

令和元年6月20日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04256

研究課題名(和文) 嗅球神経回路の可塑性における末梢性・中枢性シナプス入力機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of synaptic inputs from periphery and central brain regions in the plasticity of olfactory neural circuit

研究代表者

山口 正洋 (Yamaguchi, Masahiro)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・教授

研究者番号：60313102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：成体脳においても嗅球では新しいニューロンが生まれ生死の選別を受けている。研究代表者はマウスを用いて、この選別が匂いに基づく末梢性シナプス入力と上位中枢の嗅皮質からの中枢性シナプス入力の相互作用によって行われることを明らかにしてきた。本研究では、光・薬理遺伝学を利用して嗅球新生ニューロンへの末梢性・中枢性シナプス入力を操作する実験を通じて、末梢性シナプス入力単独ではなく、これを報酬と結びつけて学習させることによって新生ニューロンの発達が促進することを見出し、更にこの学習に中枢性シナプス入力に関わっていることを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新しいニューロンは周りのニューロンとの相互作用のなかで働いている。したがって、ニューロンの相互作用を担うシナプス入力の役割を理解することは、新しいニューロンを有効に活用して脳機能を高める方法を考える上で極めて重要である。新しいニューロンの発達を促進するシナプス機構の理解は、脳の発達・成長を担う基本メカニズムを明らかにするだけでなく、教育や再生医療においても大きく貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Even in the adult, new neurons are generated in the olfactory bulb and are selected between survival and death. By using mice as model animals, we previously revealed that this selection of new neurons is directed by the combination of synaptic inputs from periphery reflecting odor experience and synaptic inputs from central brain regions. In this project, we manipulated the individual synaptic inputs by using optogenetic and pharmacogenetic techniques, and revealed that association of peripheral synaptic inputs and reward learning facilitates development of new neurons. We further suggested that centrally-mediated synaptic inputs are involved in this facilitation of new neurons by association learning.

研究分野：神経科学

キーワード：嗅球 新生ニューロン 生死選別 スパイン発達 末梢性シナプス入力 中枢性シナプス入力

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

成体脳においても嗅球や海馬歯状回では、新しく生まれたニューロンが常に神経回路に組み込まれ、神経回路に大きな可塑的变化をもたらしている。嗅球新生ニューロンは匂い経験依存的に選別を受けその約半数が神経回路に組み込まれるが、研究代表者はこの選別が食後の睡眠時に促進すること、そして嗅球の上位中枢である嗅皮質からの中枢性入力が増進し、これが選別を促進するシグナルであることを見出した。また、マウスに電気ショックによる恐怖行動を誘導すると、電気ショックのわずか数分後に嗅球新生ニューロンの細胞死が顕著に誘導され、これも嗅皮質からの中枢性入力によっておこることを見出した。

以上のことから研究代表者は、嗅球新生ニューロン選別が「匂いによる末梢性シナプス入力」と「嗅皮質からの中枢性シナプス入力」によって行われるという新しい概念を提唱した。

2. 研究の目的

しかし、嗅球新生ニューロンに対する末梢性シナプス入力と中枢性シナプス入力がどのように相互作用してニューロンの生死選別を行っているか、詳細な神経分子機構は全く不明である。これを理解するためには、2つのシナプス入力を個別に、また統合的に操作する必要がある。

そこで本研究では、光・薬理遺伝学を用いて嗅球新生ニューロンへの末梢性・中枢性入力を個別あるいは統合的に操作し、嗅球新生ニューロンの組み込みと排除のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

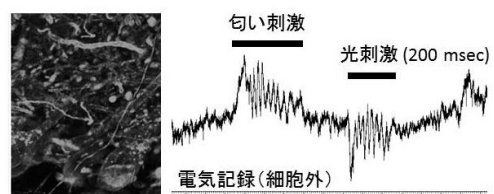
3. 研究の方法

- (1) レンチウイルスを用いて嗅球新生ニューロンを蛍光蛋白標識し、そのシナプス構造を解析する。
- (2) 嗅球投射ニューロンにチャンネルロドプシン(ChR2)を発現するマウスを作成し、光刺激によって嗅球新生ニューロンへの末梢性シナプス入力を活性化する。
- (3) 嗅皮質ニューロンに ChR2 あるいは外来性リガンドで活性化できる変異型 G 蛋白共役受容体を発現するマウスを作成し、光刺激あるいは薬剤投与によって嗅球新生ニューロンへの中枢性シナプス入力を活性化する。
- (4) 以上の実験系を組み合わせ、2つのシナプス入力が生体ニューロンの組み込みをどのように制御しているかを明らかにする。

