

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月27日現在

機関番号：12601

研究種目：特別推進研究

研究期間：2007～2011

課題番号：19002012

研究課題名（和文） 軸索末端に分子コード化される神経個性

研究課題名（英文） Neural circuit formation in the mouse olfactory system

研究代表者

坂野 仁 (SAKANO HITOSHI)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：90262154

研究成果の概要（和文）：

本研究では、長年懸案であった嗅覚受容体によって指令される嗅神経細胞の軸索投射及び嗅覚神経地図形成の分子機構について、ほぼその全容が解明された。また匂い情報の識別に関しては、同じ匂い分子であってもその質感の判断が、遺伝的にプログラムされた本能判断と記憶に基づく学習判断に対して、情報を受容するレセプターの段階から、互いに独立した2つの神経回路によって並行して処理されている事が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

In this project, we have revealed the molecular logics of olfactory map formation. Axons of olfactory sensory neurons (OSNs) are guided to approximate locations in the olfactory bulb by a combination of dorsal-ventral patterning, which is based on anatomical locations of OSNs, and anterior-posterior patterning, which is regulated by cAMP signals whose levels are uniquely determined by odorant receptor species. It was also found that odor information is separately processed by two distinct circuits; one is for hard-wired innate responses, and the other is for memory-based learned behaviors.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-------------|-------------|-------------|
| 2007年度 | 110,100,000 | 33,030,000 | 143,130,000 |
| 2008年度 | 118,600,000 | 35,580,000 | 154,180,000 |
| 2009年度 | 107,800,000 | 32,340,000 | 140,140,000 |
| 2010年度 | 117,100,000 | 35,130,000 | 152,230,000 |
| 2011年度 | 107,800,000 | 32,340,000 | 140,140,000 |
| 総計 | 561,400,000 | 168,420,000 | 729,820,000 |

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：軸索末端、シナプス形成、神経地図、匂い情報処理

1. 研究開始当初の背景

2006年秋の申請時点での研究の背景は以下の通りである。

(1) 国内外に於ける研究の背景

ヒトやマウスは外界からの様々な情報を五感を介して識別し行動している。その中で嗅

覚・味覚など化学情報の受容、すなわち chemo-sensing の能力は線虫から哺乳類に至るまで一般的に備わっており、生存に不可欠な求餌、毒物や天敵に対する忌避、フェロモンを介した性識別や生殖行動などで中心的役割を果たす。

ヒトやマウスの嗅覚受容体 (odorant receptor: OR) 遺伝子系では、免疫系の抗体遺

伝子同様、1つの細胞で1種類の受容体遺伝子が、2つある対立遺伝子の一方からのみ発現するというきわめてユニークな発現様式をとっている (allelic exclusion)。また、嗅細胞の嗅球への軸索投射は、個々の細胞が発現するOR 分子の種類によってその位置が規定され、嗅球上の投射先である糸球構造

(glomerulus) とOR の間には1:1の対応関係が成り立っている。したがって匂い情報が嗅上皮から入力されると、嗅球表面にはちょうど1,000個の糸球を素子とする電光掲示板のように、濃淡を含む糸球の発火のパターンが形成され、この匂い地図によって匂いの種類と質を脳が識別すると考えられている。

本研究課題で扱う嗅覚など化学情報受容の研究には長い歴史が有り、特にYale大学のGordon Shephardの一門による生理学的アプローチ、例えばその門下であった森憲作(東大)による匂い地図の研究やRandall Reed (Johns Hopkins大)による匂いシグナル伝達の研究等が特筆される。続いて、ケモセンシングの研究が分子生物学の時代に突入したのは、Linda BuckとRichard Axel (Columbia大)によってORの候補遺伝子が単離された1991年である。但し、遺伝子は単離されたものの、軸索投射や情報処理など基本的問題の多くは解明されないまま残され、最も重要であったORの種類に依存した神経回路形成の分子基盤については、遺伝子単離後15年を経た2006年の時点に於いても殆ど理解されていなかった。

(2) 申請者のグループによる研究の背景

申請者らはOR 遺伝子のmono-allelicな発現に関して、その発現を正に制御するシスエレメント H を発見し、同時にOR 遺伝子の発現産物が他のOR 遺伝子の新たな発現を抑制するfeedback 制御のあることを報告した (Science, 2003)。申請者はまた、長年謎とされてきた嗅細胞軸索投射におけるOR 分子の役割について画期的発見を行った。即ち、OR 分子が直接的に軸索のターゲティングや選別に関わるとされてきたこれ迄の考え方を覆し、OR のidentity が接着・投射分子の量と組み合わせという分子コードに変換されて軸索末端に表現されている事を見出した (Science, 2006; Cell, 2006)。これらOR遺伝子の発現や軸索投射に関する申請者の研究についての国際的反響は大きく、Gordon Research Conference, Keystone Symposium や Cold Spring Harbor Meeting 等で高い評価を得た。

2. 研究の目的

申請時の研究目的は以下の通りである。また、研究期間中の大きな変更はない。

本研究課題では嗅覚系をモデルシステムに用いて、個々の神経細胞の個性、即ちneuronal identity がどのように獲得され、それが軸索末端にどのように分子コード化されて回路形成が起こるのかを明らかにする。マウス嗅覚系のOR 遺伝子は、免疫系の抗原受容体遺伝子をしのぐ最大の多重遺伝子ファミリーを形成している。一方リガンドである匂い分子は数万種類とされ、個々の匂いは複数の匂い分子の組合せ及び量比によって規定されているので、匂い情報の種類はほぼ無限とあってよい。この多様な匂い情報を一千余りの受容体遺伝子でどのように識別するのが、この分野における大きな課題であった。

多様な匂い情報を一千種類程度のOR分子で識別するからくりは、嗅球における匂い情報の画像化にある。この匂い情報の2次元変換は一神経・一受容体および、一糸球・一受容体という、2つの基本ルールによって支えられている。本研究課題では主として、同種のOR 分子を発現する嗅細胞の軸索同士が特定の糸球へと収斂する、いわゆるOR-instructed な軸索投射メカニズムの解明を目的とする。具体的には発現するOR の種類によって決まる個々の嗅細胞のidentity が、軸索末端にどのように分子コード化されているのかという neuronal identity code の分子実態の解明を目指す。

3. 研究の方法

申請時に計画された研究の方法は以下の通りである。研究は大筋に於いて申請された方法に従って遂行され、期待を超える成果が得られた。

(1) 匂い地図形成の基本原則 (DV 軸)

申請者のグループは、嗅細胞の嗅上皮での位置がその軸索投射に於けるDV 軸のパラメーターになっている事を見出した (J. Neurosci., 2005)。本研究課題では、嗅細胞の嗅上皮に於ける位置情報がその軸索の嗅球に於ける投射位置の決定にどう反映されているのかについて解析を試みる。具体的には軸索投射分子の濃度勾配を想定し、嗅上皮及び嗅球上に分布する誘導分子の探索を行う。これについてはすでに、Neuropilin-2やRobo-2 などがその候補として挙げられている。本研究では、これら分子を特定のOR と共に発現させ、発現嗅細胞の軸索投射がDV 軸に沿って移動するかどうかを解析する。また、嗅上皮に於ける嗅細胞の位置情報が、OR 遺伝子の選択をどう規定しているのかについて、発生過程における細胞分化のlineage 制御の観点から考察する。

(2) 匂い地図形成の基本原則 (AP 軸)

