

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24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21500314

研究課題名（和文）ゼブラフィッシュ嗅覚行動の神経回路基盤の解明

研究課題名（英文） Toward understanding the neural circuit mechanisms underlying olfactory behaviors in zebrafish

研究代表者

小出 哲也 (KOIDE TETSUYA)

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

研究者番号：30247837

研究成果の概要（和文）：

匂いによって誘起される動物の本能行動の解明に向けて、遺伝学解析が可能な小型の熱帯魚ゼブラフィッシュを用いて研究を行った。嗅覚神経系特異的に Gal4 を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ系統を作成し、神経活動イメージング・行動学的アッセイの二つの手法を組み合わせた解析を行なった。その結果、これまで知られていなかった様々な匂い物質が嗅球の特定の糸球体を活性化することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

To understand the neural circuit mechanisms underlying the olfactory behaviors, we use zebrafish as a model system because they allow us to combine genetic and imaging methods. As a result, we identified the neural elements that control several innate behaviors responsive to different odor stimuli.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：行動、ゼブラフィッシュ、神経回路、

1. 研究開始当初の背景

嗅覚は、ヒトを含む多くの生物で、摂食行動、危険回避行動、繁殖行動などの生命活動に不可欠な役割を果たしている。匂いの成分である化学物質（匂い分子）は、鼻の奥に存在する嗅細胞に発現する嗅覚受容体と結合する。嗅覚受容体遺伝子は、ヒトでは約 350 種類、マウスでは約 1,300 種類、魚では約 200 種類

存在しているが、それぞれの嗅細胞はそのレパートリーの中からたった 1 種類の嗅覚受容体を選択して発現し、特定の化学構造を持つ匂い分子だけを認識する。その匂いの情報は、嗅細胞の軸索（嗅神経）を介して、脳の前方に位置する嗅球と呼ばれる一次の情報処理中枢に伝わる。嗅球に伝わった匂い分子の情報は、それらの化学構造を基本要素とし

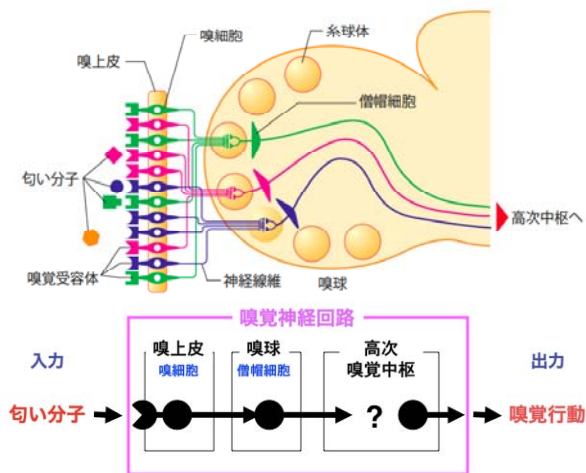


図1. 嗅覚神経系の概略図

た「匂い地図」として嗅球に展開される。同じ受容体を持つ嗅細胞の軸索は、嗅球表面に並ぶ多くの糸球体のうち特定の糸球体と接続している（図1）。このように鼻から脳への精密な神経配線が、多種多様な匂い分子の検出・識別を可能にしている。1991年の嗅覚受容体遺伝子の発見以来、匂いの受容機構と鼻から脳への神経接続様式については非常に多くのことが解明されてきた。しかしながら「好き」な匂いへの誘引反応や「嫌い」な匂いからの忌避反応といった匂いによって喚起される行動を司る神経配線様式がどのようになっているのかは、これまでほとんど報告されていなかった。

2. 研究の目的

本申請課題は「匂いの情報」がどのように「嗅覚行動」に変換されるのかを神経回路レベルで明らかにすることを目標としている。これまでの研究で、ハエ・線虫などの逃避行動・摂食行動の入出力に必要な神経回路がいくつか報告されているが、「入力から出力までの神経回路」を明らかにした例はない。この問題には以下の複数のアプローチを統合して取り組む必要がある。①特定の匂い情報を伝える神経回路を神経解剖学的に可視化する ②細胞・分子レベルでその形成機構を明らかにする ③生理学的・行動学的にその機能的意義を明らかにする。これまでこうした多面的解析は、無脊椎動物であるハエ・線虫では報告があるが、脊椎動物ではほとんどなかった。この課題に対し、申請者らはモデル脊椎動物ゼブラフィッシュがきわめて有効であることを見いだした。申請者らは、これまで知られているゼブラフィッシュの利点（多数の個体の繁殖と飼育が容易であること、体外受精し胚が透明であるため初期発生過程の観察・操作が容易であること、遺伝学

的解析ができること）に加えて、GAL4-UAS システムを用いた特定のニューロンの可視化及び機能阻害・神経活動イメージング・嗅覚行動アッセイから構成される多面的解析を世界にさきがけて確立した。これらの統合的な解析をさらに発展させることで「感覚入力から行動出力」に至る脊椎動物の神経回路基盤を世界で初めて明らかにすることが期待できる。この脊椎動物ゼブラフィッシュを用い、匂いによって誘起される動物の本能行動を司る神経回路の解明を目指した。

3. 研究の方法

本申請課題を進めるにあたり、嗅覚応答行動とその神経回路形成機構の解明へ向けて、以下の視点から研究を行った。特に、神経活動イメージング・行動学的アッセイの二つの手法を組み合わせた解析を行ない、特定の嗅覚行動を発現させる嗅覚ニューロンを同定し、その機能を明らかにすることを目指した。

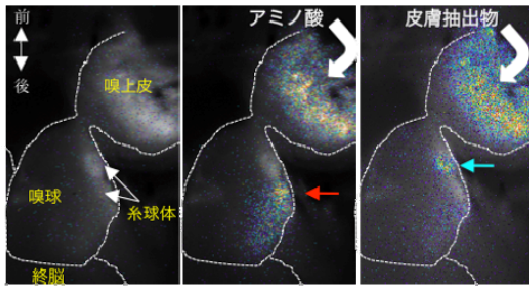
一般的にアミノ酸、胆汁酸などは、魚に対し誘引行動を、魚の皮膚抽出物質は忌避反応を引き起こす匂い物質であることが報告されているが、ゼブラフィッシュにおいて、各種匂い分子と嗅覚行動を網羅的に詳しく調べた報告はない。申請者はこれまでに8種類のアミノ酸混合溶液 (Ala, Met, His, Lys, Trp, Phe, Val, Cys) に対しゼブラフィッシュ成魚が誘引行動を示すこと、嗅上皮を外科的に除去した (OE-removed) 魚では誘引行動が消失することを明らかにしている。

これまで魚類の嗅覚応答に関わるものが示唆されている各種匂い分子 (アミノ酸、胆汁酸、核酸、ステロイド、アミン、ステロイド類) が活性化する糸球体を明らかにし、ゼブラフィッシュにおける嗅球の匂い地図の作成を目指した。具体的には、嗅覚神経系特異的な GAL4 システムを作成する。そして、GAL4-UAS システムを用いてカルシウムセンサーGCaMPを嗅細胞特異的に発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ系統を樹立する。このGCaMPを嗅細胞特異的に発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを用いて、様々な匂いに応答する糸球体をマッピングする。特定の糸球体を活性化した匂い分子については、その機能を明らかにするため行動学的解析を行った。

4. 研究成果

本研究課題では、従来から行っているジーントラップ法に加え、嗅細胞、高次神経中枢に特異的に GAL4 を発現する新たなエンハンサートラップ系統を複数樹立することができた。特に、終脳特異的な GAL4 系統の確立できたことは、今後の高次中枢における神経回路機能を解析する上での進展が期待できる。

さらに、これら嗅細胞特異的 GAL4 系統と神経活動イメージングプローブである



UAS:GCaMP を発現するゼブラフィッシュ系統を組み合わせることにより、嗅覚一次中枢である嗅球における匂い応答を網羅的に解析するシステムを構築した。これまでに我々は、アミノ酸は餌の匂いの主要な成分であり誘引行動を引き起こすことを報告しているが、GCaMP を用いたカルシウムイメージングによって、アミノ酸が糸球体外側部を活性化することを確認した。さらに、忌避行動を引き起こす皮膚抽出物（警報フェロモン）が特異的な糸球体を活性化することを見いだした。興味深いことに、この警報フェロモンで活性化される糸球体は、アミノ酸によって活性化される糸球体とは異なることが分かった。この結果は、「好きな匂い」であるアミノ酸の情報を伝える神経回路と、「嫌いな匂い」である警報フェロモンの情報を伝える神経回路が異なっていることを示唆する。

さらに、本研究課題で確立したイメージング解析を用いて、これまで知られていなかった各種匂い分子が嗅球の特異的な領域を活性化することが分かった。現在、いくつかの匂いに関しては、その嗅覚行動解析を行っており、その生物学的意義を明らかにしつつある。今後、特定の匂いによって活性化される神経回路の機能に迫ることができると考えている。

嗅球レベルでのイメージングに加え、終脳領域に特異的に Gal4 を発現する系統を用いてGCaMPカルシウムイメージングの実験系を確立しつつある。この手法を用いることで、将来的に嗅覚高次中枢に至る神経回路の全体像に迫ることができると考えている。

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)

小出哲也, 吉原良浩

「ゼブラフィッシュ嗅覚系の神経行動学」

化学と生物 49 : 601-609 (2011)

査読無し

〔学会発表〕(計 9 件)

①脇阪 紀子、増田 美和、小出 哲也、宮坂 信彦、吉原 良浩 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明

日本味と匂学会・第 45 回大会、2011 年、10 月 5 日-7 日、石川

②矢吹 陽一、小出 哲也、宮坂 信彦、脇阪 紀子、渡邊 和忠、吉原 良浩 ゼブラフィッシュにおける性行動発現の嗅覚メカニズム—プロスタグランジン F2 α によって活性化される神経回路素子の同定—

第 34 回日本神経科学大会、2011 年、9 月 14 日-17 日、横浜

③小出 哲也、大倉正道、中井淳一、吉原良浩 嗅覚神経回路選択的遺伝子発現エンハンサー OCE と蛍光カルシウムセンサーGCaMP を用いたゼブラフィッシュ嗅覚ニューロン活動の in vivo イメージング

第 34 回日本神経科学大会、2011 年、9 月 14 日-17 日、横浜

⑤Koide T. Genetic dissection of neural pathways for olfactory behavior in zebrafish Korean Association for Laboratory Animal Sciences International symposium.

2011. August 25-27, Jeollabuk-do, Korea.

④増田 美和、小出 哲也、宮坂 信彦、吉原 良浩 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、2010 年、9 月 2 日-4 日、神戸

⑥小出 哲也、宮坂信彦、川上浩一、吉原良浩 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

第 32 回日本神経科学大会、2009 年、9 月 18 日-21 日、名古屋

⑦小出哲也、宮坂信彦、森本耕造、川上浩一、吉原良浩 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

第15回小型魚類研究会、2009年、9月16日-28日、名古屋

⑧増田 美和、小出 哲也、宮坂 信彦、吉原 良浩 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年、9月2日-4日、旭川

⑨吉原良浩、宮坂信彦、小出哲也、増田美和 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・第43回大会、2009年、9月2日-4日、旭川

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小出 哲也 (KOIDE TETSUYA)

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

研究者番号：30247837

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし