

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K14566

研究課題名(和文)単一の糸球体の光刺激によって誘導されるマウスの先天的恐怖行動の解析

研究課題名(英文)Analysis of fear response behavior induced by photoactivation of single glomerular species.

研究代表者

斉藤 治美 (Saito, Harumi)

福井大学・学術研究院医学系部門・学術研究員

研究者番号：20311342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：匂い分子2,4,5-trimethyl thiazoline (TMT) に特異的に活性化される単一の受容体を発現する糸球体moduleのみを選択的に活性化および不活化出来るモデルシステムを作製し、この単一の受容体-糸球体という最小の機能単位からの入力によって活性化される嗅皮質において、光遺伝学、ウイルスベクター、及びDREADDシステムを併用したloss of functionの実験により、機能領域を明らかにする方法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Sensing of odorants is one of the most important sensory functions for animals to make behavioral decisions. We have made a mouse model system that can specifically elicit immobility responses behavior by the activation of single glomerular species in main olfactory system.

I have isolated a single olfactory receptor (ORTMT) that is specifically activated by the predator odor 2,4,5-dehydro-2,5 trimethylthiazoline (TMT) and generated ORTMT gene knock-out (KO) mice and knock-in channelrhodopsin (KI) mice which expressing in a pair of glomeruli that express an ORTMT and performed the loss / gain of function. The data indicated that the activation of ORTMT induced specifically a freezing but not aversive behavior. I assumed that this model mouse system targeting a single type of OR is useful to study the neural network and plan to proceed the study in the higher brain region. Furthermore I set up the experiment system for loss of function of olfactory cortex.

研究分野：神経科学

キーワード：オプトジェネティクス 単一の嗅覚受容体 嗅皮質 情動行動

1. 研究開始当初の背景

嗅覚情報は、各々の匂い物質やそのシグナルを受容する嗅覚受容体の相違によって、物質を識別することが出来、また、特異的な情動行動を誘因することが知られており、ヒトを含むあらゆる動物の生命の維持に重要な働きを持つ感覚器である。嗅覚系による神経回路の探索が他の感覚系に比べ実験系として優れている点として、入力情報である匂い分子が数十万から数千万存在するといわれており、哺乳類では数百-千からなる嗅覚受容体ファミリーメンバーの各々が匂い物質に対して特異的な結合様式を持つ。また、マウスの嗅覚系では、嗅上皮に約 500 万個存在する嗅神経細胞 (嗅細胞) の一つ一つが、約一千種類ある嗅覚受容体の一種類のみを発現し (1 神経-1 受容体ルール)、単一の受容体を発現する嗅細胞は軸索末端で束になり、脳の先端の嗅球で一对の糸球体を形成するという構造を呈している (1 糸球-1 受容体ルール)。この嗅覚の末梢における構造に着目し、単一の受容体を形成単位として、脳内の複雑な神経回路や高次機能の探索することは、他の感覚器からの検索からは得られない新たな知見が得られる可能性が考えられる。しかし、通常、単一の匂い物質は複数の受容体に結合し、複数の糸球体が特定の領域に分布する傾向にあり、匂いの識別はこの糸球体の活性パターン (odor map) の相違によってなされていると一般に考えられおり、単一の糸球体という感覚入力情報が情動や行動の様式に対してどのように寄与しているのか、単一の糸球体の入力を元に高次脳領域における出力判断の制御メカニズムを神経回路レベルで解析できるのか否か分かっていなかった。

2. 研究の目的

匂い分子という入力情報に対し、その検出にあたる嗅覚受容体の匂いに対する親和性はリガンドの濃度によって結合する受容体の数も変わり複雑であり、匂い分子を入力として用いた神経回路の探索では、高次機能の機能領域を明瞭化することは難しい。そこで本研究は、光遺伝学的手法を用いて単一の受容体-糸球体モジュールのみを活性化し、単一の受容体らの情報が、マウスの行動にどのような影響を及ぼすのかを検索し、更に高次中枢内の神経活性パターンを解析することを可能にすることが出来るのか否かを検索した。

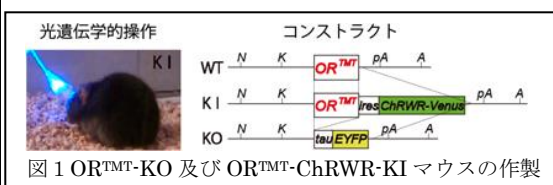
実験を行うにあたって、まず、申請者自らが同定した天敵臭 TMT に反応性の高い嗅覚受容体に対し、ノックアウト (KO) マウス及び受容体の下流にチャンネルロドプシンを発現させたノックイン (KI) マウス

を作製し、マウスの行動様式や嗅球-嗅皮質-高次中枢の神経活性のパターンを検索し、更に高次中枢においての機能領域を明らかにする為の実験系を確立することを試みた。

本研究を、嗅球から中枢への伝達様式、嗅皮質に於ける情報処理と出力判断を知る手がかりとし、研究が進む事によってヒトを含む高等動物の情動や行動が、どの様な本能的支配を受けているのかの解明が進み、感情の制御に問題を生じる精神疾患の理解に資する新たな知見が得られる事が期待される。

3. 研究の方法

入力については、天敵臭 TMT によって特異的に活性化される嗅覚受容体を optical イメージングや DiI 染色と single cell RT-PCR, および cAMP 依存性ルシフェラーゼ アッセイにより受容体を単一嗅細胞から単離する方法と、high-throughput スクリーニングを組み合わせて同定し、次に単離した嗅覚受容体遺伝子に対してノックアウト (KO) マウスとチャンネルロドプシン (ChRWR) を導入したノックイン (KI) マウスを作製し (図 1)、単一の糸球体を対象とした Gain / Loss of function の検証実験を行う。KI においては、嗅球に様々な条件の光刺激を照射した際の 2 次ニューロン Mitral Tufted Cell (MT 細胞) の神経活性を細胞外記録法により観察することにより、光刺激の最適条件を検討した。高次中枢の活性パターンでは、従来広く用いられている最初期遺伝子 Egr 1 を用いて網羅的に解析した。また、本研究では KI マウスとウイルスベクター、および DREADD システムを用いて、単一の糸球体と接続する M/T 細胞の投射領域である嗅皮質各領域、更に入力からの指令を受けて情動や行動を発動する脳領域と神経細胞群を順次同定する実験系を確立した。



4. 研究成果

TMT に反応性の高い嗅覚受容体 (OR^{TMT}) の遺伝子に対し、ChRWR をつないだノックイン (KI) マウスと KO マウスを作

製することが出来た (図2)。

光刺激を受けた KIマウスのMT細胞は、匂い刺激を受けた際の活動電位と類似の神経活性がOR^{TMT}の近傍に位置するMT細胞に見られることが分かった (図3)。

光刺激を受けた KI マウスを用い

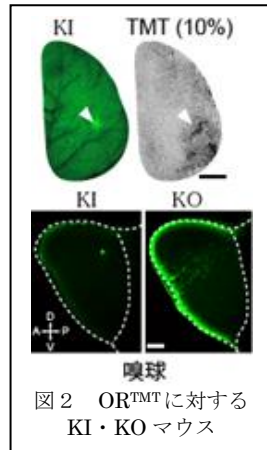


図2 OR^{TMT}に対する KI・KO マウス

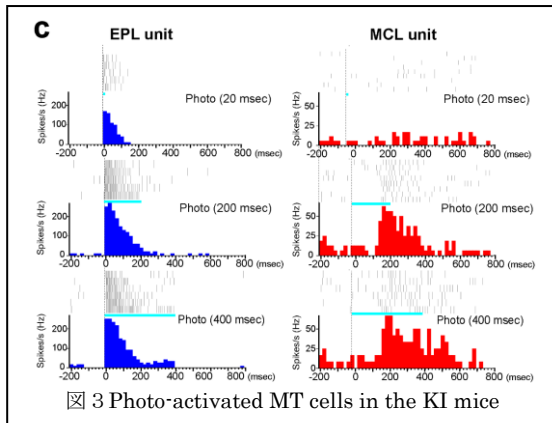


図3 Photo-activated MT cells in the KI mice

て行動実験を行ったところ、光刺激を受けた KI マウスはすくみ行動のみを有意に発現したが (図4)、KO マウスの行動実験では、単一の受容体を除去した際にすくみ行動が有意に減少したが、完全に消失することは無かった。このことにより、TMTによって誘引されるすくみ行動と忌避行動

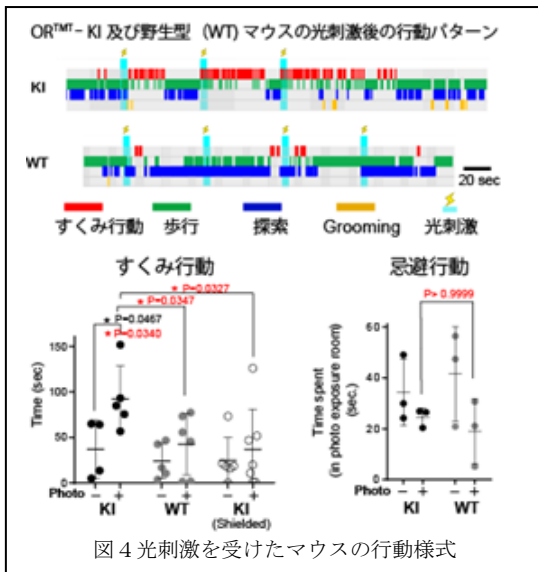


図4 光刺激を受けたマウスの行動様式

は、異なった情報入力の様式で誘引される可能性が示唆された。また、匂い刺激によって誘引されるすくみ行動は、いくつかの異なる受容体とその役割を担っている可能性が有ることが分かった。

糸球体を光刺激したOR^{TMT}のKIマウスにおいて、嗅皮質のどの領域に神経活性がみられるのかをEgr1の発現を指標に高次中枢内での神経の活性化パターンを解析した結果、匂い刺激と比較し、限局した領域が活性化されており (例・前嗅核・図5)、嗅皮質各領域における機能的サブドメインを明らかに出来る可能性が有ることが分かった。

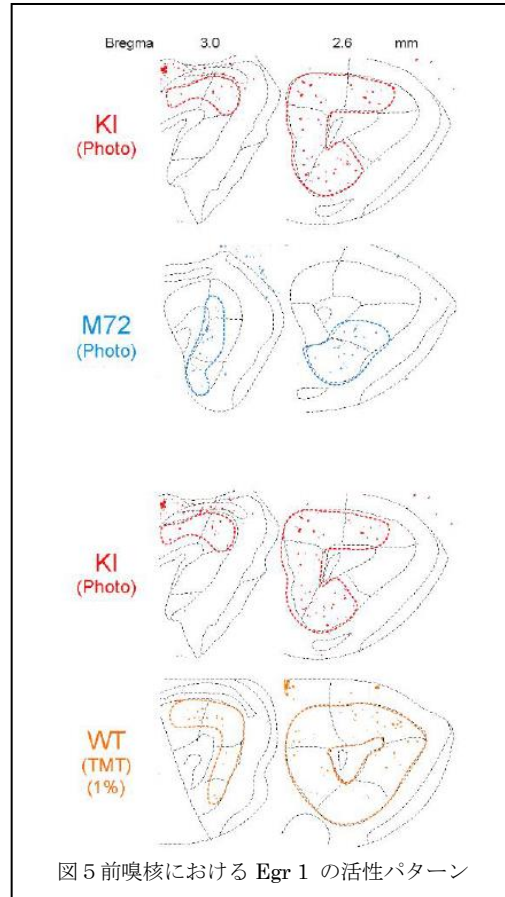


図5 前嗅核における Egr1 の活性パターン

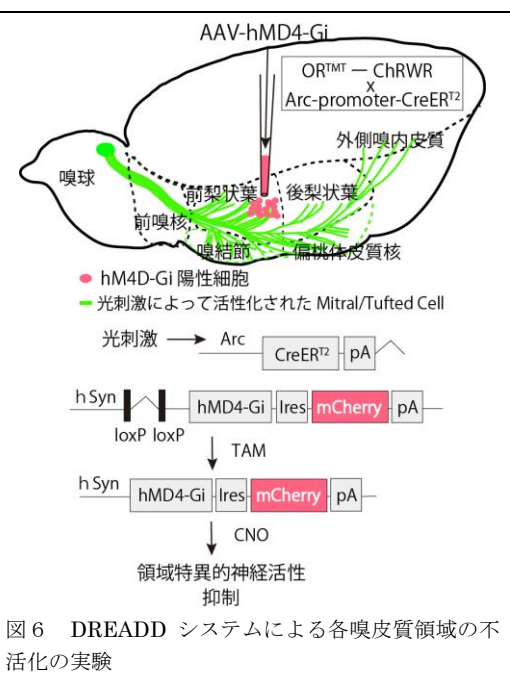


図6 DREADD システムによる各嗅皮質領域の不活化の実験

Egr 1 のシグナルで活性化される嗅皮質領域を DREADD システムによって局所的な loss of function を行うことにより、恐怖行動を発動する為の領域を特定することの出来る実験系をセットアップすることが出来た (図 6)。

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 1 件)

Saito, H., Nishizumi, H., Suzuki, S., Matsumoto, H., Ieki, N., Abe, T., Kiyonari, H., Morita, M., Yokota, H., Hirayama, N., Yamazaki, T., Kikusui, T., Mori, K., Sakano, H. Immobility responses are induced by photoactivation of single glomerular species responsive to fox odor TMT. *Nature Commun.* in press 査読有

[学会発表] (計 1 件)

Harumi Saito Photo-activation of a single pair of specific to a fox odorant elicits an immobility response in mice. Gordon Research Conference on Optogenetic approaches to understanding neural circuits and behavior. Poster presentation Newry, ME USA 17-18 July 2016

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 治美 (SAITO, Harumi)

福井大学・学術研究院医学系部門・学術研究

員

研究者番号 : 20311342

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者