

令和元年6月14日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06144

研究課題名(和文) マウス嗅覚系におけるシナプス形成特異性の検証

研究課題名(英文) Elucidating mechanisms of synapse specificity in the mouse olfactory system

研究代表者

竹内 春樹 (Takeuchi, Haruki)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・特任准教授

研究者番号：70548859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,000,000円

研究成果の概要(和文)：高等動物が外界の情報に対して適切な行動を選択するためには、発生の過程で脳に存在する神経回路が個体差なく正確に形成される必要がある。神経回路は、遺伝子に規定されたプログラムに加えて、臨界期に生じる神経活動による精緻化を経て完成される。この回路構築の具体的な分子メカニズムの理解は、動物の先天的な行動と学習によって変化する可塑的な行動原理を理解する上で重要な示唆を与える。一般に回路の精緻化は、神経細胞間の同期的な発火活動によると多くの教科書に記載されている。しかし我々はカルシウムイメージング及び光遺伝学による神経活動の観察、操作を通じて、新しい神経活動依存的な回路形成メカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトを含む高等動物の脳は、複雑かつ精緻な神経回路を用いて感覚入力情報に対して適切な出力行動を行う。この情報処理を担う神経回路の破綻は、精神・神経疾患の原因であることから、神経回路形成のメカニズムを解明することは基礎科学のみならず臨床の分野において重要な示唆を与えうる。一般に高等動物の神経回路は、遺伝的プログラムに加えて臨界期に生じる神経活動に依存した回路の精緻化を経て完成される。この活動に依存した回路の可塑的な変化は、神経細胞間の同期的な発火活動による(ヘブ則)と多くの教科書に記載されている。しかし今回我々は、既存のヘブ則に当てはまらない新規の活動依存的な回路構築のメカニズムを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Neural circuits emerge through the interplay of genetic programming and activity-dependent process. During the development of mouse olfactory map, axons segregate into distinct glomeruli in an olfactory receptor (OR)-dependent manner. ORs generate a combinatorial code of axon-sorting molecules, whose expression is regulated by neural activity. However, how neural activity induces OR-specific expression patterns of axon-sorting molecules remains unclear. Here we revealed that the temporal patterns of spontaneous neuronal spikes were not spatially-organized, but were correlated with the OR types. Moreover, optogenetically differentiated patterns of neuronal activity induced specific expression of the corresponding axon-sorting molecules and regulated axonal segregation. Thus, OR-dependent temporal patterns of spontaneous activity play instructive roles in generating the combinatorial code of axon-sorting molecules during olfactory map formation.

研究分野：神経発生学

キーワード：神経回路形成 神経科学 嗅覚 発生 分子生物学 神経活動 カルシウムイメージング

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む高等動物の脳は、複雑かつ精緻な神経回路を用いて感覚入力情報に対して適切な出力行動を行う。この情報処理を担う神経回路の破綻は、精神・神経疾患の原因であることから、神経回路形成のメカニズムを解明することは神経科学の分野における最も重要な課題の一つである。

個々の神経細胞は、発生の過程で自身が将来担う機能的役割に従って個性を獲得し、それによって軸索を伸長させ、神経回路を形成する。マウス一次嗅覚系における神経細胞の個性は、“発現する嗅覚受容体(olfactory receptor: OR)の種類として定義できること、かつその投射先が明瞭な構造として観察されることから、神経回路形成を研究する上で優れたモデル系となっている。個々の嗅神経細胞(嗅細胞)はゲノム中に存在する約 1000 種類の OR の中からたった 1 種類のみを選択して発現する(Buck L. & Axel, R. *Cell*, 1991)(1 神経-1 受容体ルール)。また同種の OR を発現した嗅細胞は、発生過程においてその軸索を嗅球上の特定の領域に収斂させ、糸球体と呼ばれる構造を形成する(Mombaerts P. *et al.*, *Cell*, 1996)(1 糸球体-1 受容体ルール)(図 1)。従って、投射先である嗅球においては OR の種類に対応する糸球群からなるデジタルマップが形成され、OR 分子によって検出される匂い情報は“どの糸球が活性化されたか”という嗅球上の位置情報に変換される。

