

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18353

研究課題名(和文)匂い情報の時間コード化におけるシナプス前抑制の役割

研究課題名(英文)Temporal coding of odor information: the role of the presynaptic inhibitory circuit

研究代表者

岩田 遼 (Iwata, Ryo)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・訪問研究員

研究者番号：50612131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：嗅上皮の嗅細胞によって受容された匂い情報は、嗅球において僧帽細胞の発火頻度および発火タイミングによって表現される。僧帽細胞の匂い応答時間パターンは、嗅上皮における時間パターンが、嗅球の神経回路により調節されて成立する。この応答時間パターンの起源と制御機構を探るために、本研究では嗅上皮のin vivoカルシウムイメージング技術を確立し、嗅上皮(嗅細胞の細胞体)と嗅球(嗅細胞の軸索末端)における応答パターンの違いを明らかにした。さらに、嗅細胞軸索末端におけるシナプス前抑制の役割について評価した。

研究成果の概要(英文)：Environmental olfactory signals are sensed by olfactory sensory neurons (OSNs) in the olfactory epithelia (OE), and are represented by both the firing rate and temporal patterns of neuronal activity in mitral/tufted (M/T) cells of the olfactory bulb (OB). The temporal patterns in M/T cells are shaped by input from the OE and modulations in the OB neuronal circuit. This study developed new techniques for in vivo calcium imaging in the OE, and revealed the difference of response patterns between somata (OE) and axon terminals (OB) of OSNs. To investigate neural processing mechanisms in the OSN axon terminals, this study also examined the functions of the presynaptic inhibition circuit in the OB.

研究分野：神経科学

キーワード：嗅細胞 嗅球 時間コーディング シナプス前抑制

1. 研究開始当初の背景

マウスの嗅覚系では、約 1,000 種類の嗅覚受容体 (OR) のうち同じ OR を発現する嗅細胞が、単一の糸球に軸索を収斂する。外界の匂い分子は、結合する OR の種類に応じて、活性化糸球の組み合わせとして嗅球上に表現される。近年、こうした空間パターンに加えて、匂い応答の時間パターンによっても匂い情報が表現されるという考え方が提唱された。嗅球の僧帽・房飾細胞は、匂い刺激に対して呼吸周期中の特定のタイミングで発火し、そのタイミングは匂いの種類・細胞ごとに異なる。匂い情報は単純にその活動レベルに表現されるだけではなく、呼吸周期における発火タイミングにも表現される (時間コーディング)。

では、嗅球における発火タイミングの違いは、どのようにして生じるのだろうか? 入力元 (嗅上皮) の活動時間パターンについては、これまで生体内で測定された例はほとんどなく、匂い情報が実際にどのような時間パターンで嗅上皮において検出されるのかは全く知られていない。一方、入力先の嗅球では、インターニューロン (図 1、GABA 作動性かつドーパミン作動性の TH 陽性神経) が糸球同士を結びつけ、ネットワークを形成している。この TH 陽性神経は、僧帽・房飾細胞に出力することが知られているが、嗅細胞軸索にシナプス前抑制を出力する可能性もある。嗅細胞軸索にはドーパミン D2 型受容体と GABAB 受容体が発現しており、シナプス前抑制を受ける。代謝型受容体を介した数十~数百ミリ秒の持続的な抑制は、嗅球時間コーディングの時間スケールに一致しており有力な機構と考えられるが、TH 陽性神経がシナプス前抑制を出力するかどうかはこれまでに知られていない。

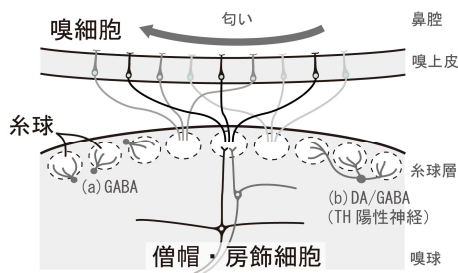


図 1. 嗅覚系の神経回路

研究代表者は本研究の開始時点までに、嗅球カルシウムイメージングを用いて嗅細胞軸索末端における抑制性の匂い応答を見出していた。この結果から、嗅球においてシナプス前抑制が側方抑制の一部を担い、時間コーディングに寄与する可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、嗅細胞軸索における抑制性の匂い応答に注目し、その起源と制御機構を明らかにするとともに、時間コーディン

グの回路基盤を明らかにすることを目的とした。

(1) 嗅細胞軸索における抑制性の匂い応答については、嗅球におけるシナプス前抑制の可能性以外に、嗅上皮におけるインバースアゴニスト様の応答に由来する可能性もある。抑制性の応答が嗅上皮起源なのか、それとも嗅球回路起源なのかを探るために、嗅上皮における *in vivo* calcium imaging 法を新たに確立し、生体における嗅上皮の匂い応答を観測する。この方法を用いて嗅上皮 (嗅細胞の細胞体) と嗅球 (嗅細胞の軸索末端) で応答の極性や時間パターンを比較する。

(2) 嗅細胞軸索末端における抑制性の応答や応答の時間パターンが、側方抑制回路 (TH 陽性神経) に基づくシナプス前抑制によってどのように調節されるのかを明らかにするために、(a) TH 陽性神経の機能障害、(b) 嗅細胞におけるシナプス前抑制の機能障害を行う。

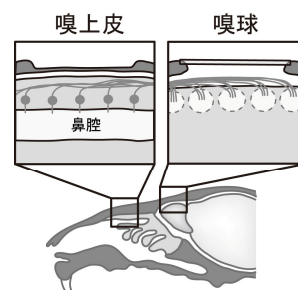
3. 研究の方法

(1) 嗅細胞特異的 GCaMP3 マウスを用いて、嗅上皮における *in vivo* 2光子 Ca²⁺イメージングの手法を確立する。嗅上皮 (嗅細胞細胞体) と嗅球 (軸索末端) を比較することで、嗅細胞軸索における匂い応答の極性や時間パターンが、細胞体の応答とどのように違うのかを明らかにする。

(2) 嗅細胞軸索における匂い応答の極性や時間パターンが、TH 陽性神経およびシナプス前抑制によってどのように調節されるのかを検証する。(a) TH 陽性神経に光依存的プロトンポンプ ArchT を発現するトランスジェニックマウスを作製し、*in vivo* イメージング中の光照射により機能障害を行う。(b) GABAB 受容体とドーパミン D2 型受容体の嗅細胞特異的ノックアウトマウスを作製する。ノックアウトマウス国際コンソーシアム (KOMP および EUCOMM) から、上記 2 種類の受容体遺伝子をターゲットした ES 細胞を取り寄せてマウスを作製する。このマウスと嗅細胞特異的に組換え酵素 Cre を発現する OMP-Cre マウスを掛け合わせる。

4. 研究成果

(1) 嗅上皮の *in vivo* calcium imaging 法を確立し、嗅上皮 (嗅細胞細胞体) と嗅球 (嗅細胞軸索末端) で匂い応答のイメージングを行った (図 2)。その結果、嗅球の軸索末端



嗅細胞特異的 GCaMP3 マウス

図 2. 嗅上皮と嗅球における *in vivo* calcium imaging の方法

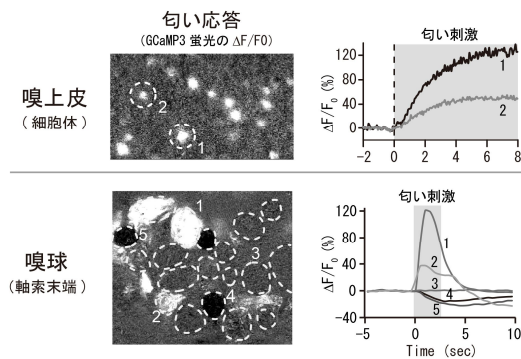


図3. 嗅細胞の嗅上皮(細胞体)と嗅球(軸索末端)における応答パターンの違い

で観察される抑制性の応答が、嗅上皮では観察されることが判明した(図3左側)。嗅球における抑制性の応答は、インバースアゴニスト様の応答などの嗅上皮起源のものではないことが示唆され、嗅球回路におけるシナプス前抑制の関与が考えられる。また、嗅上皮における細胞体は匂刺激に対して数秒かけてゆっくりと活性化するのに対して、嗅細胞軸索では素早く反応する違いも観察された(図3右側)。したがって、嗅細胞軸索では細胞体の時間パターンをそのまま反映しているわけではなく、大幅に加工されていることが示唆された。

(2) TH陽性神経の機能阻害実験については、TH (tyrosine hydroxylase) 遺伝子発現カセットに eArchT3.0-IRES-tdTomato を挿入し、トランスジェニックマウスを作製したが、得られたラインはいずれも発現効率が TH 陽性神経のうち5%を超えず、機能阻害実験は実施できなかった。

シナプス前抑制の機能阻害実験については、GABAB 受容体遺伝子 (Gabbr1) およびドーパミン D2 型受容体遺伝子 (Drd2) をターゲットした ES 細胞 (Gabbr1tm1a および Drd2tm1a) からマウスを作製した。サザンプロッキングを行い、遺伝子構造の確認を行った。このマウス (tm1a アリル) を Flippase マウスと掛け合わせて Neo カセットを除き、Cre マウスとの掛け合わせにより各遺伝子がノックアウトされるマウス (tm1c アリル) が得られた。さらに嗅細胞特異的に組換え酵素 Cre を発現する OMP-Cre マウスを掛け合わせて、嗅細胞特異的ノックアウトを行ったところ、糸球体における GABAB 受容体の発現量が顕著に低下していた。ドーパミン D2 型受容体については研究期間内に抗体染色の条件を確立できなかった。

次にこのマウスを用いて嗅細胞軸索における匂刺激の解析を行った。予想に反し、Gabbr1 および Drd2 を嗅細胞特異的にノックアウトしたマウスでは、嗅細胞軸索における抑制性応答が依然として観察された。今後この結果については定量的に検討を進める必要があるものの、この結果からは GABAB 受容体とドーパミン D2 型受容体に依存しない嗅細胞の側方抑制機構が示唆される。今後、他

の受容体に依存したシナプス前抑制機構や、シナプス前抑制によらない電気的な軸索間相互作用などの可能性も含めて、慎重に検討を進めていきたい。

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 1 件)

Aya Murai, Ryo Iwata, Satoshi Fujimoto, Shuhei Aihara, Akio Tsuboi, Yuko Muroyama, Tetsuichiro Saito, Kazunori Nishizaki, Takeshi Imai.

Distorted coarse axon targeting and reduced dendrite connectivity underlie dysosmia after olfactory axon injury.

eNeuro 5 October 2016, ENEURO.0242-16.2016;

DOI: 10.1523/ENEURO.0242-16.2016

査読有

[学会発表](計 7 件)

Ryo Iwata, Takeshi Imai
Sampling mode- and concentration-invariant temporal odor coding by airflow-driven neuronal oscillations

International Symposium 2016 - Circuit Construction in the Mammalian Brain

2016.08.08 大阪府吹田市 (大阪大学吹田キャンパス 生命システム棟 2階セミナー室)

Ryo Iwata, Takeshi Imai
嗅球におけるオシレーションと匂刺激情報の時間コーディング

Sampling mode- and concentration-invariant temporal odor coding by airflow-driven neuronal oscillations

第39回日本神経科学大会

2016.07.22 横浜市 (パシフィコ横浜)

Ryo Iwata, Takeshi Imai
Sampling mode- and concentration-invariant temporal odor coding by airflow-driven neuronal oscillations

17th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT2016)

2016.06.06 横浜市 (パシフィコ横浜)

Ryo Iwata, Takeshi Imai
Sampling mode- and concentration-invariant temporal odor coding by airflow-driven neuronal oscillations

CSH-Asia Conference: Development, Function & Disease of Neural Circuits
May 16-20. 2016, Suzhou, China

Ryo Iwata, Takeshi Imai
Nasal airflow sensation aids robust

temporal coding of an odor identity in the olfactory bulb

第 7 回光操作研究会 国際シンポジウム
「神経回路と神経修飾」

2015.12.04 東京都文京区(東京医科歯科大学 鈴木章夫記念講堂)

Ryo Iwata, Takeshi Imai.

Nasal airflow drives glomerulus-specific oscillations for reliable phase odor coding

第 38 回日本神経科学大会
Neuroscience2015

2015.07.28 神戸市 (神戸国際会議場、神戸国際展示場)

Ryo Iwata, Takeshi Imai.

Nasal airflow sensation aids robust temporal coding of an odor identity in the olfactory bulb

BBW 2015 From Neural Circuitry to Neurotechnology

2015.05.11 東京都千代田区(飯野ビルディング)

〔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://researchmap.jp/ryoiwata/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田 遼 (IWATA RYO)

研究者番号: 50612131

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・訪問研究員

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし