

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06735

研究課題名(和文) マウスにおける機能的嗅覚神経ネットワークの同定

研究課題名(英文) Neural network regulating olfactory functions in mice

研究代表者

石井 智浩 (ISHII, Tomohiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：60549947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：外部からの情報がどのような神経ネットワークによって処理されているかを理解するには、特定の情報処理に関与する神経と神経の接続を明らかにすることが重要である。今回の研究ではシナプスを超えて機能するDNA組換え酵素Creを用いて新規遺伝子改変マウスを作製した。標的細胞に隣接する神経細胞でCre-loxP反応を引き起こすことで蛍光タンパク質を発現させて神経を可視化できるかどうかを検証した。

研究成果の概要(英文)：To understand how sensory information is processed in the brain, it is important to visualize the neural network processing a particular information. We developed novel transgenic mice and tried to visualize neural connections. Modified DNA recombinase Cre molecules are transmitted to neighboring neurons through synaptic connections. We tested if the transsynaptic Cre molecules could induce DNA recombination in neurons neighboring to the target cells, resulting in fluorescent protein expression in these neurons.

研究分野：細胞生物学

キーワード：神経回路 発生工学 嗅覚

## 1. 研究開始当初の背景

動物は外界からもたらされる多様な情報に適切に対応して生存を続けている。外部から受け取った情報は脳神経によって処理され最終的に様々な行動・情動などが引き起こされる。そのメカニズムを理解するには、特定の情報に関する神経ネットワーク(神経と神経のつながり)を可視化する技術が重要となってくる。

多くの動物では外界の情報受容を化学感覚に依存しており、様々な行動・情動がそれぞれ特定の化学物質によって引き起こされる。マウス嗅覚系では約 1000 種類の嗅覚受容体(odorant receptor, OR)遺伝子が発現している。個々の嗅神経細胞は特定の一つの OR を発現し、同じ OR を発現する細胞の軸索は嗅球上において特定の領域で収束して二次ニューロンとシナプス結合し糸球と呼ばれる構造体を形成する。嗅覚受容体を発現する一次ニューロン(嗅神経細胞)の遺伝学的な可視化によって嗅上皮から嗅球への軸索投射が詳細に解析されている。

嗅覚系の二次・三次ニューロンのネットワークについても解析が進展するようになった。代表的なものとして、改変型狂犬病ウイルスを嗅皮質の様々な領域に感染させることにより、神経ネットワークの可視化が行われている。また経シナプス性トレーサー WGA (小麦胚芽レクチン)を嗅覚上皮の嗅覚系一次ニューロンに発現させることで二次ニューロン以降の神経ネットワークの可視化が行われている。ウイルスを用いる実験は汎用性が高く、また明瞭に神経ネットワークを可視化することができる点が大きな利点である。ただし、技術的な熟練が必要であり、高い安全性が求められるといったハードルがある。WGA を用いたトランスジェニックマウスの実験の場合、プロモーターを選ぶことで再現性良く細胞種特異的な発現が可能であり、また解析が容易であるという利点があるが、神経シナプスを超えて移動する効率が高くないため、接続している神経細胞を明瞭に可視化することは容易ではない。WGA のような発現特異性・簡便性とウイルスのような経シナプス輸送で減衰しない性質を同時に併せ持つ手法が望まれる。最近、WGA あるいは TTC(テタヌス毒素 fragment C)と DNA 組換え酵素 Cre リコンビナーゼを融合させた WGA::Cre、Cre::TTC が報告された。WGA::Cre は主に順行性に、Cre::TTC は逆行性に、経シナプスのように輸送され、接続する神経細胞で Cre/loxP 組換えを引き起こす。WGA::Cre は細胞内でどのように核へ移行することができるのかは不明であるが、わずかに移行する分子が Cre-loxP 反応を引き起こすのだと推測される。WGA::Cre や Cre::TTC のようなツールを用いて、トランスジェニックマウスのみでシナプス接続する神経を可視化・遺伝子操作できる可能性が出てきた。

