

令和元年6月20日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18361

研究課題名(和文) 嗅神経細胞分化の遺伝学的操作による本能行動の制御とその神経基盤の解明

研究課題名(英文) Regulation of innate olfactory behavior by genetic manipulation of Bcl11b gene

研究代表者

榎本 孝幸 (Enomoto, Takayuki)

東京工業大学・生命理工学院・研究員

研究者番号：70635680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：嗅覚は食物探索や危険回避など動物が生存する上で重要な役割を担っている。匂いを感知する嗅神経細胞はClassI型とClassII型の2種類に分かれており、これまで転写因子Bcl11bによって2種類の嗅神経細胞の運命決定が制御されていることを発見した。本研究では、中枢への情報入力の変化が神経回路網形成と嗅覚を介した本能行動に及ぼす影響を明らかにするために、2種類の嗅神経細胞の産生を遺伝学的に操作した変異マウスにおける匂いに対する神経応答と個体の反応を調べた。これら変異マウスの解析によって、産生される末梢の嗅神経細胞の変化が匂い情報を処理する神経回路網や本能行動に影響を及ぼすことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、嗅覚系感覚神経細胞の分化において異なる種類の細胞への運命決定を制御している”転写因子Bcl11b”を中心とした分子メカニズムの一端と、末梢の感覚神経細胞の産生を制御することによって匂い刺激に対する神経応答やその個体の行動にまで影響を与えることを明らかにした。本研究結果は、動物が外環境からの匂いによって本能的に誘導される行動を制御する神経基盤の学術的な理解に寄与すると考えられる。心地よい匂いや不快な匂いは直接的に感情に作用するため、ヒトにおいても近年急増する精神疾患の1つである気分障害の症状緩和にも本研究の知見が役に立つことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Olfaction is important for the survival of animals. Olfactory sensory neurons (OSNs) are subdivided into two types, which detect odorous chemicals from the external environment. The zinc finger transcription factor Bcl11b regulates a cell fate determination of two OSN-types in the development. In this study, we examined physiological and behavioral responses to odorants on OSN-specific loss-of- and gain-of-Bcl11b function mutant mice. From analyses of these mutant mice, we demonstrate that the changes of peripheral neural input influences on an innate olfactory aversion behavior in mice.

研究分野：神経科学

キーワード：本能行動 遺伝子操作 嗅覚システム 神経回路 細胞分化 転写因子

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 学術的背景

嗅覚と動物の本能的な行動との間には密接な関連性があり、動物は匂い刺激に応じて食物探索、危険回避、生殖行動などの適応行動をとる。食物や危険物などに由来する匂い分子は鼻腔内の嗅上皮に存在する嗅神経細胞によって検出されている。マウスでは、嗅神経細胞は発現する嗅覚受容体遺伝子の種類によって Class I と Class II の 2 種類に分かれる。Class I 嗅神経細胞 (図 1、白細胞) は、主に嗅上皮背側領域に分布し、それらの軸索を一次中枢である嗅球の背側領域 DI に接続している。一方 Class II 嗅神経細胞 (図 1、黒細胞) は、嗅上皮全体に分布し、嗅上皮における細胞体の位置に対応して嗅球背側領域 DII から腹側領域 V にそれぞれ神経接続している。

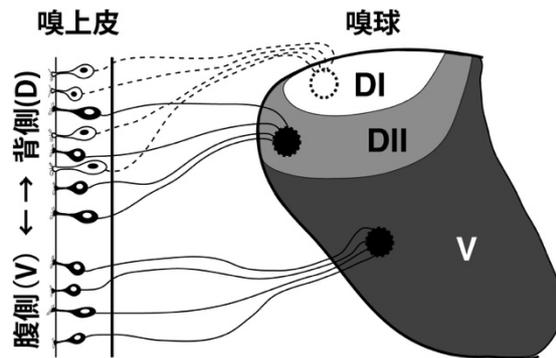


図1 2種類の嗅神経細胞から脳への神経接続
鼻腔内嗅上皮にある Class I 嗅神経細胞(白)と Class II 嗅神経細胞(黒)が脳の一部である嗅球の特定領域へと神経軸索を接続している。

