

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 11 月 2 日現在

機関番号：21601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25640037

研究課題名（和文）昆虫フェロモン受容体を利用した新規神経回路活動操作技術の開発

研究課題名（英文）Development of a novel technology for the control of specific neuronal activity with insect pheromone receptors

研究代表者

小林 和人 (Kobayashi, Kazuto)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90211903

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、昆虫フェロモン受容体を利用して、特定のニューロンの活動を興奮性に制御する新規の遺伝学的技術の開発に取り組んだ。チロシン水酸化酵素遺伝子プロモーター制御下に、IR8a/IR84a遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作成した。スライス電気生理、in vivo電気生理において、青斑核(LC)の活動はフェロモンの添加により亢進し、マイクロダイアリスにおいて、大脳皮質ノルアドレナリン遊離レベルの増加が誘導された。LC活性化は、味覚嫌悪記憶の想起を増強した。以上の結果から、フェロモン依存性イオンチャネルの発現により、特定ニューロンの活動を興奮性に制御することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規の化学遺伝学の技術は、促進性イオン透過型受容体を用いる実験系で、これまでの代謝型受容体を用いた系とは細胞内伝達系を必要とせず、安定した実験結果が期待できる。ある種の病態モデルにおいて低下した細胞機能を改善する技術に応用でき、神経回路レベルの機能回復に有益な技術を提供する。また、ノルアドレナリンの記憶再生における役割を明らかにしたが、この神経伝達系の作用を調節することにより、記憶障害やPTSDなどの疾患の改善に応用することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we tried to develop a novel genetic technology that enables activate the activity of specific neuronal types by using insect pheromone receptors. Transgenic mice were generated that express IR8a/IR84a under the control of tyrosine hydroxylase gene promoter. Slice electrophysiology and in vivo electrophysiology experiments indicated a significant activation of locus ceruleus (LC) noradrenergic neurons in transgenic mice by pheromone addition. Pheromone administration into the LC also enhanced noradrenaline release in the cerebral cortex and retrieval process of taste aversion memory. These results show that it is possible to control the activity of specific neuronal types by using insect pheromone receptors.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：昆虫フェロモン 興奮性イオンチャネル 化学遺伝学 トランスジェニックマウス 青斑核 学習

1. 研究開始当初の背景

さまざまな脳機能は、複雑な神経回路における情報の処理とその調節の機構に基づいている。脳機能を媒介する神経機構を解明するためには、神経回路を構成する特定のニューロンの行動生理学的な役割の解明が必須である。このために、種々のニューロンタイプの除去、神経伝達の抑制、光遺伝学による活動制御を含むいくつかのアプローチが存在する。化学物質を利用して特定ニューロンの活動を制御する技術の開発も進んでいるが、目的のニューロン活動を促進性に制御する有益な技術は存在しない。本研究では、昆虫フェロモン受容体を利用して、特定のニューロンの活動を興奮性に制御し、普遍的に利用できる新しい遺伝子改変技術の開発に取り組む。

我々のグループは、行動制御を媒介する神経回路の機構を明らかにするために、脳神経回路から特定のニューロンを誘導的に除去するイムノトキシン細胞標的療法や一過性に神経伝達を抑制するイムノテタヌストキシン伝達抑制法を開発してきた (Kobayashi et al., 1995, Kobayashi et al., 2008; Kobayashi et al., 2012)。これらの技術は標的ニューロンの機能を抑制するアプローチであり、今後の神経回路の研究を進展させるためにはニューロン機能を促進する技術の開発が必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、昆虫フェロモン受容体を利用して、特定のニューロンの活動を興奮性に制御する新規の遺伝学的技術の開発に取り組む。ショウジョウバエより単離された ionotropic receptor (IR) は、フェロモン依存性のイオンチャネルを形成する (Benton et al., 2009)。これらのうち、IR8a/IR84a 複合体は、フェニルアセトアルデヒドあるいはフェニル酢酸に反

応する受容体を形成する (Abuin et al., 2011)。ここではチロシン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase, TH) 遺伝子プロモーターの下流に IR8a/IR84a 遺伝子を持つトランスジェニック (Tg) マウスを作製し、導入遺伝子を発現する細胞のフェロモン応答を電気生理学的に検出するとともに、フェロモン投与による動物の行動変化を解析することにより、本技術が生体内で作動することを証明する。特に、脳幹青斑核 (LC) ノルアドレナリン細胞の機能に注目し、行動として味覚記憶の想起プロセスへの影響を解析する。

3. 研究の方法

9-kb ラット TH 遺伝子プロモーターの下流に、ショウジョウバエのイオン透過型受容体 IR8a/IR84a 遺伝子を連結した導入遺伝子を持つ Tg マウスを作製した。IR84a と IR8a の複合体は、フェニルアセトアルデヒド (PhAl) やフェニル酢酸 (PhAc) に対して親和性を示し、興奮性の応答を示すことが知られている。導入遺伝子の発現は、免疫組織化学法と *in situ* hybridization 法を用いて行った。神経細胞応答は、スライス電気生理学と *in vivo* 電気生理学の方法を用いて行った。刺激によるノルアドレナリン分泌は、マイクロダイアリシス法を用いて、大脳皮質 (ACC) における細胞外ノルアドレナリン量を測定した。行動解析は、味覚嫌悪記憶を測定し、感受性の高い味覚反応テストを行った。シュクロースを条件刺激とし、塩化リチウムの腹腔内投与により誘導される内臓不快感との連合記憶を形成させた。その後、シュクロースを口腔内に投与し、出現する嫌悪反応の潜時を測定した。LC ノルアドレナリン細胞の活動が扁桃体を介して記憶想起を媒介するかをテストするために、扁桃体に 1 および アドレナリン受容体拮抗薬を投与し、記憶への影響

を解析した。

4. 研究成果

TgマウスのLCノルアドレナリン細胞における導入遺伝子の発現を免疫組織化学およびin situ hybridization法で調べた結果、LCにおいてIR8a/IR84aの発現が観察された。脳スライスを用いた電気生理学実験により、TgマウスのLC細胞で、PhAIおよびPhAcの添加により顕著な活動の増加が誘導された。In vivoにおいても、LC細胞でPhAcに対応した神経活動の増加が誘導された。マイクロダイアリシス法によって皮質ノルアドレナリン分泌量を測定した結果、同じ刺激によってノルアドレナリン量の一過性の増加が検出された。PhAcの投与はTgマウスにおいて組織損傷は起こさず、むしろ、THの免疫シグナルは増加する傾向が観察された。これは、脱分極によるTH遺伝子の発現誘導の結果であることが示唆された。フェロモンによるLCノルアドレナリン神経の活性化を介して行動変容を起こすか否かをテストするために、味覚嫌悪学習の想起過程を解析した。LCへのPhAcの投与は、Tgマウスにおいて味覚反応の潜時を短縮し、記憶想起の増強を誘導することが示された。味覚記憶の形成には、扁桃体が主要に関与することが知られているが、扁桃体にアドレナリン受容体拮抗薬(1あるいは拮抗薬)を投与することによって、LC活性化による記憶想起増強は抑制された。これらの結果は、昆虫イオン透過型受容体によって標的の神経細胞の活性化を誘導することが可能なこと、また、LCノルアドレナリン系は、扁桃体への投射経路を介して、記憶の想起プロセスに対して増強効果を持つことが明らかとなった。

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 3 件)

1. Kato, S., Kobayashi, K., Kobayashi, K. Dissecting circuit mechanisms by genetic manipulation of specific neural pathways. **Rev. Neurosci.** 24 (1) 1-8 (2013).
2. Okada, K, Nishizawa, K., Kobayashi, T., Sakata, S., Kobayashi, K. Distinct roles of basal forebrain cholinergic neurons in spatial and object recognition memory. **Sci. Rep.** 5: 13158 (2015).
3. Fukabori, R., Iguchi, Y., Kato, S., Takahashi, H., Eifuku, S., Tsuji, S., Hazama, A., Uchigashima, K., Watanabe, M., Mizuma, H., Cui, Y., Onoe, H., Hikishima, K., Yasoshima, Y., Osanai, M., Inagaki, R., Fukunaga, K., Nishijo, T., Momiyama, T., Benton, R., and Kobayashi, K. Enhanced retrieval of taste associative memory by chemogenetic activation of locus coeruleus norepinephrine neurons. **J. Neurosci.** 40: 8367-8385 (2020).

[学会発表](計 2 件)

1. 深堀良二、加藤成樹、小林憲太、佐野裕美、南部篤、八尾寛、磯村宜和、小林和人: HiRetベクターを利用した二重遺伝子導入法による特定神経路におけるチャンネルロドプシン遺伝子の高レベルな発現誘導, 第36回日本神経科学大会/第56回日本神経化学学会大会/第23回日本神経回路学会大会, 2013年6月20-23日, 京都
2. 田村篤史、山田尚弘、矢口雄一、菊田里美、本間経康、小林和人、小山内実: 線条体の遅いカルシウム振動は直接路及び間接路ニューロンで発生している, 第37回日本神経科学大会, 2014年9月11-13日, 横浜

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 和人 (福島県立医科大学・医学部・教授)

研究者番号: 90211903