

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25430025

研究課題名(和文) 嗅覚入力を行動出力へと変換する神経回路基盤の解明

研究課題名(英文) Elucidation of Neural Circuit Mechanisms Underlying Transformation of Olfactory Inputs into Behavioral Outputs

研究代表者

宮坂 信彦 (Miyasaka, Nobuhiko)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・副チームリーダー

研究者番号：70332335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ゼブラフィッシュの嗅覚行動を担う神経回路基盤の解析を行った。性フェロモンであるプロスタグランジンF₂ (PGF₂) の嗅覚受容体を同定し、受容体機能を欠損したオス変異体は、メスに対する求愛行動の持続時間が短くなることを見出した。また、PGF₂ の嗅覚入力によって、終脳腹側部腹側核および視床下部の複数の領域が活性化されることが明らかとなった。一方、食物に由来するATPやアラニンはゼブラフィッシュの誘引行動を引き起こし、嗅球-視床下部直接経路を構成する後方結節など、複数の共通した脳領域を活性化することが明らかとなった。さらに、異なる匂いによって特異的に活性化される脳領域を同定した。

研究成果の概要(英文)：Odor information is represented as a chemotopic map in the olfactory bulb. This odor map must be transferred to higher brain centers and translated into appropriate behavioral responses. In the present study, we analyzed neural circuit mechanisms underlying transformation of odor inputs into behavioral outputs in zebrafish. We identified an olfactory receptor for prostaglandin F₂ (PGF₂), a female sex pheromone, and found that male zebrafish mutant for this receptor show impaired courtship behaviors toward female fish. Olfactory stimulation with PGF₂ activated a ventral telencephalic nucleus and several hypothalamic nuclei. ATP and alanine, food-derived odors, attracted zebrafish and commonly activated several brain regions including the posterior tuberculum, which constitutes the olfactory bulb-hypothalamus direct pathway. Furthermore, we identified brain regions that are specifically activated by different odor stimuli.

研究分野：神経科学

キーワード：嗅覚 神経回路 脳 行動 遺伝子工学 視床下部 嗅覚受容体 ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

(1) 嗅覚系の研究は、本研究開始までの20年で飛躍的に進展した。特に、匂いを受容する嗅上皮から脳の嗅球へと至る一次嗅覚系については、その精緻な神経接続様式に基づく「匂い地図」の存在が明らかとなり、嗅球における匂い情報コーディングの全体像がほぼ解明されていた。その一方で、高次中枢における匂い情報処理の研究は始まったばかりであった。

(2) 研究代表者らはゼブラフィッシュをモデル生物として利用し、脊椎動物の二次嗅覚ニューロンを単一細胞の解像度で遺伝学的に可視化することに成功していた。その解析から、動物種間で共通した神経経路とともに、哺乳動物では見られない嗅球から間脳への直接的な神経投射の存在が明らかとなった。

2. 研究の目的

匂いの情報は、匂い分子の化学構造を基にした「匂い地図」として嗅球に表現される。一方、匂いの質に対応した動物行動の発現には、高次中枢での情報の抽出・統合が必要である。研究代表者らはこれまでに、ゼブラフィッシュの嗅球から間脳を直接結ぶ二つの嗅覚経路(手綱核経路、視床下部経路)の存在を見いだした。哺乳動物では複数のシナプスを経由するのに対して、ゼブラフィッシュでは嗅球から直接間脳に情報が伝わると考えられ、これらの神経回路素子が感覚入力から運動出力への迅速な変換を司る可能性が示唆される。本研究では、「嗅球-間脳」直接経路を中心に、ゼブラフィッシュの嗅覚行動を担う神経回路メカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子工学的手法による神経回路の可視化

ニューロンタイプ特異的プロモーターの制御下に酵母転写因子 Gal4 を発現するトランスジェニック系統と、Gal4 応答配列 UAS の制御下に様々なリポーター遺伝子 (Synaptophysin-GFP, 膜局在型 tdTomato, WGA など) を発現するトランスジェニック系統を交配して、特異的な神経回路素子を可視化する。

(2) pErk 免疫組織化学およびカルシウムイメージングによる神経活動変化の解析

ゼブラフィッシュの嗅覚系では、MAP キナーゼ (Erk) のリン酸化が神経活動のよい指標となる。魚を匂いに暴露した後、嗅上皮や嗅球の pErk 免疫染色を行い、活性化した嗅細胞やその投射先の系球体を同定する。

また、Gal4/UAS システムにより G-CaMP を嗅細胞に発現させ、様々な匂いに対する嗅球の系球体の応答をカルシウムイメージングによって解析する。

(3) 神経活動マーカー分子を用いた嗅覚行動出力後の神経活動履歴の解析

様々な匂いによって誘起される生得的嗅覚行動(誘引行動、生殖行動など)について、行動変化を定量解析する。行動の誘起後に脳を取り出し、神経活動マーカーである Erk のリン酸化や最初期遺伝子 c-fos の発現を検出し、動物行動にともなって活性化した脳領域を同定する。

4. 研究成果

(1) 嗅球-手綱核経路を活性化する匂い物質の同定

嗅球-手綱核経路を構成する嗅球投射ニューロンは、主に内背側系球体 mdG と接続していることがすでに明らかとなっている。そこで、pErk 免疫染色および G-CaMP カルシウムイメージングにより、mdG を活性化する匂い物質のスクリーニングを行った。その結果、これまで魚にとって匂い物質とは考えられていなかった低分子のイオンによって、mdG が活性化することが明らかとなった。

(2) 嗅球-視床下部経路を構成する三次ニューロンの同定

視床下部の後方結節は嗅球から直接投射を受ける。後方結節の三次嗅覚ニューロンを同定するために、シナプス局在型蛍光タンパク質 Syp-GFP を嗅球投射ニューロン(二次ニューロン)に発現させ、シナプス部位を観察した(図1)。

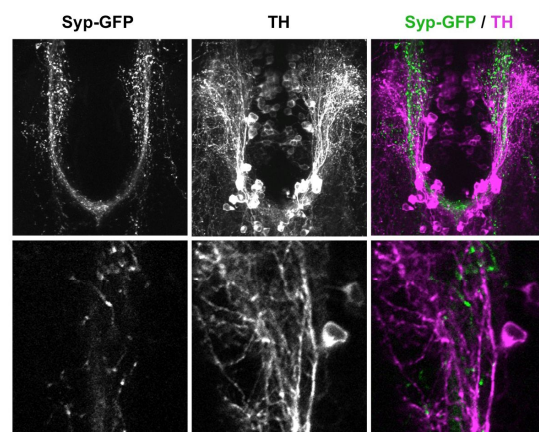


図1 嗅覚二次ニューロン軸索上のシナプス前部の可視化

嗅球ニューロンで発現したSyp-GFPは視床下部ドパミン作動性ニューロン(TH陽性)の神経線維と近接する

後方結節にはドパミン作動性ニューロンが多く存在し、Syp-GFP のシグナルはドパミンニューロンの神経線維と近接していた。さらに、経シナプストレーサーである WGA を二次

ニューロンに発現させたところ、シナプスを移行して取り込まれたと考えられる WGA のシグナルが、ドパミンニューロンの細胞体において観察された。これらのことから、後方結節ドパミンニューロンは嗅覚三次ニューロンである可能性が示唆された。

(3) 性フェロモン プロスタグランジン F2 α (PGF2 α) によって誘起される行動と活性化される高次脳領域の解析

排卵期のメスから放出される性フェロモン PGF2 α の嗅覚受容体を、嗅上皮の c-fos 遺伝子の発現を指標にして同定した。PGF2 α の生殖行動における役割を解析するために、同定した受容体の機能を欠損したゼブラフィッシュ変異体をゲノム編集技術によって作製した。生殖行動を詳細に解析するために、メスに対するオスの求愛行動に3つのパラメーター(追尾、つつき、回り込み)を設定し、その時間と回数を測定することで、求愛行動の定量的解析法を確立した。オス変異体の行動を解析したところ、3つのパラメーターによって規定されるメスへの求愛行動の回数は変化しないが、その持続時間が著しく減少することが明らかになった。さらに、PGF2 α の嗅覚入力によって活性化される高次脳領域を pErk 免疫染色によって解析したところ、終脳腹側部腹側核 (Vv) および視床下部の複数の神経核 (PPa, LH, Hc) が活性化されることが明らかになった (図2)。

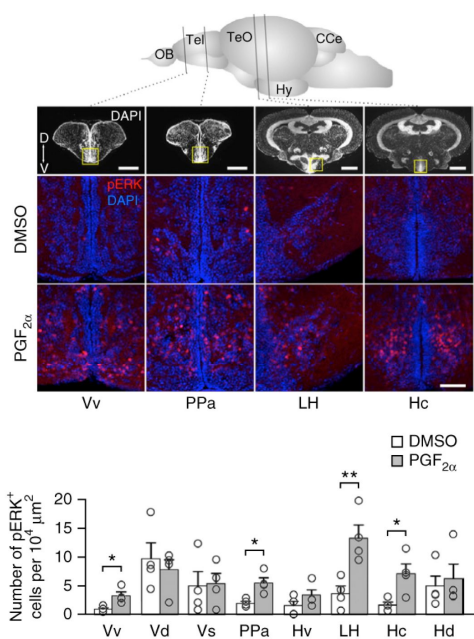


図2 PGF2 α の嗅覚入力によって活性化される高次脳領域 (pErk免疫組織化学による解析)

(4) ATP およびアミノ酸によって誘起される行動と活性化される高次脳領域の解析

食物に由来する匂い成分と考えられる ATP について、行動応答とその神経回路メカニズムの解析を行った。ゼブラフィッシュは ATP

に対して誘引行動を示し、その行動応答は、同じく食物に由来するアミノ酸の一種であるアラニンよりも低濃度で誘起された。嗅上皮における ATP の受容メカニズムを解析したところ、魚類や両生類のゲノムに特異的に存在する新規アデノシン受容体 A2c が嗅覚受容体として機能することが明らかとなった。さらに、ATP は鼻腔内で細胞外脱リン酸化酵素によって積極的かつ速やかにアデノシンに分解され、アデノシン受容体 A2c を活性化して嗅覚応答を誘起することを見出した。また、ATP の嗅覚入力によって活性化される高次脳領域を c-fos 遺伝子の発現によって解析したところ、終脳および視床下部の複数の領域 (終脳: Vs, Dp; 視床下部: Hd, PTN) が活性化されることが明らかになった (図3)。視床下部の後方結節 (PTN) は嗅球-間脳直接経路を構成するが、ATP とアラニンのどちらの嗅覚入力でも活性化されることから、匂いによって誘起される誘引行動と密接な関連があることが示唆された。さらに、ATP のみによって活性化されるニューロンが視床下部に存在することも明らかとなり (図3, Hv 腹側部) ATP の嗅覚入力に特異的な行動学的・生理学的機能の存在が示唆された。

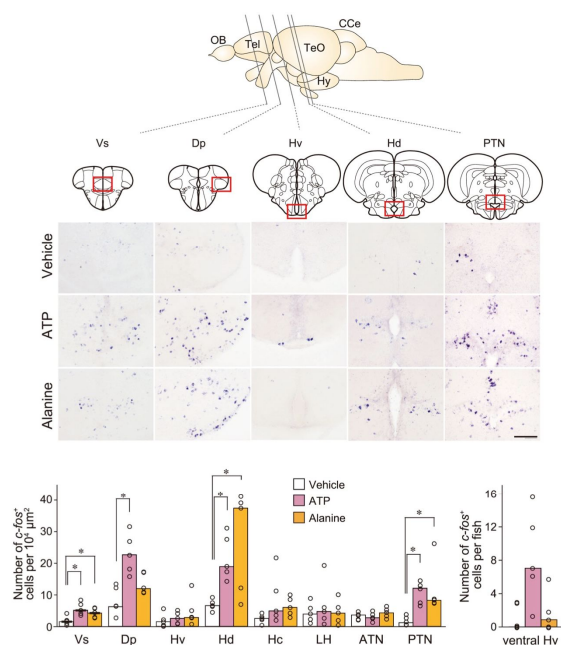


図3 ATPおよびアラニンの嗅覚入力によって活性化される高次脳領域 (c-fos遺伝子の発現解析)

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3件)

Wakisaka N., Miyasaka N., Koide T., Masuda M., Hiraki-Kajiyama T., Yoshihara Y. (2017) An adenosine receptor for olfaction in fish.

Curr. Biol. 27: 1437-1447.
doi: 10.1016/j.cub.2017.04.014 査読あり

Yabuki Y., Koide T., Miyasaka N., Wakisaka N., Masuda M., Ohkura M., Nakai J., Tsuge K., Tsuchiya S., Sugimoto Y., Yoshihara Y. (2016) Olfactory receptor for prostaglandin F_{2α} mediates male fish courtship behavior. *Nat. Neurosci.* 19: 897-904. doi: 10.1038/nn.4314. 査読あり

Miyasaka N., Arganda-Carreras I, Wakisaka N, Masuda M, Sümbül U, Seung HS, Yoshihara Y. (2014) Olfactory projectome in the zebrafish forebrain revealed by genetic single-neuron labelling. *Nat. Commun.* 5:3639. doi: 10.1038/ncomms4639. 査読あり

〔学会発表〕(計3件)

Yabuki Y., Koide T., Miyasaka N., Wakisaka N, Masuda M., Ohkura M., Nakai J., Tsuge K., Tsuchiya S., Sugimoto Y., Yoshihara Y. Olfactory receptor for prostaglandin F_{2α} mediates courtship behavior of male zebrafish. 17th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT), 2016年6月6日~6月8日, パシフィコ横浜(神奈川・横浜)

Miyasaka N., Yoshihara Y. Olfactory projectome in the zebrafish forebrain revealed by genetic single-neuron labeling. The 2nd "International Institute for Advanced Studies" Conference of Novel Developments of Life and Biological Systems Based on Genome Engineering and Imaging Science, 2014年2月28日, 国際高等研究所(京都・木津川)

Miyasaka N. Olfactory projectome in the zebrafish forebrain revealed by genetic single-neuron labeling. Workshop on Sensory Systems, 2014年1月30日, 東京工業大学(神奈川・横浜)

〔図書〕(計1件)

Miyasaka N., Wakisaka N, Yoshihara Y. (2015) Immunocytochemistry and Related Techniques (Neuromethods Vol. 101, Springer). Chapter 4: Genetic Mosaic Labeling and Immunofluorescence Techniques in Zebrafish Brain. (pg. 81-92)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 魚類の行動制御技術
発明者: 吉原良浩、脇阪紀子、宮坂信彦、小出哲也
権利者: 国立研究開発法人理化学研究所
種類: 特許
番号: 特願 2017-075796
出願年月日: 平成 29 年 4 月 6 日
国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

ATP のおいしそうな匂いに誘われて - 魚類・両生類に特異的な新しいアデノシン嗅覚受容体の発見 -
http://www.riken.jp/pr/press/2017/20170512_1/

魚の求愛行動を促進するフェロモン受容体の発見 - プロスタグランジン F₂ のセクシーな香り -
http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160531_1/

嗅覚神経回路の精緻な配線図の解読に成功 - 発生工学と最先端の3次元画像処理技術による成果 -
http://www.riken.jp/pr/press/2014/20140409_1/

6. 研究組織

(1) 研究代表者
宮坂 信彦 (MIYASAKA Nobuhiko)
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・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

(4) 研究協力者
吉原良浩 (YOSHIHARA Yoshihiro)
小出哲也 (KOIDE Tetsuya)
脇阪紀子 (WAKISAKA Noriko)
増田美和 (MASUDA Miwa)
矢吹陽一 (YABUKI Yoichi)