嗅球の背側領域に存在する神経細胞は意欲や情動を司る脳領域へと神経接続しており、この嗅球背側領域を介した匂い情報の入力为天敵や腐敗臭に対する先天的な忌避行動に必須となる (Kobayakawa *et al.* *Nature* 2007; Igarashi *et al.* *J. Neurosci.* 2012)。近年、先天的な本能行動の神経基盤の理解が進みつつあるが、嗅球背側領域には Class I と Class II 嗅神経細胞の両方からの入力があることや、誘引する匂いの情報処理にも重要であることが報告されている。このように、2種類に分かれている嗅神経細胞の役割や、動物の誘引・忌避行動を引き起こす詳細な神経基盤の理解には未だ至っていないのが現状である。

(2) 本研究に至った経緯

これまでに研究代表者らは、ノックアウト(機能欠損型)マウスの解析によって“転写因子 Bcl11b”が Class I と Class II 嗅神経細胞の系譜選択を制御していることを明らかにし (図 2)、嗅覚系感覚神経細胞の分化において異なる種類の細胞への運命決定制御機構において Bcl11b を中心とした嗅覚系感覚神経細胞分化の新たなモデルを提唱している (Enomoto *et al.* *J. Neurosci.* 2011; Enomoto 未発表)。

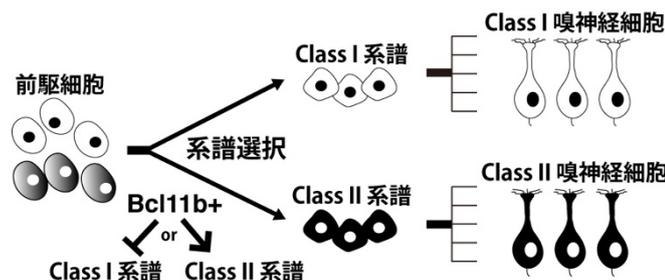


図2 2種類の嗅神経細胞分化における Bcl11b の機能
前駆細胞から成熟嗅神経細胞へと分化する過程において、転写因子 Bcl11b は Class I 系譜を抑制もしくは、Class II 系譜へ誘導することによって、2種類の嗅神経細胞の分化を制御している。

Bcl11b 機能欠損マウスでは、産生される嗅神経細胞タイプが異なり、匂いに対する応答も異なることが予想される。しかしながら、これまで用いていた全細胞で Bcl11b の機能を欠損するマウスは新生児致死のため、匂いによって誘導される行動と脳神経回路の関連性を正確に調べることが出来なかった。そこで、嗅神経細胞特異的 Bcl11b 機能欠損および獲得型変異マウスを作製し、これら変異マウス嗅上皮において産生される Class I と Class II 嗅神経細胞の変化と、末梢からの情報入力の変化が中枢神経回路形成と先天的な本能行動に与える影響を解明するために本研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では、Class I と Class II 型の嗅神経細胞の産生を遺伝学的に操作することにより、嗅覚を介した動物の本能行動の制御と、その神経基盤の解明を目指す。この目的を達成するために、嗅神経細胞特異的 Bcl11b 機能欠損・獲得型変異成体マウスを用いた以下の解析を行う。

- (1) 嗅覚システムにおける匂い応答の解析
- (2) 個体レベルにおける嗅覚を介した本能行動の解析
- (3) 嗅覚高次中枢神経回路の解析

これらの解析によって、動物が匂い物質によって引き起こされる本能的な行動発現のための神経基盤の理解に寄与することが期待できる。

3. 研究の方法

本研究では、細胞種特異的な *Bcl11b* 遺伝子改変成体マウスを作製し、それら変異マウスの嗅覚組織を用いた分子生物学的手法や組織化学的手法等によるマイクロレベルの現象の解析や、個体レベルでの現象を行動学的に解析した。用いた嗅神経細胞特異的 *Bcl11b* 機能欠損・獲得型変異マウスは、嗅神経細胞特異的 *Goofy* プロモーター (Kaneko-Goto *et al. J. Neurosci.* 2013) の下流に *Cre* 組み換え酵素コード配列を組み込んだトランスジェニックマウスと下記の2種類の変異マウスとの交配によって作製した。

