

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 9 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23680038

研究課題名(和文) マウス嗅覚系における神経回路の発生・再生ダイナミクス

研究課題名(英文) Developmental dynamics of mouse olfactory circuits

研究代表者

今井 猛 (IMAI, TAKESHI)

独立行政法人理化学研究所・発生・再生科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号：70509851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,100,000円、(間接経費) 5,430,000円

研究成果の概要(和文)：嗅球の糸球体において、嗅神経細胞軸索から入力された匂い情報は2次神経細胞である僧帽・房飾細胞へと受け渡される。僧帽・房飾細胞は単一の主樹状突起を単一の糸球体へと伸ばして興奮性入力を受け取ると共に、複数の側方樹状突起を伸ばして抑制性入力を受ける。生後直後の僧帽細胞は複数の樹状突起を複数の糸球体に接続しているが、生後1週以内に樹状突起の刈り込みによって単一の樹状突起のみを有するようになる。本研究では、僧帽細胞樹状突起の形態を定量的に解析すると共に、樹状突起刈り込みプロセスに神経活動が重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the mouse olfactory bulb, inputs from olfactory sensory neurons are relayed to second-order neurons, mitral and tufted cells. A mitral/tufted cell extends a single primary dendrite toward a glomerulus, as well as several lateral dendrites. A mitral/tufted cell initially extends multiple dendrites to glomeruli, but they prune all but one dendrite and thereby establish a single primary dendrite during the first postnatal week. In this study, we established a method for quantitative analyses of mitral cell dendrites. We also found that neuronal activity plays an important role in the dendrite pruning process.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：樹状突起 刈り込み 嗅球 僧帽細胞 嗅覚

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の中樞神経系は、数億から1,000億個もの神経細胞が秩序だった回路形成を行うことによって機能している。しかしながら、これほど多くの神経細胞がその個性に応じてどのように特異的な神経接続を行っているのかに関してはまだよく分かっていない。申請者はこの問題を解くため、マウス嗅覚系に着目してこれまで研究を行ってきた。

マウスにおいて、匂い分子は約1,000種類の嗅覚受容体(OR: odorant receptor)によって検出されている。嗅上皮に存在する約1,000万個の嗅神経細胞は、それぞれが1,000種類のORの中からたった1種類のみを発現して匂い分子を検出している。また個々の嗅神経細胞は、脳の嗅球に存在する1,000対の糸球構造のうち特定の1対に軸索を投射するが、その際の投射位置は発現するORの種類によって決まっている。従って、1,000種類のORによって検出された匂いの情報は、嗅球においては1,000個の糸球のどれが発火するかという位置情報に変換される。申請者はこれまで、嗅球上につくられる糸球地図の形成機構に関していくつかの先駆的な研究を展開してきた。これらの研究によって明らかになってきたのは、神経細胞の接続先が、鍵と鍵穴のような関係で予め決まっているのではなく、末梢神経細胞同士の相互作用によって自己組織化した結果生じるものらしいということである。こうした戦略は、限られた数の遺伝的プログラムを用いて膨大な数の神経細胞の配線先を決める上で有用であると考えられる。

それではいったい、末梢の一次神経細胞が自律的に神経地図を作った後、二次神経細胞の接続特異性はどのようにして確立するのであるか? 嗅球においては、出力神経細胞である僧帽・房飾細胞は単一の主樹状突起を伸ばし、単一の糸球からのみ直接の興奮性入力を受け入れている。このことにより、一次神経細胞によるマップは二次神経細胞にも受け継がれることになる。こうした特異的な神経接続による受容野の確立は視覚系や体性感覚系など他の神経地図でも知られており、例えば視床で網膜からの入力を受ける神経細胞は、多くても数個の網膜神経節細胞からの入力のみを受けていることが知られている。一次神経細胞と二次神経細胞のこうした特異的な神経接続は、遺伝的プログラムによって鍵と鍵穴的に厳密に決まっている訳ではない。例えば、嗅覚系ではノックインマウスにおいて新たにラットのORを導入すると、そのORに対応する新しい糸球がつけられ、そこに二次神経細胞が特異的に接続することが知られている。一方で、特定のORを発現する嗅神経細胞のみで神経活動を阻害すると、その軸索投射先である糸球は消失する。このように、哺乳類の中樞神経系は末梢の機能獲得や可塑的变化に応じて中枢の回路を組み換える能力を備えていると言える。

この分子発生生物学的基盤を知ることは、我々高等動物の知性を支えるメカニズムの一端を知るといふことに他ならず、神経科学における重要なテーマである。

### 2. 研究の目的

本研究においては、僧帽・房飾細胞がどのようにして特定の糸球体に樹状突起を接続しているのか理解することを目的とし、(1) 僧帽細胞の樹状突起の形態を包括的かつ定量的に理解するとともに、(2) 僧帽細胞の樹状突起が単一の糸球体に接続する機構の理解を目指した。これらを通して、特定の糸球体に対応して僧帽・房飾細胞の接続が決まり、嗅球内回路が作られる基本原理を明らかにすることを目指した。