## 2. 研究の目的

膨大で複雑に絡み合った神経のネットワークの中から特定の情報に関与する神経接続を可視化できる簡便なシステムを構築することを目的としている。Cre リコンビナーゼを用いるので可視化のみならず神経接続特異的な遺伝子改変も想定している。対象としてはこれまでに研究をしてきた嗅覚に関わる神経ネットワークに注目し、遺伝子改変マウスの掛け合わせだけで、特定の経シナプス神経ネットワークが可視化できるシステムを目指す。用いる手法の特徴は、上述した経シナプス神経回路を可視化できるウイルスを用いた方法と WGA や TTC を用いたトランスジェニックの方法の利点を併せ持つことである。つまり、WGA や TTC のみであれば一つのシナプスを超えるたびに、その移行効率の低さから分子数が減少してしまうが、シグナルを増幅することで減衰を防ぐ仕組みにする。

具体的には 2 つの神経ネットワークに注目する。一つ目は特定の匂い情報に関わる神経ネットワークを理解する目的で、匂い受容体遺伝子 M71 を発現する神経細胞群から順行的に接続する神経細胞を可視化する。これにより匂い情報が脳内のどのような部位で処理されているのかが理解できる。二つ目は視床下部腹内側核(VMH)に入力する神経細胞のネットワークに注目する。VMH は生殖、攻撃、恐怖、食欲を制御する脳領域であることが知られている。嗅覚情報を含め多様な情報がどのような神経ネットワークを通して処理され、VMH を経由して出力へとつながっていくのかを理解したい。この二つ目の実験系では、一つ上流の神経細胞のみならず、さらに上流の神経細胞も可視化できるような実験デザインにする。

## 3. 研究の方法

## (1) Cre リコンビナーゼ活性の確認

トランスジェニックマウスに利用する Cre リコンビナーゼは、WGA::Cre と Cre::TTC である。WGA::Cre は Deisseroth のグループが開発したアデノ随伴ウイルスベクター mCherry-IRES-WGA-Cre に含まれる WGA::Cre を用いる。Cre::TTC については、すでに報告のある GFP::TTC の GFP を Cre と入れ替えることで作製した。まずはこれらの Cre コンストラクトがゲノムに組み込まれた loxP を認識して組換えを起こすかどうか調べることにした。WGA::Cre に関してはアデノ随伴ウイルス Cre リポーターを用いた系で DNA 組換えを起こすことが報告されているが、ゲノム上の loxP を組み換えるかどうかはこれまで実験例がなかった。

アッセイ系として培養細胞 HEK293-mTmG を作製した。これは HEK293 細胞に tdTomato と

GFP を含んだコンストラクトを導入した安定株で、通常 tdTomato を発現しているが、Cre リコンビナーゼがあると組換えを起こし、GFP を発現し始めるものである。作製した Cre リコンビナーゼを含むコンストラクトを導入して活性を調べた。

#### (2) トランスジェニックマウスの作製

トランスジェニックマウスを2種類作製した。一つ目は嗅神経細胞特異的に WGA::Cre を発現させるために、プロモーターとして嗅覚受容体 M71 の発現制御領域を用いる。M71 はマウスの 1000 種類ある嗅覚受容体の中の一つで、嗅上皮の神経細胞のうちの約 0.1% の細胞で発現する。作製した具体的なコンストラクトは M71-IRES-WGA::Cre-IRES-mGFP (M71-WGA-Cre) である。mGFP は細胞膜局在型 GFP で、軸索を明瞭に可視化することができる。このトランスジェニックマウスを Cre リポーターマウス ROSA-tomato と掛け合わせた。この Cre リポーターマウスは、Cre リコンビナーゼにより赤色蛍光タンパク質 tdTomato を発現する。WGA::Cre が経シナプ的に嗅球の二次ニューロンである僧帽細胞・房飾細胞に輸送されれば、tdTomato は M71 神経細胞のみならず二次ニューロンでも発現が誘導される可能性がある。二次ニューロンでの tdTomato の発現は CAG プロモーターに制御されるので強く発現することになる。