4. 研究成果

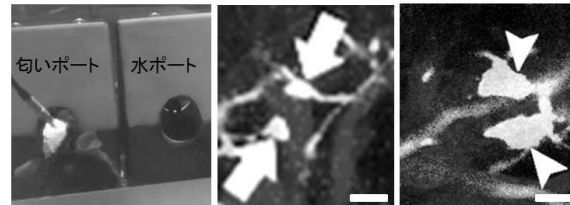
(1) 嗅球新生ニューロンをGFP発現レンチウイルスを用いて標識し、詳細な形態解析を行う手法を確立した。特に、既存の嗅球投射ニューロンと接触して光刺激によって活性化された新生ニューロンのシナプスと、既存の投射ニューロンと接触しているが光刺激によって活性化されなかった新生ニューロンのシナプスを区別して同定できる方法を確立した。

(2) 嗅球投射ニューロン特異的にCre recombinaseを発現するPcdh21-Creマウスの嗅球に、Cre依存的にチャンネルロドプシン(ChR2)を発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)を注入して、嗅球投射ニューロン特異的にChR2を発現させること、またその嗅球に光ファイバーを留置して光刺激することにより、新生ニューロンへの末梢性シナプス入力を活性化する系を確立した。光刺激の条件を検討し、200

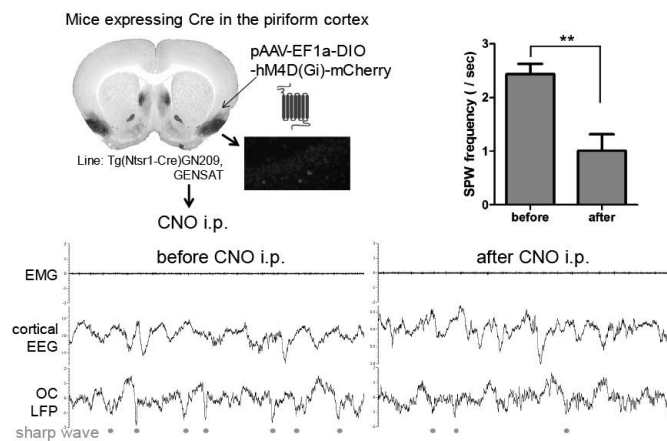


msecの連続刺激によって生理的なオシレーション活動を誘導できることを見出し、これを末梢性シナプス入力の活性化条件とした（右図）。

(3) 光刺激によって末梢性シナプス入力を受けた新生ニューロンのシナプス構造（スパイン）は若干大きくなったが、それほど顕著な増大は見られなかった（下図、中央パネル）。一方、光刺激による末梢性シナプス入力促進の際に水報酬との連合学習を行うと（下図、左パネル）、新生ニューロンのスパインが著しく大きく発達することが判明した（下図、右パネル）。これは連合学習によって嗅皮質からの中枢性入力が促進し、末梢性シナプス入力と中枢性シナプス入力が相互作用することによるものと考えられた。



(4) 更に嗅皮質の錐体細胞特異的にCreを発現するNtsr1-CreマウスとAAVを用いて嗅皮質錐体細胞にChR2や変異型G蛋白共役受容体を発現させ、光刺激やリガンド（CNO）投与で嗅皮質からの中枢性シナプス入力の活動調節ができることを確認した（右図）。



以上により、末梢性シナプス入力と中枢性シナプス入力を操作し、嗅球新生ニューロンの生死選別およびスパイン発達のシナプス入力による制御機構を解明する実験系の樹立を達成

した。この成果はシナプス統合の具体的な神経分子機構の解明に発展すると考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. Murofushi W, Mori K, *Murata K, *Yamaguchi M. Functional development of olfactory tubercle domains during weaning period in mice. *Scientific Reports*. 8: article 13204 (2018) 査読有 doi: 10.1038/s41598-018-31604-1.
2. Kawai H, Kawaguchi D, Kuebrich B, Kitamoto T, Yamaguchi M, Gotoh Y, *Furutachi S. Area-specific regulation of quiescent neural stem cells by Notch3 in the adult mouse subependymal zone. *Journal of Neuroscience*. 37: 11867-11880 (2017) 査読有 doi: 10.1523/JNEUROSCI.0001-17.2017.
3. *Yamaguchi M. The role of sleep in the plasticity of the olfactory system. *Neuroscience Research*. 118: 21-29 (2017) 査読有 doi: 10.1016/j.neures.2017.03.014.
4. *Yamaguchi M. Functional sub-circuits of the olfactory system viewed from the olfactory bulb and the olfactory tubercle. *Frontiers in Neuroanatomy*. 11: article 33 (2017) 査読有 doi: 10.3389/fnana.2017.00033.
5. *Yamaguchi M, *Seki T, Imayoshi I, Tamamaki N, Hayashi Y, Tatebayashi Y, Hitoshi S. Neural stem cells and neuro/gliogenesis in the central nervous system: understanding the structural and functional plasticity of the developing, mature, and diseased brain. *Journal of Physiological Sciences*. 66: 197-206 (2016) 査読有 doi: 10.1007/s12576-015-0421-4.

6. Naruse M, Ishino Y, Kumar A, Ono K, Takebayashi H, Yamaguchi M, Ishizaki Y, Ikenaka K, *Hitoshi S. The dorsoventral boundary of the germinal zone is a specialized niche for the generation of cortical oligodendrocytes during a restricted temporal window. *Cerebral Cortex*. 26: 2800-2810 (2016) 査読有 doi: 10.1093/cercor/bhv141.

7. Murata K, Kanno M, Ieki N, *Mori K, *Yamaguchi M. Mapping of learned odor-induced motivated behaviors in the mouse olfactory tubercle. *Journal of Neuroscience*. 35: 10581-10599 (2015) 査読有 doi: 10.1523/JNEUROSCI.0073-15.2015.

8. Fukuyama Y, Okada K, Yamaguchi M, Kiyono H, Mori K, *Yuki Y. Nasal administration of cholera toxin as a mucosal adjuvant damages the olfactory system in mice. *PLoS One*. **10**: e0139368 (2015) 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0139368.

9. Komano-Inoue S, Murata K, Mori K, *Yamaguchi M. Rapid induction of granule cell elimination in the olfactory bulb by noxious stimulation in mice. *Neuroscience Letters*. 598: 6-11 (2015) 査読有 doi: 10.1016/j.neulet.2015.05.002.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 山口正洋. 嗅球新生ニューロンへの入力と選別機構. 第 15 回 成体脳のニューロン新生懇談会 (2019)

2. 山口正洋. 匂い行動の発達と学習に関わる嗅皮質領域 日本味と匂学会第 52 回大会 (2018)

3. Yamaguchi M. Neural circuit for acquiring distinct odor-guided motivated behaviors in mice. 第 95 回日本生理学会大会 (2018)

4. 山口正洋. 匂いが食のモチベーションを誘導する神経機構. 第 72 回 日本栄養・食糧学会大会 (2018)

5. Yamaguchi M. Neural circuit mechanism of odor-induced motivation of feeding. 第 40 回日本分子生物学会・第 90 回日本生化学会合同大会 (2017)

6. 山口正洋. 食行動における嗅覚系情動回路 第 93 回日本生理学会大会 (2016)

7. 三瓶 雅迪、小林 和人、森 憲作、村田 航志、山口 正洋. 嗅覚情報にもとづく餌探索行動へのマウス嗅結節内側部の関与. 第 38 回日本神経科学大会 (2015)

8. 室伏 航、村田 航志、森 憲作、山口 正洋. マウス新生仔の離乳期に一致した嗅結節の食餌関連機能ドメインの発達. 第 38 回日本神経科学大会 (2015)

〔図書〕(計 1 件)

山口正洋 (三品昌美編集) 化学同人 感覚入力から行動に至る分子基盤と神経回路 (分子脳科学) 2015 13(312)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。