

機関番号： 82401
研究種目： 基盤研究(B)
研究期間： 2008～2010
課題番号： 20300117
研究課題名(和文)
ゼブラフィッシュ嗅覚系の神経回路網形成・機能構築原理の統合的解明
研究課題名(英文) Toward understanding the mechanisms for neural circuit formation and functional architecture of the zebrafish olfactory system
研究代表者
吉原 良浩 (YOSHIHARA YOSHIHIRO)
独立行政法人理化学研究所・シナプス分子機構研究チーム・シニア・チームリーダー
研究者番号： 20220717

研究成果の概要(和文)：

嗅覚系の神経回路網形成・機能構築原理の統合的解明へ向けて、遺伝学・発生工学・in vivo 蛍光可視化などの技術が利用可能なモデル脊椎動物としてのゼブラフィッシュの利点を最大限に活用し、以下の3つの項目について解析を行った。(1) 嗅覚神経回路網形成の分子・細胞メカニズムの解明、(2) 高次嗅覚中枢における匂い情報コーディング原理の解明、(3) 特定の嗅覚行動の発現に結びつく嗅覚神経回路素子の同定。その結果、アミノ酸への誘引行動を司る嗅覚神経回路の同定、嗅球から右手網核へと至る非対称神経回路の発見など、多くの新知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：

To understand the mechanisms underlying neural circuit formation and functional architecture of the olfactory system, we used a model organism, zebrafish, which is amenable to forward/reverse genetics, in vivo neural activity imaging, and various olfactory behavioral analyses. As a result, we obtained several new findings including the identification of distinct types of olfactory sensory neurons responsive to different odor stimuli, the anatomical and functional dissection of olfactory neural circuitry mediating the attractive response to amino acids, and the discovery of a direct and asymmetric axon projection from the olfactory bulb to the right habenular nucleus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	15,500,000	4,650,000	20,150,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：嗅覚系、神経回路網、ゼブラフィッシュ、行動、遺伝学、嗅覚誘引行動、警報フェロモン、性フェロモン

1. 研究開始当初の背景

嗅覚系は物体から発せられる匂い分子を受容し、その情報を鼻から脳へと伝え、匂いのイメージを脳内に表現・創造・記憶あるいは快・不快の感情を誘起させる神経システムである。1991年のLinda BuckとRichard Axelによる嗅覚受容体遺伝子群の発見(2004年度ノーベル医学生理学賞)が契機となり、その後、嗅覚研究は飛躍的に発展してきた。特に電気生理学・神経活動イメージング・分子生物学・発生工学などの手法を駆使した様々な研究によって、嗅上皮の嗅細胞における嗅覚受容体の発現と機能、嗅球における『匂い地図』の存在が証明され、本研究開始時には、鼻から脳の入口までに至る一次嗅覚神経系の匂い情報コーディング様式については、かなりの部分が解明されていた。しかしながら、嗅球における『匂い地図』は匂い分子の構造(例えば炭化水素の長さ、官能基、ベンゼン環など)を基にした化学構造のマップであり、匂いのイメージ形成、記憶、快・不快の感情誘起などはさらに高次の嗅覚中枢において創造されるものである。このような嗅球から高次嗅覚中枢へと至る二次嗅覚神経系の機能構築、さらには特定の嗅覚行動を司る神経回路の実体については、ほとんど何もわかっておらず、それらの解明が待たれていた。

2. 研究の目的

本研究課題においては、遺伝学・発生工学・分子生物学・神経活動イメージング・神経行動学など様々な実験手法を駆使することにより、ゼブラフィッシュ嗅覚神経系の全体像に迫ることを目的とした。具体的には以下の3つの項目について統合的なアプローチを行った。

(1) 嗅覚神経回路網形成の分子・細胞メカニズムの解明

嗅上皮から嗅球へと至る一次嗅覚神経回路、嗅球内での匂い情報プロセッシングを行う局所神経回路、さらには嗅球から高次嗅覚中枢へと至る二次嗅覚神経回路を区別し、それぞれの回路形成に関わる機能分子群の実体を明らかにする。

(2) 高次嗅覚中枢における匂い情報コーディング原理の解明

一次嗅覚神経系に比して、嗅球から終脳へ

と至る僧帽細胞軸索の投射パターンとその形成メカニズムおよび高次嗅覚中枢における匂い情報のコーディング様式については、ほとんど何も解明されていない。そこで、二次嗅覚神経系の分子発現・細胞構築・軸索投射パターン・神経回路形成・神経活動さらには匂いイメージ形成に至るまでの神経機構を分子レベル及びネットワークレベルでアプローチし、高次嗅覚中枢における匂い情報コーディング原理の解明を目指す。

(3) 特定の嗅覚行動の発現に結びつく嗅覚神経回路素子の同定

嗅覚記憶のモデルとして知られているサケの母川回帰行動、フェロモンとしてのプロスタグランジンF_{2a}(PGF_{2a})への追尾行動、アミノ酸や胆汁酸など各種匂い分子に対する誘引・忌避・フリージング反応など、ゼブラフィッシュを用いて実験室内で再現できる嗅覚行動の基盤を分子レベル・細胞レベル・神経回路レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 嗅覚神経回路網形成の分子・細胞メカニズムの解明

これまでショウジョウバエにおいて、ランダムな染色体座にGal4転写活性化因子が導入された数多くのジーントラップ系統が作製され、それらを様々なUAS(Gal4活性化ドメイン)レポーター系統と交配させることで、特定のタイプのニューロンの標識、欠損あるいは活動阻害が可能であった。申請者らは国立遺伝学研究所の川上らとの共同研究で嗅覚神経系へのTo12トランスポゾン・ジーントラップGal4/UASシステムの応用を開始した。

まず初めに別のタイプの嗅覚神経系ニューロンでGal4を発現するさらに多くのジーントラップ系統を同定・樹立する。またこれらGal4系統を用いて嗅覚神経系の特定のタイプのニューロンの発生過程・神経連絡・生理機能の解析を行うために、UASの下流に各種レポーターや機能遺伝子を繋げたトランスジーンを発現するトランスジェニックマウスゼブラフィッシュ系統の作製を進める。さらに、各ジーントラップ系統においてGal4挿入染色体部位を決定し、嗅覚神経系の特定のタイプのニューロンで発現する機能遺伝子を同定する。

同時並行して、Gal4認識・転写活性化配列UASの下流に様々な蛍光レポーターや神経活動調節分子を発現誘導できるトランスジェニック系統を樹立する。次に、上記研究で得られた嗅覚神経系の異なったタイプのニューロンにGal4を発現するジーン

ントラップ系統と、さまざまなUASレポーター系統を交配させ、神経解剖学的解析(GFP, RFP, Kaede, WGA)、神経活動イメージング(GCaMP2, synaptopHluorin)、神経機能及び行動学的解析(Tetanus toxin, Diphtheria toxin, Nitroreductase, Channelrhodopsin)へと応用を試みる。

(2) 高次嗅覚中枢における匂い情報コーディング原理の解明

一次嗅覚神経系に比して、嗅球から終脳へと至る二次嗅覚ニューロン(僧帽細胞)の軸索投射パターンとその形成メカニズムおよび高次嗅覚中枢における匂い情報のコーディング様式については、ほとんど何も解明されていない。そこで本項目では、二次嗅覚神経系の分子発現・細胞構築・軸索投射パターン・神経回路形成・神経活動さらには匂いイメージ形成に至るまでの神経機構を分子レベル及びネットワークレベルでアプローチし、高次嗅覚中枢における匂い情報コーディング原理の解明を目指す。

嗅球よりさらに高次の嗅覚中枢を解析するためには、僧帽細胞で特異的に機能する遺伝子発現プロモーターを利用して、各種レポーターや機能分子を発現させる手法が有効である。申請者らは、ゼブラフィッシュ嗅球の一部のタイプの僧帽細胞において再現性良く機能するLhx2a遺伝子発現プロモーターの単離、さらには僧帽細胞でYFPを発現するトランスジェニックゼブラフィッシュの作製に成功した。このトランスジェニックゼブラフィッシュの詳細な神経解剖学的解析を行い、嗅球から高次嗅覚中枢への軸索投射パターンを明らかにする。またLhx2a遺伝子発現プロモーターの支配下にGal4を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュの作製も行い、(1)で得られる各種UAS系統との交配に備える。さらにLhx2a遺伝子発現プロモーターを用いてのモザイク発現解析により、単一の僧帽細胞を蛍光可視化する技術を開発し、異なった糸球体から情報を受け取る僧帽細胞の形態・神経連絡・機能の相同性と相違性を明らかにし、嗅球から高次嗅覚中枢へと至る軸索投射マップを作成する。

(3) 特定の嗅覚行動の発現に結びつく嗅覚神経回路素子の同定

嗅覚記憶のモデルとして知られているサケの母川回帰行動、性フェロモンとしてのプロスタグランジンF_{2a}によって誘起される性行動、アミノ酸や胆汁酸など各種匂い分子に対する誘引反応、皮膚抽出物に含まれる警報フェロモンによって誘起される忌避行動

など、ゼブラフィッシュを用いて実験室内で再現できる嗅覚行動の基盤を分子レベル・細胞レベル・神経回路レベルで明らかにする。

4. 研究成果

(1) 嗅覚神経回路網形成の分子・細胞メカニズムの解明

To12トランスポゾンを用いてのジーントラップスクリーニング及び既知遺伝子の発現調節プロモーター領域を用いてのトランスジェネシスにより、嗅覚神経回路の一部のニューロンにGal4を発現する約30種類の系統を樹立した。ジーントラップ系統のうち、5系統についてはGal4挿入遺伝子座を同定し、それら遺伝子の嗅覚神経系における機能を現在解析している。

並行して、GFP、膜移行型YFP、膜移行型RFP、シナプス小胞型GFP、Kaede、WGA、synaptopHluorin、GCaMP2.2、GCaMP4、Tetanus toxin、Nitroreductase、弱毒化型Diphtheria toxin、Channelrhodopsinなどの発現誘導可能なUASレポーター系統の作製にも成功した。

(2) 高次嗅覚中枢における匂い情報コーディング原理の解明

嗅球から高次嗅覚中枢へと至る二次嗅覚神経系の分子発現・細胞構築・軸索投射パターン・神経回路形成・神経活動さらには匂いイメージ形成に至るまでの神経機構を分子レベル及びネットワークレベルでアプローチし、高次嗅覚中枢における匂い情報コーディング原理の解明を目指して研究を行った。嗅球僧帽細胞の一部のサブセットで選択的に機能する遺伝子発現エンハンサーの同定に成功し、その神経解剖学的解析を単一細胞ラベリング法などの技術を駆使して行った。その結果、嗅球の内背側部の糸球体から情報を受け取る僧帽細胞はその軸索を終脳領域へとともに、右の手綱核の内側部へと直接かつ非対称的に投射するという新たな神経回路を発見した(図1)(Miyasaka et al., 2009)。この知見は、感覚入力情報として左右の非対称性をもたない嗅覚系において、神経接続で非対称性を創造し、何らかの特異的な行動出力へと結びつけるための回路メカニズムの基盤になっていることを示唆するものである。

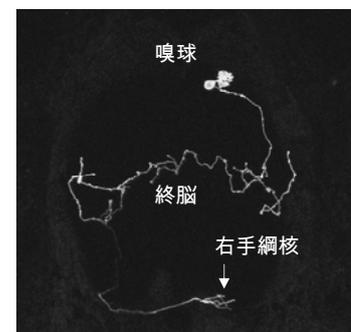


図1 遺伝学的単一ニューロン標識法で可視化された嗅球の僧帽細胞

(3) 特定の嗅覚行動の発現に結びつく嗅覚神経回路素子の同定

アミノ酸への誘引行動(好き反応)を定量的か

つ再現性良く解析できる行動実験システムを確立して、上記の様々な GAL4 発現系統における遺伝学的神経伝達遮断技術を組み合わせることにより、アミノ酸への誘引反応を制御する一次嗅覚神経回路の実体を明らかにした (Koide et al. PNAS 2009)。また、嗅覚忌避行動および性行動の半自動解析システムの確立に成功した (図 2)。さらにゼブラフィッシュ皮膚抽出物に含まれる警報フェロモンに対する魚の忌避反応 (burst swimming, freezing など)、卵巣抽出物に含まれる性フェロモンに対する雄ゼブラフィッシュの性行動 (attraction, shoaling など) を半自動的に解析できる行動実験システムを確立した。またこれら匂い刺激 (アミノ酸、警報フェロモン、性フェロモンなど) によって、異なったタイプの嗅細胞が活性化し、嗅球の特異的な糸球体へと興奮を伝達することを見出した。

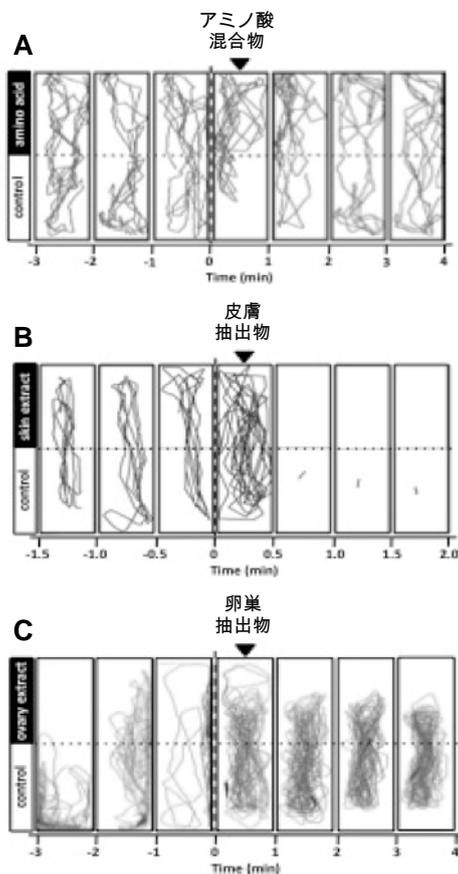


図 2 ゼブラフィッシュ嗅覚行動解析システム。魚の遊泳行動をビデオカメラでモニターし、単位時間 (1分あるいは30秒) ごとの動きをトレースした。各種匂い物質を投与し (矢尻)、前後の行動変化を様々なパラメーターについて解析することが可能である。

(A) アミノ酸混合物への誘引反応。餌などに含まれるアミノ酸を投与すると、魚が迅速に誘引される。

(B) 皮膚抽出物 (警報フェロモン) に対する忌避反応。投与後すぐに高速遊泳 (burst swim)、その後フリーズを起こす。

(C) 卵巣抽出物 (性フェロモン) に対する雄ゼブラフィッシュの性行動。投与後、水槽の中央付近で高頻度ターンを繰り返す。

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 14 件)

① Mitsui S., Yoshihara Y., et al., Genetic visualization of the secondary olfactory pathway in Tbx21 transgenic mice, *Neural Systems and Circuits* 1, 5, 2011, 査読有

② Haga S., Yoshihara Y., et al., The male mouse pheromone ESP1 enhances female sexual receptive behaviour through a specific vomeronasal receptor, *Nature* 466, 118 – 122, 2010, 査読有

③ Takeuchi H., Yoshihara Y., et al., Sequential arrival and graded secretion of sema3F by olfactory neuron axons specify map topography at the bulb, *Cell* 141, 1056 – 1067, 2010, 査読有

④ Ohmoto M., Yoshihara Y., et al., Genetic tracing of the neural pathway for bitter taste in t2r5-WGA axons specify map topography at the bulb, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 400, 734 – 738, 2010, 査読有

⑤ Miyasaka N., Yoshihara Y., et al., From the olfactory bulb to higher brain centers: genetic visualization of secondary olfactory pathways in zebrafish, *The Journal of Neuroscience* 29, 4756-4767, 2009, 査読有

⑥ Koide T., Yoshihara Y., et al., Olfactory neural circuitry for attraction to amino acids revealed by transposon-mediated gene trap approach in zebrafish, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 9884-9889, 2009, 査読有

⑦ Yoshihara Y., et al., Dendritic spine formation and stabilization, *Current Opinion in Neurobiology* 19, 146-153, 2009, 査読有

⑧ Matsumoto I., Yoshihara Y., et al., Genetic tracing of the gustatory neural pathway originating from T1R3-expressing sweet/umami taste receptor cells, *Annual of the New York Academy of Sciences* 1170, 46-50, 2009, 査読有

⑨ Kaneko-Goto T., Yoshihara Y., et al., BIG-2 mediates olfactory axon convergence to target glomeruli, *Neuron* 57, 834-846, 2008, 査読有

⑩ 宮坂信彦、吉原良浩、左右非対称な神経回路の存在を嗅覚系で発見、*Aroma Research* 10, 254-255, 2009、査読無

⑪ 吉原良浩、好きな匂いへの誘引行動を司る嗅覚神経回路、文部科学時報 1604、24-25、2009、査読無

⑫ 小出哲也、吉原良浩、好きな匂いを伝える嗅覚神経回路を同定 -ゼブラフィッシュはアミノ酸がお好き!-、Aroma Research 10、348-349、2009、査読無

⑬ 宮坂信彦、吉原良浩、神経回路形成におけるケモカインの役割、Brain Medical 20、127-133、2008、査読無

⑭ 宮坂信彦、嗅覚神経系の発達過程におけるケモカインシグナルの役割、生化学 80、1115-1119、2008、査読無

[学会発表] (計 21 件)

① Yoshihara Y., Neural circuit genetics of zebrafish olfactory system, 10th China-India-Japan-Korea Joint Workshop on Neurobiology and Neuroinformatics (NBNI 2010), 2010.10.11, Kunming, China

② Yoshihara Y., Neural circuit genetics of zebrafish olfactory system, Janelia Farm Conferences: Form and Function of the Olfactory System, 2010.5.23-26, Ashburn, USA

③ Miyasaka N., Yoshihara Y., et al., Genetic tracing of axonal projections from the olfactory bulb to higher brain centers in zebrafish, Janelia Farm Conferences: Form and Function of the Olfactory System, 2010.5.23-26, Ashburn, USA

④ Mitsui S., Yoshihara Y., et al., Identification of mitral/tufted cell-specific transcriptional enhancer upstream of mouse Tbx21 gene, The 7th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (YR Umami Forum 2009), 2009.11.4, Fukuoka, Japan

⑤ Koide T., Yoshihara Y., et al., Genetic dissection of zebrafish olfactory circuitry mediating attractive response to amino acids., The 6th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (YR Umami Forum 2008), 2008.12.6-7, Fukuoka, Japan

⑥ Yoshihara Y., Genetic dissection of olfactory neural circuits in zebrafish, 18th

European Chemoreception Research Organization Congress, ECRO-2008, 2008.9.3-6, Portoroz, Slovenia

⑦ Miyasaka N., Yoshihara Y., et al., Visualizing mitral cell axon projection in transgenic zebrafish, International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT XV), 2008.7.21-26, San Francisco, USA

⑧ Koide T., Yoshihara Y., et al., Genetic dissection of zebrafish olfactory circuitry mediating attractive response to amino acids, International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT XV), 2008.7.21-26, San Francisco, USA

⑨ 増田美和、吉原良浩、他、ゼブラフィッシュ嗅覚忌避行動を司る神経回路メカニズムの解析、第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会合同大会 (Neuro2010)、2010.9.2-4、神戸

⑩ 脇阪紀子、吉原良浩、他、警報フェロモンにตอบสนองするゼブラフィッシュ嗅細胞の同定、第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会合同大会 (Neuro2010)、2010.9.2-4、神戸

⑪ 宮坂信彦、吉原良浩、遺伝子工学的単一ニューロン標識によるゼブラフィッシュ二次嗅覚経路の解析、第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会合同大会 (Neuro2010)、2010.9.2-4、神戸

⑫ 吉原良浩、Systems molecular neuroethology of zebrafish olfaction、第 32 回日本分子生物学会年会、2009.12.9、横浜

⑬ 宮坂信彦、吉原良浩、他、嗅球から高次中枢へ：ゼブラフィッシュ二次嗅覚経路の遺伝子工学的可視化、第 32 回日本神経科学大会、2009.9.18、名古屋

⑭ 小出哲也、吉原良浩、他、アミノ酸への誘引行動を司るゼブラフィッシュ嗅覚神経回路の遺伝学的解析、第 32 回日本神経科学大会、2009.9.18、名古屋

⑮ 小出哲也、吉原良浩、他、アミノ酸への誘引行動を介するゼブラフィッシュ嗅覚神経回路の遺伝学的解析、第 15 回小型魚類研究会、2009.9.13、名古屋

⑯ 吉原良浩、他、ゼブラフィッシュ嗅覚行動の神経回路遺伝学、日本味と匂学会 43 回大会、2009.9.4、旭川

⑰宮坂信彦、吉原良浩、他、嗅球の発達における嗅神経投射の役割：片側嗅神経欠損ゼブラフィッシュ変異体を用いた解析、日本味と匂学会第43回大会、2009. 9. 3、旭川

⑱増田美和、吉原良浩、他、ゼブラフィッシュ嗅覚忌避行動の自動的定量解析法の確立、日本味と匂学会第43回大会、2009. 9. 3、旭川

⑲吉原良浩、嗅覚神経系の機能構築原理：嗅上皮から嗅球へ、さらには高次嗅覚中枢へ、第46回日本生物物理学会年会、2008. 12. 3-5、福岡

⑳宮坂信彦、吉原良浩、他、ゼブラフィッシュ二次嗅覚神経系の可視化と軸索投射パターンの解析、日本味と匂学会第42回大会、2008. 9. 17-19、富山

㉑21 小出哲也、吉原良浩、他、アミノ酸への誘引行動を介在するゼブラフィッシュ嗅覚神経回路の遺伝学的解析、日本味と匂学会第42回大会、2008. 9. 17-19、富山

〔図書〕(計1件)

Yoshihara Y., Molecular genetic dissection of the zebrafish olfactory system, Results and Problems in Cell Differentiation, 255 (97-120), 2009

〔その他〕

ホームページ：

http://www.brain.riken.jp/jp/y_yoshihara.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉原 良浩 (YOSHIHARA YOSHIHIRO)

独立行政法人理化学研究所・シナプス分子機構研究チーム・シニア・チームリーダー
20220717

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

宮坂 信彦 (NOBUHIKO MIYASAKA)

独立行政法人理化学研究所・シナプス分子機構研究チーム・研究員
70332335

小出 哲也 (TETSUYA KOIDE)

独立行政法人理化学研究所・シナプス分子機構研究チーム研究員
30247837