

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07018

研究課題名(和文) 高次嗅覚中枢における神経配線図の解読と機能マッピング

研究課題名(英文) Deciphering the wiring diagram and functional mapping in higher olfactory centers

研究代表者

宮坂 信彦 (Miyasaka, Nobuhiko)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・副チームリーダー

研究者番号：70332335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：匂いの入力から行動出力に至る神経回路メカニズムの解明を目的として、特定の嗅覚行動にリンクして活性化する高次脳領域の同定を行った。食物由来のアミノ酸やATPはゼブラフィッシュの誘引行動を引き起こし、終脳や視床下部の特定の神経核を共通して活性化した。一方、忌避行動を引き起こす警報フェロモンは、終脳や視床下部において、食物の匂いとは異なる神経核を活性化した。さらに、匂いとエサ報酬の連合学習によって、特定の視床垂核が活性化することが明らかになった。以上のことから、嗅球に表現された匂い分子の化学構造の情報は、異なる高次脳領域によって読み取られ、適切な行動出力へと変換されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳がどのように外界の情報を読み取り適切な行動に至るのかという問題は、生命科学の重要なテーマの一つであり、その解明は人の精神活動の理解につながる。本研究において、匂いの情報は一次中枢から複数の高次脳領域に伝達され、異なる行動出力に対応して特異的な神経核が活動することが明らかとなった。本研究成果は、匂い情報処理の神経回路メカニズムの解明とともに、感覚情報処理の基本原則の理解にも貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Odor information is first represented as a chemotopic map in the olfactory bulb (OB). However, it still remains to be elucidated how higher brain regions read the chemotopic map of the OB and translate it into appropriate behavioral outputs. Here, we map active brain regions relevant to various olfactory behaviors in zebrafish. Alanine and ATP, food-derived odorants, commonly activate specific nuclei in the telencephalon and hypothalamus and evoke attraction of zebrafish, whereas conspecific skin extract, which elicits fright response, activates distinct nuclei in those brain areas. Furthermore, we found that a subnucleus of the thalamus is activated following appetitive olfactory conditioning. These results suggest that the chemotopic organization of odor information in the OB could be transformed into distinct sensory representations in higher brain centers.

研究分野：神経科学

キーワード：匂い 嗅覚 神経回路 脳 生得的行動 ゼブラフィッシュ 学習 記憶

1. 研究開始当初の背景

匂い情報処理の神経回路メカニズムの研究は、1991年の嗅覚受容体遺伝子群の発見 (Linda Buck & Richard Axel; 2004年ノーベル生理学・医学賞) が契機となり、飛躍的に進展した。特に、嗅上皮から脳の嗅球へと至る一次嗅覚系について、その精緻な神経接続様式に基づく「匂い地図」の存在が明らかとなり、嗅球における匂い情報コーディングの全体像が解明されてきた。しかしながら、嗅球の匂い地図は匂い分子の構造を基にした化学地図であり、動物が匂いの種類に応じて様々な嗅覚行動 (餌の探索、危険回避、繁殖行動など) を出力するためには、高次中枢が嗅球の匂い地図を適切に読み取る必要がある。一次嗅覚系研究の飛躍的発展の一方で、高次中枢における情報のデコーディングから行動出力に至る神経回路の解析は、そのネットワークの複雑さゆえになかなか進展していなかった。

2. 研究の目的

嗅覚系は外界の多種多様な化学物質を受容し、対象物の認知、情動の誘起、記憶の形成・想起や内分泌系の変化を介して、動物個体の生存や種の維持に必要な行動を出力する神経システムである。脳がどのように匂い情報を処理し、特定の行動出力に至るのかを理解するためには、嗅覚情報を担う神経配線図の解剖学的解読および特定の神経回路素子と行動出力との機能的関連の解明 (機能マッピング) が必要不可欠である。研究代表者らはこれまでに、モデル脊椎動物であるゼブラフィッシュにおいて、嗅球から高次中枢に至る詳細な神経配線図を解剖学的に明らかにした。本研究では、匂い情報処理メカニズム解明に向けた次のステップとして、様々な嗅覚行動とリンクした神経活動履歴を可視化し、高次嗅覚中枢における神経回路素子の機能マッピングを行う。

3. 研究の方法

(1) 嗅覚行動の定量的解析

- ① ゼブラフィッシュを行動実験用の細長い水槽に1個体ずつ馴化する。アミノ酸、アデノシン三リン酸 (ATP)、皮膚抽出物などの生得的行動を誘起する匂い物質を水槽の片側の隅からゆっくりと注入し、魚の遊泳軌跡、速度、匂い投与口近傍での滞在時間などを定量解析する。
- ② 匂いの連合学習実験では上述の実験システムを応用し、匂いの投与から30秒後に同側よりエサ報酬を与える。1日3回の反復学習において、匂いの投与から給餌までの30秒間の魚の行動を定量解析して学習度を評価する。4日間の反復学習後の5日目に、匂いのみを投与して (プロブテスト)、投与前後それぞれ5分間の魚の行動を定量的に比較解析する。

(2) 神経活動履歴の解析

生得的嗅覚行動実験 (誘引行動・忌避行動など) や、匂いとエサ報酬の連合学習実験において、行動の誘起後に脳を固定・薄切し、神経活動マーカーである *c-fos* mRNA の発現を *in situ* hybridization によって検出する。特定の動物行動にともなって活性化された脳領域を同定する。

4. 研究成果

(1) 生得的嗅覚行動を担う高次神経回路素子の機能マッピング

研究代表者らはすでに、ゼブラフィッシュの様々な生得的嗅覚行動 (アミノ酸や核酸に対する誘引行動、皮膚抽出物に対する忌避行動) を定量解析する行動実験システムを確立している。匂いによって誘起される誘引および忌避行動時に活性化される脳領域を *c-fos* mRNA の発現を指標にして解析した。その結果、誘引・忌避のそれぞれ異なる行動出力に対応して、特異的に活性化される脳領域を同定した。食物に由来すると考えられる

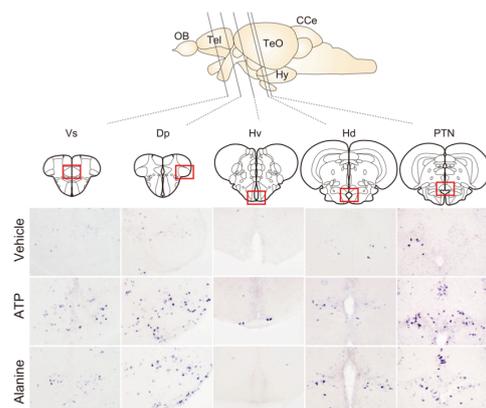


図1. ATPおよびアラニン(アミノ酸)の嗅覚入力によって活性化される脳領域 (*c-fos* mRNAの発現解析)

アラニン（アミノ酸の一種）や ATP はゼブラフィッシュの誘因行動を引き起こすが、どちらの匂い物質も終脳の Vs, Dp、視床下部の Hd および視床関連神経核の PTN を共通して活性化した（図 1）。このことは、類似の行動出力を誘起する匂いの情報は、嗅球から複数の共通した高次脳領域で処理されることを示している。また視床下部の Hv には、ATP 特異的に活性化される少数のニューロンが存在することも明らかとなった。このことは、ATP の匂い入力に特異的な行動学的・生理学的機能が存在する可能性を示唆している。一方、忌避行動を誘起するゼブラフィッシュの皮膚抽出物（警報フェロモンを含む）は、終脳および視床下部において、食物由来の匂い物質とは異なる神経核を活性化した。以上のことから、嗅球に表現された匂い分子の化学構造の情報は、異なる高次脳領域によって読み取られ、異なる行動出力に変換されることが示唆された。

(2) 匂い-エサ報酬連合学習の行動実験系の確立

生得的嗅覚行動に対して、嗅覚系のもう一つの重要な機能である匂い連合学習を解析する行動実験システムの構築を行った。行動学的に中立な（生得的な誘因・忌避行動を起こさない）匂いとして合成アミンであるモルホリンを使用し、匂いの投与に続いてエサ報酬を与えるトレーニングを行った（paired グループ）。4 日間のトレーニングによって、paired グループは匂いの投与だけで誘因行動やエサ投与口への接近行動を示すようになった（図 2）。一方、匂いの投与と給餌のタイミングを完全に分離してトレーニングしたグループ（unpaired）では、トレーニング後もモルホリンに対して行動応答を示さなかった。このことから、匂い刺激と報酬の反復学習により、ゼブラフィッシュは匂い連合記憶を形成したと考えられる。

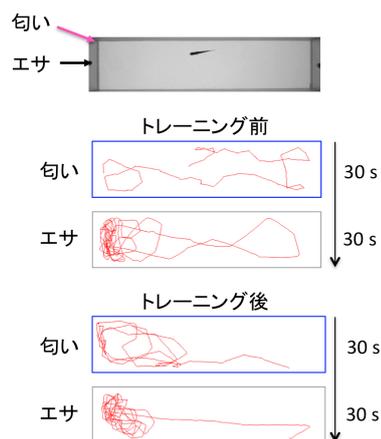


図2. ゼブラフィッシュの匂い-エサ報酬連合学習 (魚の遊泳軌跡)

(3) 匂い-エサ報酬連合学習によって活性化する脳領域の同定

匂い連合記憶に関わるゼブラフィッシュ高次脳領域の同定を目的として、神経活動履歴の解析を行った。匂いの投与に続いてエサ報酬を与えるトレーニングをした paired グループと、匂い投与と給餌のタイミングを完全に分離した unpaired グループとの間で、プローブテストにおける匂い刺激後の c-fos mRNA の発現を比較解析した。嗅覚一次中枢である嗅球から直接入力を受ける終脳の Dp や、哺乳類扁桃体の相同部位と考えられている Dm では、paired-unpaired グループ間で c-fos 陽性細胞数に顕著な差は認められなかった。一方、視床の特定の亜核において、paired グループの c-fos 陽性ニューロンの数が unpaired グループより顕著に大きいことを見出した（図 3）。この視床亜核は、構成するニューロンのタイプや神経接続について未だ報告のない神経核で、哺乳動物における相同な脳領域も明らかになっていない。そこで、匂い連合学習に伴って活性化する視床ニューロンの分子発現プロファイルを明らかにするために、様々な機能分子と c-fos mRNA の二重標識解析を行った。その結果、c-fos 陽性ニューロンは特定の神経ペプチドを発現し、同時にグルタミン酸を主要な神経伝達物質とする興奮性ニューロンの集団であることが明らかとなった。

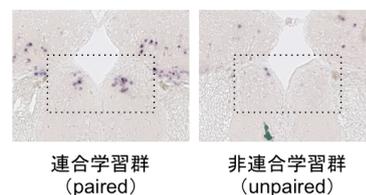
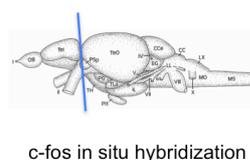


図3. 匂い-エサ報酬連合学習群における視床亜核の活性化

paired グループでの視床亜核の活性化の生理的意義を明らかにするために、トレーニングを行っていないナイーブな魚を常飼育環境から新奇環境へ移す実験を行った。その結果、新奇環境グループでも、paired グループと同じ特定の神経ペプチドを発現するニューロン集団が活性化されることが明らかとなった。これらの実験結果は、匂いによって動機づけされた誘引行動や、新奇環境での探索行動など、視床亜核の活性化が目的行動への意欲を生み出す脳の状態と関連することを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wakisaka Noriko, Miyasaka Nobuhiko, Koide Tetsuya, Masuda Miwa, Hiraki-Kajiyama Towako, Yoshihara Yoshihiro	4. 巻 27
2. 論文標題 An Adenosine Receptor for Olfaction in Fish	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 1437 ~ 1447.e4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2017.04.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Miyasaka N, Yoshihara Y
2. 発表標題 Neural circuit mechanisms underlying olfactory memory and motivated behavior in zebrafish
3. 学会等名 Neuro2019（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮坂信彦, 吉原良浩
2. 発表標題 嗅覚記憶と意欲行動の神経回路メカニズム
3. 学会等名 日本味と匂学会第53回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyasaka N, Yoshihara Y
2. 発表標題 Olfactory memory and motivated behavior in zebrafish
3. 学会等名 The 48th Naito Conference on Integrated Sensory Sciences - Pain, Itch, Smell and Taste（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮坂信彦 吉原良浩
2. 発表標題 匂いと食の連合記憶を担う神経回路メカニズム
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮坂信彦 吉原良浩
2. 発表標題 ゼブラフィッシュの嗅覚記憶と意欲行動
3. 学会等名 日本味と匂学会第52回大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮坂信彦
2. 発表標題 嗅覚記憶と意欲行動の神経回路メカニズム
3. 学会等名 Chemosensation & Behavior Workshop 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮坂信彦
2. 発表標題 ゼブラフィッシュの嗅覚行動を司る神経回路メカニズム
3. 学会等名 北海道から芽吹いた生命科学シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮坂信彦 吉原良浩
2. 発表標題 匂いと食の連合記憶を担う神経回路メカニズム
3. 学会等名 日本味と匂学会第51回大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 魚類の行動制御技術	発明者 吉原良浩、脇阪紀子、宮坂信彦、小出哲也	権利者 国立研究開発法人理化学研究所
産業財産権の種類、番号 特許、2017-075796	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	吉原 良浩 (Yoshihara Yoshihiro)		
研究協力者	脇阪 紀子 (Wakisaka Noriko)		
研究協力者	増田 美和 (Masuda Miwa)		
研究協力者	小出 哲也 (Koide Tetsuya)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	梶山 十和子 (Kajiyama Towako)		