この匂いの情報処理を支える神経回路は、遺伝的プログラムによる大まかな軸索の位置決めを経た後、嗅細胞で生じる神経活動によって精緻化されて軸索が収斂する。この精緻化の過程において、嗅細胞で発現する OR 分子は極めて重要な役割を果たす。OR 分子は自発的な神経活動を介して複数の軸索選別分子の発現を転写レベルで制御することで、軸索末端に軸索選別分子の組み合わせと量比からなる固有の分子コードを作り出し、同一 OR を発現する軸索の収斂を制御する(Serizawa S. *et al.*, *Cell*, 2006)。しかしながら、神経活動、即ち発火パターンの中に“OR の種類”という情報がどのように書き込まれ、軸索選別分子の発現量へと情報変換しているのかについては不明であった。

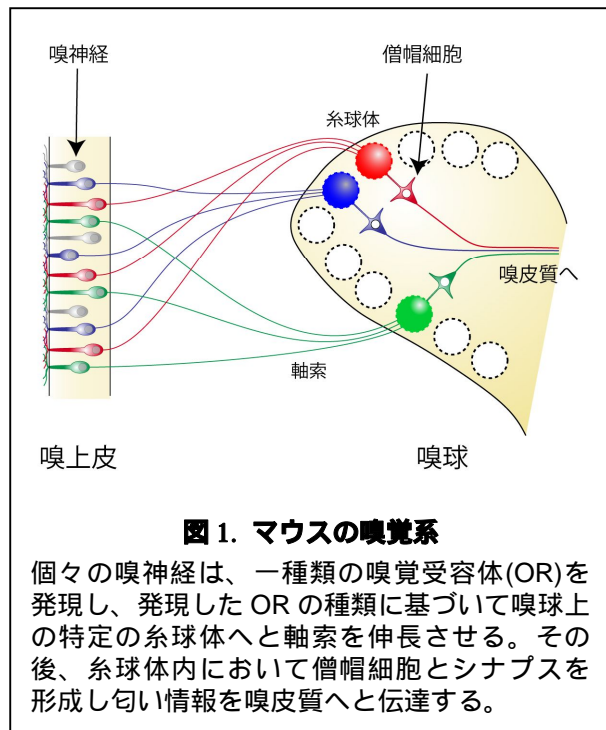
## 2. 研究の目的

マウスの一次嗅覚系は神経回路構造が明瞭であることと遺伝学的手法による介入実験の簡便さから神経回路形成の優れたモデルとなっている。一次神経細胞と二次神経細胞が正しくシナプス接続されるためには、一次神経細胞の軸索が特定の箇所へ投射し収斂する必要がある。これまでの我々の先行研究などを含め回路形成の遺伝的プログラムに関しては多くの知見が提供されてきたが、神経活動による精緻化のプロセスについては具体的なメカニズムは明らかにされてこなかった。そこで、本研究では嗅細胞における神経活動の記録と操作を行うことで、OR 依存性かつ神経活動依存性な回路の精緻化機構の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

### (i) 嗅球における軸索選別分子の大規模な発現解析

これまでの研究から、OR は自発活動を介して複数の軸索選別分子の発現レベルを制御することで、軸索末端に軸索選別分子の組み合わせと量比からなる固有の分子コードを作り出し、これらの分子の接着性もしくは反発性の相互作用を用いることで同一 OR を発現する軸索の収斂を制御することが明らかにしてきた。そこで、嗅細胞の軸索末端における軸索選別分子の発現パターンを調べるため、投射先である嗅球の切片の固定条件を工夫し、一度に 4 つの抗体を用いた高感度 4 重免疫染色法を確立した。また、一枚の切片に多数の糸球体が載るように嗅球切片の作製方法にも工夫を加えた。これらの手法を駆使して、OR の数に相当する約 1000 個の糸球体における軸索選別分子の発現プロファイルを調べ、軸索選別分子の発現パターンを比較した(Ihara N., *et al.*, *J Vis Exp.*, 2017)。神経活動に依存して発現する軸索選別分子(Kirrel2, PCDH10, Sema7A)に着目し、大規模な発現解析を行なった。



## (ii) 嗅細胞における神経活動の記録と操作

OR 依存かつ神経活動依存な回路の精緻化機構を明らかにするためには、嗅細胞の神経活動を記録する実験と、その活動を操作し軸索選別分子の発現への影響を観察する実験が必要である。まず、嗅細胞特異的にカルシウム指示薬である GCaMP6f を発現する遺伝子改変動物を作製し、発達期にある嗅細胞の自発的な神経活動の記録を行なった。さらに、嗅細胞特異的にチャンネルドプシン 2(ChR2)を発現する遺伝子改変動物を作製し青色光の照射パターンを変化させることで様々な神経活動パターンを人為的に誘導できる系を確立し、特定の神経活動パターンが軸索選別分子の発現に与える影響を調べた。

## 4. 研究成果

### (i) 神経活動依存な軸索選別分子の発現制御

嗅細胞において軸索収斂に関わることが遺伝的に示されている軸索選別分子 (Kirrel2, PCDH10, *Sema7A*) に関して網羅的な発現パターン解析を行った。その結果、発現する OR の種類ごとに軸索選別分子の発現量は多様であること、*Sema7A* と *PCDH10* は類似した発現パターンを示すものの、*Kirrel2* との発現パターンの相関は観察されなかったことを明らかにした。またこれらの発現データに関して多変量解析を実施して、嗅細胞の神経活動の主要なジェネレーターである cyclic nucleotide-gated (CNG) channel 由来の活動がこれらの多様な発現パターンを作り出していることを明らかにした (Ihara N., *et al.*, *Eur J Neurosci*, 2016)。

#### (ii-1) 嗅細胞における神経活動パターンの記録

まず、発達期にある嗅細胞の自発的な神経活動の記録を行なったところ、嗅細胞の自発的な神経活動は非同期的であり、かつ細胞ごとに多様なパターンを示した。さらに、特定の OR を発現する嗅細胞に着目し神経活動のパターンを解析したところ、異なる OR を発現する嗅細胞は異なる神経活動のパターンを示すことを突き止めた。

また、軸索選別分子の発現レベルの違いに着目して神経活動パターンを比較したところ、*Kirrel2* の高い嗅細胞では短いバースト状の神経活動を示す一過的なカルシウム濃度レベルの上昇が見られた。一方、*Sema7A* および *PCDH10* の高い嗅細胞では異なる神経活動パターン（長期的バースト発火）が観察されたことから、神経活動パターンと各軸索選別分子の発現パターンには対応関係があることが示唆された。

#### (ii-2) 光遺伝学による神経活動パターン操作

上記の実験で見られた特徴的な神経活動パターンと軸索選別分子の発現の因果関係を検証するため、嗅細胞特異的に ChR2 を発現する遺伝子改変動物を作製し、青色光の照射パターンを変化させることで様々な神経活動パターンを人為的に誘導できる系を確立した。

この遺伝子改変マウスを用い、一過的なカルシウム濃度上昇を引き起こす様々な発火パターンが軸索選別分子の発現へ与える影響を調べた結果、

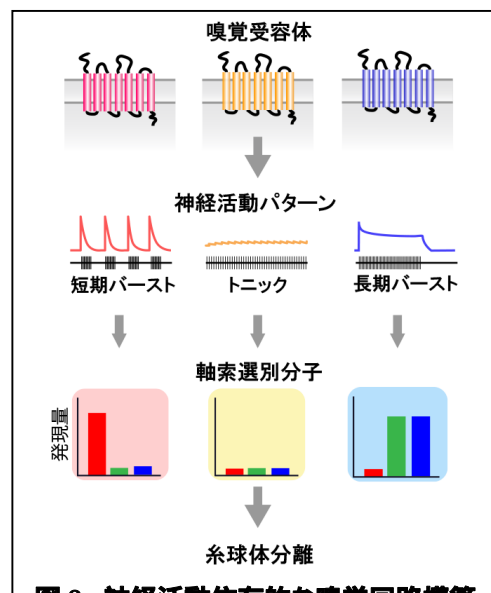
・ 数秒単位の繰り返しの短期バースト状発火は *Kirrel2* の発現のみを特異的に誘導すること

・ 数十秒から数分単位の長期バースト状発火は *Sema7A*, *PCDH10* の発現を特異的に上昇させること

を明らかにした。*Sema7A* と *PCDH10* が同じ発火パターンで制御されていること、また *Kirrel2* と *Sema7A/PCDH10* の発現が別の発火パターンで独立に制御されていることは、修士課程時の解析で得られた発現プロファイルのデータと整合性があることから、この神経活動操作によって得られた知見は生理学的な条件を模倣していることが示唆される。

以上の結果を踏まえると、発現する OR の種類という

情報は経時的な神経活動パターンとして変換され、OR の種類に固有な量比からなる軸索選別分子の分子コードを作り出すものと考えられる (図 2)。これは、神経細胞間の同期的活動を前提とする既存のヘブ則とは全く異なるものであり、本研究は新規の神経活動依存な回路構築モデルとしての論文を投稿した (Nakashima A., *et al.*, *Science*, *in press*)。近年、*Sema7A* シグナルは嗅球におけるシナプス形成に寄与することが報告されている (Inoue N., *et al.*, *Nat Commun.*,



2018)。このことから、今回得られた軸索選別分子の神経活動依存的な発現制御メカニズムは、嗅球における一次神経細胞と二次神経細胞のシナプス形成特異性に迫る重要な知見である。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 7 件 )

Nakashima A, Ihara N, Shigeta M, Kiyonari H, Ikegaya Y, and Takeuchi H  
“Structured spike series specify gene expression patterns for olfactory circuit formation”  
***Science (article)***, in press

Katori K, Manabe H, Nakashima A, Eerdunfu, Ikegaya Y, and Takeuchi H  
“Sharp wave-associated activity patterns of olfactory cortical neurons in the mouse piriform cortex” ***Eur. J. Neurosci***, 48(10), 3246-3254, 2018

Sakamoto St, Takeuchi H, Ihara N, Baoligao, and Suzukawa K  
“Possible requirement of executive functions for high performance in soccer” ***PLOS one***,  
doi.org/10.1371/journal.pone.0201871, 2018

Eerdunfu, Ihara N, BaoLigao, Ikegaya Y and Takeuchi H“Differential timing of neurogenesis underlies dorsal-ventral topographic projection of olfactory sensory neurons”  
***Neural. Dev*** DOI 10.1186/s13064-017-0079-0, 2017

Inokuchi K, Imamura F, Takeuchi H, Kim R, Okuno H, Nishizumi H, Bito H, Kikusui T, and Sakano H  
“Nrp2 is sufficient to instruct circuit formation of mitral-cells to mediate odour-induced attractive social responses” ***Nat Commun***, doi: 10.1038/ncomms15977, 2017

Ihara N, Ikegaya Y and Takeuchi H  
“Quadruple-immunostaining of the olfactory bulb for visualizing molecular identity codes of olfactory sensory axons” ***J. Vis. Exp.*** doi: 10.3791/55893, 2017

Ihara N, Nakashima A, Hoshina N, Ikegaya Y and Takeuchi H  
“Differential expression of axon-sorting molecules in mouse olfactory sensory neurons”  
***Eur. J. Neurosci*** Vol.44(3), 1998-2003, 2016

[ 学会発表 ] ( 計 33 件 )

国際学会、国際シンポジウム

Takeuchi H, Nakashima A, Ihara N and Ikegaya Y selected as a speaker  
“Patterned, but not synchronous spontaneous activity of developing olfactory neurons regulates olfactory receptor-specific axon sorting”  
Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Molecular Mechanisms of Neuronal Connectivity (New York, USA), 2018/9/25-29

Katori, K., Manabe, H., Nakashima, A., Sasaki, T., Ikegaya, Y., Takeuchi H  
“Sequential activities of cortical neurons in the mouse piriform cortex during sharp wave”  
Cold Spring Harbor Asia Conference (Awaji), 26 September 2018

Takeuchi H, Nakashima A, Ihara N and Ikegaya Y poster  
“Patterned, but not synchronous spontaneous activity of developing olfactory neurons regulates olfactory receptor-specific axon sorting”  
Gordon Research Conference: Molecular and Cellular Neurobiology (Hong Kong, China), 2018/7/1-6

Ihara N, Nakashima A, Nonaka K, Ihara N, Ikegaya Y, and Takeuchi H poster  
“A Combinatorial expression of axon-sorting molecules ensures robustness to neural activity changes for neural map formation in the mouse olfactory system”  
Gordon Gordon Research Conference: Molecular and Cellular Neurobiology (Hong Kong, China), 2018/7/1-6

Nakashima A, Ihara N, Ikegaya Y, Takeuchi H oral  
“Patterned, but not synchronous spontaneous activity of developing olfactory neurons regulates olfactory receptor-specific axon sorting”  
***22nd Biennial Meeting of the International Society of Developmental Neuroscience*** (Nara,

Japan), 2018/5/22-25

Nakashima A, Ihara N, Ikegaya Y and Takeuchi H poster

“Patterned, but not synchronous spontaneous activity of developing olfactory neurons regulates olfactory receptor-specific axon sorting”

Keystone Symposia A2: State of the Brain: Genetic Dissection of Brain Circuits and Behavior in Health and Disease” (Keystone, Colorado), 2018/1/14-18

Katori K, Manabe H, Ikegaya Y and Takeuchi H poster and oral presentation

“Sharp wave-associated activity patterns of olfactory cortical neurons in the mouse piriform cortex”

Keystone Symposia A2: State of the Brain: Genetic Dissection of Brain Circuits and Behavior in Health and Disease” (Keystone, Colorado), 2018/1/14-18

Nakashima A, Ihara N, Ikegaya Y and Takeuchi H poster and oral presentation

“Patterned, but not synchronous spontaneous activity of developing olfactory neurons regulates olfactory receptor-specific axon sorting”

Keystone Symposia “Synapses and Circuits” (New Mexico, USA), 2017/3/5-8

Takeuchi H oral

“Patterned spontaneous activity regulates OR-specific axon sorting”

KoSCL symposium (Seoul, Korea), 2016/10/28-29

Takeuchi H, Ihara N, Nakashima A and Ikegaya Y

“Differential expression of axon-sorting molecules in mouse olfactory sensory neurons”

Society for Neuroscience 2016 (San Diego, USA), 2016/11/12-16

Nakashima A, Ihara N, Ikegaya Y and Takeuchi H oral and poster presentation

“An instructive role for spontaneous neural activity in glomerular map formation” CSHL meeting “Axon Guidance, Synapse Formation & Regeneration” (New York, USA), 2016/9/20-24

Nakashima A, Ihara N, Ikegaya Y and Takeuchi H

“Activity dependent mechanisms of the olfactory map formation”

ISOT2016 17<sup>th</sup> International Symposium on Olfaction and Taste, 2016/6/5-9

Inokuchi K, Takeuchi H, Imamura F, Kim R, Okuno H, Nishizumi H, Bito H, Kikusui T, and Sakano H

“Nrp2<sup>+</sup> mitral cells in the main olfactory bulb send axons to the medial amygdala to induce social behaviours”

ISOT2016 17<sup>th</sup> International Symposium on Olfaction and Taste, 2016/6/5-9

Ihara N, Nakashima A, Ikegaya Y and Takeuchi H

“Differential expression of axon-sorting molecules in mouse olfactory sensory neurons”

ISOT2016 17<sup>th</sup> International Symposium on Olfaction and Taste, 2016/6/5-9

Takeuchi H

“Assembly of the olfactory neural circuit in mice”

*JST CREST-PRESTO joint international symposium* (Tokyo, Japan), 2015/11/5-6

#### 国内学会

香取和生、池谷裕二、竹内春樹 “梨状皮質における睡眠時鋭波中の規則的な神経活動” 日本薬学会第 139 年会(千葉)、2019/3/23

岡本和樹、藤井直樹、蛭名鉄平、小西邦昭、佐藤由宇、中野利沙子、日置寛之、山口瞬、竹内春樹、湯本潤司、松崎政紀、池谷裕二 “テルビウムドープガラスの蛍光を手がかりにした標的パッチクランプ法” 日本薬学会第 139 年会(千葉)、2019/3/23

中野利沙子、森川勝太、伊原尚樹、安藤めぐみ、鐘巻将人、小山隆太、竹内春樹、池谷裕二 “神経細胞における可逆的タンパク質高速分解システムの構築” 第 139 回日本薬学会年会 (千葉)、2019/3/21

中嶋藍、伊原尚樹、池谷裕二、竹内春樹 “Structured spike series specify gene expression

patterns for olfactory circuit formation” 第 22 回日韓薬理合同セミナー, 大阪, 2019/3/19

竹内春樹

“嗅覚梨状皮質における大規模単一細胞解析”

The 6<sup>th</sup> Chemosensation and Behavior Workshop, 三浦海岸, 2019/3/11-13

香取和生、竹内春樹

“梨状皮質における睡眠時の神経活動”

The 6<sup>th</sup> Chemosensation and Behavior Workshop, 三浦海岸, 2019/3/11-13

竹内春樹、中嶋藍、伊原尚樹、池谷裕二

“A non-Hebbian activity-dependent mechanism underlying olfactory circuit formation”

日本味と匂学会第 52 回大会, 大宮, 2018/10/29-31

山下龍馬、中嶋藍、野仲航司、伊原尚樹、井ノ口霞、エルドンフ、池谷裕二、竹内春樹 “マウス嗅覚系の神経回路の堅牢性に関わる軸索選別分子の発現” 第 139 回日本薬理学会関東部会(東京)、2018/10/20

香取和生、眞部寛之、中嶋藍、エルドンフ、佐々木拓哉、池谷裕二、竹内春樹 “嗅覚皮質における睡眠時の規則的な神経活動” 東京大学こころの多様性と適応の統合的研究機構シンポジウム「こころの適応を探る」(東京)、2018/10/5

竹内春樹

“梨状皮質の神経活動パターン解析”

The 5<sup>th</sup> Chemosensation and Behavior Workshop, 熱海, 2018/3/12-14

竹内春樹、中嶋藍、伊原尚樹、エルドンフ、池谷裕二

“自発的な神経活動に依存した嗅覚神経回路の形成メカニズム” 日本分子生物学会, 神戸, 2017/12/6 - 9, 3AW08-2 口頭

野仲航司、中嶋藍、伊原尚樹、井ノ口霞、エルドンフ、池谷裕二、竹内春樹

“マウス嗅覚系の神経回路の堅牢性に関わる軸索選別分子の発現” 日本分子生物学会, 神戸, 2017/12/6 - 9, 3LBA-134

中嶋藍、伊原尚樹、池谷裕二、竹内春樹

“マウス嗅覚系における活動依存的な神経回路形成機構” 日本神経科学大会, 千葉, 2017/7/20 - 23, 1P-LBA002

野仲航司、中嶋藍、伊原尚樹、池谷裕二、竹内春樹

“嗅神経の自発活動パターンによる回路形成の制御” 第 17 回東京大学生命科学シンポジウム, 東京, 2017/4/15 優秀ポスター賞

伊原尚樹、中嶋藍、池谷裕二、竹内春樹

“マウス嗅覚系における活動依存的な神経回路形成機構” 日本薬学会第 137 年会、仙台、2017/3/25 優秀発表賞(ポスター部門)

竹内春樹

“神経スパイク列の再構成から迫る活動依存的な嗅覚回路形成機構の解明”

The 4<sup>th</sup> Chemosensation and Behavior Workshop 2016, 岩手, 2017/2-17-19

Takeuchi H, Nakashima A, Ihara N and Ikegaya Y

“Activity-dependent olfactory neural circuit formation”

日本神経科学大会, 横浜, 2016/7/20-22

Ihara N, Nakashima A, Ikegaya Y and Takeuchi H

“Differential expression of axon-sorting molecules in mouse olfactory sensory neurons”

東京大学生命科学シンポジウム 2016/4/23 優秀ポスター賞

## 6 . 研究組織

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。