

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H00482

研究課題名（和文）神経個性を表象する神経活動パターンと遺伝子発現制御

研究課題名（英文）Neural activity patterns linking neuronal identity and gene expression

研究代表者

竹内 春樹（Takeuchi, Haruki）

東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・教授

研究者番号：70548859

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 35,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、マウスの嗅覚回路をモデルに神経活動依存的な回路形成機構の具体的な分子メカニズムを明らかにするべく、嗅神経細胞の神経活動の記録と操作の実験を行った。マウス嗅覚系では、発現する嗅覚受容体に規定される神経活動の時間的なパターンが、回路形成に関わる遺伝子の発現を制御することが知られている。本研究では、*in vivo*条件で異なる嗅覚受容体を発現する細胞は異なる神経活動パターンを示すこと、そしてその中で神経発火の頻度の違いが神経活動依存的な転写調節因子であるカルシニューリンを活性化することを介して回路形成に関わる軸索選別分子の一つであるKirrel2の発現量を規定することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の高次脳機能は、多数の神経細胞が織り成す神経回路に支えられている。この神経回路の破綻は、重篤な神経疾患の原因であることから、回路形成メカニズムの解明は基礎と臨床の両面から重要な課題であると考えられている。

一般に哺乳類の神経回路は予め遺伝的に決められたプログラムに加えて、臨界期と呼ばれる発達期の特異的な時期における神経活動による洗練過程を得て機能的な回路へと習熟する。本研究では、電気的な活動である神経活動がどのように神経回路の構造へと影響を与えるのかという点に着目し研究を進めた。その結果、特定の神経活動パターンが特定の遺伝子の発現を制御するというこれまでにない新しいメカニズムを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Using the mouse olfactory circuit as a model system, we conducted experiments to record and manipulate the neural activity of olfactory sensory neurons in order to elucidate the molecular mechanisms of neural activity-dependent circuit formation. In the mouse olfactory system, the temporal pattern of neural activity defined by expressed olfactory receptors regulates the expression levels of genes involved in circuit formation. In this study, we found that cells expressing different olfactory receptors under *in vivo* conditions showed different patterns of neural activity. We also found that differences in neuronal firing frequency define the expression level of Kirrel2, an axon sorting molecule involved in circuit formation via activation of the activity-dependent transcriptional regulator calcineurin.

研究分野：分子神経科学

キーワード：嗅覚 回路形成 神経活動パターン ヘブ則 遺伝子発現

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経細胞が発する電気的な活動は、脳の発達や環境に応じた可塑的变化など正常な脳機能発現に必須の役割を担う。高等動物の神経回路は、遺伝的プログラムに加え発達期に生じる電気的な神経活動を介した精緻化を経て完成されることが知られている。個々の神経細胞は発生の過程で、自らが担う機能的役割に従って神経個性を獲得し、それに基づいて軸索を伸長させるが、マウス一次嗅覚系における神経個性は、発現する嗅覚受容体(odorant receptor: OR)の種類によって決定される。個々の嗅細胞はゲノム中に約 1000 種類存在する OR 遺伝子の中から 1 種類のみを相互排他的に発現する。嗅細胞の軸索は、発生の過程で発現する OR の種類ごとに収斂し、嗅球の特定の箇所に糸球構造を形成して投射する。これまでの我々の先行研究から、OR 分子は神経活動(自発活動)を介して様々な軸索選別分子群の発現量を調節し、軸索末端にその発現パターンの組み合わせから成る“分子コード”を形成し、OR 依存的な軸索収斂を可能にしていることがわかっている。しかしながら、1000 種類以上存在する“OR の種類”という情報が神経活動、即ち発火パターンの中にどの様に見えるか、どのような細胞内シグナル伝達経路を介して OR の種類に固有な軸索選別分子群の発現量へと変換されているのかについてはほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

本申請課題の目的は、マウス嗅覚系の神経回路形成をモデルに、神経活動のどのような特徴が軸索選別分子の遺伝子発現パターンを規定しているのかという、神経活動と遺伝子発現の両者の具体的な対応関係を明らかにし、その変換メカニズムを解明することである。この目的を遂行するにあたり、以下の 3 つの小目的を設定した。

- (1) 嗅細胞の神経活動パターンと軸索選別分子の遺伝子発現パターンの相関関係の検証
- (2) 神経活動パターンと軸索選別分子発現の因果関係の検証
- (3) 神経活動を遺伝子の発現パターンに変換する細胞内シグナル伝達経路の同定

3. 研究の方法

- (1) 嗅細胞の神経活動パターンと軸索選別分子の遺伝子発現パターンの相関関係の検証

時間分解能が最も高いカルシウムセンサータンパク質である GCaMP6f を用い、同一の OR を発現する嗅細胞からの自発的な神経活動記録及び大規模データ解析を行う。申請者は、嗅細胞特異的に GCaMP6f を発現する遺伝子改変動物を作製し、発達期における嗅細胞の自発的な神経活動の *ex vivo* 条件下におけるイメージングに成功している。加えて、二光子レーザー顕微鏡を利用したカルシウムイメージング技術を新規に構築し、*in vivo* 条件下での神経活動記録も試みる。また、特定の OR を発現する嗅細胞を標識できるマウスを作製し、同一 OR 発現細胞からの神経活動パターンを記録することで、神経活動パターンのパラメーターを抽出し、OR の種類に特徴的な神経活動パターンを明らかにする。続いて、同一 OR 発現細胞に対し組織染色や RNA シーケンスを行うことで、その細胞種の軸索選別分子群の遺伝子発現プロファイルを同定し、神経活動の特徴と遺伝子の発現パターンの相関関係を検証する。

- (2) 神経活動パターンと軸索選別分子発現の因果関係の検証

嗅細胞の神経活動を光刺激依存的に制御するために、嗅細胞特異的に組換え酵素 Cre を発現するマウスと Cre 依存的にチャネルロドプシン(ChR2)を発現するマウス(RCL-ChR2)を掛け合わせたマウスを作成する。このマウスを用いて、上記①で同定した特定の OR に固有な神経活動パターンを与えた際にど

の遺伝子の発現が変化するかを組織染色や Q-PCR、RNA シーケンスなどを用いて調べる。

(3) 神経活動を遺伝子の発現パターンに変換する細胞内シグナル伝達経路の同定

神経活動に伴う細胞内カルシウム濃度の変化は様々な転写調節因子の活性化を促し、下流に存在する遺伝子の発現を制御する。したがって、CaMKII-CREB、カルシニューリン-NFAT、Akt-NFkB、MAPK 経路などのカルシウム依存性のシグナル伝達分子に着目し、これら候補遺伝子を嗅細胞特異的にノックアウトする実験を実施する。

4. 研究成果

(1) 嗅細胞の神経活動パターンと軸索選別分子の遺伝子発現パターンの相関関係の検証

はじめに、OR の種類の違いが神経活動のどの特徴に反映されているかを調べた。嗅細胞から神経活動を記録する手段として、従来申請者らが行ってきた急性スライスを用いた *ex vivo* カルシウムイメージング系に加え、二光子レーザー顕微鏡を用いた *in vivo* カルシウムイメージング技術を新規に立ち上げた。これにより、生体内の環境を維持した上でより長時間の神経活動記録が可能となった。さらに、特定の OR 遺伝子の下流に Cre 遺伝子を挿入した遺伝子改変マウスを、CRISPR/Cas9 によるノックイン技術を用いて新たに作成した。これを、Cre 依存的に GCaMP6f を発現することが可能なマウスと交配させることで、標的 OR を発

現する嗅細胞のみを対象にしたカルシウムイメージングを可能とした。そこで軸索選別分子の一つである Kirrel2

の発現プロファイルが既知である MOR28、

MOR256-17、I7 という 3 種類の OR 遺伝子をそれぞれ発現する嗅細胞から神経活動を記録した(図 1)。この 3 つの細胞種の kirrel2 発現量は MOR28、MOR256-17、I7 の順に高くなっている。三者の神経活動パターンの差から、Kirrel2 の発現パターンを制御するパラメーターが抽出できると考え、振幅、持続時間、発火間隔に着目し、それらの確率密度を求めた。その結果、発火間隔の確率密度分布においてのみ三者の間で有意な差がみられることが分かった(図 2 左)。発火間隔についてさらに比較を行うために、一分あたりの発火頻度を算出すると、MOR28 から I7 にかけて発火頻度が高くなること分かった(図 2 右)。以上から、神経活動の発火頻度と一種類の軸索選別分子 Kirrel2 の発現量の間に関連関係があることがわかった。

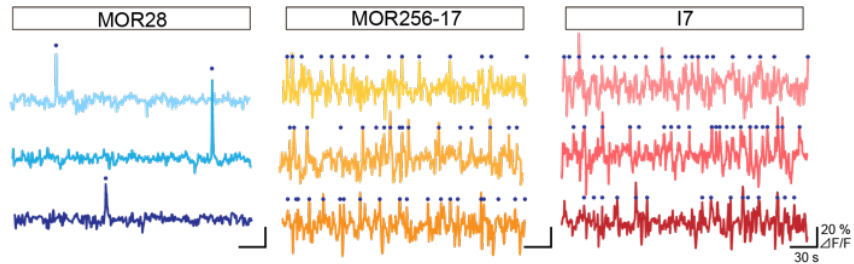


図 1. 標的 OR 発現細胞のカルシウムトレース
トレース上の青ドットは検出されたピークの位置を示す。

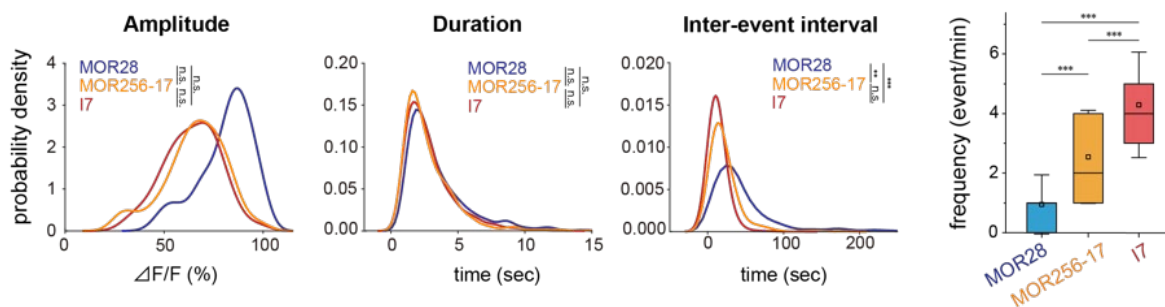


図 2. 各細胞種の神経活動パラメーターについての確率密度(左)と、発火頻度の比較(右)

(2) 神経活動パターンと軸索選別分子発現の因果関係の検証

上記の結果を受けて、神経活動の発火頻度と *Kirrel2* の発現量との因果関係の検証を行った。本研究で新たに作成した嗅覚受容体-Cre マウスのうち、*Kirrel2* の発現量が低レベルである MOR28-Cre マウスと、RCL-ChR2 マウスを交配させ、MOR28 発現細胞でのみ ChR2 を発現するマウスを作出した。①で得られた細胞種ごとの発火間隔の確率密度分布に沿ったランダムな青色光照射パターンを作成し、このマウスに overnight で照射した後、蛍光 in situ hybridization で *Kirrel2* の発現量を検出した。その結果、MOR256-17 または I7 の発火間隔を模したパターンで照射した場合に、MOR28 発現細胞で *Kirrel2* の発現量が増加することが示された(図 3)。さらに、発現量は MOR256-17 より I7 の照射パターンを与えた場合に大きくなること