二つ目は Cre 依存的に Cre::TTC と蛍光タンパク質が発現するコンストラクトである。具体的には CAG プロモーター下に Cre 依存的に反転する逆向き Cre::TTC-IRES-mtdTomato (DIO-Cre-TTC) をつないで作製した。mtdTomato は膜移行型 tdTomato である。このコンストラクトを持つマウス個体では、ある細胞で Cre リコンビナーゼが発現していると、その細胞で Cre::TTC と mtdTomato が発現する。その Cre::TTC がさらに上流の神経細胞へと輸送され、そこで Cre::TTC と mtdTomato が発現誘導される。これを繰り返してシナプス接続する神経ネットワークが可視化されるというデザインである。コンストラクトが Cre 依存的に反転して遺伝子が発現する仕組みなので、トランスジェニックマウスの作製では、ゲノム上に1コピーで挿入し、さらに部位特異的な遺伝子導入の位置効果をなくし、導入遺伝子の高発現を実現できる手法が良い。それに適した TARGATT 法という部位特異的 DNA 挿入方法を用いた。実際には TARGATT 法はうまくいかず、並行して通常のトランスジェニックマウスの方法で作製したマウスを用いて実験を行った。このマウスを SF1-Cre マウスと掛け合わせた。SF1 は視床下部腹内側核の細胞群で特異的に発現する転写因子で、SF1-Cre マウスではそれらの細胞群で Cre リコンビナーゼを発現する。これにより DIO-Cre::TTC と SF1-Cre の掛け合わせたマウスでは、視床下部腹内側核に入力する神経ネットワークが可視化されることを

期待している。

## 4. 研究成果

### (1) 培養細胞における Cre の活性の確認

WGA::Cre と Cre::TTC がゲノム上の loxP を認識して DNA 組換えを起こすかどうかを調べるためにそれらの発現コンストラクトを HEK293-mTmG 細胞にトランスフェクションした。どちらのコンストラクトも組換えを起こしたことを示す GFP の発現が観察された。このことによりこれら Cre 融合タンパク質はゲノム DNA の組換え活性を持つことが確かめられた。ただし、コントロールとして導入した野生型の Cre リコンビナーゼと比較すると組換え効率はかなり低下していた。シナプスを超えて移動する Cre 融合タンパク質は量が少ないと考えられるので、Cre 融合タンパク質は高発現していることが最低限必要であると考えられる。

### (2) トランスジェニックマウスの作製

M71-WGA-Cre と DIO-Cre-TTC のトランスジェニックコンストラクトを作製した。後者については培養細胞を用いて Cre リコンビナーゼにより逆向き Cre::TTC-IRES-mtdTomato が反転して発現を始めることを確認した。HEK293 細胞にトランスフェクションしたところ、Cre 依存的に mtdTomato の発現を誘導することができた。

M71-WGA-Cre マウスは通常の受精卵 (C57BL/6 系統) へのインジェクションによりトランスジェニックマウスを作製した。その結果2ラインのマウスを得ることができた。DIO-Cre-TTC マウスは TARGATT 法によるトランスジェニックマウス作製を試みたが、成功しなかった。並行して行った通常のトランスジェニックマウス作製法では2ライン(#64と#68)のマウスを得ることができた。

### (3) トランスジェニックマウスの解析

DIO-Cre-TTC マウスは SF1-Cre マウスと掛け合わせて解析を行った。DIO-Cre-TTC マウスは2ラインとも解析した。コントロールとして SF1-Cre と ROSA-tomato を掛け合わせたマウスを解析した。このマウスでは SF1 発現細胞が赤色の蛍光で標識されることになる。10週齢のマウスから脳を取り出し、脳全体から連続切片を作製して観察した。tdTomato の赤色の蛍光を直接観察する方法と、抗体に抗 RFP 抗体 (抗 tdTomato 抗体) を使い、シグナルを増幅して検出する ABC 法を用いた免疫化学染色により観察する方法を行った。コントロールマウスでは明瞭な tdTomato の蛍光を視床下部腹内側核の細胞と近傍の神経突起に見ることができた。免疫化学染色でも明瞭な DAB による染色を観察することができた。一方、DIO-Cre-TTC と SF1-Cre の掛け合わせマウスでは、tdTomato の蛍光も免疫化学染色による染色も観察することができなかった。トランスジェンが発現困難なゲノム領域に挿入されていたか、複

