

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年5月28日現在

機関番号：13401

研究種目：特別推進研究

研究期間：2012～2016

課題番号：24000014

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

研究代表者

坂野 仁 (Sakano, Hitoshi)

福井大学・学術研究院医学系部門・特命教授

研究者番号：90262154

交付決定額(研究期間全体)(直接経費)：366,000,000

研究成果の概要(和文)：本研究プロジェクトでは、高等動物の情動・行動の発動のメカニズムを、マウス嗅覚系を用いて、分子レベル及び神経回路レベルで理解する事を目的とした。

本研究では、長年の懸案であった「嗅覚受容体によって指令的に制御される嗅覚神経の一次投射のメカニズム」を最終的に解明し、続いて情動・行動発動の回路レベルの理解の為に、更に解明が困難と言われた嗅覚二次神経のシナプス形成と扁桃体への投射のメカニズムを明らかにした。本研究プロジェクトで得られた主な成果は次の通りである。

- (1) 嗅覚神経回路形成の基本原理の解明(一次投射) (*Cell*, 154, 1314, 2013)
- (2) 嗅覚神経回路形成の基本原理の解明(二次投射) (*Nat. Commun.*, 8, 15977, 2017)
- (3) 単一糸球体の光活性化による恐怖行動の誘導 (*Nat. Commun.*, 8, 16011, 2017)
- (4) 神経活動依存的に生じる糸球内でのシナプス形成の解明 (*Nat. Commun.*, 9, 1842, 2018)
- (5) 嗅覚系に於ける臨界期と刷り込み記憶の解明 (*Nat. Neurosci.*, in revision)

研究成果の概要(英文)：In mammals, neural circuits are formed based on a genetic program and refined by neuronal activity after birth. In the primary projection, expressed odorant-receptor (OR) molecules play an instructive role in guiding axons to the olfactory bulb (OB). We found that agonist-independent OR activity regulates targeting of olfactory sensory neurons (*Cell*, 154, 1314, 2013).

In the secondary projection, Neuropilin 2-positive (Nrp2⁺) mitral cells were found to play crucial roles in transmitting attractive social signals. In the Nrp2 knockout, odor-induced social responses were perturbed. *In utero* electroporation demonstrated that activation of the *Nrp2* is sufficient to instruct circuit formation to the anterior medial amygdala (MeA) (*Nat. Commun.*, 8, 15977, 2017).

We also found that olfactory circuits are newly connected to second-order neurons in an activity-dependent manner. *Sema7A* is key for inducing post-synaptic events within glomeruli (*Nat. Commun.*, 9, 1842, 2018). Exposure of the newborn to a particular odorant enhanced *Sema7A* expression in the responding glomeruli establishing imprinted memory (*Nat. Neurosci.*, in revision).

Fox odor trimethyl thiazoline (TMT) is known to activate multiple glomeruli and elicits strong fear responses. We generated channel-rhodopsin knockin mice for one of the TMT-reactive receptors, *Olf1019*, and found that photo-stimulation induced freezing/immobility responses (*Nat. Commun.*, 8, 16011, 2017).

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝子操作マウス、光遺伝学、恐怖反応、社会行動、セマフォリン、二次神経、扁桃体、シナプス形成

1. 研究開始当初の背景

本研究プロジェクトは前回の特別推進研究(19002012・2007~2011年度)を引き継ぐものとして2012年度に開始された。前回のプロジェクトでは、嗅覚神経系の一次投射を中心に解析が進められたのに対し、今回のプロジェクトでは二次投射に軸足を移して研究が行われた。研究のゴールとして、二次投射を介した情動・行動の出力判断、いわゆる decision making の回路レベルでの解明を目標とした。

当グループではこれ迄、胎生期に於ける遺伝的プログラムに基づいた回路形成に主眼を置いて来たが、本プロジェクトでは出生直後の新生仔期に生じる神経活動依存的な回路形成の解明にも重点を置いた。

嗅覚系を用いた神経回路の研究は、視覚系などに比べ、入力情報が匂い分子として特定出来る点が優れている。また、一種類の匂いリガンドに対して、嗅覚受容体、糸球体、それに接続する二次神経、更にはその嗅皮質への二次投射と、入力情報の伝達が一対一に対応させ乍らフォロー出来る点も有利である。本研究プロジェクトは、これ迄の一次投射に関する研究成果を踏まえ、二次神経のシナプス形成及び軸索投射の分子メカニズムの解明を目指し、嗅覚情報の出力判断の回路レベルでの解明を目的として開始された。

2. 研究の目的

本研究プロジェクトでは研究課題名にも掲げる様に、「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」事を目的とした。研究の目的項目、即ち specific aims は次の通りであった。

- (1) 発現する OR 分子によって指令的に制御される一次投射の基本原理の解明。
- (2) 一次投射の結果、嗅覚情報が糸球体を画素とする二次元デジタルマップに展開される機能的意味の解明。
- (3) 嗅球に展開された匂い情報を嗅皮質、特に扁桃体に伝える二次投射の解明。
- (4) 二次投射を介して付与される嗅覚情報に対する先天的価値付けの回路レベルでの解明。
- (5) 新生仔期に起こる神経活動依存的なシナプス及び回路形成の分子レベルでの解明。
- (6) 光遺伝学的手法を用いて、単一糸球体の活性化により先天的行動を誘発するシステムの開発。

3. 研究の方法

(1) 本研究プロジェクトの遂行には、様々な遺伝子操作マウスを使用した。軸索投射の解析には、主としてノックアウト(KO)マウスや、特定の細胞種に限定したコンディショナル KO を用いた。また、光遺伝学を応用した糸球体の光刺激による恐怖行動の誘導の実験にはチャンネルロドプシン(ChR) 遺伝子を導入したノックイン(KI)マウスを作製した。

(2) 嗅覚神経回路のトレーシングには、シナプスを逆行性に伝播するレヴィウイルスのシステムを用いた。この実験は東京大学医学部尾藤研究室の協力を得て行われた。また、DiI による色素染色法も併用した。更に、糸球内に於けるシナプス解析にはルシファーイエローの注入による染色法を用い、併せて東京大学医科学研究所の協力を得て、電子顕微鏡による検定も行なった。

(3) 本研究では、遺伝子組み換えマウスを用いた様々な行動実験が行われた。これらの行動実験は、麻布大学獣医学部の菊水研究室の助言を得て遂行された。

(4) 本研究における様々な遺伝子の組織や細胞に於ける発現は、RNA プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションと抗体を用いた免疫染色法を併用して解析された。嗅神経組織や神経細胞の電気生理学的解析は、東京大学医学部森研究室(当時)の協力を得て遂行された。

(5) 出生前の胎仔嗅球への遺伝子導入は、*in utero* electroporation により行われ、この実験はペンシルベニア州立大学の今村研究室の協力を得て遂行された。

4. 研究成果

本研究プロジェクトで得られた研究成果は次の通りである。

(1) 嗅覚神経回路形成の基本原理の解明 (一次投射)

高等動物の嗅覚系に於いて、鼻腔内の嗅上皮で受容された匂い情報は、嗅神経細胞の一次投射を介して、嗅球において二次元の位置情報に変換される。この画像化された情報を脳が識別する事によって多様な匂いの情報が判明されると考えられている。一方、嗅球表面には大脳のブロードマンマップの様に、様々な機能ドメインが含まれていると考えられ、一次投射の結果、忌避すべき腐敗臭や天敵臭は嗅球の背側奥に、また誘引的社会行動を引き起こす匂い情報は腹側奥へと分配される。当グループでは、この一次投射の基本原則を背腹軸と前後軸に分けて解析し、夫々が Nrp2/Sema3F 及び Nrp1/Sema3A の軸索誘導システムによって独立に制御されている事を明らかにした。これらの成果により、長年懸案であった「嗅覚受容体によって指令的に制御される軸索投射」の謎が解明された。

(2) 嗅覚神経回路形成の基本原則の解明 (二次投射)

一次投射によって嗅球の背側と腹側に分配された忌避と誘引の嗅覚情報は、次に僧帽細胞の二次投射によって、嗅球から扁桃体の CoA 及び MeA の領野に夫々配信され、先天的な情動・行動の出力が発動される。本研究では、この二次投射を介した嗅覚情報の分配を支える分子メカニズムの解明を行った。我々は、胎仔の発生中期に嗅球深部で産生される僧帽細胞が、Nrp2 を発現するもの(Nrp2⁺) としないもの(Nrp2⁻) に分別され、Nrp2⁺ の集団は嗅球の腹側へ、Nrp2⁻ の集団は背側へと

誘導される事、またこの分配には嗅球背側の一次神経から分泌される反発性のリガンド、Sema3F が関与する事を KO マウスを用いて証明した。この Nrp2/Sema3F のシグナルシステムは Nrp2⁺ の僧帽細胞の軸索を扁桃体の MeA 前方部へ誘導することにも関与して居り(図1)、Nrp2 シグナルの KO マウスでは、オスメス間や母子間の主嗅覚系を介した誘引的社会行動が阻害される事が示された。我々は更に、胎仔の嗅球へ Nrp2 遺伝子を強制導入する electroporation の実験を行い、僧帽細胞に Nrp2 を発現させるだけで、誘引的社会行動を引き起こす神経回路の形成が誘導される事を証明した。

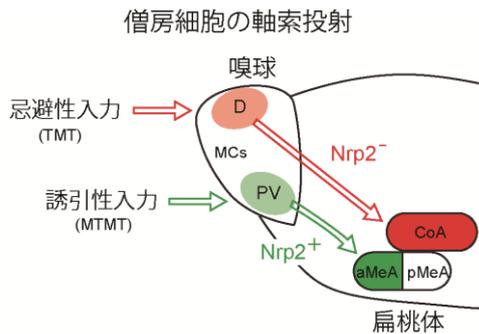


図1. 社会的誘引行動を引き起こす神経回路の特定
二次神経細胞である僧房細胞は Nrp2 の発現を指標に、Nrp2⁺ と Nrp2⁻ の2つのグループに分類される。そのうち、Nrp2⁺ な細胞は嗅球腹部と扁桃体内側 (MeA) 前方部をつなぎ、誘引的社会行動を引き起こすための神経回路形成に重要な役割を果たすことが判明した。一方 Nrp2⁻ な僧房細胞は、嗅球頭部と扁桃体外側 (CoA) を結び、回避回路の形成に関わると考えられる。

(3) 単一糸球体の光活性化による恐怖行動の誘導

嗅球表面には約一千個の糸球体を画素とするデジタル画面が嗅覚神経地図として展開している。この糸球地図に映し出される糸球体の活性化パターンは、微妙な匂いの識別に利用されていると考えられる。一方、この神経地図にはいくつかの機能ドメインが含まれるといわれ、嗅球背側は先天的な忌避や恐怖行動の発動に特化されている。我々は天敵であるキツネの匂い、トリメチルアゾリン (TMT)、に反応する複数の糸球体の内から、最もリガンド特異性が高く反応性も強いものを選び、そこに発現する嗅覚受容体 Olfr1019 に ChR を導入した KI を作製した。このマウスの嗅球を覚醒状態で光照射する

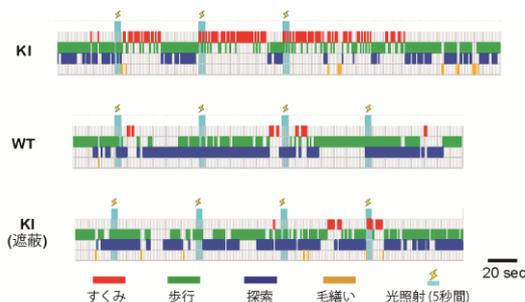


図2. 単一糸球体の光刺激によるすぐみ行動の誘導
TMT に反応性の嗅覚受容体のうち、リガンド選択性の高い Olfr1019 に ChR を導入し KI マウスを作製した。このマウスを1分毎に5秒間光照射してその行動を経時的に解析したところ、その直後にすぐみ反応(赤)が示された。コントロールとして、野生型およびアルミフイルで頭部をカバーした KI マウスを並行して解析した。

と、扁桃体の CoA 領域や BNST など TMT で活性化される脳の中枢領野に部分的な活性化が見られ、強いすくみ (freezing) 反応が観察された(図2)。しかし意外な事に、TMT に対して通常見られる忌避の行動は誘発されなかった。これらの実験により、単一糸球体 Olfr1019 の光刺激のみで先天的すくみが誘導可能である事、また TMT によって誘導される恐怖行動はすくみ反応と忌避反応の2つの要素から成る事が示された。

(4) 神経活動依存的に生じる糸球体内でのシナプス形成

嗅覚神経回路の大まかな形成は、出生前の胎仔期に遺伝的プログラムによって完了する。しかし出生直後の新生仔期には、外界からの環境入力によって神経活動依存的な神経回路の精緻化及び、可塑的な修正が行われる。しかしながら、こうした神経回路の修正は出生直後の限られた時期、いわゆる臨界期 (critical period) に神経活性依存的に行われる。そのよく知られた例として、カモのヒナが孵化して最初に目にした動く物体を親と認識して一生その後を追う刷り込み現象が有名である。当グループではこれら外界情報依存的な回路形成について、入力情報を匂い分子として特定できる嗅覚系を用いて解析した。当グループでは、新生仔の糸球体で外界入力依存的に Sema7A が発現し、それが二次神経の樹状突起に局在する受容体 PlxnC1 に結合すると糸球体が肥大し強いシグナルが中枢へと運ばれる事を突き止めた(図3)。この神経活動依存的に生じる Sema7A シグナルは、PlxnC1 の樹状突起における局在が生後一週間に限定されている為、マウス嗅覚系の臨界期を規定する重要な要素と考えられる。

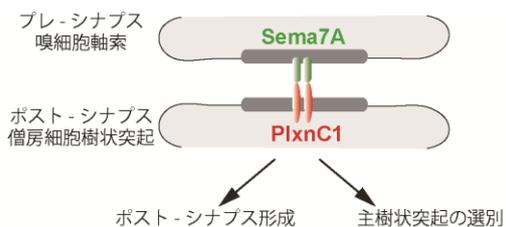


図3. 神経活動依存的にシナプス形成を誘導するシグナル分子の同定
二次神経の軸索末端に神経活動依存的に発現する Sema7A が、また二次神経の樹状突起に新生仔期の7日目まで局在が認められる受容体分子 PlxnC1 が同定された。両者の結合によりシナプス形成が促進され、樹状突起の成熟・選択が生じ、糸球体の機能および大きさが増進する。

(5) 嗅覚系に於ける臨界期と刷り込み記憶

当グループでは、新生仔期に於ける環境からの嗅覚情報入力が、Sema7A シグナルを誘導して糸球体を増強し、刷り込み記憶を成立させる事を見出した。本研究では更に、この刷り込み記憶に誘引的価値付けを与える物質が、新生仔期に脳内で発現が亢進しているオキシトシンである事を、その KO マウスを用いた実験により証明した。本研究では更に、新生仔の鼻腔閉塞などにより Sema7A シグナルをブロックすると、成長後の社会行動に異常を来し、他個体との関わりを避ける人見知り行動を示す様になる事も明らかとなった。これらの結果は、ヒトに見られる自閉症や愛着障害などにも、臨界期における誘引的

な刷り込み記憶が関与している事を示唆している。また、オキシトシン欠損マウスの新生仔にオキシトシンを鼻腔内投与する事により誘引的刷り込みが回復する事から、本研究成果は、精神発達障害の発症メカニズムの解明やその治療にも大きく寄与するものと期待される。

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 7 件)

- ① Inoue, N., Nishizumi, H., Naritsuka, H., Kiyonari, H., Kikusui, T., and Sakano, H.: Olfactory imprinting during the critical period in mice. *Nature Neurosci.* (in revision).
- ② Inoue, N., Nishizumi, H., Naritsuka, H., Kiyonari, H., and Sakano, H.: Sema7A/PlxnC1 signaling triggers the activity-dependent olfactory synapse formation. *Nature Commun.* 9, 1842 (2018).
- ③ Saito, H., Nishizumi, H., Suzuki, S., Matsumoto, H., Ieki, N., Abe, T., Kiyonari, H., Morita, M., Yokota, H., Hirayama, N., Yamazaki, T., Kikusui, T., Mori, K., Sakano, H.: Immobility responses are induced by photoactivation of a single glomerular species responsive to fox odor TMT. *Nature Commun.* 8, 16011 (2017).
- ④ Inokuchi, K., Imamura, F., Takeuchi, H., Kim, R., Okuno, H., Nishizumi, H., Bito, H., Kikusui, T., and Sakano, H.: Nrp2 is sufficient to instruct circuit formation of mitral-cells to mediate odor-induced attractive social responses. *Nature Commun.* 8, 15977 (2017).
- ⑤ Nishizumi, H. and Sakano, H.: Developmental regulation of neural map formation in the mouse olfactory system. *Dev. Neurobiol.*, 75, 594-607 (2015).
- ⑥ Shirasu, M., Yoshikawa, K., Takai, Y., Nakashima, A., Takeuchi, H., Sakano, H., Touhara, K.: Olfactory receptor and neural pathway responsible for highly selective sensing of musk odors. *Neuron* 81, 165-178 (2014).
- ⑦ 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 anterior-posterior targeting of olfactory sensory neurons. *Cell* 154, 1314-1325 (2013).

[学会発表] (計 14 件)

- ① Sakano, H.: Cold Spring Harbor Meeting: Wiring the Brain (招待講演), 2017, 04, New York (USA)
- ② 坂野 仁: 国際高等研究所 研究会「精

神発達障害から考察する Decision Making の分子的基盤」研究会(招待講演), 2017, 02, 国際高等研究所(京都府木津川市)

- ③ Sakano, H.: XXVith Annual meeting of the European chemoreception research Organization (ECRO) (招待講演), 2016, 09, Athens (Greece)
- ④ Sakano, H.: Max Planck Institute, Berlin (招待講演), 2016, 04, Berlin (Germany)
- ⑤ Sakano, H.: European Chemoreception Research Organization (ECRO) (特別講演) 2015, 09 Istanbul (Turkey)
- ⑥ Sakano, H.: Kavli Institute for theoretical Physics (招待講演), 2015, 07, Santa Barbara, CA (U.S.A)
- ⑦ Sakano, H.: University of California, Davis Seminar (招待講演), 2015, 04, Davis, CA (U.S.A)
- ⑧ 坂野 仁: 第 120 回 日本解剖学会総会・全国学術集会 第 92 回 日本生理学会大会 (特別講演), 2015, 03, 神戸国際会議場・展示場 (神戸市)
- ⑨ 坂野 仁: 第 41 回 脳科学学会 (特別講演), 2014, 11, 福井県民ホール(福井市)
- ⑩ Sakano, H.: Edinburgh Workshop: From maps to circuits: Models and mechanisms for generating neural connections (招待講演), 2014, 07, Edinburgh (Scotland)
- ⑪ Sakano, H.: EMBO International Workshop on Semaphorin Function & Mechanisms of Action (招待講演), 2013, 10-11, Paris (France)
- ⑫ Sakano, H.: The 5th International Stem Cell Meeting (招待講演), 2013, 10, Jerusalem (Israel)
- ⑬ Sakano, H.: ECRO Symposium: Structure Organization and Functional Properties of Circuits in the Olfactory Bulb and Cortex (招待講演), 2013, 08 Leuven (Belgium)
- ⑭ Sakano, H.: Cold Spring Harbor Meeting: Francis Crick Symposium on Neuroscience (招待講演), 2013, 05 Suzhou (China)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂野 仁 (Sakano, Hitoshi)

福井大学・学術研究院医学系部門・特命教授

研究者番号: 90262154

(2)研究分担者

濡木 理 (Nureki, Osamu)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：10272460

西住 裕文 (Nishizumi, Hirofumi)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：30292832

菊水 健史 (Kikusui, Takefumi)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：90302596

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

坪川 時子 (Tsubokawa, Tokiko)

福井大学・学術研究院医学系部門・特命職員