグループによって同じ雑誌の同じ号に並んで発表された^{13,14}。電子顕微鏡研究によって点と線のごとく命脈を保ってきた大脳皮質のギャップ結合研究は、約30年の時を経て初めて生理学から光があてられたことになる。電気シナプスが存在するペアでは、二つのインターニューロンの同期した電氣的活動が認められる（電氣的カップリング）。電氣的カップリングが見いだされたのは、生理学的特性からfast spiking cellと分類されるGABAニューロンのペアであったが、これは海馬や線条体で電子顕微鏡によりギャップ結合が同定されていた神経細胞と、まさに同じタイプのものであった。

4.2 形態学によるギャップ結合ネットワークの解明

一方形態学からのアプローチは、生理学でそのような発見が行われつつあったこととは無関係に、むしろ形態学そのものの新しい流れの中から始まった。90年代半ばから使用が一般化され始めた共焦点レーザー顕微鏡は、切片の深さ方向(z軸方向)の高い解像度を実現することから、これを切片のx-y方向の解像度にすぐれている高品質の対物レンズと組み合わせることにより、神経細胞のように3次元的な構造をもつ細胞の形態の詳細な解析に威力を発揮する。またz軸方向に一定間隔で取り込んだデジタル画像ファイルを元にして、各種の立体的観察が可能になる。他方、共焦点レーザー顕微鏡は基本的には光学顕微鏡であることから、広い視野での観察にも適している。しかも光顕連続切片を貫いて伸びる突起をトレースしていけば、奥行き方向にも無限に解析空間が広がる。高解像力と広い視野の両立は、前に述べた電子顕微鏡の弱点である局所性を大きく補うことが期待できる。つまり共焦点レーザー顕微鏡は、局所的なdetailをより大きな構造の中で俯瞰的にとらえていく研究にとって、これまでできなかったことを可能にするポテンシャルを持っている。このような見通しのもとに、われわれは海馬や新皮質のインターニューロン間のギャップ結合と、それによるネットワークの解明に着手した。

海馬や新皮質のバスケット細胞は、カルシウム結合タンパクの一つであるパルブアルブミン(PV)の抗体を用いて、免疫組織化学的に同定することができる¹¹。バスケット細胞の大きな特徴は、錐体細胞の細胞体の近くにGABA作動

性の抑制性シナプスを形成し (図 2c, d), それによって錐体細胞における活動電位の発生を, 発生源近傍で効果的に制御することにある. 神経解剖でよく用いられる冠状断方向の海馬切片では, PV ニューロンの長い樹状突起が同じ方向に向かって長く伸びている様子がよく見える (図 2b). 共焦点レーザー顕微鏡で細部を観察すると, 近接する細胞から平行して伸びている樹状突起の間にコンタクトが見られた. これは 80 年代に明らかにされた樹状突起間のギャップ結合に相当する場所と考えられる. ところが思いがけない事に, 海馬の白質 (図 2b 中の A) に平行な連続切片 (接線方向切片) を PV に対する抗体で染めたところ, 海馬の実質と白質の境界部に, 切片内を大きく横に広がる樹状突起の網のような構造が出現した (図 3)³⁾. この接線方向切片は, 海馬の中を横に広がる構造を一番よく見せてくれる切り方になるが, 立ち現れたこの網のような構造物がもしギャップ結合でつながっていれば, これまで知られている近接細胞間の連絡とは異なった, 横方向へ大きく広がるネットワークが存在していることになる.

共焦点レーザー顕微鏡で見ると, 新たに出現した横方向へ広がる網の継ぎ目は, 樹状突起がお互いに直接コンタクトしているように見える (図 3b-e). 早速電子顕微鏡で観察す

ると, 果たしてそこにはギャップ結合が存在していた (図 4). 観察を重ね, 海馬内の中を横に広がる樹状突起ネットワークの形態学的性質に関して様々な検討を加えた結果, 図 5b に示すような構造が明らかになった^{3,15)}.

図 5a は, よく知られた海馬の基本回路である. 大脳皮質の各領域からの情報は, 嗅内皮質 (EC) を入り口として海馬に入ってくる. 海馬内では, 情報は 3 種類の興奮性ニューロンを経由して一方向的に伝達され (歯状回顆粒細胞 DG → CA3 錐体細胞 → CA1 錐体細胞), その間になされる計算結果が, 海馬台 (sub) を経て外に出力される. ちなみに学習・記憶の素過程と考えられるシナプス可塑性が, この基本回路を構成する 3 種のニューロンのいずれにおいても同定されている. では, 新たに出現した構造 (図 5b) は, この海馬の基本回路とどのような関係にあるであろうか? まず以前から知られているように, 個々の PV ニューロンが, 一個あたり数百個の錐体細胞 (図 5b で p 層にある小さな卵形) の上に, GABA による抑制性のシナプスを形成する (図 5b 小矢印). このことは, 一個の PV ニューロンに由来する活動電位によって, 錐体細胞層 (図 5 の p) にある数百の標的細胞集団に同期的な抑制性シナプス後電位 IPSP を発生させることを意味する. この PV ニューロンどうしが, さらにギャップ結

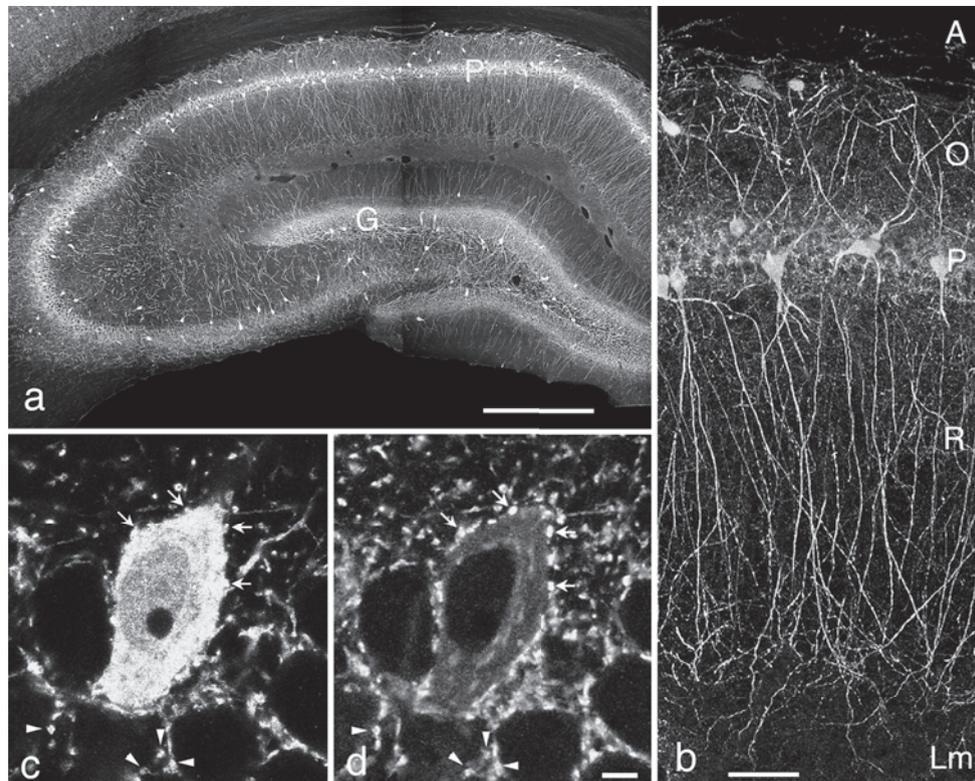


図 2 マウス海馬の PV 免疫陽性神経細胞. (a) 冠状断での低倍像. P 錐体細胞層, G 歯状回顆粒細胞層. (b) 錐体細胞層にある細胞体から伸びる樹状突起は, 放線層 (R) では主として縦方向に平行に走る. A 海馬白質 (白質), O 上昇層, Lm 網状分子層. (c, d) 錐体細胞層における PV (c) と GABA の合成酵素 GAD (d) の二重免疫組織化学染色像. PV 陽性ニューロンの細胞体の上に二重陽性の軸索終末 (矢印) が多数存在することに注意. これらは他の PV ニューロンに由来する終末で, PV ニューロン間の抑制性相互シナプス結合に相当する. 矢頭で示す二重免疫陽性終末は, 反応陰性の錐体細胞細胞体を取り囲む軸索終末. Scale: a, 0.5 mm; b, 50 μ m; c, d, 5 μ m. 文献 3) より許可を得て転載 (© 2000 by the Society for Neuroscience).

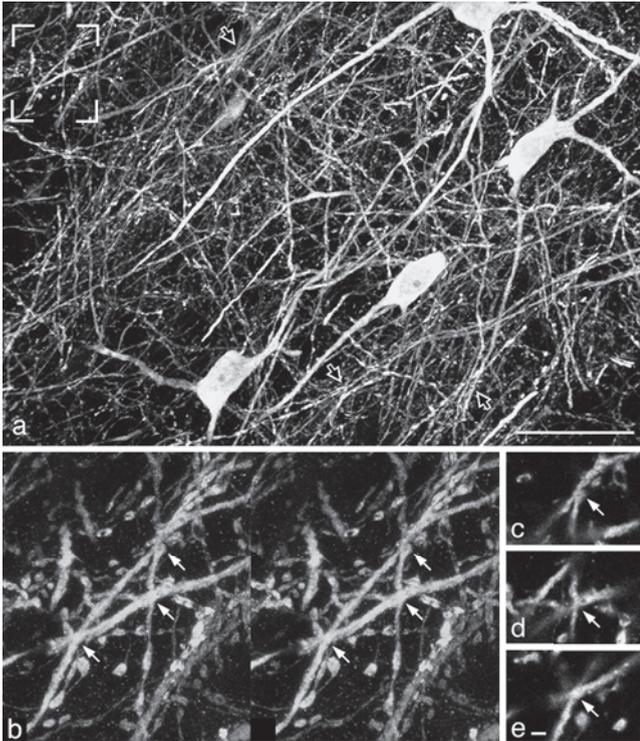


図3 マウス海馬の接線方向切片で認められるPVニューロン樹状突起の網状構造。(a) 海馬白板と上昇層の境界部(図2のAとOの境界部)を接線方向に切ると、多数の樹状突起が折り重なりながら横方向に大きく広がっている様子が観察できる。図2の冠状断ではほとんど認識できない事に注意。図の左上の枠で囲む部分の拡大をbに示す。(b) 樹状突起の網状構造をステレオ画像で示す。矢印は樹状突起間のコンタクト部位3箇所を示す。(c-e) bで示すコンタクト部位を、それぞれ一枚のoptical sliceで見た像。共焦点レーザー顕微鏡の解像度で見える限り、樹状突起の直接の接触が示唆される。Scale: a, 50 μ m; b-e, 1 μ m。文献3)より許可を得て転載(© 2000 by the Society for Neuroscience)。

合(図5b白丸)を介して大きな樹状突起のネットワークを形成していることになる。すなわち、ギャップ結合性樹状突起ネットワークを作るPVニューロンは、海馬の中で横方向に広い領域に渡って電気シナプスによって直接つながる形になる。後述するように、このようなネットワークに組み込まれているPVニューロンは、ネットワークとしてのダイナミックな活動を通じてリズムや同期的活動を生み出すと考えられている。そしてこのリズムや同期性が、ひるがえって個々のPVニューロンから作られる同期的なIPSPを介して、海馬の基本回路を構成する標的細胞集団に反映されるという図式になる。

海馬で見られる構造は、新皮質においても本質的には同様のものである¹⁶⁾。新皮質のGABAニューロンのうち、約50%をPVニューロンが占めているが、その多くは海馬と類似の性質を持つ。新皮質のPVニューロンの樹状突起を共焦点レーザー顕微鏡と電子顕微鏡によって観察した結果、予想通りギャップ結合によって連結した樹状突起ネットワークの

存在が明らかになった。しかし新皮質が海馬と大きく異なる点は、海馬では錐体細胞がシート状に単一の層に集中しているのに対して、新皮質は6層に分かれ、各層を構成する細胞要素にも大きな違いがあることである。これはPVニューロンの樹状突起ネットワークの構造にも反映される。海馬のPVニューロンでは、樹状突起の走向が比較的そろっていて(図2b)、ネットワークの構造としても、図式化しやすい(図5b参照)。一方新皮質では、各層に分布する個々のPVニューロンから、樹状突起が立体的にさまざまな方向に伸び、それがお互いに大きく重なり合っ、全体としては錯綜した無秩序的な様相を呈している。この無秩序性については5章の最後と6章で言及するように、次のステップでの検討に重要な意味をもつこととなる。

4.3 神経細胞特異的なコネクシン遺伝子のクローニング

ギャップ結合の構成タンパクであるコネクシンには多数の遺伝的に異なったタイプが知られている。その中で神経細胞に特異的なコネクシン36(Cx36)が1998年に同定された^{17,18)}。Cx36は、発生に伴ってその発現量が大きく変化する。マウス脳でのNorthern blotの検討では¹⁸⁾、胎生14日には既に発現が認められ、しだいに上昇して生後1~2週にピークを迎える。3週目に急速に減少し、以後basal level(ピーク時の8%)が成熟脳まで維持される。生後2週までの上昇は、興奮性の錐体細胞が一過性にCx36を発現してギャップ結合を形成するためであると考えられている¹⁹⁾。成熟期でのbasal levelでのCx36の発現は、これまで説明してきたインターニューロンによるものである。ギャップ結合が発生の初期に一過性に興奮性神経細胞に出現し、以後は抑制性神経細胞に限定されてくることの意義についてはいろいろな考え方があるが、ここでは、もし興奮性神経細胞間にギャップ結合が残存しているとすると、どのような事態が起こりうるかという問題を指摘しておきたい。ある皮質領域へ到来する興奮性入力、ギャップ結合を通じて興奮性の錐体細胞間に同期的に伝播されるとすると、それはとりもなおさず、epilepsyのリスクを高めることにほかならない。実際の脳では、電気的活動が活発化する3週目に、錐体細胞間のギャップ結合は速やかに消失するのである。

5. 隣近所かそれとも大きなネットワークか?

大脳皮質インターニューロンにおけるギャップ結合について、2000年前後に生理学と形態学によって相次いで発表された研究は、ネットワークの3次元の広がりを見積もりを巡って、当初から大きく見解が分かれた。生理学では、記録する2細胞間の距離が短い時だけカップリングが得られることから、ギャップ結合は細胞体から50 μ m以内の樹状突起表面にしか存在しないと考えられていた。一方われわれは、形態学的所見から、もっと遠いところにも多数のギャップ結合があると考えざるをえない間接的証拠を得てきた^{3,16)}。しかし電子顕微鏡観察は、ギャップ結合の存在を直接示す最も確実な方法であるものの、先に述べたようなその局所性から、

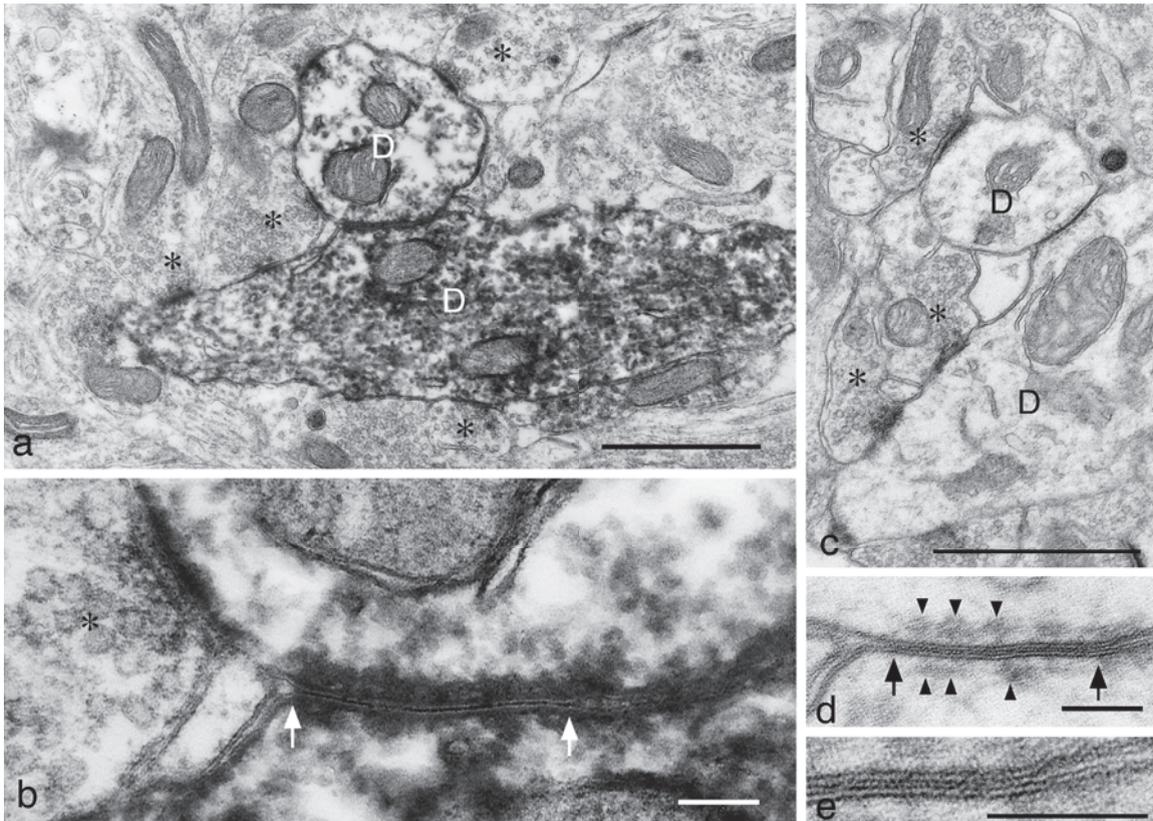


図4 PVニューロンの樹状突起ネットワークに存在するギャップ結合。(a) 海馬白板上昇層の境界部の免疫電顕像。交差するPV陽性の二本の樹状突起(D)は、一方が図を垂直に貫く方向に走り、他方は図を水平に横切る方向にある。いずれも化学シナプス(*)を受けている。(b) aのコンタクト部位の拡大。白矢印の間で二本の樹状突起の細胞膜がぴったりとくっついてギャップ結合を形成している。(c) 免疫反応を施さない標本で、aと同様にギャップ結合を形成している二本の樹状突起を見た電顕像。(d, e) cのコンタクト部位の拡大。dはbと同じ拡大率で示す。矢印の間にギャップ結合が認められる。矢頭は神経細胞のギャップ結合に特異的な裏打ち構造。eにおいて対向する脂質二重膜と、両者の間の3 nmの間隙(gap)に注意。bではこの間隙にDAB反応産物が入り込み、明瞭なラインを形作る。Scale: a, c, 1 μm; b, d, e, 0.1 μm。文献3)より許可を得て転載。(© 2000 by the Society for Neuroscience)

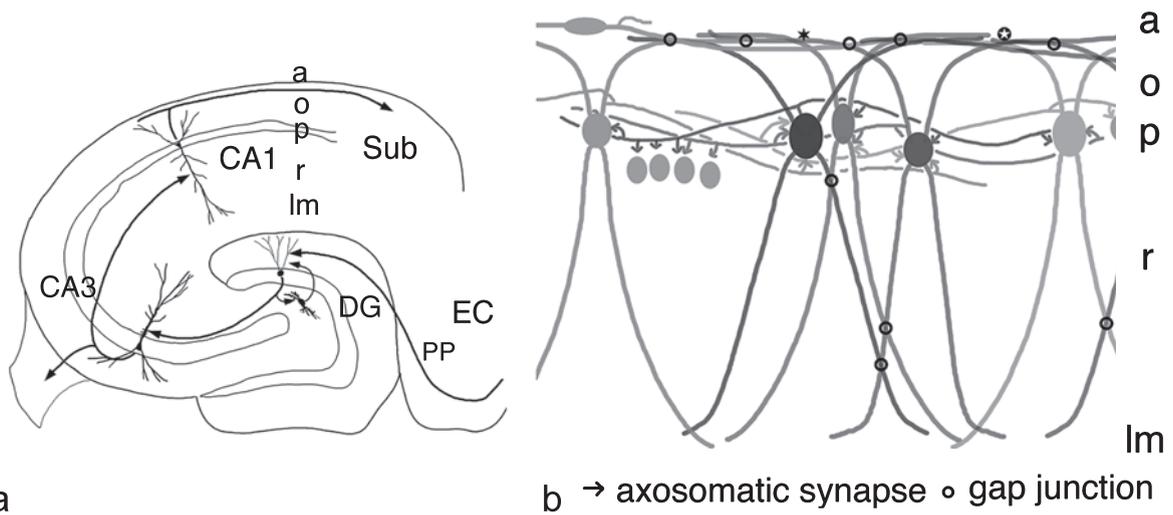


図5 海馬の基本的神経回路(a), およびGABAニューロンが化学シナプスとギャップ結合を介して形成する“二重のネットワーク”(b)。詳細は本文参照。文献15)より許可を得て転載。(© 2000 by Elsevier)

ギャップ結合の3次元的な分布を大きなスケールで調べていくことは、非常に困難な課題であった。

ギャップ結合が存在する部位の細胞体からの距離の問題は、マクロな視点で見た場合に、ギャップ結合による細胞の連結とそれによるニューロン活動の束ねが、クラスター状に集まる少数のニューロンにとどまるのか、それともより大きなネットワークとして成り立つのかという違いを意味し、さらにそれは、大脳皮質の情報処理のメカニズムに、いかにギャップ結合がかかわりうるかという問題にも発展する。

このギャップ結合の位置の問題についての直接的な解答は、ギャップ結合研究の第三の要素であるコネクシンに注目し、その分布を共焦点レーザー顕微鏡と電子顕微鏡により追究することで、ようやく得ることができた⁴⁾。図6はネコの18野(視覚皮質)において、PVとCx36に対する二重免疫組織化学染色を行った結果である。図6aの矢印は、図の上方のPV陽性の細胞体から下降してくる樹状突起と、下方から来る別のPV陽性樹状突起とのコンタクト部位であり、上方の細胞体からは250 μm 離れている。図6bはこの部位の拡大で、PVニューロンの2つの樹状突起(*)の間のコンタクト部位に一致して、Cx36陽性の2つの点状の染色が認められる。このCx36陽性の点状の構造はたいへん小さなものであるが、はたしてこれが本当にギャップ結合に対応しているであろうか?そこでPVを標識している蛍光色素のラベルを、PAP法をうまく利用して電子顕微鏡で同定できるdiaminobenzidine (DAB)の標識に変換した。図6cは黄色矢印で示すコンタクト部位を含む切片標本をエポキシに包埋し、薄切用にトリミングしたブロック表面の写真である。共焦点レーザー顕微鏡で観察した2本の樹状突起を電子顕微鏡下に同定し、2つのコンタクト部位(1と2)を拡大すると、確かに間違いなくギャップ結合がそこに存在している(図6d1, d2)。すなわち、共焦点レーザー顕微鏡でCx36陽性の小さな点として観察される構造物は、電子顕微鏡的にもギャップ結合に一致していることが確かめられた。同様の対応が17個のすべてのCx36陽性の点状構造で得られた。これにより、以後は電子顕微鏡を用いなくても、Cx36の免疫組織化学染色像を共焦点レーザー顕微鏡で観察することによって、ギャップ結合の存在をとらえることが、初めて可能になったわけである。

この新しい方法は、大きな威力を発揮する。まず二重蛍光標識した光顕連続切片を用いて一つのPVニューロンの樹状突起の広がりを追跡すると、一つのPVニューロンあたり約60個ものギャップ結合が存在することが明らかになった(図7, 8a)。細胞体から近い所にも遠いところにもギャップ結合が認められ、最も遠い例では細胞体から380 μm 離れていた。さらに細胞体からの距離を50 μm ごとに区切ったそれぞれのshellの中に何個ずつ分布しているかというSholl analysisによる検討でも(図8b)、細胞体から50 μm, 100 μm, 150 μm, および200 μm までのそれぞれの区域に、全体の37%, 35%, 18%, および8%のギャップ結合が存在

していた。これらの結果は、ギャップ結合が50 μm 以内のみ存在し、クラスター状に集まった神経細胞のcouplingに関わっているであろうというそれまでの生理学による見方に大きな変更をもたらすものである。

このように非常に密で、しかも遠位樹状突起にも及んでいるギャップ結合の分布は、大脳皮質のPVニューロンが広範囲に連結している可能性を示唆する。実際一つのPVニューロンからトレースを開始し、Cx36陽性コンタクト部位において出会う他のニューロン由来の樹状突起を次々にトレースして見ると、そのような連鎖は途切れることなくどこまでも続いていく様子が見てとれる(図7)。しかも次々にトレースしていったニューロンのそれぞれについて、上述のように平均60個のコンタクト部位が期待される。図7においてさまざまな記号で位置を示したギャップ結合は、すべて連結する相手がある。もし相手側のPVニューロンを全部トレースして書き加えれば、途方もなく密なネットワークがそこに存在していることが理解できるであろう。

このような密なネットワークが、新皮質のはたらきを考える際の鍵構造である機能的カラムとどのような空間的関係性を持つかという問題はたいへん興味深いテーマである⁴⁾。一般に新皮質の神経細胞は、機能的に同質の特徴を持ったものが縦に並んでいて、幅200~500 μm の柱状の単位構造(カラム)を構成している。特に視覚野の方位選択性カラムでは、特定の傾きを持った線分の光刺激に高い反応性を示す神経細胞が柱状に配列している。PVニューロンは、この方位選択性カラムに依存しないランダムな分布をしていることがわかった。しかも個々のニューロンからは水平方向へ樹状突起が大きく広がり、異なる方位カラムを自由に横切り、かつお互いに大きく重なり合っている。大事なことは、このような樹状突起がギャップ結合により電氣的に相互に連結していることである。すなわち、ギャップ結合ネットワークは単一の機能的カラム内にとどまるといっても、密に重なり錯綜しながら側方に連続的につながっており、横方向にhomogeneousに形成されていると考えられる。

6. ギャップ結合性神経ネットワークの機能的意義

最後に、ギャップ結合を介する「もう一つの神経細胞ネットワーク」の機能的意義について考えたい。現在まで形態学的にも生理学的にも詳しく調べられているのは、既に見てきた海馬と新皮質にあるPV陽性のバスケット細胞型インターニューロンが作るネットワークである。それゆえ考察は、これらのニューロンについての理解を軸として進めることとする。

海馬と新皮質のPVニューロンは、錐体細胞の細胞体近傍に抑制性のGABA作動性シナプスを作ることで、錐体細胞の出力(活動電位の発生)を効果的に制御すると考えられている。この場合PVニューロンは、単純に標的細胞の出力を抑えるというよりも、PVニューロン側で起きるある時間的パターンを持った一連の発火活動によって、標的となる錐体

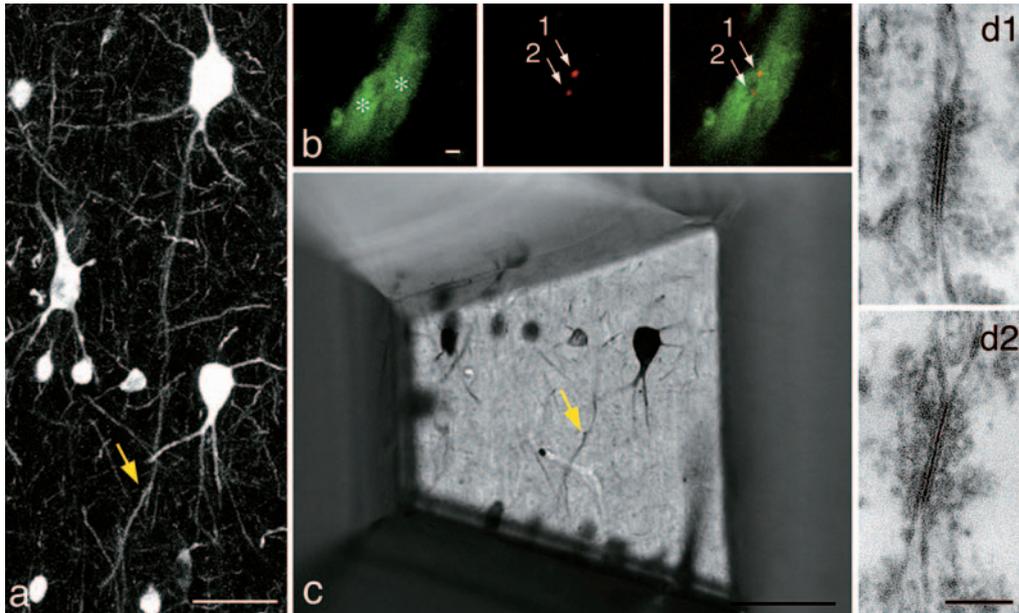


図6 PVニューロンの樹状突起コンタクト部位に局在するCx36陽性の点状構造がギャップ結合に一致することの証明. ネコ18野の2/3層. 詳細は本文参照. Scale: A, 50 μm ; B, 1 μm ; 右側パネル, 0.1 μm . 文献4) を一部改変し, 許可を得て転載. (© 2006 by the Society for Neuroscience)

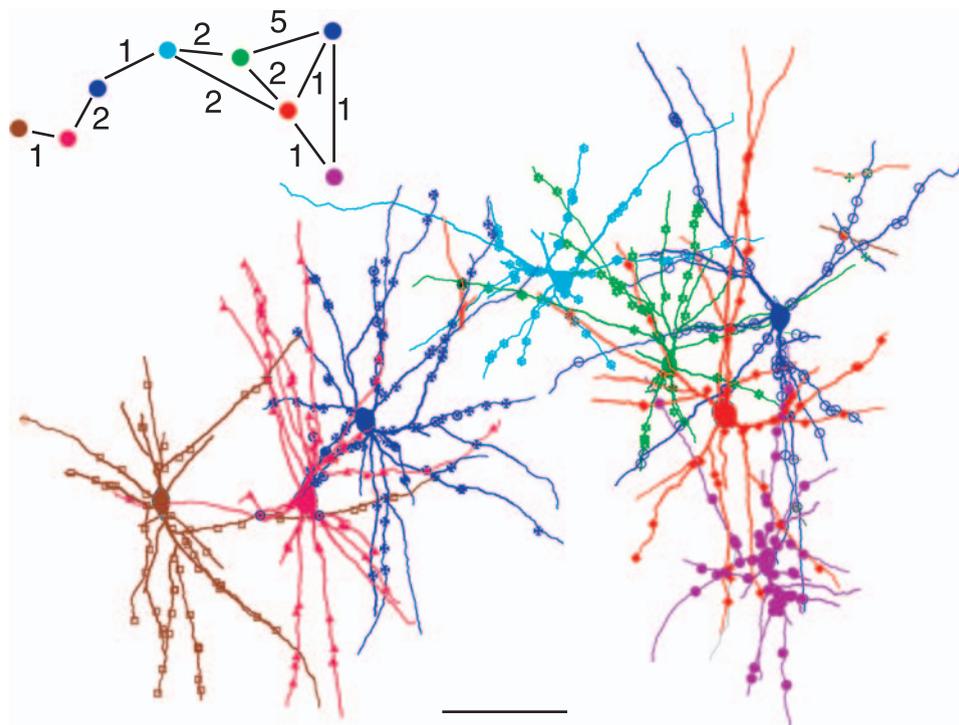


図7 ギャップ結合によって連結した樹状突起ネットワーク. ネコ18野2/3層. ここでは8個のPVニューロンがお互いにギャップ結合によって連結している. 左上に結合関係とギャップ結合数を示す. それぞれのニューロンの樹状突起に沿う各種の記号は, すべてギャップ結合を示す. そのすべての場所で, 結合する相手のPVニューロンが存在しているが, その大部分は図には描かれていない. Scale, 150 μm . 文献4) から許可を得て転載. (© 2006 by the Society for Neuroscience)

細胞にIPSPのパターンを作り出し, それにより錐体細胞の発火のタイミングを制御すると考えられている²⁰⁾. この時間的制御という考え方の背景としては, 神経細胞の情報表現のあり方をめぐる次のような最近の見方が基礎にある. すな

わち, 神経細胞が処理する情報の内容は, 神経細胞活動の発火頻度の多寡によるだけでなく (rate coding), その時間的構造にも含まれ (temporal coding), さらに同時に発火している複数の細胞の空間的組み合わせも重要である (population

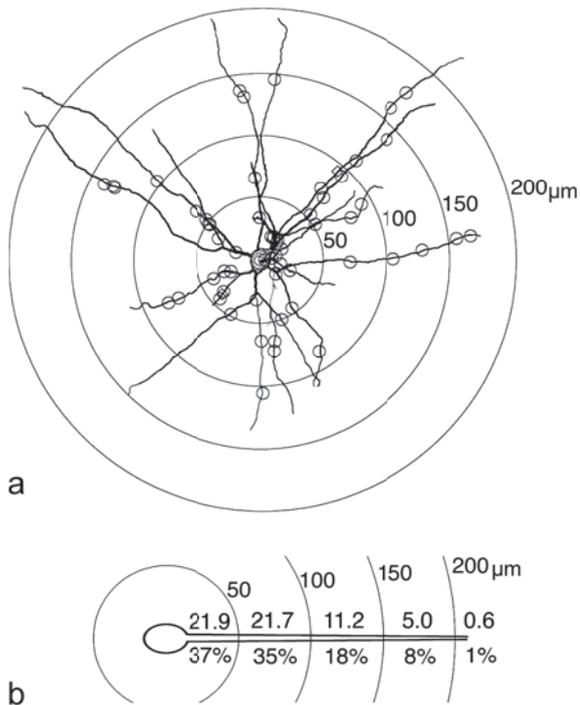


図8 PVニューロンの樹状突起に沿ったギャップ結合の分布の定量解析. ネコ18野2/3層. (a) 一つのPVニューロンの樹状突起をトレースし, 他のPVニューロンの樹状突起との間に認められたギャップ結合(白丸)をプロットした図. この細胞では59個のギャップ結合が, 細胞体からいろいろな距離に分散して存在していた. (b) aと同様の解析を行った9個のPVニューロンから得られた平均値. 文献4)を一部改変し, 許可を得て転載. (© 2006 by the Society for Neuroscience)

coding) とする考え方である.

実は大脳皮質のPVニューロンは, 錐体細胞だけでなく, お互いの細胞体の上にもGABAシナプスを多数形成している^{21,22)}(図2c, d). この相互抑制性回路は, *in vivo*で見られる数十Hzのリズミカルなニューロン活動の基礎にあると考えられているが²⁰⁾, このようなPVニューロンがさらに樹状突起間のギャップ結合によるネットワークを作っていることになる. 神経活動の時間的構造を考える際に, リズミカルな活動に加えて, ニューロン活動の同期性という問題が注目されている²³⁾. リズムと同期性は, 感覚, 運動, 認知などさまざまな高次神経活動に伴って観察されており, *temporal coding*の一つの形として議論されてきた. その発生のメカニズムには不明な点が多いが, 最近の研究から, GABAニューロン特にPVニューロン(もしくはバスケット細胞)の重要性を示唆する証拠が, 繰り返し見いだされている. 大脳皮質PVニューロンは, 化学シナプスを介する相互抑制性結合によるネットワーク, ならびにギャップ結合による樹状突起ネットワークからなる二重のネットワークを作っており¹⁵⁾, 前者によるリズムの発生, そしてギャップ結合による同期性の促進, という働きが想定できる. Cx36遺伝子のノックアウトマウスで行われた研究も^{24,25)}, この見解を支持している. 大脳皮質におけるギャップ結合ネットワークは横方向に連

続的に広がっているが, このことは, 必ずしも広い範囲のPVニューロンの全体がシンチチウムとして機能しているということを意味しない. 樹状突起を受動的なケーブルとして考える限り, その長さに沿って電気信号が減衰するからである. そうなると, 密にランダムに折り重なりながらギャップ結合によって広い領域にわたる連絡を形成する網状構造には, どのような機能的意義が考えられるであろうか?