数コピーのトランスジーンが挿入されたため Cre による組換えで発現しない構造になっていた可能性が考えられる。

M71-WGA-Cre マウスはまずホルマウントで GFP の観察を行った。M71 トランスジーン の発現が野生型 M71 の発現パターンを反映しているかを確かめた。ただし、嗅覚受容体は同じ発現制御領域を持っていても、同一細胞で2種類の受容体を発現しないので、内在性の M71 とトランスジーン M71 は異なる細胞で発現することになる。トランスジェニックマウスでは GFP は嗅上皮の背側の領域の嗅神経細胞でまばらに発現しており、それらの軸索は嗅球の背側の領域に収束していた。このパターンは野生型 M71 発現細胞と同様である。#64 ラインと#68 ラインを比較すると前者の方が GFP を発現している細胞が多い。M71 神経細胞（一次ニューロン）の情報を受け取る二次ニューロンの数が一定だとすると、ライン#64 の方がより多くの一次ニューロンの入力の一つ一つの二次ニューロンが受け取ることになる。つまり、#64 ラインの方がより多くの WGA::Cre を二次ニューロンが受け取ると考えられる。

次に M71-WGA-Cre マウスと ROSA-tdTomato マウスを掛け合わせて解析した。Cre リコンビナーゼが十分な時間機能できるように、マウスは 10 週齢以上のものを使用した。ホルマウントで嗅球を解析したところ、2つのラインのマウスとも GFP 蛍光の軸索では tdTomato の蛍光も見られた。詳細に解析するために嗅上皮と嗅球の切片を作製し観察を行った。嗅上皮を観察したところ GFP(+)tdTomato(+) の細胞の他に GFP(-)tdTomato(+) の細胞も存在していることが分かった。後者の細胞はかつて一時的に M71-WGA-Cre を発現した履歴があることを示している。次に嗅球を解析したところ GFP(+)tdTomato(+) の系球が観察された。これは M71-WGA-Cre を発現している嗅神経細胞群の軸索末端集合部位である。注意深く観察すると GFP(-) であるが tdTomato(+) の軸索が周辺の系球にまばらに入り込んでいることが分かった。GFP(+)tdTomato(+) の系球において WGA::Cre が二次ニューロンに受け渡されているはずであるので、その系球の近傍の切片を詳細に解析した。WGA::Cre により ROSA-tdTomato の発現が誘導されれば、二次ニューロンが tdTomato の蛍光で標識されることになる。しかしながら、すべての GFP(+)tdTomato(+) の系球近傍を調べても、tdTomato で標識される二次ニューロンは観察されなかった。2 ラインとも同様の結果だった。

#### (4) 考察

WGA::Cre の組換え活性は培養細胞ではそれほど高くなかったが、M71-WGA-Cre マウスにおける嗅神経細胞では WGA::Cre が感度よく Cre リポーター ROSA-tdTomato の DNA 組換えを誘導した。過去に一過的に WGA::Cre を

発現したと思われる細胞においても tdTomato の発現を誘導している。これは本来の目的からするとノイズを大きくする原因になりうる。嗅神経細胞で発現した WGA::Cre が、神経接続する二次ニューロン（僧帽細胞・房飾細胞）での Cre-loxP 反応を引き起こすことはなかった。おそらく約 100 個の嗅神経細胞が一つの僧帽細胞・房飾細胞に接続していると考えられることを考えると、WGA::Cre を適用するトランスジェニックシステムとしては最適な系の一つであると考えられる。今回実験がうまくいかなかったことから WGA::Cre を用いたトランスジェニックシステムはうまく機能しない可能性が高いと思われる。シナプスを越えた WGA::Cre の分子数がまだ少ない可能性と、輸送された WGA::Cre が核には極めて入りにくい可能性が考えられる。WGA::Cre 発現ウイルスと Cre リポーターウイルスを組み合わせた方法では、神経接続する細胞における Cre-loxP 反応が機能することが報告されている。このことから、本研究計画の目的からは外れるが、M71-WGA-GFP の GFP ポジティブの系球に Cre リポーター発現ウイルスを注入し、そこに樹状突起を接続する僧帽細胞・房飾細胞に感染させることで、M71 神経細胞と接続する二次ニューロンを特異的に可視化することができる可能性がある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Sachiko Akiyoshi, Tomohiro Ishii, Zhaodai Bai, Peter Mombaerts. Subpopulations of vomeronasal sensory neurons with coordinated coexpression of type 2 vomeronasal receptor genes are differentially dependent on Vmn2r1. *Eur. J. Neurosci.* 2018.04; 47 (7): 887-900. DOI: 10.1111/ejn.13875 (査読有)

石井 智浩, 中田 隆夫. 光スイッチによる細胞内 Ca<sup>2+</sup>シグナル制御 実験医学. 2016.03; 34 (4): 601-606. (査読なし)

Tomohiro Ishii, Koji Sato, Toshiyuki Kakumoto, Shigenori Miura, Kazushige Touhara, Shoji Takeuchi, Takao Nakata. Light generation of intracellular Ca<sup>2+</sup> signals by a genetically encoded protein BACCS. *Nat Commun.* 2015; 6 8021. DOI:10.1038/ncomms9021 (査読有)

[学会発表](計7件)

石井智浩、佐藤幸治、中田隆夫. 細胞内

カルシウムシグナルの光遺伝学ツール  
BACCS. 第8回光操作研究会 2016.09.29  
慶応義塾大学・三田キャンパス、東京  
Tomohiro Ishii, Koji Sato, Toshiyuki  
Kakumoto, Shigenori Miura, Kazushige  
Touhara, Shoji Takeuchi, Takao Nakata.  
Light control of intracellular Ca<sup>2+</sup>  
signals by a genetically encoded  
protein, BACCS. 第39回日本神経科学大  
会 2016.07.21 パシフィコ横浜, 横浜  
Tomohiro Ishii, Takao Nakata. Optical  
control of Ca<sup>2+</sup> signaling by a  
synthetic protein BACCS.  
International and Interdisciplinary  
Symposium 2016 "Towards a New Era of  
Cardiovascular Research" 2016.07.13  
Tokyo Medical and Dental University,  
Tokyo  
関詩織, 石井智浩, 中田隆夫. BACCS によ  
る細胞内 Ca<sup>2+</sup>シグナルの光操作と Ca<sup>2+</sup>  
濃度変化および細胞事象の同時イメージ  
ング. 第121回日本解剖学会総会・全国  
学術集会 2016.03.28 ビックパレットふ  
くしま  
石井智浩, 中田隆夫. 細胞内カルシウム  
シグナルを光によって操作する新規光遺  
伝学ツール BACCS の開発. 第121回日本  
解剖学会総会・全国学術集会 2016.03.28  
ビックパレットふくしま  
石井智浩, 佐藤幸治, 角元利行, 三浦重  
徳, 東原和成, 竹内昌治, 中田隆夫. 細  
胞内カルシウムシグナルを光で操作する  
遺伝学ツールの開発. BMB2015 第38回日  
本分子生物学会年会 第88回日本生  
化学会大会 合同大会 2015.12.01 神戸ポ  
ートピアアイランド  
佐藤幸治, 石井智浩, 竹内昌治, 中田隆  
夫. マウス嗅神経細胞における光活性型  
カルシウムチャネルの発現. 日本味と匂  
い学会第49回大会 2015.09.24 じゅう  
ろくプラザ(岐阜)

〔その他〕

ホームページ等

研究室

<http://www.tmd.ac.jp/cbio/index.html>

「光で細胞内カルシウムシグナルを自在に  
操る技術を開発」 プレスリリース

[http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouho  
u/20150819.pdf](http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20150819.pdf)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

石井 智浩 (ISHII, Tomohiro)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・講  
師

研究者番号：60549947

### (2)研究分担者

中田 隆夫 (NAKATA, Takao)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教  
授

研究者番号：50218004