

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31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500303

研究課題名（和文） 高次嗅覚中枢における匂い情報コーディング様式の解明

研究課題名（英文） Elucidation of Odor Information Coding in Higher Olfactory Centers

研究代表者

宮坂 信彦 (MIYASAKA NOBUHIKO)

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・副チームリーダー

研究者番号：70332335

研究成果の概要（和文）：

嗅覚系において、匂いの情報は糸球体の空間的発火パターン（匂い地図）として嗅球に表現される。一方、匂い地図がどのように高次中枢に伝達されるのかは未解明であった。本研究では、ゼブラフィッシュの遺伝子工学的単一細胞標識法と画像レジストレーション法を組み合わせ、嗅球ニューロンの軸索投射について以下の知見を得た。1) 単一嗅球ニューロンは複数の高次脳領域に投射する。2) 各々の高次嗅覚中枢は、糸球体クラスター非選択的な投射、または特定の糸球体クラスターからの優位な投射を受ける。すなわち、高次嗅覚中枢では匂い地図の情報が統合・抽出され、匂いの質を表現する新たな嗅覚情報として再編されることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In the olfactory system, odor information is represented as a topographic map of neural activities across glomeruli in the olfactory bulb (OB). However, it remains largely unknown how this odor map is transferred to higher brain centers. In the present study, I combined genetic single-neuron labeling and image registration techniques to address this issue in zebrafish. I found that 1) individual OB neurons send axons to multiple forebrain regions, and that 2) each target region receives either non-selective or biased projections from the OB with respect to glomerular classes. These results suggest that different forebrain regions sample distinct combinations of glomerular inputs and create various forms of olfactory representations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	0	0	0
2009年度	0	0	0
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：嗅覚、神経回路、脳、軸索投射、遺伝子工学、動物行動、ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

(1) 1991年のLinda BuckとRichard Axelによる嗅覚受容体遺伝子群の発見(2004年ノーベル生理学・医学賞)がきっかけとなり、嗅覚研究に分子生物学的・発生工学的手法が取り入れられると、嗅上皮から嗅球へと至る一次嗅覚経路が非常に秩序だった精緻な神経接続を有することが明らかとなった。すなわち、1つの嗅細胞は1種類の嗅覚受容体を発現し、同じ嗅覚受容体を発現する嗅細胞の軸索は嗅球の同一糸球体に集束する。特定の化学構造を有する匂い分子は特定の嗅覚受容体サブセットと結合し、その情報が軸索を介して嗅球に「匂い地図」として投影される。一方、高次嗅覚中枢がどのように嗅球の匂い地図を読み取るのかという問題はほとんど未解明であった。

(2) ゼブラフィッシュは神経系の研究において様々な利点を有している。特に稚魚は身体が透明で体外で発達するため、遺伝子工学的手法によって蛍光タンパク質を発現させると、生きたまま特定の神経回路の接続様式とその発達過程を観察することができる。これまでに研究代表者らは、ゼブラフィッシュを用いて嗅上皮から嗅球までの一次嗅覚経路および嗅球から高次中枢に至る二次嗅覚経路について以下の知見を発表した。

- ① ゼブラフィッシュにもマウスの「匂い情報伝達経路」と「フェロモン情報伝達経路」に相当する二つの嗅覚経路が存在する。
- ② 匂い地図形成を司る基本原理「嗅細胞での単一受容体の発現と軸索の集束」がゼブラフィッシュでも保存されている。
- ③ 一次嗅覚経路の形成過程(嗅細胞の軸索投射)にSlit/Robo軸索反発性シグナルが必要である。
- ④ 嗅ブラコード(嗅上皮原器)の形成および一次嗅覚経路の形成にCxl12/Cxcr4ケモカインシグナルが必要である。
- ⑤ 嗅球の内背側糸球体クラスターに接続する投射ニューロンサブセットは、間脳の手綱核に左右非対称な投射を示す。

2. 研究の目的

一次嗅覚系では、異なる匂いの情報は嗅細胞の軸索を介して異なる組み合わせの糸球体を発火させ、活性化した糸球体の空間配置情報(匂い地図)として表現される。一方、匂い刺激に対応した様々な嗅覚行動(索餌、危険回避、繁殖、社会性コミュニケーションなど)の発現には、高次中枢での情報の抽出や統合が必要である。本研究では、ゼブラフ

ィッシュの利点である遺伝子工学的手法の適用性と生体イメージングの容易性を活かして、高次中枢における「嗅球ニューロンの包括的軸索マップ」および「匂い刺激依存的な機能的神経活動マップ」について解析し、匂い情報コーディング様式の解明へ向けて統合的研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 嗅球投射ニューロンの遺伝子工学的手法による可視化

研究代表者らは本研究課題の開始以前に、1hx2a遺伝子プロモーターを用いて、嗅球の内背側糸球体クラスターに接続する投射ニューロンサブセットの可視化に成功している。予備実験から、他の糸球体クラスターと接続する嗅球投射ニューロンは、T-box型転写因子をコードするtbx21遺伝子を発現することを見いだしていた。そこで、tbx21遺伝子を含む約200 kbのBACクローンに対して大腸菌内相同組換え法を適用し、酵母のGal4遺伝子を挿入したBACトランスジーンを作製する。さらに、BACトランスジーンを安定的にゲノムに組み込んだトランスジェニック系統を樹立する。

(2) 蛍光タンパク質のモザイク発現系による嗅球投射ニューロンの単一細胞標識と軸索軌跡マップの作製

- ① 各糸球体クラスターに対応した嗅球投射ニューロンの軸索軌跡を解析するために、モザイク発現系による単一ニューロン標識を行う。嗅球投射ニューロン特異的にGal4を発現するGal4 driverプラスミド(上述)と膜移行型蛍光タンパク質を発現するUAS effectorプラスミドを1-4細胞期の受精卵に共注入し、受精後3日目および7日目の稚魚を共焦点レーザー顕微鏡下でスクリーニングして、単一ニューロン標識個体を同定・解析する(図1)。

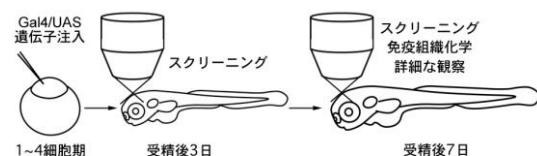


図1 遺伝子工学的手法による単一ニューロン標識

- ② 単一ニューロン標識によって得られた画像サンプルは全て別個体由来する。嗅球投射ニューロンの軸索軌跡を同一座標軸上で

評価・解析するために、画像レジストレーション法を用いてそれぞれの軸索軌跡を標準脳画像上にマップする。

(3) Erk のリン酸化を指標にした嗅球および高次嗅覚中枢における機能的神経活動マップの解析

予備実験から、MAP キナーゼである Erk のリン酸化 (pErk) が匂い刺激依存的な神経活動のよい指標となることを見いだしている。嗅球および高次脳中枢における pErk 免疫組織化学により、各種匂い物質による嗅覚刺激および誘起される動物行動にともなって活性化されるニューロン群を同定する。

4. 研究成果

(1) 2つの遺伝子プロモーターによる異なる嗅球投射ニューロンサブセットの可視化・同定

tbx21 遺伝子座に Gal4 を挿入した BAC トランスジーンを作製し、トランスジェニック系統を樹立した (図 2)。UAS:RFP 系統および 1hx2a:GFP 系統と交配し、tbx21 ニューロンと 1hx2a ニューロンを異なる色の蛍光タンパク質で可視化した。tbx21 ニューロンは主に嗅球の内腹側部に存在し、1hx2a ニューロンとは完全に異なるニューロン集団であった。tbx21 ニューロンの投射パターンを解析したところ、1hx2a ニューロンと同様に終脳には投射するが、その多くは手綱核には投射せずに視床下部関連脳領域である後方結節に投射することが明らかとなった。また、終脳への投射において、1hx2a ニューロンと一部重複しながらも、異なる領域性が認められた。

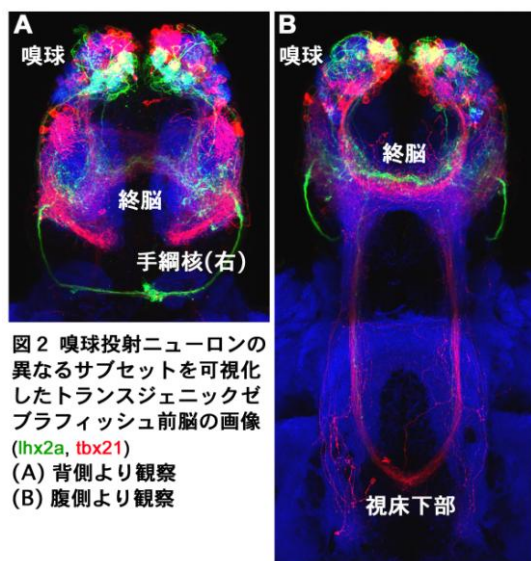


図2 嗅球投射ニューロンの異なるサブセットを可視化したトランスジェニックゼブラフィッシュ前脳の画像 (1hx2a, tbx21)
(A) 背側より観察
(B) 腹側より観察

(2) 高次嗅覚中枢における嗅球投射ニューロンの軸索マップ

単一嗅球ニューロンの可視化と画像レジストレーション法による解析 (図 3) から、以下の知見が明らかとなった。

- ① 個々の嗅球ニューロンは複数の高次脳領域 (終脳後方領域、終脳腹側領域、右手綱核、視床下部関連後方結節) に投射する。
- ② 終脳後方領域 (主要嗅覚領域) は全ての糸球体クラスターから広範囲に投射を受ける。
- ③ 終脳後方領域の中心部は異なる糸球体クラスターから重複した投射を受ける。
- ④ 終脳後方領域の辺縁部は特定の糸球体クラスターから特異的な投射を受ける。
- ⑤ 終脳腹側領域は社会性行動に関連した糸球体クラスターから優位な投射を受ける。
- ⑥ 特定の糸球体クラスターと接続する左右両方の嗅球ニューロンは、右の手綱核に投射するが、左の手綱核には投射しない。
- ⑦ 視床下部関連後方結節は全ての糸球体クラスターから投射を受ける。

