

令和元年6月14日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18377

研究課題名（和文）マウス嗅結節の入出力経路から探る適応的な嗅覚行動誘起の神経メカニズム

研究課題名（英文）Neuroanatomical pathways of the mouse olfactory tubercle and odor-induced adaptive behaviors

研究代表者

村田 航志（Murata, Koshi）

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：10631913

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）：ヒトを含めて動物は、匂いに対して適応的な行動反応を示す。以前の研究で、学習によって獲得した匂いに対する誘引行動および忌避行動には、嗅結節の活性化がともない、誘引行動時には前内側ドメインが、忌避行動時には外側ドメインが主に活性化することを見出した。本研究では、嗅結節の両ドメインから逆行性標識を行い、嗅球から嗅結節への軸索投射様式を評価した。またオプトジェネティクスを用いて嗅結節ドメインを操作し、ドメインごとに誘引行動または忌避行動が生じることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

嗅覚は意欲行動を促しやすい感覚であるが、嗅覚中枢での匂い情報の処理の仕組みはよくわかっておらず、脳が匂いに対して意欲を形成する神経メカニズムは十分には解明されていない。嗅結節はその接続様式から、大脳で処理された匂いの感覚情報を間脳・中脳へと伝達して行動出力をうながす領域だと予想された。本研究の成果により、嗅結節ドメイン構造から匂いで誘引行動や警戒行動が引き起こされる神経メカニズムの理解が進んだ。

研究成果の概要（英文）：Animals adaptively acquire motivated behavioral responses to odors according to their past experiences. I previously showed that learned odor-induced motivated behavior accompanies activation of the olfactory tubercle, a part of the olfactory cortex and ventral striatum, in a domain- and cell-type-specific manner. In this study, I performed retrograde tracing from the anteromedial and lateral domains of the olfactory tubercle to reveal the connectivity from the olfactory bulb and address whether the axonal projection from the olfactory bulb to the olfactory tubercle is topographic. In addition, optogenetic manipulation revealed that the domains of the olfactory tubercle play different roles in inducing attractive or aversive behaviors.

研究分野：神経科学

キーワード：神経科学 神経解剖学 嗅覚 嗅結節 嗅皮質 意欲 情動

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

匂いの情報は食べ物と結びつくとその匂いは誘引行動を引き起こし、危険と結びつくと警戒行動を引き起こすようになる。匂いの情報が過去の経験と結びついて適応的な意欲・情動行動を促す際には、嗅結節という脳領域の活動が変化する。マウスにある匂いがすると砂糖が得られる、もしくは電気ショックを受けることを学習させ、同じ匂い物質で誘引行動もしくは警戒行動という異なる行動反応を獲得させた。嗅皮質全体の活動性を最初期遺伝子 c-Fos の発現を指標にして観察し、誘引行動時と警戒行動時と比較したところ、ユニークな応答を示したのが嗅皮質内でも腹側線条体に含まれる嗅結節であった (Murata et al., 2015)。誘引行動時は、前内側ドメインのドーパミン受容体 D1 を発現する投射ニューロン (以下 D1 ニューロン) が活性化した。警戒行動時は、外側ドメインの D1 ニューロンと前内側ドメインのドーパミン受容体 D2 陽性の投射ニューロン (以下 D2 ニューロン) が活性化した。この結果から、嗅結節の前内側ドメインは誘引行動を、外側ドメインは警戒行動を制御し、D1 ニューロンは行動の促進を、D2 ニューロンは行動の抑制に関わることが示唆された。

どのような匂いが特定の神経細胞種を活性化しうるのか。また嗅結節の前内側・外側ドメインからそれぞれどのような出力経路で餌探索もしくは警戒行動が制御されるのか。これらの問いに答えるには、嗅結節のドメイン特異的、神経細胞種特異的な神経接続様式の理解が必要であった。

### 2. 研究の目的

#### (1) 嗅結節の入力経路の解析

匂いの感覚は動物に多様な生理・心理作用をもたらす。たとえば餌に関連づいた匂いに対しては誘引行動を獲得する。一方で同じ匂いでも、危険な目にあったときに嗅ぐと、警戒行動を獲得する。餌と関連づいた匂いへの誘引行動では嗅結節の前内側ドメインが、危険と関連づいた匂いへの警戒行動では嗅結節の外側ドメインが活性化されることを見いだした。

我々が様々な化学物質を匂いとして感じるができる。嗅覚の一次中枢である嗅球には「匂い地図」があるとわれ、匂いを感じる物質の情報はその化学構造に応じて嗅球の特定の空間領域へと情報が伝達される。そこで本研究では嗅球のどの領域から嗅結節の前内側ドメイン・外側ドメインに神経接続がなされるかを調べ、各匂いをもつ固有の誘引性・忌避性が生じる神経メカニズムに迫ることを目的とした。

#### (2) 嗅結節の出力経路の解析

嗅結節の前内側ドメインと外側ドメインからは、どのような神経路で誘引もしくは警戒行動へと至るのだろうか。嗅結節投射ニューロンにはドーパミン受容体 D1 と D2 を発現するサブタイプ、D1 ニューロンと D2 ニューロンが存在し、それぞれ行動の促進と抑制に関わると予想している。この予想をオプトジェネティクスを用いた神経操作実験で検証し、あわせて各嗅結節ニューロン群からの軸索投射先を解剖学的に同定することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 嗅結節の入力経路の解析

入力経路の解析には逆行性標識を用いた。軸索から取り込まれ細胞体へと輸送されるコレラ毒素サブユニット B を嗅結節の前内側ドメイン、または外側ドメインに局所注入する。これにより、嗅結節の両ドメインへ軸索を投射する神経細胞群を網羅的に標識できる。あらかじめ蛍光色素が付与されたコレラ毒素サブユニット B を用いて、嗅結節に投射する神経細胞を可視化し、特に嗅球投射ニューロンの分布を評価した。

コレラ毒素サブユニット B に加えて、後述する理由から改変型狂犬病ウイルスベクターを用いた逆行性標識実験を行った。この手法により、嗅結節の両ドメインから経シナプス性の逆行性標識が可能になった。

#### (2) 嗅結節の出力経路の解析

出力経路の解析では、Cre 依存的にチャネルロドプシンを発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた。前内側ドメインおよび外側ドメインにおいて D1 ニューロンと D2 ニューロンを区別してそれぞれオプトジェネティクスを用いて操作し、嗅結節の神経操作がマウスの行動に与える影響を評価した。マウスの誘引行動および忌避行動の測定にはリアルタイム場所嗜好性試験を用いた。行動試験の後、マウス脳の組織標本を作製し、嗅結節ニューロンの軸索投射先を観察した。

### 4. 研究成果

#### (1) 嗅結節の入力経路の解析

<コレラ毒素サブユニット B の嗅結節内側ドメインおよび外側ドメインへの局所注入>

嗅結節前内側ドメインへの注入では、嗅球の腹側に標識細胞が分布する傾向が見られた。

嗅結節外側ドメインへの注入では、嗅球全域に標識細胞が分布する傾向が見られた。

嗅結節の内側に投射する嗅球投射ニューロンの軸索は、嗅結節外側を経由して前内側へと入る。そのため、嗅結節外側へコレラ毒素サブユニット B を注入した場合、嗅結節前内側に投射する

嗅球投射ニューロンも標識される可能性が考えられた。

この結果を踏まえて、経シナプス性に逆行性標識が可能な改変型狂犬病ウイルスの注入実験を行った。

#### < 改変型狂犬病ウイルスの注入実験 >

嗅結節前内側ドメインへの注入では、嗅球の腹側に標識細胞が分布する傾向が見られた。

嗅結節外側ドメインへの注入では、嗅球の背側に標識細胞が分布する傾向が見られた。

#### ( 2 ) 嗅結節の出力経路の解析

嗅結節前内側ドメインの D1 ニューロンを光刺激すると、マウスは光刺激を受けた環境の滞在時間が長くなり、誘引的に作用した。

嗅結節前内側ドメインの D2 ニューロンを光刺激すると、マウスは光刺激を受けた環境の滞在時間が短くなり、忌避的に作用した。

嗅結節前内側ドメインの D1 ニューロンと D2 ニューロンの軸索投射を観察すると、どちらの場合も腹側淡蒼球が主要な軸索投射先の 1 つであった。

嗅結節外側ドメインの D1 ニューロンを光刺激すると、マウスは光刺激を受けた環境の滞在時間が短くなり、忌避的に作用する傾向が見られた。

#### 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 5 件 )

Koshi Murata, Tomoki Kinoshita, Yugo Fukazawa, Kenta Kobayashi, Kazuto Kobayashi, Kazunari Miyamichi, Hiroyuki Okuno, Haruhiko Bito, Yoshio Sakurai, Masahiro Yamaguchi, Kensaku Mori, and Hiroyuki Manabe

GABAergic neurons in the olfactory cortex projecting to the lateral hypothalamus in mice  
Scientific Reports 9, Article number: 7132 (2019) 査読有り

doi: 10.1038/s41598-019-43580-1

Koshi Murata, Tomoki Kinoshita, Yugo Fukazawa, Kenta Kobayashi, Akihiro Yamanaka, Takatoshi Hikida, Hiroyuki Manabe, and Masahiro Yamaguchi

Opposing roles of dopamine receptor D1- and D2-expressing neurons of the anteromedial olfactory tubercle in acquisition of place preference

Frontiers in Behavioral Neuroscience, Volume 13 Article 50 (2019) 査読有り

doi: 10.3389/fnbeh.2019.00050

Kazuki Shiotani, Hiroyuki Manabe, Yuta Tanisumi, Koshi Murata, Junya Hirokawa, Yoshio Sakurai, Kensaku Mori

Tuning of ventral tenia tecta neurons of the olfactory cortex to distinct scenes of feeding behavior

bioRxiv 455089 (2018) 査読無し

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/455089v1>

Wataru Murofushi, Kensaku Mori, Koshi Murata, and Masahiro Yamaguchi

Functional development of olfactory tubercle domains during weaning period in mice  
Scientific Reports 8, Article number: 13204 (2018) 査読有り

doi: 10.1038/s41598-018-31604-1

#### 村田 航志

嗅結節から探る匂いの質感形成の脳神経メカニズム

Is the olfactory tubercle involved in creating odor quality?

AROMA RESEARCH (フレグランスジャーナル社) No. 67 224-229 (2016) 査読有り

[ 学会発表 ] ( 計 9 件 )

村田 航志、木下 智貴、小林 憲太、眞部 寛之、深澤 有吾、山口 正洋

Effects of optogenetic stimulation of the mouse olfactory tubercle in place preference test

マウス嗅結節の光刺激が場所嗜好性試験に与える影響

第 41 回日本神経科学大会、神戸、2018 年 7 月

#### 村田 航志

マウス脳で探る匂いの誘引性と忌避性が生じる神経メカニズム

日本基礎心理学会第 36 回大会、大阪・茨木、2017 年 12 月

シンポジウム 2 「食と基礎心理学の接点」

木下 智貴、村田 航志、小林 憲太、深澤 有吾、山口 正洋、森 憲作、眞部 寛之  
視床下部外側野に投射するマウス嗅皮質領域の発見  
日本解剖学会 第 77 会中部支部学術集会、愛知・豊明、2017 年 10 月

村田 航志

嗅覚で誘起されるモチベーション行動への嗅結節の関与  
Involvement of the olfactory tubercle in odor-induced motivated behaviors  
日本味と匂学会第 51 回大会、神戸、2017 年 9 月  
若手の会シンポジウム「化学感覚と動物の生きる仕組み」

村田 航志、小林 憲太、深澤 有吾、山口 正洋、森 憲作、眞部 寛之

Identification of a novel subregion of the olfactory cortex projecting to the lateral hypothalamus in mice  
視床下部外側野に投射する嗅皮質亜領域の同定  
第 40 回日本神経科学大会、幕張、2017 年 7 月

石川 達也、村田 航志、黒田 一樹、深澤 有吾

Cellular and subcellular distribution of Na/K-ATPase isoforms in the mouse hippocampal and dentate gyrus neurons  
マウス海馬および歯状回神経細胞における Na/K-ATPase サブユニットアイソフォームの細胞膜上発現分布  
第 40 回日本神経科学大会、幕張、2017 年 7 月

村田 航志、小林 憲太、深澤 有吾、山口 正洋、森 憲作、眞部 寛之

視床下部外側野に投射する嗅皮質領域の発見  
第 2 回食欲・食嗜好の分子・神経基盤研究会、岡崎、2017 年 6 月

石川 達也、村田 航志、黒田 一樹、深澤 有吾

Na/K-ATPase alpha サブユニットのアイソフォーム多様性と脳内局在  
第 39 回日本神経科学大会、横浜、2016 年 7 月

Koshi Murata, Masamichi Mikame, Wataru Murofushi, Kazuto Kobayashi, Kensaku Mori, Masahiro Yamaguchi  
Involvement of the mouse olfactory tubercle in adaptation of learned odor-induced food-seeking behavior  
17th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT2016), Yokohama, Japan, June 2016

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.med.u-fukui.ac.jp/laboratory/brain/>

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

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。