

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06860

研究課題名(和文) 嗅覚刺激に応答する視床下部の機能地図構築

研究課題名(英文) Construction of functional map in the hypothalamus in response to olfactory input

研究代表者

梶山 十和子 (Kajiyama, Towako)

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・基礎科学特別研究員

研究者番号：00757130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：嗅覚刺激により(1)視床下部のどのニューロンが活性化されるのか(2)それによりどのような生体内の変化が起きるのかを明らかにすることを目的にゼブラフィッシュを用いて研究を行い、以下の成果を得た。

(1) カルシウムイメージングに用いるトランスジェニック系統を探索し、4系統を試したが反応が得られなかったため、新たに4系統を検討中である。また、嗅覚刺激により活性化するニューロンを同定した。
(2) 視床下部における神経ペプチド遺伝子発現アトラスを作成し、嗅覚刺激により活性化するニューロンで発現する神経ペプチドを同定した。また、生体内の変化をモニターするトランスジェニック、ノックアウトの作製を行った。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is to elucidate (1) the neurons in the hypothalamus activated by olfactory input and (2) the change in the internal state caused by these neurons, using zebrafish as a model. For each aim, following result was obtained.

(1) I searched for a transgenic line that can be used for calcium imaging. 4 lines were tried but no response was observed. Therefore 4 other lines are now under investigation. Neurons activated by olfactory input were identified by in situ hybridization.
(2) Atlas of neuropeptide expression in the hypothalamus was constructed. Using this atlas, the neuropeptide expressed in the neurons activated by olfactory input was identified. I also produced transgenic fish lines and knockout fish lines for monitoring the change in the internal state.

研究分野：神経生理学

キーワード：嗅覚 視床下部 ゼブラフィッシュ 神経ペプチド

1. 研究開始当初の背景

動物が生存していくためには外界の様々な情報を収集し、その入力に基づき適切な行動をとったり、体内の状態を変化させたりする必要がある。中でも嗅覚は、脊椎動物、無脊椎動物を問わず多くの動物種に保存された外界情報の重要な入力形態である。これまでの研究により、多くの動物種において、嗅覚入力により特異的な行動が誘引または抑制されることが明らかになってきている (Koide et al., PNAS, 2009; Ferrero et al., Nature, 2013)。しかしながら、嗅覚の入力によって生体に起こる変化は行動だけではない。ヒトではむしろ、良い匂いによりリラックスする、悪い匂いによりイライラする、食べ物の匂いにより空腹感を感じるなど、行動以外の変化が顕著にみられる。ヒト以外の動物においても、マウスでは天敵の匂いにより血中のコルチゾル濃度が上昇する (Day et al., Brain Res, 2004)、魚類ではメスから分泌されたフェロモン (17,20P) によりオスの生殖腺刺激ホルモン分泌が促進される (Dulka et al. Nature, 1987) 等、嗅覚入力による生体内の状態変化が複数報告されている。これらの状態変化は、いずれも内分泌系と自律神経系によって調節されている。内分泌系・自律神経系は間脳の視床下部にその中枢が存在するため、視床下部における何らかの神経活動を通じて体内の状態変化が引き起こされると考えられる。しかし、嗅覚入力により、どのような視床下部ニューロンが活性化されるのか、また、それによってどのような内分泌系・自律神経系の変化が起こるのかは全く明らかになっていない。本研究は、嗅覚という外部刺激により視床下部においてどのような神経活動が引き起こされるのかを調べ、さらにそれにより体内の内分泌系・自律神経系がどのように変動するのかを明らかにすることにより、視床下部の機能地図を構築する。それにより、視床下部が外部刺激に応じて、体内の状態を変化させるという一連の情報処理の流れを包括的に明らかにする。

2. 研究の目的

本研究はゼブラフィッシュをモデルとして、(1) 各種の嗅覚刺激により視床下部のどのようなニューロンが活性化されるのかを可視化し、(2) 活性化された各視床下部ニューロンの内分泌系・自律神経系に対する機能を明らかにする。それにより、ゼブラフィッシュ視床下部の機能地図を構築することを目的とする。

(1) 嗅覚刺激により活性化される視床下部ニューロンの可視化

様々な嗅覚刺激を与え、視床下部ニューロンが活性化される様子を、GCaMP カルシウムイメージング法により可視化する。この際、嗅上皮ごと取り出した脳を標本として用いる

ことで、脳が生きた状態でリアルタイムに視床下部全体のニューロンの活動を記録することができる。これにより、視床下部のどのようなニューロンがどのようなタイミングで活性化されるのかを、様々な嗅覚刺激の種類別にマッピングする。

(2) 嗅覚刺激により活性化される視床下部ニューロンの機能の解明

ゼブラフィッシュ視床下部における神経ペプチド・モノアミン類発現分布アトラスを作成する。活性化されたニューロンの位置をこれと照合することで、活性化されたニューロンで発現する神経ペプチド遺伝子を同定する。この遺伝子をマーカーとし、これらのニューロンで Gal4 を発現するトランスジェニックフィッシュを作成する。各 Gal4 トランスジェニックフィッシュを、UAS 配列下流にニューロンの除去、神経伝達のブロックなどの作用をもつトランスジーンを組み込んだエフェクターフィッシュと交配し、内分泌系・自律神経系にどのような変化が起きるのかを調べる。それにより、視床下部が外部からの嗅覚情報を得て生体内の状態を変化させる上で、各ニューロン群が内分泌系・自律神経系に対してどのような作用を及ぼすのかを体系的に明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 嗅覚刺激により活性化される視床下部ニューロンの可視化

以下の2つのステップにより、様々な嗅覚刺激により活性化される視床下部ニューロンの可視化を行う。

カルシウムイメージングに使用するトランスジェニックフィッシュの作製

視床下部のニューロンで、神経活動による細胞内カルシウム濃度変動のインジケータである GCaMP を発現するトランスジェニックフィッシュを作製する。所属研究室で利用可能な様々な場所で Gal4 を発現するトランスジェニックフィッシュのうち、視床下部で Gal4 を発現するトランスジェニックフィッシュを探索し、UAS:GCaMP のトランスジェニック系統と掛け合わせる。また、利用したトランスジェニックフィッシュの Gal4 の発現場所を正確に調べるために、UAS:GFP トランスジェニックフィッシュと掛け合わせた上で脳の切片を作製し、抗 GFP 抗体を用いた免疫組織化学を行う。

カルシウムイメージングによる可視化

で確立したトランスジェニックフィッシュの脳を、嗅上皮と脳の神経接続を保ったまま丸ごと取り出し、蛍光顕微鏡下で培養し、匂い物質を投与した際の視床下部における GCaMP の蛍光の変化を記録することで、神経活動をモニターする。匂い物質としては、摂餌関連の刺激 (アミノ酸、ヌクレオチドなど)、外敵関連の刺激 (皮膚抽出物)、生殖関連の刺激 (性フェロモン) 等を用いる。

c-fos の in situ hybridization による可視化
匂い刺激を行ったゼブラフィッシュの脳を取り出し、切片を作製し、神経活動のマーカ-遺伝子である c-fos の in situ hybridization を行う。それによって活性化するニューロンの詳細な解剖学的な位置を同定する。

(2) 嗅覚刺激により活性化される視床下部ニューロンの機能の解明

嗅覚刺激により活性化される視床下部ニューロンで発現する神経ペプチド遺伝子の同定

初めに、視床下部における神経ペプチド遺伝子の発現場所を in situ hybridization により網羅的に調べる。次に(1)で同定した嗅覚刺激によって活性化される視床下部ニューロンで発現する神経ペプチド遺伝子を、ここで作製したアトラスを参照し、絞り込む。候補となった神経ペプチド遺伝子と c-fos の二重 in situ hybridization を行うことで、活性化したニューロンで発現する神経ペプチド遺伝子を同定する。

嗅覚刺激により活性化される視床下部ニューロンの操作により生体内で起こる変化のモニター

Gal4/UAS システムを用いた網羅的な機能解析を行うためのエフェクターフィッシュの準備を行う。エフェクターフィッシュのうち、UAS:ジフテリア毒素、UAS:破傷風毒素のエフェクターフィッシュについては既に確立されているので、実験に使用できるよう準備する。また、UAS:ボツリヌス毒素のエフェクターフィッシュでは他の研究室においてすでに確立されているので、譲渡してもらえよう依頼する。次に で同定された神経ペプチド遺伝子のプロモーター領域下流に Gal4 遺伝子を組み込んだトランスジェニックフィッシュの作出を行う。

並行して、嗅覚刺激による内分泌系・自律神経系の変動を測定する方法の確立を行う。

4. 研究成果

(1) 嗅覚刺激により活性化される視床下部ニューロンの可視化

カルシウムイメージングに使用するトランスジェニックフィッシュの作製

ニューロンのマーカ-遺伝子のプロモーター下流に Gal4 遺伝子を組み込んだ4種類の Gal4 発現トランスジェニックフィッシュを UAS:GCaMP トランスジェニックフィッシュと掛け合わせてダブルトランスジェニックフィッシュを作製した。またそれぞれの Gal4 発現トランスジェニックフィッシュを UAS:GFP のトランスジェニックフィッシュと掛け合わせたダブルトランスジェニックフィッシュの脳内における GFP の局在を免疫組織化学により調べ、Gal4 の発現場所を詳細に調べた。その結果、視床下部のすべてのニュー

ロンで網羅的に Gal4 を発現する系統はなく、系統ごとに Gal4 の発現場所がすべて異なっていることがわかった。そのため、それぞれの系統について匂い刺激を行ってみて、目的的刺激による反応が得られる系統を選択していく必要があることが明らかになった。

カルシウムイメージングによる可視化

で確立した4つの系統それぞれについて、匂い刺激を行ったときに視床下部で反応が得られるかどうかカルシウムイメージングの試行を行った。その結果、4つの系統のいずれにおいても、匂い刺激に対する視床下部の反応を観察することはできなかった。一方で、1つの系統において、性フェロモン刺激に対する終脳の活動を可視化することができた。本研究の目的とは異なるが、この系統を今後フェロモン刺激により起こる脳内の神経活動を研究するツールとして活用することが可能である。

用意した4つの系統が視床下部のカルシウムイメージングに利用できないことが明らかになったため、視床下部で Gal4 を発現する他の系統を探索した。他の研究室で作製された Gal4 トランスジェニックフィッシュを複数系統譲り受け、UAS:GCaMP トランスジェニックフィッシュとの掛け合わせを行った。本研究の研究期間中には視床下部のカルシウムイメージングの成功には至らなかったため、今後もカルシウムイメージングの試行を続ける必要がある。

c-fos の in situ hybridization による可視化

パラフィン切片の利用により、迅速かつ効率的に c-fos 発現の変動を定量する方法を確立した。この方法を用い、性フェロモン刺激により c-fos 発現が上昇する神経核を同定した。その結果、視床下部後部の神経核において c-fos 発現が上昇することが明らかになった。

(2) 嗅覚刺激により活性化される視床下部ニューロンの機能の解明

嗅覚刺激により活性化される視床下部ニューロンで発現する神経ペプチド遺伝子の同定

視床下部における神経ペプチドの発現アトラスを作成した。34種類の神経ペプチドのプロープを作成し、ゼブラフィッシュの脳のパラフィン切片を用いた in situ hybridization を行った。得られたデータをとりまとめ、現在論文を作成中である。

このアトラスを参照し、匂い刺激によって c-fos の発現が上がった神経核において発現する神経ペプチドを絞り込んだ。さらに、性フェロモンあるいは ATP 刺激を行った脳のサンプルを用いて c-fos と神経ペプチド遺伝子の二重 in situ hybridization を行い活性化したニューロンで発現する遺伝子を同定した。ATP については視床下部の一つの神経核で c-fos と共発現する神経ペプチドを同定し

た。この神経ペプチドのプロモーターを用いた Gal4 トランスジェニックフィッシュを今後作製する予定である。性フェロモンについては、複数種類の神経ペプチドについて二重 in situ hybridization を行ったが、c-fos と共発現する神経ペプチドを同定することはできなかった。今後、候補となる遺伝子を増やしてさらに解析を進める必要がある。

嗅覚刺激により活性化される視床下部ニューロンの操作により生体内で起こる変化のモニター

本研究期間中は、性フェロモン刺激に対する生体内の変化をモニターする方法に集中的に取り組んだ。初めに、オスの精子の量の測定を試みた。しかし、精子量は日による変動、個体による差が大きく、性フェロモン刺激に対する変化を確認することはできなかった。また、下垂体からの LH 分泌量の変化をモニターするためのトランスジェニックフィッシュとして、LH:Gal4 トランスジェニックフィッシュの作製を行った。このトランスジェニックフィッシュを UAS:GCaMP のトランスジェニックフィッシュと掛け合わせることでカルシウムイメージングにより LH 分泌の変化をモニターすることが可能になる。これと並行して、性フェロモンの嗅覚受容体遺伝子をノックアウトしたゼブラフィッシュの作製も行った。ノックアウトフィッシュの解析を通して、性フェロモンが生体内の状態をどのように変えるのかを解明することが期待される。

引用文献

Tetsuya Koide, Nobuhiko Miyasaka, Kozo Morimoto, Kazuhide Asakawa, Akihiro Urasaki, Koichi Kawakami, Yoshihiro Yoshihara, Olfactory neural circuitry for attraction to amino acids revealed by transposon-mediated gene trap approach in zebrafish, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, Vol. 106, pp. 9884-9889,

David M. Ferrero, Lisa M. Moeller, Takuya Osakada, Nao HorioQian Li, Dheeraj S. Roy, Annika Cichy, Marc Spehr, Kazushige Touhara Stephen D. Liberles, A juvenile mouse pheromone inhibits sexual behaviour through the vomeronasal system, *Nature*, 2013, Vol. 502, pp. 368-371

Heidi E.W. Day, Cher V. Masini, Serge Campeau, The pattern of brain c-fos mRNA induced by a component of fox odor, 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT), in rats, suggests both systemic and processive stress characteristics, *Brain Research*, 2004, Vol. 1025, pp. 139-151

J. G. Dulka, N. E. Stacey, P. W. Sorensen, G. J. Van Der Kraak, A steroid sex pheromone synchronizes male-female

spawning readiness in goldfish, *Nature*, 1987, Vol.325, pp.251-253

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)

Kohei Hosono, Junpei Yamashita, Yukiko Kikuchi, Towako Hiraki-Kajiyama, Kataaki Okubo, Three urocortins in medaka: identification and spatial expression in the central nervous system, *Journal of Neuroendocrinology*, 査読あり, 2017, 印刷中
doi: 10.1111/jne.12472.

Noriko Wakisaka, Nobuhiko Miyasaka, Tetsuya Koide, Miwa Masuda, Towako Hiraki-Kajiyama, Yoshihiro Yoshihara, An Adenosine Receptor for Olfaction in Fish, *Current Biology*, 査読あり, 2017, Vol. 27, pp. 1437-1447.e4
doi: 10.1016/j.cub.2017.04.014.

Kohei Hosono, Yukiko Kikuchi, Hiroshi Miyanishi, Towako Hiraki-Kajiyama, Akio Takeuchi, Kiyoshi Nakasone, Sayaka Maehiro, Kataaki Okubo, Teleocortin: A Novel Member of the CRH Family in Teleost Fish, *Endocrinology*, 査読あり, 2015, Vol. 156, pp. 2949-2957
doi: 10.1210/en.2015-1042.

[学会発表](計 3件)

Towako Hiraki-Kajiyama, Yoshihiro Yoshihara, A comprehensive map of neuropeptide expression in the zebrafish brain, BSI Retreat, Poster presentation, September 16th 2017, 日本科学未来館(東京都・江東区)

Towako Hiraki-Kajiyama, Kataaki Okubo, Female-specific expression of Neuropeptide B and its role in reproductive behavior, 8th congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology, Oral presentation, June 20th 2016-June 24th 2016, Seoul, Korea

梶山十和子、性フェロモン 17,20beta-PS のゼブラフィッシュにおける役割と神経回路基盤、第3回ケモビ研究会、口頭発表、2015年11月13日~2015年11月15日、KKR宮ノ下(神奈川県・箱根町)

6. 研究組織

(1)研究代表者

梶山 十和子 (KAJIYAMA, Towako)

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・
基礎科学特別研究員
研究者番号：00757130