

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H05141

研究課題名（和文）死臭を認識する嗅覚神経メカニズムの解析

研究課題名（英文）Elucidating olfactory mechanisms recognizing the smell of death

研究代表者

竹内 春樹 (TAKEUCHI, HARUKI)

東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・教授

研究者番号：70548859

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 25,200,000円

研究成果の概要（和文）：動物個体の生と死の間には、厳密な境界が存在するはずだがその判断基準には多分に哲学的な要素が含まれ、何をもって個体が死んだと定義するかについてはいまだ明確な結論が出ていない。本研究では、動物が死んだ際に放出する化合物や死と直結するような天敵から放出される匂いがどのように脳内で処理されるのかを解明することを目指した。その結果、死に関連する匂いは、グルーネバーグ神経節と呼ばれる特殊な感覚器で検知され、その情報は、一般的な嗅覚皮質に加え、扁桃体梨状皮質移行領域と呼ばれる領域で処理された後、恐怖や不安といった情動反応を制御する扁桃体へと送られ、個体の持続的な防御反応を惹起することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、動物にとって生死に関わる匂い物質は、通常の嗅覚器官とは異なる感覚器と脳領域で処理されることが明らかになった。これまでの神経科学では、特定の入力かどのような回路を通じて特定の行動を引き起こすかに関する報告は多いが、特定の入力か状態変化を引き起こし、入力が消失した後も特定の状態を持続させる脳内メカニズムに関する報告はほとんどない。この点で、本研究が発見したAmPirの持続的な神経活動は、特定の状態を維持する神経メカニズムとして新しいモデルであると言える。

研究成果の概要（英文）：There should be a clear boundary between life and death in individual animals, but the criteria for this judgment involve many philosophical elements, and a definitive conclusion on what constitutes death in an individual has yet to be reached. This study aimed to elucidate how compounds released upon the death of an animal or odors emitted by predators directly associated with death are processed in the brain. The results showed that death-related odors are detected by a specialized sensory organ called the Grueneberg ganglion (GG). This information is then processed not only in the general olfactory cortex but also in a region called the amygdala-piriform transition area (AmPir). Subsequently, the information is transmitted to the amygdala, which controls emotional responses such as fear and anxiety, thereby triggering sustained defensive reactions in the individual.

研究分野：分子神経科学

キーワード：嗅覚 回路形成 神経活動 死 防御反応 グルーネベルグ神経節

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

死は、すべての動物にとって不可避の現象である。とりわけ同種他個体の死は、動物からみればこれ以上ない警報となる外部情報であり、ある種の普遍的な認識機構が存在すると予想される。実際に、本領域の研究代表者である奥山らは、死亡直後の同種他個体に対して、マウスが強い忌避行動を示すことを突き止めている。しかしながら、その認識を支える神経基盤、分子基盤は殆ど明らかにされていない。

2. 研究の目的

マウスにとって捕食者に見つかり捕食されることは死を意味するため、捕食者が発する情報は死を誘発するシグナルであると考えられる。マウスでは、このシグナルを受け取るために嗅覚が非常に重要であることが知られている。これまでの研究から、捕食者が放出する匂い物質、その匂いを受け取る受容体、回避行動や凍りつき行動を誘発する神経回路など、多くのことが解明されてきた。一過性に遭遇した捕食者の匂い刺激は、検出、回避、凍りつきといった連続的な防衛行動を誘発する。生存のためには、持続的な防衛状態が重要であるにもかかわらず、捕食者の臭いに暴露された後、そのような防衛状態が脳内でどのように維持されるのかは、依然として不明である。本研究では、捕食動物のにおいによって誘起される持続的な防衛行動の根底にある神経メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

齧歯類では、上述の嗅上皮や鋤鼻器以外の嗅覚器官として、いくつかの垂領域が知られている。その一つが鼻先に存在する grüneberg 神経節 (以下 grüneberg ganglion: GG) である。GG は、その名にあるように Hans Grueneberg によって発見され、個体の忌避行動を誘発するアラームフェロモンの受容体として知られている。GG に存在する細胞は、肉食動物の排泄物に含まれるチアゾリン誘導体に反応して動物の恐怖行動や忌避行動を誘起する。そこで本研究では、GG に着目して、GG における嗅覚情報伝達を担う神経回路の同定とその機能解析を遺伝的神経回路トレーシングや光遺伝学的手法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) Grueneberg 神経節を介した捕食者臭の入力は、持続的な防御行動を誘起する

まず我々は、中性臭としてオイゲノール、警報フェロモンである SBT(2-sec-butyl-4,5-dihydrothiazole)、腐敗臭として MBA (2-methylbutyric acid)、捕食者臭の代表として 1,3DT (1,3-dithiolane) と 2MT(2-methyl-2-thiazoline) を用いた。1,3 DT は短尾イタチの肛門腺から分泌され、2MT は狐臭の強力な誘導体である。これらの匂いをマウスに提示した後、においのないオープンフィールドに移動させ、行動を記録した。とりわけ valence を持たない中性臭であるオイゲノールに暴露されたマウスはフィールド全体を動き回ったのに対し、2MT に暴露されたマウスはほとんど壁際を動いた(図 2)。壁際に留まることを Thigmotaxis と呼び、防衛行動や不安行動の一種と考えられている。Thigmotaxis を定量化するために、壁から 4cm をエッジゾーンと定義し、エッジゾーンに滞在した時間の割合を計算した。中性臭と比較して、オイゲノール、2MT、1,3DT はエッジゾーンに滞在した時間の割合を有意に増加させた。しかし、警戒フェロモンや腐敗臭を嗅がせたマウスでは、同じ負の価を持つ匂いであるにもかかわらず、Thigmotaxis の増加は見られなかった。この結果から、捕食者の匂いだけが、刺激よりも持続的な防衛行動を引き起こすことがわかった(図 3)。GG は嗅上皮から物理的に離れたところに位置するため、GG 軸索切断術 (GG 軸索束を外科的に切断する方法) によって、他の嗅覚器官を傷つけることなく、GG からの

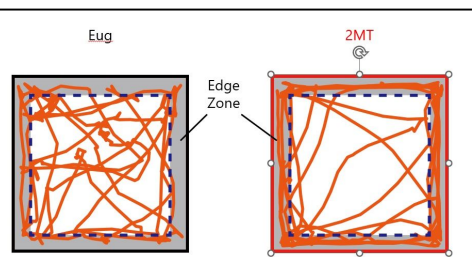
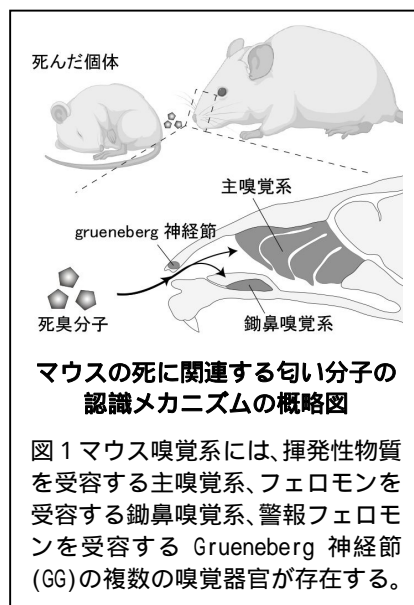


図2 2MTは持続的な防御行動を誘起する

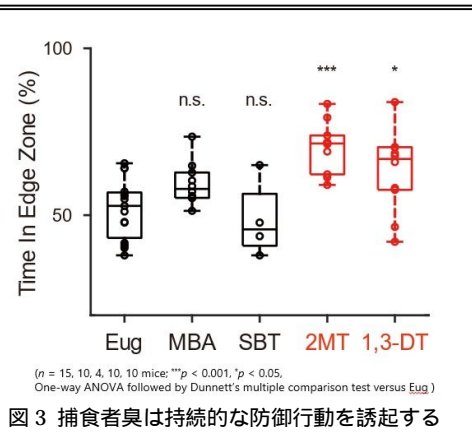


図3 捕食者臭は持続的な防御行動を誘起する

匂い情報を遮断することができる。GG 軸索切断により、2MT の匂い提示で見られた持続的な防衛行動が消失することがわかった。

(2) 扁桃体移行野(AmPir)における捕食者臭依存的な持続的な神経活動

上記の知見は、GG を介した嗅覚入力通常は通常の匂いには見られない持続的な防衛活動を誘起することを示唆している。しかしながら、捕食者の臭いにさらされたマウスは、なぜその匂いそのものが消失した後も持続的な防衛行動を維持し続けられるのだろうか？この疑問を解決するため、我々は扁桃体移行野(AmPir: Amygdala Piriform Transition Area)に着目した。AmPir は、梨状皮質、扁桃体の尾側極、外側嗅内皮質の接合部に位置し、先行研究から AmPir は、ヒューマの尿に反応して GG を介して強く活動することが報告されている。そこで我々はウイルスベクターを用いてカルシウムインディケーターである GCaMP7 を AmPir に存在する神経細胞に発現させたのち、GRIN レンズを埋め込み、自由行動下のマウスにおけるカルシウムイメージング実験を実施した。その結果、Eug や IAA などの中性的な匂いを提示した時とは異なり、2MT を提示した場合、匂いを提示した後も数十秒に渡って持続する活動が記録された(図4)。このような持続的な神経活動は、シリコンプロブ電極を用いた電気生理学的な実験においても記録された。また、GG 軸索切断により 2MT 提示時に持続的な活動を示す AmPir ニューロンの数が減少したことから、GG からの匂い入力も AmPir の持続的な活動に重要であることがわかった。

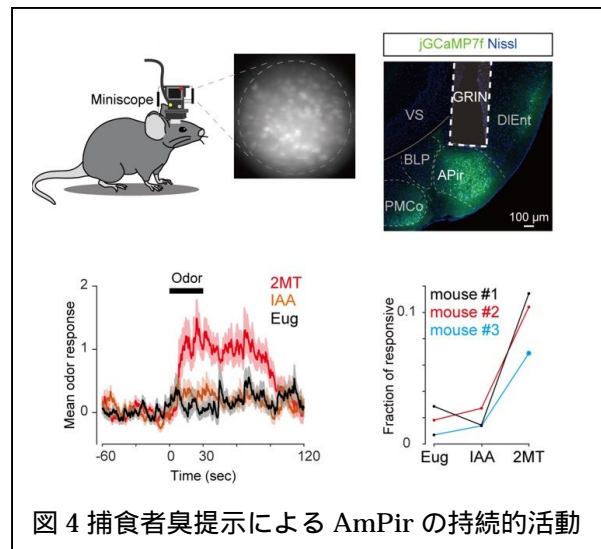


図4 捕食者臭提示による AmPir の持続的活動

(2) Grueneberg 神経節(GG)を介した嗅覚回路の同定

AmPir の持続的な神経活動はどのようにして生じているのだろうか？その神経回路メカニズムを明らかにするため、我々は狂犬病ウイルスベクターを用いて逆行性の神経回路トレーシングを行い、AmPir に入力する脳領域の同定を試みた。その結果、嗅球(OB: olfactory bulb)にもシグナルが見られたが、嗅皮質のひとつである pPir (posterior piriform cortex) から多くのシナプス前入力を受けていることがわかった。梨状皮質後部は嗅球から直接入力を受けていることから、GG で検知された匂い情報は、OB および pPir を介して AmPir へと伝達されることが示唆された。また、AmPir からの順行性神経回路トレーシング、および恐怖・防衛行動を制御する扁桃体からの逆行性神経回路トレーシング実験により、AmPir は扁桃体中心核(CeA)へと直接情報を伝達していることがわかった。我々は、pPir および OB においてシリコンプロブ電極を用いて匂いに対する応答を記録したところ、AmPir で見られるような持続的な神経活動は検出されなかった。したがって、AmPir における持続的な神経活動は、AmPir 内の神経回路によって生み出されている可能性が示唆された。

(4) AmPir における持続的な神経活動は、捕食者臭に対する持続的な防衛応答を制御する

次に、我々は AmPir の持続的な神経活動が持続的な防衛行動に必要であるかどうかを調べた。AmPir に特異的に組み換え酵素 Cre が発現する CARTPT-Cre トランスジェニックマウスを用いて、Cre 依存的に細胞体を標的とした陰イオン伝導チャンネルロドプシン 2 (stGtACR2) を発現する AAV ウイルスを両側に注入し、AmPir 特異的に stGtACR2 を発現させた。その後、マウスを GG を活性化する匂いに 1 分間曝露し、オープンフィールドテストを行った。AmPir ニューロンの持続的な活動のみを抑制するため、匂い提示直後のオープンフィールドテスト中に青色光を照射した。その結果、光刺激を受けたマウスで

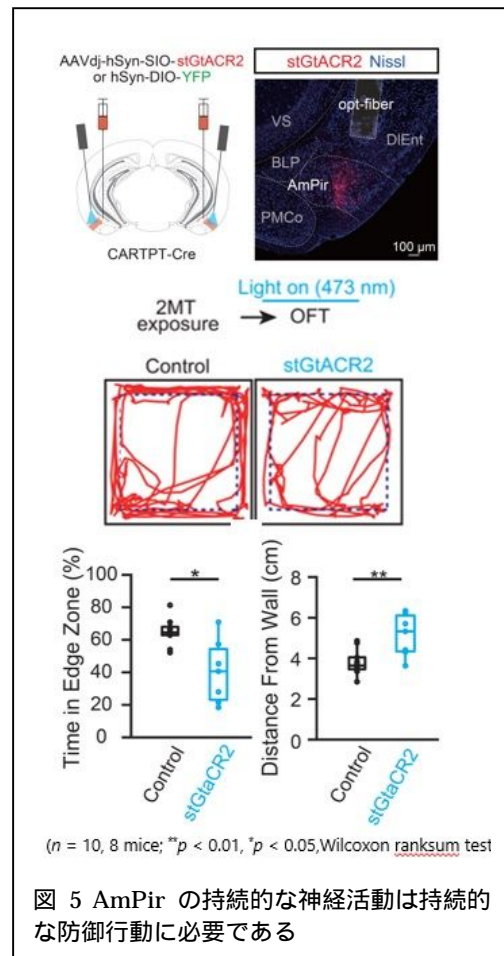


図5 AmPir の持続的な神経活動は持続的な防衛行動に必要である

は Thigmotaxis が有意に減少し、エッジゾーンにいる時間が短く、壁から遠くなる傾向が見られた。これにより、捕食者の匂いによって誘導される AmPir の持続的な活性が、持続的な防衛行動に必要であることが示された。

(5)考察

本研究により、GG を介した匂い入力、通常の嗅上皮で検知される匂い分子とは異なる神経回路によって処理されることが明らかになった。特に注目すべきは、GG を介した入力、AmPir の持続的な神経活動を誘起する点である。これまで、特定の入力、どのような回路を通じて特定の行動を引き起こすかに関する報告は多数存在するが、特定の入力がある種の状態変化を引き起こし、入力そのものが消失した後も特定の持続的な脳内状態を維持するメカニズムについての報告はほとんどない。この点において、AmPir の持続的な神経活動は、特定の状態を維持する神経メカニズムとして新奇なモデルであると言える。

GG は他にも天敵臭や死臭物質を認識すると言われる TAAR 受容体を発現しており、生死に関わる先天的な化学感覚情報を処理する器官として機能していると考えられる。しかしながら、先行研究では SBT も GG によって検知されることが示唆されているものの、本研究では持続的な防御行動は観察されなかった。GG には約 300 個の匂い受容神経細胞が存在するが、それらの中にサブタイプがあり、2MT や 1,3-DT を受容する GG のサブタイプのみが持続的な神経活動を誘起できるのかもしれない。また、GG は進化的に線虫の感覚神経との類似性が指摘されており、1 つの神経細胞に複数の匂い受容体が発現している可能性も示唆されている。今後、GG 細胞で機能する匂い受容体が同定されることで、GG を介した嗅覚情報処理のメカニズムがさらに明らかになると考えられる。

<引用文献>

Kondoh, K., Lu, Z., Ye, X. et al. A specific area of olfactory cortex involved in stress hormone responses to predator odours. *Nature* 532, 103–106 (2016).

Brechbühl, J., de Vallière, A., Wood, D. et al. The Grueneberg ganglion controls odor-driven food choices in mice under threat. *Commun Biol* 3, 533 (2020).

Julien Brechbühl et al. ,Grueneberg Ganglion Cells Mediate Alarm Pheromone Detection in Mice.*Science*321,1092-1095(2008).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Morikawa, S., Katori, K., Takeuchi, H., Ikegaya,	4. 巻 529
2. 論文標題 Brain-wide mapping of presynaptic inputs to basolateral amygdala neurons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Comp. Neurol.	6. 最初と最後の頁 3062-3075
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 有
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 -

1. 著者名 Nakashima, A., Ihara, N., Ikegaya, Y., Takeuchi, H	4. 巻 170
2. 論文標題 Cell type-specific patterned neural activity instructs neural map formation in the mouse olfactory system.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurosci. Sci.	6. 最初と最後の頁 13-17
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 有
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 -

1. 著者名 森川勝太, 池谷裕二, 竹内春樹	4. 巻 28
2. 論文標題 逆行性ウイルスを用いた嗅球僧帽細胞の形態可視化法	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本味と匂学会誌	6. 最初と最後の頁 97-100
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 -

1. 著者名 竹内春樹	4. 巻 28
2. 論文標題 嗅覚回路形成の分子基盤	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本味と匂学会誌	6. 最初と最後の頁 11-15
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 -

1. 著者名 Nobuyoshi Matsumoto, Miyuki Miyano, Takaya Abe, Tetsuhiko Kashima, Eriko Kato-Ishikura, Ken-ichi Inoue, Jiayan Liu, Hiroshi Kiyonari, Haruki Takeuchi, Yuji Ikegaya	4. 巻 47
2. 論文標題 Generation of Dopamine Transporter (DAT)-mCherry Knock-in Rats by CRISPR-Cas9 Genome Editing	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biological & Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 394-398
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b23-00598.	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Nakashima Ai, Takeuchi Haruki	4. 巻 18
2. 論文標題 Shaping the olfactory map: cell type-specific activity patterns guide circuit formation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Neural Circuits	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncir.2024.1409680	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 -

1. 著者名 Nakashima Ai, Takeuchi Haruki	4. 巻 -
2. 論文標題 Roles of odorant receptors during olfactory glomerular map formation” for publication	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Genesis	6. 最初と最後の頁 -
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 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 -

〔学会発表〕 計25件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 香取和生、池谷裕二、竹内春樹
2. 発表標題 匂い学習による梨状皮質における匂い表象変化
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takeuchi, H
2. 発表標題 Cell-type specific patterned activities specify gene bexpression patterns for olfactory circuit formation
3. 学会等名 2nd Meeting on Spontaneous Activity in Brain Development (SPONT2022) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中野利沙子、村上知成、大木研一、池谷裕二、竹内春樹
2. 発表標題 in vivo二光子イメージングを用いた発達期における嗅神経細胞の自発活動パターンの解析
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森川勝太、香取和生、日置寛之、竹内春樹、田村英紀、池谷裕二
2. 発表標題 神経ペプチド VIP による学習・記憶の制御機構の解析
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中野利沙子、村上知成、大木研一、池谷裕二、竹内春樹
2. 発表標題 in vivo二光子イメージングを用いた発達期における嗅神経細胞の自発活動パターンの解析
3. 学会等名 次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 香取和生、森川勝太、奥山輝大、中嶋藍、竹内春樹、池谷裕二
2. 発表標題 天敵臭に対する持続的な防御行動を担う神経基盤の解明
3. 学会等名 第8回ケモビ研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹内春樹
2. 発表標題 嗅神経細胞のin vivo神経活動イメージング
3. 学会等名 第8回ケモビ研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Katori, K., Morikawa, S., Okuyama, T., Nakashima, A., Takeuchi, H., Ikegaya, Y
2. 発表標題 Neural mechanism underlying predator-odor induced persistent defensive behavior
3. 学会等名 ACC International Symposium 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中野 利沙子(D3)、村上 知成、大木 研一、池谷 裕二、竹内 春樹
2. 発表標題 in vivo二光子イメージングを用いた発達期の嗅神経細胞における神経活動パターンの解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森川勝太、香取和生、中嶋藍、竹内春樹、池谷裕二
2. 発表標題 Neural circuits for switching innate defensive behaviors
3. 学会等名 第64回日本神経化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 香取和生、池谷裕二、竹内春樹
2. 発表標題 Learning-induced changes in the representation of odors in the piriform cortex
3. 学会等名 第55回日本味と匂学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中嶋美紀、香取和生、中嶋藍、竹内春樹、池谷裕二、森川勝太
2. 発表標題 先天的な防御行動を切替えるための神経回路の解析
3. 学会等名 次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中嶋美紀、香取和生、中嶋藍、竹内春樹、池谷裕二、森川勝太
2. 発表標題 先天的な防御行動を切替えるための神経回路の解析
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野利沙子、森川勝太、鐘巻将人、池谷裕二、竹内春樹
2. 発表標題 Auxin-mediated rapid knockdown in neurons
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nakashima, M., Katori, K., Nakashima, A., Takeuchi, H., Ikegaya, Y., Morikawa, S.
2. 発表標題 Neural circuits for switching innate defensive behaviors
3. 学会等名 AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内春樹
2. 発表標題 神経活動パターン依存的な嗅覚回路の形成機構
3. 学会等名 生理学研究所 記憶研究会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内春樹
2. 発表標題 匂いの情報処理を支える神経回路とその作動原理
3. 学会等名 東京大学 Beyond AI研究推進機構BAIセミナー (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内春樹、中嶋藍、伊原尚樹、池谷裕二
2. 発表標題 活動パターン依存的な嗅覚回路の形成機構
3. 学会等名 第15回日本分子イメージング学会総会 五感の分子イメージング (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 香取和生、池谷裕二、竹内春樹
2. 発表標題 匂い学習による梨状皮質における匂い表象変化
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takeuchi H
2. 発表標題 Molecular Codes for olfactory receptor-dependent neural circuit formation
3. 学会等名 Structure, Function and Dynamics International Conference(SFD) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹内春樹
2. 発表標題 活動パターンに依存した嗅覚神経回路の形成機構
3. 学会等名 第五回形態解析ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takeuchi H
2. 発表標題 Molecular codes for olfactory circuit formation
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takeuchi H
2. 発表標題 Neural mechanisms underlying persistent defensive behavior
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takeuchi H
2. 発表標題 活動パターンに依存した嗅覚神経回路の精緻化
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹内春樹
2. 発表標題 匂い依存的な持続的防御行動を支える神経メカニズム
3. 学会等名 The 9th Chemosensation and Behavior Workshop
4. 発表年 2023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
研究協力者	宮崎 雅雄 (Miyazaki Masao) (20392144)		
研究協力者	森川 勝太 (Morikawa Shota)		
研究協力者	香取 和生 (Katori Kazuki)		

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
---------	---------