

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：33501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06539

研究課題名(和文) 終神経が介在する二酸化炭素からの忌避行動の神経基盤

研究課題名(英文) Neural basis of avoidance behavior from carbon dioxide mediated by the terminal nerve

研究代表者

小出 哲也 (Koide, Tetsuya)

帝京科学大学・総合教育センター・准教授

研究者番号：30247837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題が対象とする終神経は、嗅神経と嗅球の間に位置し、鼻と脳の広範囲にその軸索を投射するが、その機能はよくわかっていない。終神経は性腺刺激ホルモン放出ホルモン(Gonadotropin-releasing hormone, GnRH)を発現することから、その機能は生殖行動に関与すると考えられてきた。しかしながら、本研究課題によって終神経は、CO₂を受容し、忌避行動を駆動する侵害受容ニューロンであることが明らかとなった。終神経に関する新たな研究分野の開拓、ヒトを含む他の動物におけるGnRHペプチドニューロンの役割の解明に向けて役立つものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

痛みを伝える侵害受容ニューロンは、個体の生存を脅かす侵害性の脅威刺激に応答して忌避行動等を引き起こす。本研究によって、終神経が新規の侵害受容ニューロンであること、ゼブラフィッシュの終神経は侵害受容ニューロンの作用機序を解明するための非常に良いモデルとなりうることが判明した。終神経は、ほぼ全ての脊椎動物の鼻に存在するが、これまでその機能はほとんど分かっていなかった。本研究課題を通じて侵害受容ニューロンとしての終神経を理解することは、ヒトの第0番脳神経のはたらきを理解するうえでも重要な意味をもつ。したがって、本研究は、今後のヒトの侵害感覚受容メカニズムの研究発展に貢献できると期待される。

研究成果の概要(英文)：The terminal nerve is located between the olfactory nerve and the olfactory bulb and projects its axons over a wide area of the nose and brain, but its function is not well understood. Since the terminal nerve expresses gonadotropin-releasing hormone (GnRH), its function has been considered to be involved in reproductive behavior. However, this research project revealed that the terminal nerve is a nociceptive neuron that receives CO₂ and drives avoidance behavior. It is expected to be useful for developing new research fields on terminal nerves and elucidating the role of GnRH peptide neurons in other animals including humans.

研究分野：神経科学

キーワード：感覚神経 侵害受容ニューロン 終神経 痛み ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

私たちの行動は、五つの感覚（視覚・聴覚・触覚・味覚・嗅覚）と脳の内部状態を保つ神経系によって生み出される。例えばネズミは、キツネの匂い・空から近づいてくる鷹・正体不明の動物が近くの茂みで出すカサカサした音に恐怖反応を示す。これら匂い・光景・音は解剖学的に異なる脳領域でまず処理され、それらに反応する神経経路が収束して高次脳中枢に至り、恐怖反応のような典型的行動を引き起こす。逆に、食べ物・交配相手・子供の匂い刺激は全く異なる行動、すなわち、索餌行動・性行動・子育て行動を誘起する。この場合、単一の感覚系における解剖学的によく似た領域からの神経経路は、中枢に向かって分岐して刺激に応じた行動を引き起こす。異なる感覚刺激がどのように収束するのか、また、単一の感覚系への入力がどのように分岐するのかという課題は行動をつかさどる神経回路基盤を理解する上で中心的課題である。そこで本研究の核心をなす課題は、感覚入力から行動出力に至る神経回路の全貌解明である。

これまで申請者は、どのように特定の感覚系が異なる行動を生み出すのかを明らかにするモデル系として、ゼブラフィッシュにおける匂いの誘引・忌避行動の神経回路基盤の解明に取り組んできた(図3)。化学感覚系は、行動をつかさどる神経回路を研究する上で強力なモデルである。多くの動物にとって化学感覚は生存に必須であり、なかでも嗅覚神経回路は、少ないシナプス連絡で感覚入力を行動出力に変換する。申請者は、エサの成分であるアミノ酸やATPの匂いへの誘引行動(Koide, 2009; Wakisaka, 2017)、雌が放出する性フェロモン・プロスタグランジン(PGF2a)への雄の誘引行動(Yabuki, 2016)、アラームフェロモンに対する忌避行動をつかさどる神経回路について解析・発表してきた。その過程で、細胞特異的な外来遺伝子の発現系の確立、さらに蛍光カルシウムセンサーGCaMPを用いた匂いで活性化される嗅球糸球体神経活動のマッピングを行ってきた。しかしながら、成魚の全脳をイメージングして二次嗅覚ニューロンから運動ニューロンに至る神経回路の全貌を可視化することは難しい。そこで脳がさらに小型でかつ透明なゼブラフィッシュ稚魚でGCaMPイメージングを用いれば、今までできなかった「感覚入力から行動出力に至る神経回路の可視化」が可能になり、感覚刺激に応じて適切な行動を駆動する神経回路メカニズムを明らかにできるものと考え、本研究を着想した。様々な匂い物質(化学物質)を5日目稚魚に投与したところ、唯一、CO₂だけが非常に強い忌避行動を引き起こした。本研究課題では、このCO₂忌避行動をモデルにして感覚入力から行動出力に至る神経回路の全貌解明に挑む。

2. 研究の目的

これまでの研究で、CO₂忌避行動は第0脳神経である終神経が介在することを見出している。そこで本研究は、GCaMPイメージングを用いて終神経が介在するCO₂忌避行動の神経回路基盤を明らかにする。以下の3項目において解析を行ない、初年度は、計画(1-2)を行い、次年度以降は研究計画(3)を遂行する。

(1) GCaMPイメージングによるCO₂忌避行動をつかさどる神経回路の全貌解明

(2) CO₂受容体の同定と受容体欠損魚の作成

(3) 遺伝学的神経活動操作によるCO₂忌避行動をつかさどる神経回路の生理機能の解明

本研究課題が対象とする終神経系は、嗅神経と嗅球の間に位置し、脳の広範囲にその軸索を投射する。終神経は性腺刺激ホルモン放出ホルモン(Gonadotropin releasing hormone, GnRH)を発現するペプチドニューロンであることから、生殖行動に関与すると考えられてきたが、その生理機能はよくわかっていない。化学感覚系としての機能は全くわかっていない。したがって、終神経におけるCO₂を受容するしくみ、運動ニューロンへ至る神経回路網の解明を目指す本研究は、申請者独自の研究である。本研究においてCO₂忌避行動をつかさどる神経回路が明らかになれば、脊椎動物で初めて化学感覚の入力から行動出力に至る神経回路の全貌解明という意義がある。それだけでなく生殖以外の終神経系の生理機能解明に向けた新たな研究分野の開拓、ヒトを含む他の動物におけるGnRHペプチドニューロンとしての終神経の役割の解明に向けて役立つものと期待される。

3. 研究の方法

終神経に発現するGnRH3遺伝子のプロモーターを利用したGnRH3:Gal4系統はすでに確立しており、終神経がCO₂刺激に応答することを見出している。そこで2光子顕微鏡を用いたGCaMPイメージングを行い、CO₂刺激で活性化される終神経から後脳の運動ニューロンに至る神経回路を解明する。全ての神経細胞にGal4を発現するHuc:Gal4系統を併用し、CO₂刺激で活性化される神経細胞群を詳細に記載する。次に、光励起性GCaMPによる神経回路の同定を行う。近年発表された光励起性GCaMP(sPA-GCaMP6; Berlin, 2015)は、神経活動を可視化した後、その細胞を光刺激することによってその軸索を光標識することが可能である。終神経GnRH3:Gal4系統とHuc:Gal4系統にsPA-GCaMP6を発現させ、2光子顕微鏡による観察をもとにして、終神経の投射先・CO₂応答神経細胞の投射先を明らかにし、後脳の運動ニューロンに至るまで、これらシナプスを作りうる脳領域を詳細に解析し、忌避行動を生み出す終神経回路網を明らかにする。

最初期遺伝子 *c-fos* の発現を指標とした CO2 刺激で活性化される神経細胞群の同定も合わせて行い、光励起性 GCaMP マッピングの結果と総合して神経回路を明らかにする。また、GnRH ペプチドニューロンとしての終神経の機能を明らかにするため、CO2 応答神経回路における GnRH 受容体の発現も明らかにする。

終神経に発現する CO2 受容体遺伝子を明らかにする目的のため、トランスクリプトーム解析を行う。終神経 GnRH3:Gal4;UAS:GFP トランスジェニックフィッシュ系統で GFP 陽性終神経細胞を FACS 装置で回収し、RNA シークエンスを行う。具体的には、GnRH3 プロモーター下で GFP を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ Tg(GnRH3:Gal4FF;UAS:GFP) 由来の GFP 細胞集団を実験試料とする。①RNA シークエンスでは、終神経由来の GFP 細胞集団のみを FACS で回収し、RNA シークエンスを行う。この試料数は、10 匹分をプールした終神経 GFP 細胞集団由来 RNA X3 セット程度を想定している。②シングルセル解析では、脳内に位置する GFP (GnRH) 陽性細胞を対象として、終神経、間脳視床下部と三叉神経節の細胞タイプを確定する。正確な GFP 細胞数は未定だが、およそ 100 個前後と考えている。

終神経に特異的な RNA の発現プロファイルをもとにして、遺伝子リストの上位から CO2 受容体候補遺伝子の cDNA プローブを作成し、終神経に発現していることを確認する。CO2 受容体遺伝子が全ての終神経に発現しているのか、特定の細胞集団なのかを明らかにする。同定した CO2 受容体候補遺伝子を HEK293 細胞に発現させた *in vitro* での発現系によりその機能を明らかにする。受容体が同定でき次第、CO2 受容体欠損変異体の作成、さらには、CO2 受容体・GnRH 受容体のゲノム領域に Gal4 (酵母由来の転写活性化ドメイン) を挿入したトランスジェニックフィッシュを作成する。

4. 研究成果

侵害刺激として多くの動物の忌避行動を引き起こす二酸化炭素 (CO2) に注目してゼブラフィッシュ侵害性化学感覚ニューロンの探索を行ってきた。その過程で、第 0 番脳神経である「終神経」が、特異的に CO2 に応答すること、終神経をレーザーアブレーションで破壊すると CO2 からの忌避行動が消失することを突き止めた。つまり、終神経は CO2 センサーとして機能することが判明した。さらに、終神経の下流で三叉神経節、後脳の毛様体脊髄神経群を介して忌避行動が駆動されることを明らかにした (Koide, 2018)。

本基盤 C を元にして、新学術領域研究「先進ゲノム支援」に応募した結果、採択された。このゲノム支援では、GnRH3 プロモーター下で GFP を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ Tg(GnRH3:Gal4FF;UAS:GFP) 由来の GFP+細胞集団を FACS で回収し、①GFP 陽性ニューロンの bulk RNA シークエンス (この解析をもとに CO2 受容体遺伝子を同定する)、そして②GFP 陽性ニューロンの Fluidigm C1 System を用いた scRNA 解析を行い、シークエンスが終了したところで現在、解析を行っている。

この解析の過程で、終神経は GnRH だけでなく、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin gene-related peptide: CGRP)、ニューロペプチド FF (NPFF)、プロラクチン (脳下垂体前葉ホルモンの一種 Prolactin: PRL) と複数の神経ペプチドホルモンを発現していることが判明した。

興味深いことに、体幹の侵害受容ニューロンである脊髄後根神経節 DRG ニューロンにも、CGRP、PRL の他に Substance P、ソマトスタチン、血管作動性腸管ペプチド (Vasoactive intestinal peptide: VIP) 等の神経ペプチドが存在する。そして、これらの神経ペプチドは、侵害刺激に応じて、一次知覚神経の末梢と中枢両終末部より分泌され、痛みの神経伝達を調節すること、そしてさらに組織の損傷だけでなく炎症や感染に対しても個体の損傷を抑える機能も報告されている。つまり、侵害受容ニューロンは感覚ニューロンでありながら、複数の神経ペプチドを介して侵害刺激/炎症/感染から個体を守る機能を併せ持つといえる。今後の研究課題の遂行によって、痛み研究における新たな侵害受容ニューロン研究の分野の創造が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Koide T, Yabuki Y, Yoshihara Y. | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 Terminal nerve GnRH3 neurons mediate slow avoidance of carbon dioxide in larval zebrafish. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Cell Report (2018) 22(5):1115-1123. | 6. 最初と最後の頁 1115, 1123. |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.01.019. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 小出 哲也 | 4. 巻 39巻 5号 |
| 2. 論文標題 第0 脳神経 1 終神経 terminal nerve | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Clinical Neuroscience | 6. 最初と最後の頁 538-539 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 小出 哲也 |
| 2. 発表標題 ゼブラフィッシュ稚魚における二酸化炭素からの忌避行動は終神経がつかさどる |
| 3. 学会等名 動物学会関東支部大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|