これらの結果から、高次嗅覚中枢では、嗅球に表現された化学構造に基づく匂い地図の情報が統合・抽出され、匂いの質を表現する新たな嗅覚情報として再編されることが示唆された。

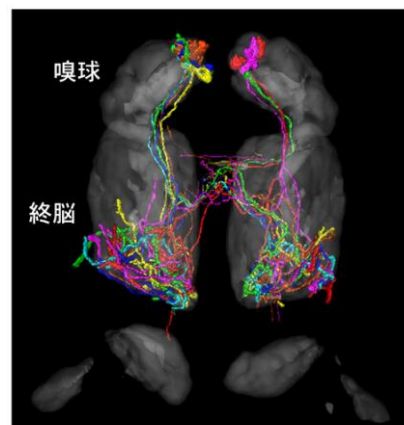


図3 単一ニューロン標識と画像レジストレーションによる同一糸球体クラスターに接続する嗅球投射ニューロンの3次元再構築

(3) 匂い刺激依存的な神経活動マップ

- ① 各種匂い刺激 (アミノ酸、胆汁酸、アミン、プロスタグランジン、ステロイド、警報フェロモンを含むゼブラフィッシュ皮膚抽出物など) に対する嗅球の応答をホールマウント脳の pErk 免疫組織化学により解析し (図

4)、匂い物質の化学構造に対応した包括的な匂い地図を明らかにした。

② 匂い刺激によって誘起される嗅覚行動の後に、pErk 免疫組織化学によって神経活動履歴を解析し、誘因行動や忌避行動に伴って活性化される高次脳領域（終脳、視索前野、視床下部など）を同定した。

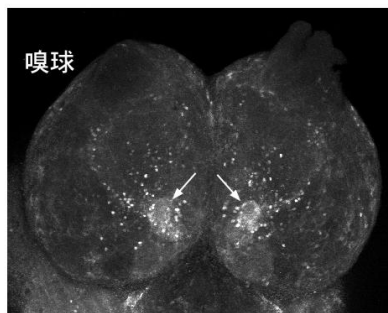


図4 匂い刺激によって活性化された糸球体の同定 (ホルマウント脳の pErk免疫組織化学)

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 0 件)

[学会発表] (計 8 件)

① Miyasaka N, Wakisaka N, Masuda M, Arganda-Carreras I, Seung HS, Yoshihara Y. From the olfactory bulb to higher brain centers: a comprehensive axon projection map revealed by genetic single-neuron labeling in zebrafish. Symposium on Sensory Systems & Neural Circuits, Apr. 11-12, 2013, Ito Hall, Univ. Tokyo

② 宮坂信彦、脇阪紀子、増田美和、Ignacio Arganda-Carreras、H. Sebastian Seung、吉原良浩 嗅球から高次中枢へ：ゼブラフィッシュ二次嗅覚系の包括的軸索投射マップ 2012年9月20日 第35回日本神経科学大会 名古屋国際会議場

③ Miyasaka N, Wakisaka N, Masuda M, Arganda-Carreras I, Seung HS, Yoshihara Y. From the olfactory bulb to higher brain centers: a comprehensive axon projection map revealed by genetic single-neuron labeling in zebrafish. 16th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT), June 24-25, 2012, Stockholm, Sweden

④ 宮坂信彦、吉原良浩 嗅球から高次中枢へ：ゼブラフィッシュ嗅覚系の機構構築 2011年9月21日 第82回日本動物学大会 大雪クリスタルホール・旭川

⑤ 宮坂信彦、吉原良浩 嗅球から高次中枢へと至るゼブラフィッシュ嗅覚経路の包括的遺伝学的解析 2011年9月17日 第34回日本神経科学大会 パシフィコ横浜

⑥ 宮坂信彦 ゼブラフィッシュ嗅覚神経回路の形成と機能構築 日本味と匂学会第44回大会・研究奨励賞受賞講演 2010年9月9日 北九州国際会議場

⑦ 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 2010年9月3日 Neuro2010 神戸コンベンションセンター

⑧ Miyasaka N, Koide T, Okamoto H, Yoshihara Y. Genetic tracing of axonal projections from the olfactory bulb to higher brain centers in zebrafish. Janelia Conference: Form and Function of the Olfactory System, May 23-26, 2010, Janelia Farm Research Campus, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮坂 信彦 (MIYASAKA NOBUHIKO)
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・副チームリーダー
研究者番号：70332335

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし