

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21029

研究課題名(和文)多様な神経個性を分子コード化する嗅覚シグナル機構の解明

研究課題名(英文)Neural map formation in the mouse olfactory system

研究代表者

中嶋 藍 (Nakashima, Ai)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・特任助教

研究者番号：60706331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス嗅覚系において、嗅細胞で発生する神経活動は発現する嗅覚受容体の種類に応じた回路構築を制御する。同一の受容体を発現している嗅細胞の軸索を収斂させるためには、神経活動が何らかの形で受容体の種類という情報を表現する必要があるが、この過程がシナプス後細胞に依存せず起こる細胞自律的なものであることから、嗅覚受容体の情報はヘブ則に依らない新規の機構により表現されていると推測された。そこで我々は、高速カルシウムイメージング法を用いて嗅細胞で生じる神経活動の多細胞同時計測を行い、その活動記録を用いた統計学的解析を行うことで、従来のヘブ則に当てはまらない新規の活動依存的回路形成モデルの構築を目指した。

研究成果の概要(英文)：In the mouse olfactory system, olfactory receptors (ORs) regulate a combinatorial expression of axon-sorting molecules at OSN axon termini through spontaneous neural activity. However, it remains unclear how different ORs generate different expression patterns of axon-sorting molecules. Here we have applied genetic approaches to explore regulatory mechanisms underlying their expressions. We conducted Calcium imaging using GCaMP6f sensor to monitor spontaneous activities of developing olfactory neurons. It was found that OSNs expressing the same OR exhibited similar patterns of calcium transients. However, cross-correlation analysis revealed that calcium events between OSNs expressing the same OR were not synchronized. These results indicate that temporal patterns of spontaneous activity, which are correlated with expressed OR types, are important to generate the combinatorial expressions of axon-sorting molecules for the OR-specific axon sorting.

研究分野：分子生物学

キーワード：嗅覚 神経回路構築 カルシウムイメージング

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む高等動物の脳は、多数の神経細胞からなる複雑かつ精巧に組織された神経回路によって外界からの感覚情報を適切に処理し、行動する。この情報処理の根幹をなす神経回路は、予め遺伝的に決定されたプログラムによるシステム構築のあと、発生過程で生じる神経活動による回路の精緻化を経て完成される。マウスの嗅覚系において、個々の嗅覚神経細胞は多数存在する嗅覚受容体 (olfactory receptor: OR) 遺伝子の中からたった一種類を発現し、同一の OR を発現した嗅覚神経細胞の軸索は互いに収斂し嗅球の特定の箇所に糸球体構造を形成して投射する。これまでの先行研究から、嗅覚神経軸索の大まかな投射の位置は遺伝的に決定され、最終的な軸索収斂の過程において神経活動が重要な役割を果たすことが明らかとなっている。遺伝学的手法により嗅覚神経細胞の神経活動を阻害すると、通常一カ所に投射するはずの同一 OR を発現する軸索が複数の糸球体へと誤って投射することから、嗅覚神経細胞における神経活動は同一の OR を発現する軸索同士を束ね、異なる OR を発現する軸索を分離するという自己・非自己の識別の役割を担っていると考えられる。しかしながら、神経活動のどのようなパラメータが最終的な軸索の分離を制御しているのかについてはほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

マウス嗅覚系において、嗅細胞の神経個性は多数存在する嗅覚受容体の中から一種類のみを発現することによって規定される。嗅覚受容体は神経活動を介して自身の細胞個性を軸索末端に提示することで複雑かつ特異的な回路の構築を指令する。しかしながら、その具体的な分子機構は不明のままである。本研究課題では、嗅覚受容体由来する神経活動の下流のシグナルの実態、および神経活動依存的に発現する分子の役割を検証し、多様な神経個性から回路の特異化までの経路を明らかにする。

3. 研究の方法

発現する OR 分子は神経活動を介し複数の軸索収斂分子の発現を制御することで、軸索末端に分子コードを作り出し最終的な軸索の選別を行う。本研究では、同定されている複数の軸索収斂分子の詳細な機能解析及び神経活動を介した具体的な遺伝子発現制御を明らかにすることを通じて、当グループが提唱したモデルの妥当性、普遍性を明らかにする。具体的な実験は以下の3つのサブテーマに分割して遂行した。

1. 活動依存的に軸索末端に発現する分子群の機能解析

軸索末端に発現する軸索収斂分子の機能を、遺伝学的手法を用いて解析する。これにより、どの程度の分子のセットによって嗅細胞の神経配線の特異性が保証されるのかを検証する。

2. 神経活動の可視化

嗅細胞で発生する神経活動をカルシウムイメージングによって観察する。これにより、神経活動(カルシウム動態)の発火パターンと OR の種類・軸索収斂分子の発現量の間にある相関関係を明らかにする。

3. 神経活動を分子コードへと変換するシグナル機構の解明

神経活動から軸索収斂分子の発現へ至るまでのシグナル伝達経路を明らかにする。候補遺伝子を発現解析、薬理学的実験によって同定し、遺伝学的実験により詳細な役割を明らかにする。

4. 研究成果

マウス嗅覚系では、同一の嗅覚受容体 (OR) を発現する嗅細胞は、互いにその軸索を収斂させ嗅球の特定の糸球体へと投射する。OR は神経活動を介して軸索選別分子の発現レベルを調節することで軸索の収斂を制御している。本研究課題では、さらに一次嗅細胞において軸索選別分子が OR 依存的、かつ神経活動依存的に制御されるメカニズムを明らかにする。申請者は、OR の種類依存的かつ神経活動依存的に制御される軸索収斂分子群を複数同定してきた。Kirrel2、

Semaphorin7A (Sema7A)、OL-protocadherin (OLpc)、protocadherin-17(pcdh17) はいずれも嗅細胞の軸索投射先である嗅球においては、系球特異的かつモザイクな発現パターンを示す。本年度はこれら OR 特異的かつ神経活動依存的に制御される軸索収斂分子群の遺伝子改変動物を用いた機能解析および発現解析を行った。

前者については、嗅細胞の一部の集団でのみ機能分子 Kirrel2 がノックアウトされたマウスを解析した。同じ OR を発現しているも、Kirrel2 発現細胞とノックアウトされた細胞とは別個の系球体を形成したことから、この分子が嗅細胞の軸索末端の収斂に機能するという

仮説が支持された。また、Kirrel2、Sema7A、OLpc、pcdh17 に関して、嗅球一個分に相当する系球体における発現量を定量し、主成分分析やクラスタリングの手法による解析を行った。この結果、神経活動に対して正に発現が制御されている分子の多様な発現パターンにより、系球体は複数のクラスターへと分離された。この発現パターンの多様性は一次元の軸だけでは説明することが出来ないため、神経活動の中に組み込まれたパターンといった活動量以外の情報が嗅細胞によって読み取られ軸索選別分子の発現が調節されていると推察された。

神経活動を介した具体的な遺伝子発現制御を明らかにすることを目的とし、遺伝的カルシウムインディケータである GCaMP6f を嗅細胞に発現させた遺伝子改変マウスを作出した。カルシウムイメージング法を用いて神経回路構築が生じる出生直後の自発的活動を観察する実験系を構築し実験を行なったところ、特定の嗅覚受容体を発現する嗅神経について、カルシウム流入イベントの観察される頻度、イベント間隔など複数のパラメータに関して定量データを抽出し多変量解析を行なった結果、発

現する嗅覚受容体の種類ごとに神経活動（カルシウム流入）のパターンが異なっていた。加えて、この神経活動パターンの変化は、上流のプロモーターは同一の条件下で、発現する嗅覚受容体の種類のみを変化させた2種類の嗅神経においても観察された。これらの観察結果は、『嗅神経においては発現嗅覚受容体の種類にしたがって固有の神経活動パターンが規定される』という仮説を支持している。

さらに、嗅神経において、神経活動下流で回路構築に関わる細胞接着遺伝子群 (Kirrel2、OLPC、Sema7A) に関しては、*ex vivo* の嗅神経培養系を利用し、神経活動・カルシウム依存的に活性化するシグナル分子がその転写制御に関わるという示唆を得た。Kirrel2、OLPC、Sema7A について、各遺伝子のノックアウトマウスを用いて発現解析を行なった結果、Kirrel2 の発現に影響を与えるシグナル伝達分子を同定することに成功した。このノックアウトマウスでは、Kirrel2 の発現が大幅に減少する一方で、OLPC および Sema7A の発現は減少しなかった。

神経活動パターンの解析と併せて考えると、『神経活動パターンは特定のシグナル分子の活性化を誘起し、嗅覚受容体特異的な細胞接着分子の発現パターンへと変換される』と考えられる。

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1件)

Ihara, N., Nakashima, A., Hoshina, N., Ikegaya, Y. Takeuchi, H. Differential expression of axon-sorting molecules in mouse olfactory sensory neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 44:1998-2003, 2016.

[学会発表](計5件)

Nakashima, A., Ihara, N., Ikegaya, Y., Takeuchi, H., Patterned, but not synchronous spontaneous activity of

developing olfactory neurons regulates olfactory receptor-specific axon sorting, Keystone Symposia A2: State of the Brain: Genetic Dissection of Brain Circuits and Behavior in Health and Disease (Keystone, Colorado), 14-18 January 2018

Nakashima, A., Ihara, N., Ikegaya, Y., Takeuchi, H. Patterned spontaneous activity of olfactory neurons regulates olfactory receptor-specific axon sorting, Neuroscience 2017 (横浜), 20 July 2017, 1P-LBA002

野仲航司(M1)、中嶋藍、伊原尚樹、井ノ口霞、エルドンフ、池谷裕二、竹内春樹、マウス嗅覚系の神経回路の堅牢性に関わる軸索選別分子の発現、第40回日本分子生物学会年会(神戸)、2017年12月8日、3LBA-134

Nakashima, A., Ihara, N., Sakano, H., Ikegaya, Y., Takeuchi, H. An instructive role for spontaneous neural activity in glomerular map formation. The tenth meeting on Axon Guidance, Synapse Formation and Regeneration (Cold Spring Harbor), 22 September 2016

Nakashima, A., Ihara, N., Sakano, H., Ikegaya, Y., Takeuchi, H. Activity-dependent mechanisms of olfactory map formation. ISOT 2016-17th International Symposium on Olfaction and Taste (Yokohama), 8 June 2016, P3-050

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

東京大学 大学院薬学系研究科 薬品作用学
教室 ホームページ
<http://www.yakusaku.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者
中嶋藍 (NAKASHIMA, Ai)
東京大学・大学院薬学系研究科・特任助教
研究者番号：60706331

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()