次にAP軸に沿った軸索投射のパラメータの決定であるが、申請者らはORを介したcAMPのシグナルの強さがこのプロセスに深く関わっている事を見出した(Science, 2006)。即ち、OR分子においてGタンパク質を活性化するのに必要な部位(DRYモチーフ)を変異させると軸索投射が乱れ糸球が形成されなくなる事、またG_{olf}類似のGタンパク質で、嗅細胞の分化段階初期に発現するG_sの活性を変動させると嗅細胞の軸索投射位置がAP軸に沿って移動する事が見出された。これらの観察は、ORの種類という嗅細胞のidentityが、G_sタンパク質を介してcAMPのレベルというパラメータに変換され、軸索の投射に関与している可能性を示唆している。本研究課題では、cAMP依存的に働くタンパク質リン酸化酵素(PKA)や転写制御因子(CREB)の変異遺伝子を特定のOR遺伝子にIRESを介してリンクさせ、それらの嗅細胞の投射に与える影響について解析する。また、cAMPのシグナル強度によって転写量が変わる軸索投射因子のスクリーニングを行う。申請者等は、single-cell RT-PCRを用いることにより、軸索投射・シナプス形成に関与する遺伝子の探索を試みた。その結果、Neuropilin-1など、神経活動非依存的に発現し、嗅球上の糸球においてAP軸に沿った濃度勾配を示す候補分子を複数種類同定した。本研究で、これら遺伝子について、トランスジェニックマウスを用いたモザイクマウスの解析を試みる。

(3) ゾーン特異的欠損マウスの匂い識別

ヒトやマウスにおいて匂い情報は情動と密接に関連している。解剖学的にも嗅球からの匂い情報が情動反応に重要である大脳辺縁系の扁桃体へと直接伝達されていることから、他の感覚系に比べて入力によって誘起される情動反応を解析するのに適した系である。本研究では、野生型マウスが嫌う2-methyl-butiric acid (2-MBA)や天敵であるキツネの肛門分泌線に検出されるtri-methyl-thiaoline (TMT)を用いて解析を行う。これら分子は嗅球のゾーン1と非ゾーン1に存在する異なる糸球を共に発火させるが、ゾーン1除去マウスではゾーン1領域の糸球が欠失しているため、非ゾーン1領域の糸球のみでこの匂いを検出する。興味深いことに、野生型マウスは2-MBAやTMTを先天的に忌避するのに対し、ゾーン1除去マウスではこれら分子に対し興味を示すものの嫌悪感を表さない。本研究では、嗅球の様々な投射領域を空白にした遺伝子改変マウスを作製しその行動を解析する事により、嗅球に形成される匂い地図と匂い情報の質との関係を明らかにする。

(4) OR遺伝子の単一発現制御

申請者のグループでは、OR遺伝子の発現を制御するlocus control region (LCR)としてH領域を報告した(Science, 2003)。Columbia大学のAxel博士のグループは、H領域のメチル化がOR遺伝子のmono-allelicな発現制御に関与している可能性を報告している。このH領域のDNAメチル化は、通常知られているCpG配列をターゲットとするものではなく、CpA配列のメチル化であり、メチル化酵素Dnmt3Aによる特殊なものである。本研究では、OR分子から入力されるfeedbackシグナルのターゲットが、H領域のDNAメチル化部位である可能性を想定し次の様な実験を計画する。まず、DNAメチル化酵素Dnmt3Aの嗅細胞特異的なconditionalノックアウトを行い、OR遺伝子の単一発現が維持されているかどうかを解析する。次にH領域のメチル化であるが、これ迄に31のCpA配列にDNAメチル化が検出されている。本研究ではこれらメチル化を受けるCpA配列に変異を導入してメチル化を阻害した場合、ORの単一発現制御にどのような影響が出るかについて検討する。またこのDNAメチル化が、H領域の活性化に必要なのか、不活性化に必要なのかについて考察し、allelic exclusionとの関連を調べる。

4. 研究成果

本研究による成果は次の四点にまとめられる。それらはいずれもインパクトファクターの高いジャーナルのarticleとして公表され、国際的にも高い評価を得ている。

(1) 前後軸に沿った軸索投射

前後軸に沿った嗅覚神経地図形成に関しては、以前、発現するORの種類に応じて産生される固有なレベルのcAMPが、Neuropilin-1 (Nrp1)など軸索ガイダンス分子の転写量を決定する事によって制御される事を報告した(Imai et al., Science, 314, 657-661, 2006)。我々は更に、このNrp1受容体の反発性リガンド、Semaphorin-3A (Sema3A)が、ターゲットである嗅球ではなく、嗅細胞においてNrp1と相補的に発現する事を見出した。これは、Nrp1とSema3Aの反発性シグナルを介して、軸索束内での軸索間相互作用により神経地図のトポグラフィックがつけられることを示している。ここで見出された神経地図形成におけるpre-target axon sortingの考え方は、高等動物の脳における神経マップ形成の新たなストラテジーとして注目されている。(Imai et al., Science, 325, 251-260, 2009)

(2) 背腹軸に沿った軸索投射

嗅覚神経地図の背腹軸に沿ったトポグラフィックは、前後軸とは異なり、嗅細胞の嗅上皮における細胞体の相対的位置によって決

定される。この背腹軸に沿った軸索投射を制御する分子として、Nrp2 受容体とその反発性リガンドである Sema3F が候補として挙げられていた。我々は当初、Sperry の化学親和性モデルに従い、Nrp2 は軸索末端で Sema3F はターゲットである嗅球において発現すると考えた。しかしながら、予想に反して Sema3F 遺伝子は嗅球細胞では転写されず、Nrp2 同様、嗅細胞によって濃度勾配をなして、しかも相補的に産生される事が判明した。これらの研究により、背腹軸に沿った嗅覚地図のトポグラフィは、発生過程に於ける sequential な軸索投射と、腹側に向かって拡張していく嗅球構造を背景に、反発性の Sema3F とその受容体である Nrp2 との相補的発現によって形成されることが明らかになった。

(Takeuchi *et al.*, *Cell*, 141, 1057-1067, 2010)

(3) OR 遺伝子の単一発現制御

匂い分子を受容する OR はマウスの場合約一千種類存在するが、個々の嗅細胞はそのうちの1種類のみを相互排他的かつ mono-allelic に発現している(1神経・1受容体ルール)。我々は先に報告した OR 遺伝子の LCR の一つである *H* 領域 (Serizawa *et al.*, *Science*, 302, 2088-2094, 2003) に必須配列を同定する為、ゼブラフィッシュのアッセイ系を用いて、様々な欠失変異体を作製しその活性を解析した。その結果、*H* 領域の中央部に位置するわずか 124bp の配列内にエンハンサー活性があることが判明した。Columbia 大学の Axel 博士のグループは、我々の同定した *H* 領域が染色体を越えてトランスに働き得るのではないかという、転写制御ハブ複合体モデルを提唱した。我々はこのモデルの真偽を検証する為、*H* コア領域のノックアウトマウスを作製した。その結果、Axel 博士らのモデルは支持されず、*H* 領域はトランスではなく、シスにのみ働く制御領域である事が示された。(Nishizumi *et al.*, *PNAS*, 104, 20067-72, 2007)

(4) 糸球地図の領野特異的な欠損マウス

様々な匂い情報は約 1000 画素からなる糸球地図というデジタルスクリーンに、糸球の発火パターンとして画像展開され、この匂い地図をもとに脳が匂いの質と種類を判別する。ところでこの糸球地図は大脳皮質のブロードマンマップの様に、その領野ごとに匂い識別に対して異なる機能を持つのだろうか。我々は背側(dorsal: D)ゾーン特異的なプロモーターと、神経細胞特異的なプロモーター活性を組み合わせる事により、D ゾーンの嗅細胞のみが選択的に除去される変異マウス(Δ D)を作製した。次に様々な匂いに対するマウスの行動を調べたところ、変異マウスは天敵臭など忌避物質の匂いを正常に検知出来るにもかかわらず、全く忌避行動をとらずむ

しろ強い好奇心を示した。ちなみに Δ D マウスは、忌避物質の匂いに痛みを連携して学習させた後は、同じ匂いに対して忌避を示す。ここで得られた実験結果は、先天的行動を支配する本能判断のために神経回路が、記憶に基づく学習判断の為に回路とは独立に、入力の段階から別れて機能する事を示している。この研究はネコを恐れない fear-less マウスとして、英国 BBC やフランス国営放送など、海外メディアで広く取り上げられた。(Kobayakawa *et al.*, *Nature*, 450, 503-508, 2007)

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 17 件)

- ① Igarashi, K.M., Ieki, N., An, Myungho, Yamaguchi, Y., Nagayama, S., Kobayakawa, K., Kobayakawa, R., Tanifuji, M., Sakano, H., Chen, W.R., and Mori, K.: Parallel mitral and tufted cell pathways route distinct odor information to different targets in the olfactory cortex. *J. Neurosci.* 32, 7970-785 (2012).
- ② Imai, T. and Sakano, H.: Axon-axon interactions in neuronal circuit assembly: lessons from olfactory map formation. *Eur. J. Neurosci.*, 34, 1647-1654 (2011).
- ③ Mori, K., Sakano, H.: How is the olfactory map formed and interpreted in the mammalian brain? *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 465-497 (2011).
- ④ Yokoyama, T.K., Mochimaru, D., Murata, K., Manabe, H., Kobayakawa, K., Kobayakawa, R., Sakano, H., Mori, K., and Yamaguchi M.: Elimination of adult-born neurons in the olfactory bulb is promoted during the postprandial period. *Neuron* 71, 883-897 (2011).
- ⑤ Tsuboi, A., Imai, T., Kato, H.K., Matsumoto, H., Igarashi, K.M., Suzuki, M., Mori, K., and Sakano, H.: Two highly homologous mouse odorant receptors encoded by tandemly-linked *MOR29A* and *MOR29B* genes respond differently to phenyl ethers. *Eur. J. Neurosci.*, 33, 205-213 (2011).
- ⑥ Sakano H.: Neural map formation in the mouse olfactory system. *Neuron* 67, 530-542 (2010).
- ⑦ Matsumoto, H., Kobayakawa, K., Kobayakawa, R., Tashiro, T., Mori, K., Sakano, H., and Mori, K.: Spatial arrangement of glomerular molecular-feature clusters in the odorant-receptor class domains of the mouse olfactory bulb. *J. Neurophysiol.* 103,

- 3490-3500 (2010).
- ⑧Haga, S., Hattori, T., Sato, T., Sato, K., Matsuda, S., Kobayakawa, R., Sakano, H., Yoshihara, Y., Kikusui, T., Touhara, K.: The male mouse pheromone ESP1 enhances female sexual receptive behaviour through a specific vomeronasal receptor. *Nature* 466, 118-122 (2010).
- ⑨Takeuchi, H., Inokuchi, K., Aoki, M., Suto, F., Tsuboi, A., Matsuda, I., Suzuki, M., Aiba, A., Serizawa, S., Yoshihara, Y., Fujisawa, H., Sakano, H.: Sequential arrival and graded secretion of Sema3F by olfactory neuron axons specify map topography at the bulb. *Cell* 141, 1056-1067 (2010).
- ⑩Imai, T., Sakano, H., and Vossahl, L.B.: Topographic Mapping-The Olfactory System. In Cold Spring Harbor Perspective Biology., 2, a001776 Cold Spring Harbor Laboratory Press. (2010).
- ⑪Imai, T., Yamazaki, T., Kobayakawa, R., Kobayakawa, K., Abe, T., Suzuki, M., Sakano, H.: Pre-target axon sorting establishes the neural map topography. *Science* 325, 585-590 (2009).
- ⑫Imai, T. and Sakano, H.: “Odorant Receptor Gene Choice and Axonal Projection in the Mouse Olfactory System” in Chemosensory Systems in Mammals, Fishes, and Insects. W. Meyerhof and S. Korsching Eds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 57-75 (2009).
- ⑬Imai, T. and Sakano, H.: Odorant receptor-mediated signaling in the mouse. *Curr. Opin. Neurobiol.* 18, 251-260 (2008).
- ⑭Nishizumi, H., Kumasaka, K., Inoue, N., Nakashima, A., Sakano, H.: Deletion of the core-H region in mice abolishes the expression of three proximal odorant receptor genes in cis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 20067-20072 (2007).
- ⑮Kobayakawa, K., Kobayakawa, R., Matsumoto, H., Oka, Y., Imai, T., Ikawa, M., Okabe, M., Ikeda, T., Itohara, S., Kikusui, T., Mori, K., Sakano, H.: Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb. *Nature* 450, 503-508 (2007).
- ⑯Imai, T. and Sakano, H.: Roles of odorant receptors in projecting axons in the mouse olfactory system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17, 507-515 (2007).
- ⑰Nagawa, F., Kishishita, N., Shimizu, K., Hirose, S., Miyoshi, M., Nezu, J., Nishimura, T., Nishizumi, H., Takahashi, Y., Hashimoto, S., Takeuchi, M., Miyajima, A., Takemori, T., and Sakano, H.: Functional antigen receptor genes of the agnathan lamprey are constructed by a process involving copy choice. *Nature Immunol.* 8, 206-213 (2007).
- [学会発表] (国外計 4 3 件、以下抜粋)
- 発表者、講演タイトルは全て
Sakano, Hitoshi: “Axon wiring and neural map formation in the mouse olfactory system”
- ①ISOT, Stockholm, Sweden. June 23-27, 2012.
- ②AChemS 34th Annual Meeting. Huntington Beach, CA, USA. April 25-28, 2012.
- ③Janelia Farm Research Conference: Constructing Neural Circuits. Janelia Farm Research Campus, Ashburn, VA, USA. April 29-May 2, 2012.
- ④International Society of Developmental Neuroscience (ISDN), Tata Institute, Mumbai, India January 11-14, 2012
- ⑤EMBO Olfaction Conference: From Receptor to Behavior. The Hebrew University of Jerusalem, Israel. February 6-9, 2011.
- ⑥Gordon Research Conference: Neural Development. Salve Regina University, Newport, RI, USA. August 25-21, 2010.
- ⑦Gordon Research Conference: Molecular and Cellular Neurobiology. Hong Kong University of Science and Technology, Hong Kong. June 6-11, 2010.
- ⑧Janelia Farm Conference: Form and Function of the Olfactory System. Janelia Farm Research Campus, Ashburn, VA, USA. May 23-26, 2010.
- ⑨Francis Crick Symposium on Neuroscience. CSH Meeting, Asia. Suzhou, China. April 12-17, 2010.
- ⑩Keystone Symposium: Synapses. Snowbird Resort in Snowbird, UT, USA. April 11-15, 2010.
- ⑪Salk-Nature-IPSEN Symposium on Biological Complexity: Sensory Systems. Salk Institute, La Jolla, CA, USA. January 13-15, 2010.
- ⑫Scientific Meeting on the Chemical Senses. Beijing, China, November 15-17, 2009.
- ⑬EMBO Conference Series: Assembly and Function of Neural Circuits. Monte Verita, Ascona, Switzerland. October 4-8, 2009.
- ⑭The XIXth ECRO Congress: Taste and Smell. Sardinia, Italy. September 24-27, 2009.
- ⑮25th Meeting of the International Society of

Chemical Ecology. Neuchatel,
Switzerland. August 23-27, 2009.

⑩Janelia Farm Conference: Constructing
Neural Circuits. Janelia Farm Research
Campus, Ashburn, VA, USA. May 3-6,
2009.

⑪International Symposium on Olfaction and
Electric Nose. Brescia, Italy. April
15-17, 2009.

⑫Keystone Symposium: Chemical Senses.
Tahoe City, CA. March 15-19, 2009.

⑬Keystone Symposium: Axonal Connections.
Keystone, CO, USA. February 17-22, 2009.

[その他]

ホームページ等

<http://www.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/sakano-lab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂野 仁 (SAKANO HITOSHI)
東京大学・大学院理学系研究科・教授
研究者番号：90262154

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：