

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06715

研究課題名(和文) 新生嗅球介在ニューロンによる嗅覚行動の制御機構の解析

研究課題名(英文) Function of newborn interneurons in the olfactory behaviors

研究代表者

高橋 弘雄 (Takahashi, Hiroo)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：20390685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：匂いの情報処理を行う嗅球の介在ニューロンは、生涯に渡り新生するというユニークな特徴を持つ。本研究は、嗅球介在ニューロンの役割に着目して研究を行った。膜タンパク質5T4は、嗅球介在ニューロンの一部のサブタイプ(5T4+顆粒細胞)で特異的に発現する。5T4欠損マウスでは、5T4+顆粒細胞の樹状突起の枝分かれが減少する。興味深いことに、5T4欠損マウスでは、弱い匂いの感知や、匂いを識別する能力が低下していることが分かった。本研究により、嗅球介在ニューロンのサブタイプの1つである5T4+顆粒細胞が、匂いの情報処理に必須の役割を果たすことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The olfactory bulb (OB) possesses a battery of interneurons, including various types of granule cells (GCs); however, the contribution that each type of interneuron makes to the control of olfactory behavior remains unknown. Here, we investigated the function of the GC subtype (5T4 GCs), expressing oncofetal trophoblast glycoprotein 5T4. 5T4 facilitates the dendritic arborisation in the 5T4 GCs. Optogenetic stimulation of 5T4 GCs revealed their connection to external tufted cells (ETCs). Interestingly, in 5T4 knockout mice, ETCs received fewer inhibitory inputs from 5T4 GC dendrites than in the wild type. Notably, in olfactory behavior tests, 5T4 knockout mice had higher odor-detection thresholds than the wild type, as well as defects in odor-discrimination learning. Taken together, our findings suggest that loss of 5T4 attenuates inhibitory inputs from 5T4 GCs to ETCs, thus probably leading to superfluous firing of the ETCs and consequent disturbances in olfactory behaviors.

研究分野：神経科学

キーワード：嗅球 ニューロン新生

## 1. 研究開始当初の背景

匂いの情報処理を行う嗅球の介在ニューロンは、神経細胞としては例外的に成体の脳内でも新生する。新たに生まれたニューロンが、生涯を通じて嗅球の神経回路へと組み込まれ、失われたニューロンを補うことで、嗅球の神経回路は維持されている (*Nat. Neurosci.*, 10, 1153, 2008)。脳室周囲で生まれた嗅球の介在ニューロンは、RMS (rostral migratory stream) と呼ばれるルートを通り、嗅球へと移動する (図1)。RMS 内では、周囲のアストロサイトや血管が、介在ニューロンの移動をサポートすることが報告されている (*Neuron* 67, 213, 2010; *J. Comp. Neurol.* 516, 94, 2009)。嗅球に到達すると、介在ニューロン (顆粒細胞・傍系球細胞) は移動の方向を変え、細胞ごとに異なる場所の神経回路へと組み込まれる (図1)。

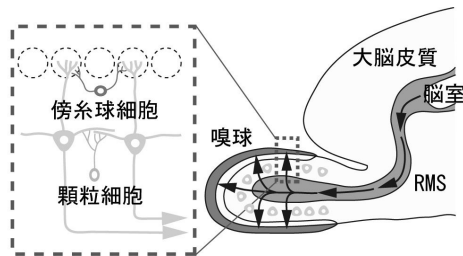


図1 嗅球介在ニューロン (顆粒・傍系球細胞) は胎生期だけでなく、成体の脳室周辺でも産生され、嗅球の神経回路に組み込まれる。

興味深いことに、マウスの脳梗塞モデルを用いた実験では、脳室周囲で生まれた新生ニューロンが、本来の目的地の嗅球ではなく、梗塞に伴う損傷部位へと血管に沿って移動することが澤本らにより報告されている (*Stem Cells*, 28, 545, 2010)。嗅球の神経回路再編メカニズムを研究することは、再生医療への応用に繋がることも期待され、近年大きな注目を集めている。

一方、嗅球介在ニューロンが匂いの情報処理に果たす役割に関しては、これまであまりよく分かっていない。特に、嗅球介在ニューロンの多数を占める顆粒細胞には、多様なサブタイプが存在するが、それぞれのサブタイプの果たす役割や、多様なサブタイプの存在理由は、これまで全く明らかとなっていない。このように、嗅球介在ニューロンの多様性に関する研究が進まない大きな理由の1つとして、特定のサブタイプを分けて、その機能を調べるための有効なマーカー遺伝子があまり確立していないことが上げられる。興味深いことに、膜タンパク質 5T4 は、嗅球介在ニューロンの一部のサブタイプ (5T4+顆粒細胞) でのみ特異的に発現する。

## 2. 研究の目的

本研究は、嗅球介在ニューロンが、匂いの情報処理に果たす役割を明らかとすることを目的として行った。嗅球介在ニューロンのサブタイプに着目して解析を行い、特定のサブタイプの介在ニューロン (5T4+顆粒細胞) が、匂いの感知や識別に必須の役割を果たすことを明らかとした。

## 3. 研究の方法

膜タンパク質 5T4 は、嗅球介在ニューロンの一部のサブタイプ (5T4+顆粒細胞) でのみ特異的に発現する。5T4 欠損マウスでは、5T4+顆粒細胞において、樹状突起の枝分かれが顕著に減少する。5T4+顆粒細胞に異常が生じる 5T4 欠損マウスは、特定のサブタイプの顆粒細胞が果たす役割を調べる極めてよいモデル系であると考えられる。そこで、5T4 欠損マウスを用いて、嗅球の神経回路や行動への異常を検討した。

## 4. 研究成果

5T4+顆粒細胞およびそれ以外の顆粒細胞の形態を、野生型と 5T4 欠損マウスで比較した。5T4 欠損マウスでは、5T4+顆粒細胞で、樹状突起の枝分かれが顕著に減少したが、それ以外の顆粒細胞への影響は見られなかった。5T4 欠損マウスでは、多様な顆粒細胞の中でも、5T4+顆粒細胞の樹状突起に、特異的に異常が起こっていることが分かった。

嗅球の神経回路において、抑制性の介在ニューロンである顆粒細胞は、興奮性の投射ニューロンとの間に、双方向性の樹状突起間シナプスを形成する。介在ニューロンは、投射ニューロンの神経活動を抑制的に調節することが知られている。

そこで、5T4+顆粒細胞の接続相手である投射ニューロンへの影響を検討した。まず、5T4+顆粒細胞が接続する投射ニューロンを同定するため、チャンネルロドプシンを 5T4+顆粒細胞に発現させた。光刺激により 5T4+顆粒細胞を活性化して、応答の見られる投射ニューロンの種類を検討した。その結果、5T4+顆粒細胞は、僧帽細胞および外房飾細胞とシナプスを形成していることが明らかとなった。さらに、嗅球スライスを用いた電気生理による解析を行ったところ、外房飾細胞は盛んな自発活動を示す Bursting タイプと、自発活動をあまり示さない Non-bursting タイプに分けられることを見出した。5T4+顆粒細胞は、Bursting タイプと Non-bursting タイプの双方の外房飾細胞に接続していることを確認した。

そこで、5T4+顆粒細胞の樹状突起に異常が生じる 5T4 欠損マウスを用いて、5T4+顆粒細胞

と投射ニューロンとの間のシナプスへの変化を解析した。興味深いことに、5T4 欠損マウスでは、5T4+顆粒細胞と Non-bursting タイプの外房飾細胞との間で、樹状突起間シナプスが顕著に減少することが分かった。一方、Bursting タイプの外房飾細胞や、僧帽細胞と 5T4+顆粒細胞との間のシナプスには、変化は見られなかった。5T4 欠損マウスでは、5T4+顆粒細胞による Non-bursting タイプの外房飾細胞の調節に異常が生じていることが示唆された。

次に、このような嗅球の神経回路の異常が、匂いの感知に及ぼす影響を、行動実験により解析した。床敷きの下に埋めたエサを嗅覚により探索するという、簡単な匂いのテストでは、野生型と 5T4 欠損マウスで大きな差は見られず、5T4 欠損マウスも匂いを感じられることが確認できた。

そこで、匂いの検出閾値を調べるテストを行ったところ、5T4 欠損マウスは野生型マウスと比較して、感知できる匂いの閾値が上昇していた。5T4 欠損マウスは、弱い匂いを感じることができないことが分かった。また匂いの識別能を調べるため、砂糖と関連づけて学習記憶させた匂い A に、別な匂い B を混ぜ、A と B の混合臭から匂い A を嗅ぎ分けるテストを行った。野生型マウスは、A と B の混合臭から、匂い A を嗅ぎ分けることができたが、5T4 欠損マウスはこの匂いの嗅ぎ分けができなかった。以上の研究から、5T4+顆粒細胞が、匂いの検知と識別に必須の役割を果たすことが分かった。

これまで嗅球顆粒細胞のサブタイプに関して、その役割は全く明らかとなっていなかった。本研究から、5T4+顆粒細胞という特定のサブタイプの介在ニューロンが、外房飾細胞の神経活動を調節することにより、匂いの感知に極めて重要な役割を果たすことが示唆された。

顆粒細胞はサブタイプの違いにより、異なる種類の投射ニューロンと接続して、その神経活動を調節すると考えられている。また、胎児期、新生仔期、成体期という時期によって、産生される顆粒細胞サブタイプの種類に偏りがあることも報告されている。例えば、5T4+顆粒細胞は、胎児期や新生仔期に主に産生され、本研究から基本的な匂いの感知に重要な役割を果たすと推測される。一方で、成体期に産生される介在ニューロンは、より複雑な匂いの識別学習に重要であることが報告されている。

今後、5T4+顆粒細胞以外の嗅球介在ニューロンに関しても、その役割や、5T4+顆粒細胞との相違点を明らかとしていくことにより、成体でも嗅球介在ニューロンが新生する意味や、多様性の理由に関して、興味深い知見が得られると期待される。

## 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 4 件)

Takahashi H and Tsuboi A. Olfactory Habituation-dishabituation Test (Mouse) *Bio-Protocol* 査読有, Vol 7, 2017, DOI: <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2154>

Takahashi H and Tsuboi A. Olfactory Avoidance Test (Mouse) *Bio-Protocol* 査読有, Vol 7, 2017, DOI: <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2153>

Takahashi H, Ogawa Y, Yoshihara S, Asahina S, Kinoshita M, Kitano T, Kitsuki M, Tatsumi K, Okuda M, Tatsumi K, Wanaka A, Hirai H, Stern PL and Tsuboi A. A specific subtype of olfactory bulb interneurons is necessary for odor-detection and odor-discrimination behaviors. *The Journal of Neuroscience* 査読有, Vol 36, 2016, pp. 8210-8227, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2783-15.2016.

Yoshihara S, Takahashi H and Tsuboi A. Molecular mechanisms regulating the dendritic development of newborn olfactory bulb interneurons in a sensory experience-dependent manner. *Frontiers in Neuroscience* 査読有, Vol 9, 2016, Article 514, DOI: 10.3389/fnins.2015.00514.

[学会発表](計 10 件)

高橋弘雄 他、Neural activity-dependent transcription factor Npas4 plays a crucial role in neuronal survival after ischemic stroke、Keystone Symposia: State of the Brain: Genetic Dissection of Brain Circuits and Behavior in Health and Disease、2018 年 1 月 14 日、Keystone Resort

高橋弘雄 他、Neural activity-dependent transcription factor Npas4 is required for neuroprotection and survival after stroke、第 40 回日本分子生物学会大会、2017 年 12 月 6 日、神戸ポートアイランド

高橋弘雄 他、Neural activity-dependent transcription factor Npas4 is required for neuroprotection and survival after stroke、第 40 回日本神経科学学会大会、2017 年 7 月 20 日、幕張メッセ

高橋弘雄 他、Neural activity-induced transcription factor Npas4 is required for neuroprotection and survival after stroke、Keystone Symposia: Neurogenesis during Development and in the Adult Brain、2017年 1月 8日、Resort at Squaw Creek

高橋弘雄 他、Neural activity-induced transcription factor Npas4 is required for neuroprotection and survival after stroke、第 39 回日本分子生物学会大会、2016 年 11 月 30 日、パシフィコ横浜

高橋弘雄 他、A specific subtype of newborn olfactory bulb interneurons is required for behaviors on odor detection and discrimination、第 39 回日本神経学会大会、2016 年 7 月 20 日、パシフィコ横浜

高橋弘雄 他、A specific subtype of newborn olfactory bulb interneurons is required for behaviors on odor detection and discrimination、The 17th International Symposium on Olfaction and Taste、2016 年 6 月 5 日、パシフィコ横浜

高橋弘雄 他、A specific subtype of newborn interneurons in the olfactory bulb is required for behaviors on odor detection and discrimination、Fusion Conference on Neurogenesis: Implications for Lifelong Development and Disease、2016 年 3 月 2 日、Cancun

高橋弘雄 他、A specific subtype of newborn interneurons in the olfactory bulb is required for behaviors on odor detection and discrimination. (Selected in oral presentations)、第 38 回日本分子生物学会大会、2015 年 12 月 1 日、神戸ポートアイランド

高橋弘雄 他、A specific subset of newborn granule cells in the olfactory bulb are required for maintaining odor-detection thresholds and acquiring two-odor discrimination tasks. (Selected in oral presentations)、第 38 回日本神経学会大会、2015 年 7 月 25 日、神戸ポートアイランド

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.naramed-u.ac.jp/~amrc-lab1/tsuboi%20Lab3.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高橋 弘雄 (TAKAHASHI HIROO)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：20390685

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし