

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成 24 年度採択分

平成 27 年 5 月 25 日現在

研究課題名（和文） **マウス嗅覚系を用いて遺伝子-神経回路-
行動のリンクを解く**

研究課題名（英文） **Elucidation of the link of gene, neural circuit,
and behavior in the mouse olfactory system**

課題番号：24000014

研究代表者

坂野 仁 (SAKANO HITOSHI)

福井大学・医学部・特命教授



研究の概要:本研究ではマウス嗅覚系を用いて、一次投射の結果展開された神経地図の情報が、
どの様に二次神経を介して嗅皮質へと分配され、情動・行動の発動につながるのかを解析した。

研究分野：分子生物学

キーワード：嗅覚情報受容、神経回路形成、情動・行動の判断、光遺伝学

1. 研究開始当初の背景

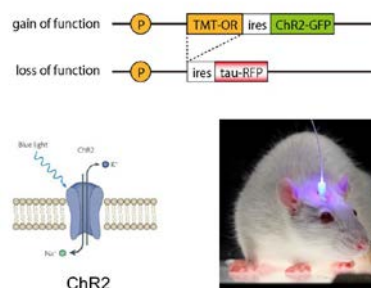
本研究では高等動物の嗅覚系において、匂い情報がどのように受容され、質感が判断されて情動や行動の出力へと結びつくのかを、神経回路レベルで解析する。10万種類を超えるとされる匂い分子の多様な組み合わせと量比からなる匂い情報を、限られた種類の嗅覚受容体で識別する分子メカニズムは長い間謎であった。これについて最近、嗅上皮で検出された匂い分子の受容体に対する結合情報が、嗅球表面にある嗅覚神経地図に匂いマップとして二次元展開される事で無限情報の識別が可能になっている事が明らかになってきた。本研究課題ではこの嗅覚神経地図が、発生過程でどのように形成されるかという一次投射と、嗅球表面に画像展開された匂い情報が二次神経によってどのように嗅皮質へと分配されるのかという二次投射の解明を目指す。本研究ではまた、匂い情報を嗅上皮から嗅球を経て嗅皮質へと伝達する神経回路の同定と、質感の判断、即ち decision making の解明を行う。

2. 研究の目的

本研究課題では、ヒトを含む高等動物の脳において感覚情報がどのように受容され、情動・行動という出力にどう結びつくのかの解明を目指す。我々は最近、高等動物の嗅覚神経回路の形成について、嗅細胞の一次投射とそれに伴う神経地図形成の基本原理のほぼ全容を明らかにした。また、遺伝子操作マウスを用いて、嗅覚情報が本能判断の為の神経回路と記憶に基づく学習判断の為の回路とによって、独立に処理されている事を報告した。本研究課題では、これ迄の一次投射の研究成果を踏まえて二次投射の研究を進めると

もに、天敵臭である TMT に対する恐怖行動を誘導する神経回路をモデルシステムに用い、回路レベルでの gain-of-function と loss-of-function の実験を行う。本研究で得られる成果は、ヒトの意識や心の葛藤の理解に寄与するのみならず、自閉症など精神発達障害の解明にも役立つものと期待される。

Genetic manipulation of aversive olfactory circuit



3. 研究の方法

本研究では、嗅覚神経地図の形成や神経配線に関与する軸索誘導・選別分子について、遺伝子操作マウスを作成し、嗅覚神経回路の形成と作動原理を明らかにする。また様々なイメージングや二光子レーザー顕微鏡を用いた解析と電気生理学的手法を組み合わせ、覚醒マウスにおける optogenetics を用いた行動解析を行う。

4. これまでの成果

嗅覚神経地図形成において最も興味深い現象は、嗅神経細胞の軸索が自らの発現する嗅覚受容体の種類に従って、投射位置を決定する事である。これ迄この分野の著名な研究者達は、軸索末端に発現する嗅覚受容体分子が軸索誘導受容体として働き、ターゲットに

存在する軸索誘導分子を検出すると考えてきた。当グループではこの軸索投射の「嗅ぎ分けモデル」に異をとえ、嗅覚受容体の分子ゆらぎによって生じる基礎活性がcAMPに変換され、Nrp1やPlxnA1など軸索投射分子の発現量を規定して投射位置を決定している事を見出した(*Science*, 2006 and 2009; *Cell*, 2013)。これらの成果は、嗅覚受容体遺伝子が発見されて以来の最大の懸案であった「嗅覚受容体が指令的に制御する軸索投射」の実体を解明したのみならず、発生期にリガンド非存在下で生じるGPCRのノイズ活性に、軸索投射の制御という重要な機能の有る事を初めて示したという意味でも重要である。

嗅覚系において二次神経は、発生初期に嗅球深層部に誕生し、その後表層部に移動し更に背腹軸に沿って配向する。我々は、背側の一次神経軸索が反発性リガンドSema3Fを分泌し、遅れて投射してくるNrp2陽性の一次神経軸索と、Nrp2陽性の二次神経を共に腹側領域へと誘導し、両者の正しいmatchingを保障している事を明らかにした(投稿中)。嗅球において、二次神経細胞のdendriteがどの様にして接続相手となる糸球体を特定するのは重要な問題である。我々は様々な変異体マウスを駆使して、二次神経と一次神経がシナプス形成に至る経緯を解析した。その結果、二次神経は距離的に最も近い糸球体を目指してdendriteを接触させシナプス形成を行う事が判明し、いわゆるproximity modelが支持された(投稿中)。我々はまた、一次神経の軸索と二次神経のdendriteに各々発現するSema7AとPlxnC1の結合シグナルが、二次神経のシナプス形成の開始とdendrite成熟に必須である事を示した(投稿中)。これらの成果は、嗅覚系において神経活動依存的にシナプス形成を開始させる分子メカニズムに関する最初の知見として重要である。

当グループでは最近、嗅球背側に位置する単一糸球体の光刺激によってキツネの分泌する匂い物質(TMT)に対する恐怖反応(freezing)が人為的に誘導可能である事を見出した。我々は以前、嗅球背側D_{II}領域の後方に天敵臭に対応する恐怖領域の有る事を報告した(*Nature*, 2007)。今回は、光学的イメージングによってTMTで活性化される糸球体を同定し、それにDiI色素を注入する事でTMT反応性の嗅細胞を染色し、TMT受容体遺伝子(OR^{TMT})を単離した。我々は更に、OR^{TMT}にチャンネルロドプシンをつないだノックイン(knockin: KI)マウスとOR^{TMT}を欠失させたノックアウト(knockout: KO)マウスを作製し行動解析を行った。その結果、上記KIマウスは光照射によって頬ヒゲ(whisker)の動きを停止して体の動きを止めるfreezing反応を示す事が判明した。これは高等動物の主嗅覚系に於いて、単一糸球体の光刺激によって本能行動を

誘導した最初の例である(投稿中)。

我々はまた光照射によって活性化された糸球体に接続する二次神経の活動を電気生理学的に解析し、これら細胞がTMTによる活性化の時と同様に発火する事を確認した。また興味深い事に、同KIマウスの嗅皮質ではBNSTなどの恐怖領域が、TMTをかいた時と同様に光照射によっても活性化されている事を観察した。以上の成果は、単一糸球体の光刺激により、天敵臭に対する恐怖反応のgain-of-functionを回路レベルで再現するという、本研究課題の目的の一つを達成したという意味で重要な成果と言える。

5. 今後の計画

我々は2007年の*Nature*誌に、嗅覚情報の価値判断は先天的(innate)な本能回路と記憶に基づく学習(learned)回路の二本立てで、情報入力段階から独立かつ並行して行われる事を報告した。*Drosophila*などハエの嗅覚系ではlateral hornで先天的本能判断、mushroom bodyで学習依存的判断が下されると言われている。しかしながらマウスでは、嗅皮質のどこで入力情報に対する価値付けがなされているのかについて依然として不明な点が多い。今後は以下の様に、匂い情報に対する情動・行動のdecision makingがどこでどの様に行われているのかを明らかにする。

- 1) 先天的本能行動のdecision makingの解明
 - 2) 匂い情報に質感を付与する機構の解明
 - 3) 学習及び本能判断のbalancing機構の解明
 - 4) optogeneticsを用いた神経回路の操作
- これらの研究により本研究課題を更に大きく進展させる事が出来ると考えている。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Nakashima, A., Takeuchi, H., Imai, T., Saito, H., Kiyonari, H., Abe, T., Chen, M., Weinstein, L.S., Yu, C.R., Storm, D.R., Nishizumi, H., and Sakano, H.: Agonist-independent GPCR activity regulates axon targeting of olfactory sensory neurons. *Cell*, **154**: 1314-1325 (2013)
2. Aoki, M., Takeuchi, H., Nakashima, A., Nishizumi, H., and Sakano, H.: Possible roles of Robo1⁺ ensheathing cells in guiding dorsal-zone olfactory sensory neurons in mouse. *Dev. Neurobiol.*, **73**: 828-840 (2013)
3. Takeuchi, H. and Sakano, H.: Neural map formation in the mouse olfactory system. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**: 3049-3057 (2014)
4. Nishizumi, H. and Sakano, H.: Developmental regulation of neural map formation in the mouse olfactory system. *Dev. Neurobiol.* **75**: 594-607 (2015)

すべて査読有

武田医学賞(2013)、東レ科学技術賞(2013)、持田記念学術賞(2013)、内藤記念科学振興賞(2014)、紫綬褒章(2014)