嗅神経細胞特異的 *Bcl11b* 機能欠損型変異マウスは、*Bcl11b* 遺伝子に *loxP* 配列を組み込んだ遺伝子改変マウスとの交配によって嗅神経細胞特異的に *Bcl11b* 遺伝子を破壊した (図3左)。

嗅神経細胞特異的 *Bcl11b* 機能獲得型変異マウスは、新たに作製した *CAG* プロモーターの下流に *loxP-STOP-loxP-Bcl11b* 配列を組み込んだトランスジェニックマウスとの交配によって、嗅神経細胞で *Bcl11b* を強制的に発現させた (図3右)。

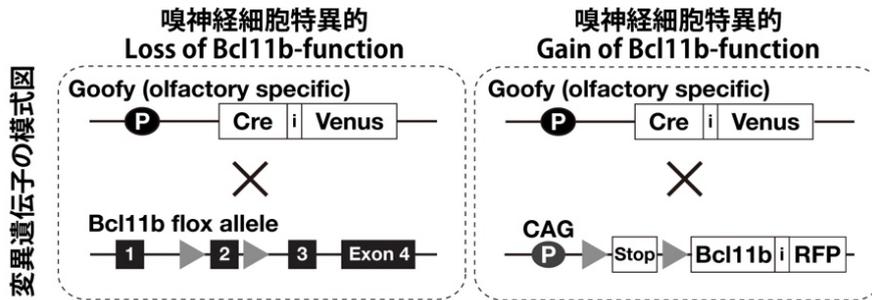


図3 嗅神経細胞特異的 *Bcl11b* 機能欠損・獲得変異
嗅神経細胞特異的 *Bcl11b* 機能欠損(左)と機能獲得(右)マウスの変異遺伝子の模式図。

以上の2種類の変異マウスを作製し、それらの成体マウスを以降の解析に用いた。

4. 研究成果

(1) 嗅覚システムにおける匂い応答の解析

作出した嗅神経細胞特異的 *Bcl11b* 機能欠損/獲得型変異マウス新生仔では、Class I と Class II 嗅神経細胞数が変化していた。この結果は一次感覚器官の嗅上皮における匂い応答の強度や、その入力を受ける一次中枢の嗅球への入力範囲にも変化が生じている可能性が考えられる。そこで、末梢レベルでの2種類の嗅神経細胞産生の遺伝学的操作による匂い応答への影響を明らかにするために、嗅神経細胞特異的 *Bcl11b* 機能欠損/獲得型変異成体マウスにおいて、①産生されている Class I と Class II 嗅神経細胞の解析および、②匂い物質に対する応答について神経活動マーカーを用いて解析した。

①産生されている Class I と Class II 嗅神経細胞の解析

それぞれの嗅神経細胞に特異的な受容体遺伝子の発現を *in situ* hybridization 法によって可視化し、陽性細胞数を定量化した。その結果、成体においても嗅神経細胞特異的 *Bcl11b* 機能欠損型変異マウスの嗅上皮背側領域では、Class I 嗅神経細胞が増加し、Class II 嗅神経細胞が減少していた。一方、機能獲得型変異では、Class I 嗅神経細胞が顕著に減少し、Class II 嗅神経細胞は増加していたもしくは、その変化に有意な差がなかった(図4)。これらのことから、嗅神経細胞特異的 *Bcl11b* 機能欠損・獲得型変異成体マウスでは、産生される2種類の嗅神経細胞のバランスが変化し、匂い情報の処理やその個体の行動にも影響が生じている可能性が考えられた。

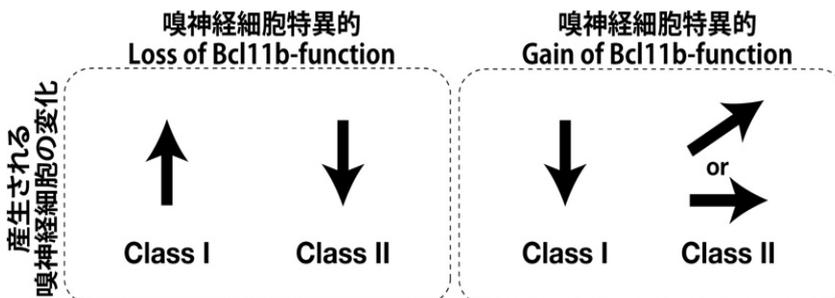


図4 機能欠損・獲得変異成体マウスにおける2種類の嗅神経細胞産生
嗅神経細胞特異的 *Bcl11b* 機能欠損(左)と機能獲得(右)成体マウス嗅上皮において産生される Class I と Class II 嗅神経細胞の変化。

②匂い物質に対する神経応答

同じ嗅覚受容体を発現する嗅神経細胞は嗅球の外側と内側それぞれ1つの糸球体にそれらの軸索を投射するため、嗅球における匂い刺激の情報は糸球体の発火パターンとして反映される。そこで、糸球体の発火と連動する傍糸球体細胞における即時型遺伝子 *Egr1* の発現を比較することによって匂い応答の変化を解析した。Class I 嗅神経細胞が検出している2メチル酪酸および、Class II 嗅神経細胞が検出している Trimethylthiazoline (TMT) を用いて各変異マウスに匂い刺激を与え、それぞれの嗅球糸球体層における *Egr1* 陽性細胞数を定量化し、その嗅球全体にわたる包括的な発火マップとして再構成した。その結果、変異マウス嗅球における糸球体の発火パターンやその強度は嗅上皮における Class I と Class II 嗅神経細胞数の変化と連動していることが明らかとなった。

(2) 個体レベルにおける嗅覚を介した本能行動の解析

産生される2種類の嗅神経細胞のバランスの崩壊が個体の行動にどのような影響を及ぼすのか明らかにするために、腐敗食物や天敵の匂いに対する先天的忌避行動を調べた。洗浄した飼育ケージの中に匂い物質を染み込ませた濾紙を提示し、マウスが匂いに対してケージ幅の3分の1以上離れた場所に存在する時間を忌避行動の指標として定量化し、比較した。腐敗食物に関連する匂いである2メチル酪酸に対する忌避行動は背側領域 Class I 嗅神経細胞を介し、天敵臭の TMT に対する忌避行動は背側領域 Class II 嗅神経細胞を介していると考えられている。2メチル酪酸や TMT に対して変異マウスが示す忌避行動の強さは、末梢で産生される2種類の嗅神経細胞数の変化や、一次中枢の嗅球における発火パターン・強度の変化と連動していることが明らかとなった。

(3) 嗅覚高次中枢神経回路の解析

末梢レベルで2種類の嗅神経細胞の産生を操作したことによる中枢への入力の変化が嗅覚高次中枢の神経回路形成において及ぼす影響を明らかにするために、嗅覚高次中枢における特定の匂い刺激による神経発火パターンを調べた。

匂い刺激によって活性化される嗅覚高次中枢領域が既に分かっている2メチル酪酸と TMT を用いて、2つの匂い刺激後の神経活動を上述した即時型遺伝子 *Egr1* の発現によって比較した。嗅球から直接神経入力がある脳領域では2メチル酪酸と TMT によって異なる領域が活性化されるが、嗅神経細胞特異的 *Bcl11b* 機能欠損・獲得変異によってそれらの活性化領域も変化している可能性を示唆する結果を得た。この結果は、末梢の嗅覚器官からの入力の変化がそれらの情報を処理する脳の嗅覚高次中枢における活性化状態にも影響を及ぼすことを示唆している。また順行性の蛍光神経トレーサーを用いて、直接嗅球から嗅覚高次中枢への神経接続の可視化を試みたが、蛍光色素の注入部位付近における拡散の影響が大きく詳細な神経接続パターンの解析が困難であった。1細胞レベルでの色素注入やウイルスを用いた標識細胞の特定化技術が必要になると考えられる。

以上の研究成果をまとめると、末梢の細胞特異的な転写因子の発現の操作によって、動物の本能的な忌避行動の制御が可能であることがわかった。本研究で得られた結果は、外環境からの匂い物質によって動物の本能的な快・不快を区別する神経基盤の理解に寄与する。心地よい匂いや不快な匂いは直接的に感情に作用するため、ヒトにおいても急増する精神疾患の1つである気分障害の症状緩和にも本研究の知見が役に立つ可能性が期待される。

<引用文献>

Enomoto T, Ohmoto M, Iwata T, Uno A, Saitou M, Yamaguchi T, Kominami R, Matsumoto I, Hirota J. “*Bcl11b/Ctip2* controls the differentiation of vomeronasal sensory neurons in mice.” *J. Neurosci.* (2012) 32, 7970-7985

Igarashi KM, Ieki N, An M, Yamaguchi Y, Nagayama S, Kobayakawa K, Kobayakawa R, Tanifuji M, Sakano H, Chen WR, Mori K. “Parallel mitral and tufted cell pathways route distinct odor information to different targets in the olfactory cortex.” *J. Neurosci.* (2012) 32, 7970-7985

Kaneko-Goto T, Sato Y, Katada S, Kinameri E, Yoshihara S, Nishiyori A, Kimura M, Fujita H, Touhara K, Reed R, Yoshihara Y. “Goofy coordinates the acuity of olfactory signaling.” *Journal of Neuroscience* (2013), 33(32), 12987-12996.

Kobayakawa K, Kobayakawa R, Matsumoto H, Oka Y, Imai T, Ikawa M, Okabe M, Ikeda T, Itohara S, Kikusui T, Mori K, Sakano H. “Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb.” *Nature* (2007) 450, 503-508

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計2件）

- (1) Suzuki H, Nishida H, Kondo H, Yoda R, Iwata T, Nakayama K, **Enomoto T**, Wu J, Moriya-Ito K, Miyazaki M, Wakabayashi Y, Kishida T, Okabe M, Suzuki Y, Ito T, Hirota J, Nikaido M. “A Single Pheromone Receptor Gene Conserved across 400 My of Vertebrate Evolution.” *Mol Biol Evol.* (2018), 35(12):2928-2939 (査読有)
- (2) Iwata T, Niimura Y, Kobayashi C, Shirakawa D, Suzuki H, **Enomoto T**, Touhara K, Yoshihara Y, Hirota J. “A long-range cis-regulatory element for class I odorant receptor genes.” *Nature Communications* (2017), 8(1):885 (査読有)

〔学会発表〕（計2件）

- (1) **Enomoto T**, Nishida H, Iwata T, Nakayama K, Fujita A, Kashiwagi T, Hatanaka Y, Ohmoto M, Kajitani R, Itoh T, Matsumoto I and Hirota J. “Bcl11b governs the binary fate of olfactory sensory neurons.” 第40回 日本神経科学会, 2017. 7. 20～7. 23、幕張メッセ、千葉県千葉市
- (2) 榎本孝幸、 “嗅神経細胞分化の遺伝学的操作による本能的な忌避行動の制御” 第4回ケモビ研究会、2017. 2. 17～2. 19、鶯宿温泉 赤い風車、岩手県雫石

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究代表者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：廣田 順二
ローマ字氏名：Hirota, Junji

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。