が分かり、この増加量の順位は、内在性の *Kirrel2* 発現量や発火頻度の順位と一致する。このことから、今回着目した神経活動の発火頻度というパラメータは軸索選別分子 *Kirrel2* の発現量を規定する一つの要因であることが示唆された。

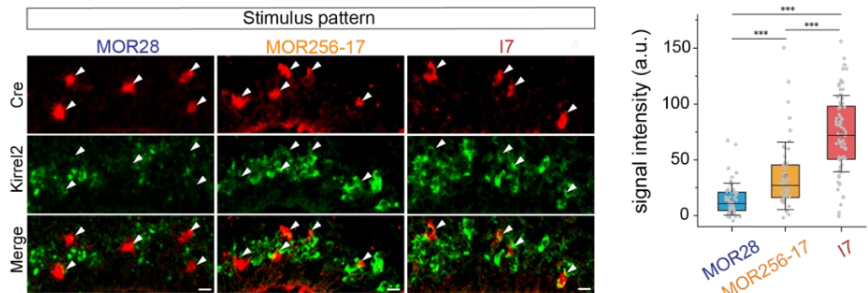


図 3. 各細胞種の発火頻度の密度分布を光遺伝学によって模倣した際の軸索選別分子の発現量の変化

(左) *Cre* と *Kirrel2* についての蛍光 in situ hybridization

(右) 各刺激パターンについて、*Cre* 陽性細胞の *Kirrel2* 発現量の定量

(3) 神経活動を遺伝子の発現パターンに変換する細胞内シグナル伝達経路の同定

代表的なカルシウム依存性のシグナル伝達経路のうち CaMKII-CREB、カルシニューリン-NFAT、Akt-NFKB、MAPK 経路に着目し、現在までにそれら経路の上流分子である CaMKII、カルシニューリンのノックアウト実験を実施した。まず、それぞれの

分子のサブユニットを欠損したマウスにおいて、代表的な軸索選別分子の発現パ

ターンを in situ hybridization によって調べた。その結果、カルシニューリンのサブユニットである *CNBI* のノックアウトによって *Kirrel2* の発現量が WT と比較して減少し、OLPC の発現量は上昇した。一方、CaMKII を構成する α γ δ の 3 つのサブユニットをすべて欠損したマウスでは、OLPC や *Sema7A* の発現量が減少することが分かった(図 4)。また、これらのノックアウトマウスの嗅細胞を回収し、RNA シーケンスによって軸索選別分子群の発現プロファイルを解析すると、in situ hybridization の結果と同様に、カルシニューリンと CaMKII のノックアウトによって *Kirrel2*、OLPC、*Sema7A* の発現が変動していることが明らかとなった(図 5)。以上の結果から、カルシニューリンは *Kirrel2* 発現を誘導する上流因子であることが示唆されると同時に、CaMKII シグナルの制御下にあると推測される OLPC の発現を抑制する可能性が示された。したがって、この2つのシグナル伝達経路は神経活動を遺伝子発現パターンに変換する過程

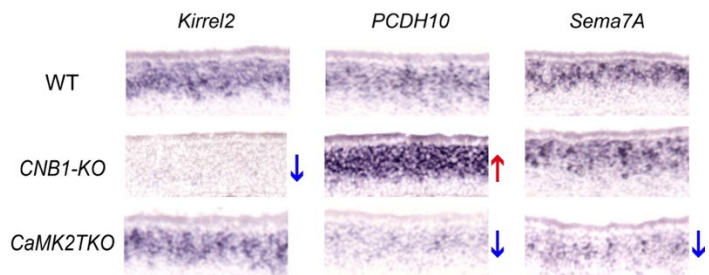


図 4. *CNBI*(中段)または *CaMKII*(下段)ノックアウトマウスの嗅上皮における軸索選別分子群の in situ hybridization

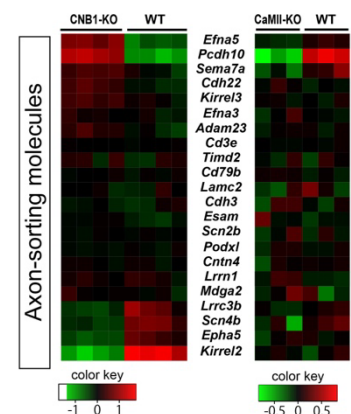


図 5. *CNBI*、*CaMKII* ノックアウトマウスと WT マウスの mRNA プロファイルの比較

で干渉し合う(クロストークする)ことが示唆される。また、上述した(1)(2)の結果と照らし合わせると、神経活動の発火頻度が高ければ高いほどカルシニューリンの活性化が亢進する可能性が考えられ、今後はその仮説の検証が必要になる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5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 Nakashima Ai, Ihara Naoki, Ikegaya Yuji, Takeuchi Haruki	4. 巻 170
2. 論文標題 Cell type-specific patterned neural activity instructs neural map formation in the mouse olfactory system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 1~5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2020.06.007	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 -
1. 著者名 Morikawa Shota, Katori Kazuki, Takeuchi Haruki, Ikegaya Yuji	4. 巻 529
2. 論文標題 Brain wide mapping of presynaptic inputs to basolateral amygdala neurons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 3062~3075
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cne.25149	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 -
1. 著者名 竹内春樹	4. 巻 28
2. 論文標題 嗅覚回路形成の分子基盤	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本味と匂学会誌	6. 最初と最後の頁 11-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 森川勝太、池谷裕二、竹内春樹	4. 巻 28
2. 論文標題 逆行性ウイルスを用いた嗅球僧帽細胞の形態可視化法	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本味と匂学会誌	6. 最初と最後の頁 97-100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Yesbolatova Aisha, Saito Yuichiro, Kitamoto Naomi, Makino-Itou Hatsune, Ajima Rieko, Nakano Risako, Nakaoka Hirofumi, Fukui Kosuke, Gamo Kanae, Tominari Yusuke, Takeuchi Haruki, Saga Yumiko, Hayashi Ken-ichiro, Kanemaki Masato T.	4. 巻 11
2. 論文標題 The auxin-inducible degron 2 technology provides sharp degradation control in yeast, mammalian cells, and mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-19532-z	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 -

1. 著者名 Okamoto Kazuki, Ebina Teppei, Fujii Naoki, Konishi Kuniaki, Sato Yu, Kashima Tetsuhiko, Nakano Risako, Hioki Hiroyuki, Takeuchi Haruki, Yumoto Junji, Matsuzaki Masanori, Ikegaya Yuji	4. 巻 7
2. 論文標題 Tb3+-doped fluorescent glass for biology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abd2529	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 -

1. 著者名 伊原尚樹、中嶋藍、池谷裕二、竹内春樹	4. 巻 73
2. 論文標題 嗅覚神経回路の形成に必要な遺伝子発現パターンはニューロンのスパイク発火列によって規定される	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 442-448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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27件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 香取和生、池谷裕二、竹内春樹
2. 発表標題 匂い学習による梨状皮質における匂い表象変化
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takeuchi, H
2. 発表標題 Cell-type specific patterned activities specify gene bexpression patterns for olfactory circuit formation
3. 学会等名 2nd Meeting on Spontaneous Activity in Brain Development (SPONT2022) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中野利沙子、村上知成、大木研一、池谷裕二、竹内春樹
2. 発表標題 in vivo二光子イメージングを用いた発達期における嗅神経細胞の自発活動パターンの解析
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森川勝太、香取和生、日置寛之、竹内春樹、田村英紀、池谷裕二
2. 発表標題 神経ペプチド VIP による学習・記憶の制御機構の解析
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中野利沙子、村上知成、大木研一、池谷裕二、竹内春樹
2. 発表標題 in vivo二光子イメージングを用いた発達期における嗅神経細胞の自発活動パターンの解析
3. 学会等名 次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 香取和生、森川勝太、奥山輝大、中嶋藍、竹内春樹、池谷裕二
2. 発表標題 天敵臭に対する持続的な防御行動を担う神経基盤の解明
3. 学会等名 第8回ケモビ研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹内春樹
2. 発表標題 嗅神経細胞のin vivo神経活動イメージング
3. 学会等名 第8回ケモビ研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Katori, K., Morikawa, S., Okuyama, T., Nakashima, A., Takeuchi, H., Ikegaya, Y
2. 発表標題 Neural mechanism underlying predator-odor induced persistent defensive behavior
3. 学会等名 ACC International Symposium 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中野 利沙子(D3)、村上 知成、大木 研一、池谷 裕二、竹内 春樹
2. 発表標題 in vivo二光子イメージングを用いた発達期の嗅神経細胞における神経活動パターンの解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹内春樹、中嶋藍、伊原尚樹、池谷裕二
2. 発表標題 活動パターン依存的な嗅覚回路の形成機構
3. 学会等名 第15回日本分子イメージング学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森川勝太、香取和生、中嶋藍、竹内春樹、池谷裕二
2. 発表標題 Neural circuits for switching innate defensive behaviors
3. 学会等名 第64回日本神経化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 香取和生、池谷裕二、竹内春樹
2. 発表標題 Learning-induced changes in the representation of odors in the piriform cortex
3. 学会等名 第55回日本味と匂学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中嶋美紀、香取和生、中嶋藍、竹内春樹、池谷裕二、森川勝太
2. 発表標題 先天的な防御行動を切替えるための神経回路の解析
3. 学会等名 次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中嶋美紀、香取和生、中嶋藍、竹内春樹、池谷裕二、森川勝太
2. 発表標題 先天的な防御行動を切替えるための神経回路の解析
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野利沙子、森川勝太、鐘巻将人、池谷裕二、竹内春樹
2. 発表標題 Auxin-mediated rapid knockdown in neurons
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内春樹
2. 発表標題 神経活動パターン依存的な嗅覚回路の形成機構
3. 学会等名 記憶研究会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内春樹
2. 発表標題 匂いの情報処理を支える神経回路とその作動原理
3. 学会等名 東京大学 Beyond AI研究推進機構BAIセミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeuchi H., Nakashima A., Ihara N., Ikegaya Y
2. 発表標題 Cell-type specific patterned activity specify gene expression patterns for olfactory circuit formation
3. 学会等名 International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Katori K., Ikegaya Y., Takeuchi H
2. 発表標題 State-dependent odor representation in the Piriform Cortex
3. 学会等名 International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nakano R., Ihara N., Morikawa S., Nakashima A., Kanemaki M., Ikegaya Y., Takeuchi H
2. 発表標題 Auxin-mediated rapid degradation of targeted proteins in neurons
3. 学会等名 International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野利沙子、伊原尚樹、森川勝太、鐘巻将人、池谷裕二、竹内春樹
2. 発表標題 Auxin-mediated rapid degradation of targeted proteins in hippocampal neurons
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹内春樹、中嶋藍、伊原尚樹、池谷裕二
2. 発表標題 神経活動パターン依存的な嗅覚神経回路の精緻化
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹内春樹
2. 発表標題 A non-Hebbian activity-dependent mechanism underlying olfactory circuit formation
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会（ジョセフアルトマン記念発達神経科学賞受賞講演）（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹内春樹
2. 発表標題 神経可塑性 時間的活動パターンに基づく回路の精緻化
3. 学会等名 第54回日本味と匂学会(日本味と匂学会研究奨励賞受賞講演)（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野利沙子、森川勝太、鐘巻将人、池谷裕二、竹内春樹
2. 発表標題 神経系におけるオーキシン誘導性タンパク質高速分解系の構築
3. 学会等名 第143回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹内春樹、中嶋藍、伊原尚樹、池谷裕二
2. 発表標題 神経細胞の自発活動に基づく回路の精緻化
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会13.0 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹内春樹、中嶋藍、伊原尚樹、池谷裕二
2. 発表標題 The possible existence of neural activity code linking firing patterns and gene expression
3. 学会等名 第43回日本分子生物学学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------