前項で説明したように, 視覚皮質のPVニューロンは, 方位選択性カラムに依存せず, 無秩序的で密な樹状突起ネットワークを形成している. この空間的トポロジーの意義を考える際に, 視覚皮質には方位選択性カラムだけでなく, 動きの方向や縞模様の間隔など, 視野にある物体が持つさまざまな特性に対応する異なったカラムが, 複雑に重なり合いながらも同じ空間を共有しているという事情を想起することが理解を助けるであろう²⁶⁾. つまり, ギャップ結合性ネットワーク, あるいはインターニューロン全般においてもそうであるが, それらは方位選択性カラムにおける情報処理に特化しているわけではない. PVニューロンのギャップ結合ネットワークは, 特定のカラムに束縛されずどのような組み合わせも可能にする構造をとっており, それによりさまざまな内容が多彩に組み合わせられた入力情報に対してflexibleに対応することが可能となって, 入力により今活性化されている領域の中で, 種々の空間的パターンで発火している錐体細胞の1セット(アセンブリ)の時間構造を同期化させる役割が期待される. 情報を伝える主ニューロン(principal neuron: 視床のrelay cellや新皮質の錐体細胞など)のネットワークには, 末梢から中枢に至るまで, 体性局在のような秩序立った結合関係があり, さらに視床や大脳皮質内部の細胞構築にも, カラムなどの秩序立った単位構造がある. 対照的に抑制性インターニューロンは, 情報伝達の担い手というよりも制御システムを構成すると考えられるが, ギャップ結合による密でランダムな連続的構成を取ることによって, より自由でflexibleな作動原理を制御系に与えているのではないかと推測される.

7. おわりに

脳におけるギャップ結合は, 長く電子顕微鏡による同定を唯一の確実な手段として, その存在の証明に努力が注がれてきた. しかしごく最近の生理学・形態学・遺伝子クローニングの進歩によって, 神経細胞間に存在するギャップ結合の解明が, さまざまな角度から飛躍的に進んでいる. われわれは電子顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡を組み合わせた新しい方法によって, 光学顕微鏡レベルでギャップ結合を確実に同定し, それで作るネットワークの3次元構造を広い視野で解析する方法を確立した. ギャップ結合によって神経細胞が形成する「もう一つのネットワーク」の大きな広がりが見明らかとなりつつある. そこで得られた3次元構造は, 大脳皮質神経細胞の集団的活動におけるリズムと同期性の実現に関連する未知のネットワークが, 大脳皮質の中に驚くほどの密度と広がりを持って内在していたことを示している.

文 献

- 1) Hestrin, S. and Galarreta, M.: *Trends Neurosci.*, **28**, 304–309 (2005)
- 2) Connors, B.W. and Long, M.A.: *Annu. Rev. Neurosci.*, **27**, 393–418 (2004)
- 3) Fukuda, T. and Kosaka, T.: *J. Neurosci.*, **20**, 1519–1528 (2000)
- 4) Fukuda, T., Kosaka, T., Singer, W. and Galuske, R.A.W.: *J. Neurosci.*, **26**, 3434–3443 (2006)
- 5) Hama, K.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **6**, 61–66 (1959)
- 6) Hama, K.: *Anat. Rec.*, **141**, 275–293 (1961)
- 7) Sotelo, C. and Korn, H.: *Int. Rev. Cytol.*, **55**, 67–107 (1978)
- 8) Sloper, J.J. and Powell, T.P.S.: *Proc. R. Soc. Lond. B*, **203**, 39–47 (1978)
- 9) Kosaka, T. and Hama, K.: *J. Comp. Neurol.*, **231**, 150–161 (1985)
- 10) Kosaka, T.: *Brain Res.*, **271**, 157–161 (1983)
- 11) Katsumaru, H., Kosaka, T., Heizmann, C.W. and Hama, K.: *Exp. Brain Res.*, **72**, 363–370 (1988)
- 12) Kita, H., Kosaka, T. and Heizmann, C.W.: *Brain Res.*, **536**, 1–15 (1990)
- 13) Galarreta, M. and Hestrin, S.: *Nature*, **402**, 72–75 (1999)
- 14) Gibson, J.R., Beierlein, M. and Connors, B.W.: *Nature*, **402**, 75–79 (1999)
- 15) Fukuda, T. and Kosaka, T.: *Neurosci. Res.*, **38**, 123–130 (2000)
- 16) Fukuda, T. and Kosaka, T.: *Neuroscience*, **120**, 5–20 (2003)
- 17) Condorelli, D.F., Parenti, R., Spinella, F., Sallinaro, A.T., Belluardo, N., Cardile, V. and Circirarta, E.: *Eur. J. Neurosci.*, **10**, 1202–1208 (1998)
- 18) Söhl, G., Degen, J., Teubner, B. and Willecke, K.: *FEBS Lett.*, **428**, 27–31 (1998)
- 19) Peinado, A., Yuste, R. and Katz, L.C.: *Neuron*, **10**, 103–114 (1993)
- 20) Buzsáki, G. and Chrobak, J.J.: *Curr. Opin. Neurobiol.*, **5**, 504–510 (1995)
- 21) Sik, A., Penttonen, M., Ylinen, A. and Buzsáki, G.: *J. Neurosci.*, **15**, 6651–6665 (1995)
- 22) Fukuda, T., Aika, Y., Heizmann, C.W. and Kosaka, T.: *Neurosci. Res.*, **26**, 181–194 (1996)
- 23) Singer, W.: *Neuron*, **24**, 49–65 (1999)
- 24) Deans, M.R., Gibson, J.R., Sellitto, C., Connors, B.W. and Paus, D.L.: *Neuron*, **31**, 477–485 (2001)
- 25) Buhl, D.L., Harris, K.D., Hormuzdi, S.G., Monyer, H. and Buzsáki, G.: *J. Neurosci.*, **23**, 1013–1018 (2003)
- 26) Hübner, M., Shoham, D., Grinvald, A. and Bonhoeffer, T.: *J. Neurosci.*, **17**, 9270–9284 (1997)