### 3. 研究の方法

(1) まず、僧帽・房飾細胞の樹状突起の形態を3次元的に包括的・定量的に評価するため、新しい組織透明化試薬の開発を行った。これを用いて共焦点・2光子イメージングを行い、嗅球の神経回路の理解を目指した。(2) 僧帽細胞樹状突起の形態形成に関わる分子機構を解明するため、子宮内エレクトロポレーションやノックアウトマウス、トランスジェニックマウスといった分子遺伝学的手法を用いた。

### 4. 研究成果

(1) 組織透明化法を用いた僧帽・房飾細胞の定量解析

近年、GFPを初めとする蛍光タンパク質の普及に伴い、遺伝学的に神経回路を標識することが可能になったが、光散乱のため、数10 $\mu$ m、2光子励起顕微鏡を用いても数100 $\mu$ mの深さまでしか高解像度の画像を得ることができない。このため、数mm以上に亘って突起を伸ばす神経細胞の形態を明らかにすることは困難であった。近年、光散乱を減らす方法として、様々な組織透明化法が報告されているが、蛍光タンパク質の褪色や組織の変形といった問題があり、神経細胞の形態や回路の定量的な解析には向かなかった。そこで本研究では蛍光色素や組織の形態を保持したまま組織を透明化する方法の開発を行った。

我々は、水溶性で生体組織を変性させにくい高屈折率の液体に着目して検討を行い、その結果、高濃度のフルクトースが短時間で効率よく組織を透明化出来ることを見出した。更に還元剤の作用で自家蛍光を抑えられることを見出し、水とフルクトースとチオグリセロールからなる組織透明化試薬 SeeDB(See Deep Brain)を開発した。これまでの方法では組織が透明化の過程で膨潤・収縮するという問題があったが、SeeDB法では組織の大きさや細胞の微細な形態が保持されていた。また、変性剤や界面活性剤を含まないため、蛍光タンパク質はもちろん、Dilなどの脂溶性

の色素も蛍光が保持されていた。SeeDB 法を用いると共焦点顕微鏡を用いて1mm以上の深さまで成体マウス脳の蛍光画像を取得出来た。さらに、2光子励起顕微鏡と専用の対物レンズを組み合わせることで、成体マウス脳を背側から腹側まで可視化できることが判明した。電動ステージを組み合わせることで、数 mm スケールの3次元画像を容易に取得出来ることが明らかになった。また、この方法を用いることにより、マウス嗅球の特定の糸球体に接続している僧帽細胞の樹状突起の形態のほぼ全容を明らかにする事が出来た。

我々はこの方法を用いて単一の糸球体に接続する僧帽・房飾細胞の定量解析を行った。単一の糸球体に色素を注入して接続している僧帽細胞を染め出した後、SeeDBによる透明化を行い、嗅球の共焦点イメージングを行った。3次元データの解析の結果、特定の糸球体に接続する僧帽細胞の細胞体は広く散らばっており、別の糸球体に属する僧帽細胞と互いに混じり合っていることが判明した。また、単一の糸球体には約15個の僧帽細胞が接続しているが、これらの側方樹状突起のパターンはまちまちであることから、これらが独立に情報処理を行っていることが示唆された(Ke et al., Nat Neurosci, 2013)。(2) 僧帽細胞樹状突起の刈り込みのメカニズム

遺伝学的な解析の結果、僧帽細胞における神経活動が樹状突起刈り込みに必須であることが判明した。僧帽細胞にKir2.1を強制発現して神経活動を抑制すると、主樹状突起の刈り込みが阻害されるとともに、側方樹状突起の伸長が損なわれた。次に、この神経活動がシナプス入力によるのか、純粹に細胞自律的な自発活動によるのかを検討するために、NMDARのsingle-cellノックアウトを行ったところ、樹状突起刈り込みに若干の異常が認められた。さらにGABAA受容体を介した興奮性入力が重要な役割を果たしていることが判明した。NMDARノックアウトと、GABAA受容体の興奮性応答の阻害を組み合わせるとより明瞭な異常が認められた。テタヌストキシントランスジェニックマウスの解析から、嗅神経細胞由来のシナプス入力が重要であることが判明した。

#### 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 6件)

Ke M-T, Imai T  
Optical clearing of fixed brain samples using SeeDB.

*Current Protocols in Neuroscience* 2014, Jan;66:2.22.1-19.

doi: 10.1002/0471142301.ns0222s66. 査読有

Nakashima A\*, Takeuchi H\*, Imai T\*, Saito H, Kiyonari H, Abe T, Chen M,

Weinstein LS, Ron Yu C, Storm DR, Nishizumi H, Sakano H.

Agonist-Independent GPCR Activity Regulates Anterior-Posterior Targeting of Olfactory Sensory Neurons.

*Cell*. 2013 Sept 12; 154:1314-1325.

doi: 10.1016/j.cell.2013.08.033. 査読有

Ke M-T, Fujimoto S, Imai T.

SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction.

*Nature Neuroscience*. 2013 June

23;16:1154-1161.

doi: 10.1038/nn.3447. 査読有

Takaba H, Imai T, Miki S, Morishita Y, Miyashita A, Ishikawa N, Nishizumi H, Sakano H.

A major allogenic leukocyte antigen in the agnathan hagfish.

*Scientific Reports*. 2013 Apr 24;3:1716.

doi: 10.1038/srep01716. 査読有

Sasagawa Y, Nikaido I, Hayashi T, Danno H, Uno KD, Imai T, Ueda HR.

Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA-Seq reveals non-genetic gene

expression heterogeneity.

*Genome Biology*. 2013 Apr 17;14(4):R31.

doi:10.1186/gb-2013-14-4-r31 査読有

Imai T,

Positional information in neural map development: Lessons from the olfactory system.

*Dev Growth Differ*. 2012 Apr;54(3):358-65.

doi: 10.1111/j.1440-169X.2012.01334.x.

査読有

〔学会発表〕(計 38件)

以下、口頭発表(抜粋)

今井 猛

Development of olfactory bulb circuits Workshop on Sensory Systems

2014.01.30 神奈川県横浜市(東京工業大学 すすかけ台キャンパス)

今井 猛

嗅球の情報処理および回路形成における自発発火の役割

国立遺伝学研究所研究会「哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム」

2013.12.19-20 静岡県三島市(国立遺伝学研究所)

今井 猛

細胞内シグナルの定量から神経回路形成のロジックを読み解く

「定量生物学の会」第6回年会

2013.11.24

大阪府吹田市(大阪大学吹田キャンパス銀杏会館)

Takeshi Imai

Nasal Airflow Entrainments Glomerulus

Specific Oscillatory Activities for  
Temporal Odor Coding  
Mini symposium on Synapses and Circuits  
November 6.2013, University of California  
San Diego

Ryo Iwata, Takeshi Imai

Roles of widespread glomerular responses  
to the nasal airflow

第11回国際シンポジウム「味覚嗅覚の分子  
神経機構」 2013.11.01-02

福岡県福岡市(九州大学馬出キャンパス コ  
ラボレーションセンター 2階 視聴覚ホー  
ル)

Meng-Tsen Ke, Satoshi Fujimoto, Takeshi  
Imai

SeeDB: a simple and morphology-preserving  
optical clearing agent for neuronal  
circuit reconstruction

ECRO2013, August 26-29.2013, Leuven,  
Belgium

Ryo Iwata, Takeshi Imai

In vivo two-photon Ca<sup>2+</sup> imaging of  
spontaneous neuronal activity in the mouse  
olfactory bulb

神経科学学会 Neuro2013 2013.6.22 京都  
市(国立京都国際会館)

Meng-Tsen Ke, Takeshi Imai

Differential wiring of sister mitral cells  
in the olfactory bulb revealed by a novel  
optical clearing agent, SeeDB

神経科学学会 Neuro2013 2013.6.20-23 京都  
市(国立京都国際会館)

今井 猛

嗅球僧帽細胞における樹状突起の発達メカ  
ニズム

嗅覚情報処理の神経基盤 - 匂い分子から  
嗅覚神経回路、行動・情動まで -

2012.09.15 東京(東京大学医学部教育研究  
棟)

今井 猛

Wiring Specificity in the Mouse Olfactory  
Circuits"

嗅覚神経回路の特異性はどのようにして決  
まっているのか

大阪大学大学院 生命機能研究科 脳科学  
セミナー

2012.05.17 大阪府吹田市(大阪大学大学院  
生命機能研究科)

Takeshi Imai

Wiring specificity in the mouse olfactory  
circuits

NIPS International Workshop 2011`Cutting  
edge in synapse research`

2011.12.08-09 Okazaki (Okazaki Conference  
Center) Japan

Takeshi Imai

Odorant receptor-instructed axonal wiring  
in the mouse olfactory system

KAIST-RIKEN Joint Symposium on Cell and  
Developmental Biology

2011.11.30 Daejeon(KAIST) Korea

今井 猛

マウス嗅球僧帽・房飾細胞軸索投射の系球に  
よる違いの解析

第34回日本神経科学会-こころの脳科学-

2011.09.14-17 横浜市(パシフィコ横浜)

今井 猛

嗅覚神経地図の形成メカニズム

平成23年度生理学研究所 研究会「シナプ  
ス可塑性の分子細胞基盤」

2011.06.16-17 岡崎市(生理学研究所)

Takeshi Imai

Odorant receptor-instructed neuronal  
wiring in the mouse olfactory system

Workshop/ European Molecular Biology  
Organization/

Frontiers In Sensory Development

03-06May,2011 Barcelona Spain

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: 生物材料を透明化する方法および生物  
材料用透明化処理キット

発明者: 今井 猛、柯 孟岑

権利者: 独立行政法人理化学研究所

種類: 特許

番号: 特願 2012-141488

出願年月日: 2012年6月22日

国内外の別: PCT 国際出願

取得状況(計 0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.cdb.riken.go.jp/jp/02\\_research/0202\\_creative26.html](http://www.cdb.riken.go.jp/jp/02_research/0202_creative26.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 猛 (IMAI TAKESHI)

独立行政法人理化学研究所 発生・再生科学  
総合研究センター チームリーダー

研究者番号: 70509851

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし