

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 14 日現在

機関番号：32639

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19447

研究課題名(和文) 嗅覚高次中枢において神経回路機構を形成する分子メカニズムの探索

研究課題名(英文) Studying the molecular mechanisms in the olfactory cortex

研究代表者

斉藤 治美 (SAITO, Harumi)

玉川大学・脳科学研究所・特任助教

研究者番号：20311342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：外界を感知するための感覚機能は主に五感に分類されるが、あらゆる動物の五感進化の過程で環境に適応して各々の動物特有の発達を遂げてきた。本研究では、マウス嗅覚系において、すくみ行動を誘引する単一の受容体を用いて脳内神経回路の探索を基に行った。その結果、単一の受容体からの情報は、脳底に広がる広範囲の嗅皮質の各領域へと送られるが、特異的な投射パターンがあり、今回は、そのパターンの詳細と分類を鮮明に解析することが出来た。また、近年では、霊長類の大脳皮質視覚野の神経回路網の探索を行うための実験システムのセットアップに着手し、第1視覚野において遺伝子情報を解析する一連の実験系を作製することが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

五感を介して入力する感覚情報は、神経回路を基盤とした情報処理がなされているが、そのメカニズムは動物や知覚の相違によって異なる要素と共通の普遍的な要素がある。本研究では、神経回路の形成と動作原理を理解することを目的に、嗅覚が最も発達しているマウスを用いて抹消の嗅覚受容体の匂い分子結合様式から嗅皮質の探索を行った。その研究成果は、嗅覚の抹消から嗅皮質までの情報処理機構及び神経回路を知る上で重要な研究成果であった。更に現在、高等動物にみられる特徴的な高次の神経回路形成単位をを明らかにすることを目指して、マカクザルの大脳皮質視覚野において遺伝子情報を背景に細胞種のカテゴリ分けを行っている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was understanding the fundamental role of neural circuits in sensory systems from an evolutionary point of view, In this study, I have been analyzed the neural circuit inducing the innate emotional behavior in mouse olfactory system and currently I am setting up the system analyzing the neural circuit in macaque monkey visual cortex. In mouse olfaction, I examined the functional meaning of a single olfactory receptor (OR) that induce the freezing behavior and focused on analyzing the functional domain in the olfactory cortex. I found that the information of a single OR widely spread into the olfactory cortex, however, it also showed the distinct pattern, which reflects the function of an olfactory receptor and output behavior. Currently, I am making the gene libraries in macaque visual and prefrontal cortexes and preparing for future studies for analyzing the primate brain function and neural circuit.

研究分野：神経科学

キーワード：皮質 神経回路

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

動物の情動・行動の発動は、外界を感知し、その情報の価値付けによって決定される。外界を感知するための感覚機能は主に五感(嗅覚、味覚、視覚、聴覚、触覚)に分類されるが、あらゆる動物の五感は進化の過程で環境に適応して各々の動物特有の発達を遂げてきた。五感の情報処理機構の恒常的な働きは動物の生命の維持に非常に重要であり、人では、このような感覚の情報処理機構の欠如・欠損により正常な社会活動が困難になる。五感を介して入力する感覚情報は、神経回路を基盤とした情報処理がなされているが、そのメカニズムは動物や知覚の相違によって異なる要素と共通の普遍的な要素がある。

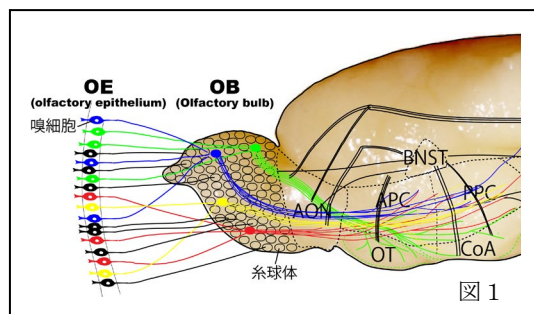
嗅覚は、実験動物であるマウスで非常に発達している。自然界には数万といわれるそれぞれ質感の異なった匂い分子が、鼻腔に局在する嗅覚受容体に結合し、その情報が脳内の嗅球へ伝えられ、更に嗅皮質を介して扁桃体、視床下部、海馬など高次領域へと伝達し、情動行動の誘引、記憶形成に至る。嗅覚の受容の仕組みは、長年、視覚受容機構と対比しながら仮設がたてられていたが、憶測の域でしかなかった。しかし、1991年に分子生物学的手法を用いて嗅粘膜から嗅覚受容体が単離され、受容体は、~1000ものゲノム上で最大のファミリーメンバーから成るG-蛋白結合共役型受容体であり、各々の嗅神経細胞には1種類の受容体のみが発現されることが報告された。そして更に改変マウスの解析によって同じ嗅覚受容体を発現する嗅神経細胞の軸索は収束して嗅球の特定の領域に投射され、嗅球の表層で糸球体を形成する、いわゆる嗅覚受容体 **Odor Map** を形成することが明らかにされた。本研究では、**Odor Map** から嗅皮質への情報伝達のメカニズムと単一の受容体から伝達される情報の出力に対する役割を明らかにすることが嗅覚の情報伝達の仕組みを理解する為に重要であると考え、研究を進めた。

霊長類で最も発達している知覚は視覚であるが、1次視覚野(V1)で視覚情報がどのように情報処理され色の識別、方位選択性、輝度などの特徴の抽出がされているのか、また、その情報がさらに高次の視覚領域に伝えられ情報処理されるのか、そのメカニズムを知るための研究がサルを用いてなされてきており、多くのことが明らかにされてきた。この特徴抽出にはコラム構造や層構造内での情報処理が非常に重要であり、これらの構造単位内には異なった細胞種がそれぞれ役割分担を果たしていると考えられるが、その細胞の種類、各々の役割については未だ明白にされていない。また、V4、下側頭葉などの側頭葉視覚連合野においては、物体像を生物(顔、手足)、無生物(人工物、風景)というカテゴリー別に分類した際に、これらに特異的に反応する細胞集団がクラスターを形成していることが明らかになってきたことから、これらの領域ではV1、V2とは質の異なった情報処理が展開されていると考えられ、側頭葉視覚連合野のこれらのクラスター内の神経活動や投射経路の相違を細胞種レベルで明らかにすることは、階層的情報処理のメカニズムを知る上で非常に重要であると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、神経活動の基本的動作原理および脊椎動物の進化や感覚器による情報処理機構の相違を明らかにすることを目的に、嗅覚が最も発達しているマウスを用いて嗅覚刺激によって誘引される情動行動を誘引する神経回路探索を行い、更に現在、霊長類の視覚系を用いて階層的な情報処理を行う神経回路網の探索を行う為に、大脳皮質視覚野の遺伝子解析を行うシステムをセットアップした。

嗅覚は他の知覚と比べると情動行動を誘引する脳領域に直接結びつく経路をより多く持つ感覚器であり、特定の匂い物質に誘引される様々な情動行動が報告されている。また、げっ歯類においては受容体を発現する嗅細胞、その軸索投射のターゲットとしての糸球体が、1:1:1であり、受容体の発現で末梢の神経の集合体を分類でき(図1)、この嗅覚の性質を利用して末梢から高次中枢、さらに出力に至るまで特異的な情動行動を誘引する神経回路を探索していくことで、脳内情報処理機構を知る上で重要な知見が得られる可能性があると考えられる。しかし、通常、単一の匂い物質は複数の受容体に結合し、複数の糸球体が特定の領域に分布する傾向にあり、匂いの識別はこの糸球体の活性パターン(odor map)の相違によってなされていると一般に考えられていた。本研究では、キツネの肛門腺から分泌される匂い分子 2, 4, 5-trimethyl thiazoline (TMT) が、マウスに先天的な恐怖行動(すくみ行動と忌避行動)を引き起こすことに着目し、TMTに特異的に活性化される単一の受容体を発現する糸球体 module のみを選択的に活性化および不活化出来るモデルシステムを



本研究では、キツネの肛門腺から分泌される匂い分子 2, 4, 5-trimethyl thiazoline (TMT) が、マウスに先天的な恐怖行動(すくみ行動と忌避行動)を引き起こすことに着目し、TMTに特異的に活性化される単一の受容体を発現する糸球体 module のみを選択的に活性化および不活化出来るモデルシステムを

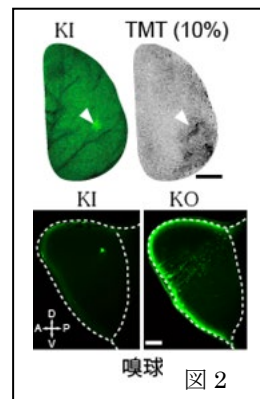
確立し、単一の受容体からの情報が、脳内にどのように伝達され、情動行動の誘引に関わるのかを明らかにするために、嗅皮質を中心に、神経活性と行動様式の相関関係を解析し、嗅覚の情報処理機構および恐怖行動の神経回路を知る手掛かりとした。

マカクザルの V1 において猫やげっ歯類には見られないペースメーカーと示唆される神経活動が確認されており、このような神経細胞を特定し、機能解析を行うことは、高等動物の脳内の高次の情報処理機構を知る上で非常に重要であると考えられ、遺伝子導入技術を用いた解析はそのような機能を明らかにする為の新しい知見が得られることが期待できる。よって本研究では、視覚野において遺伝子ライブラリーを作製して、マカクザルの視野皮質内における特異的な発現パターンを示す遺伝子を同定することを目指している。

### 3. 研究の方法

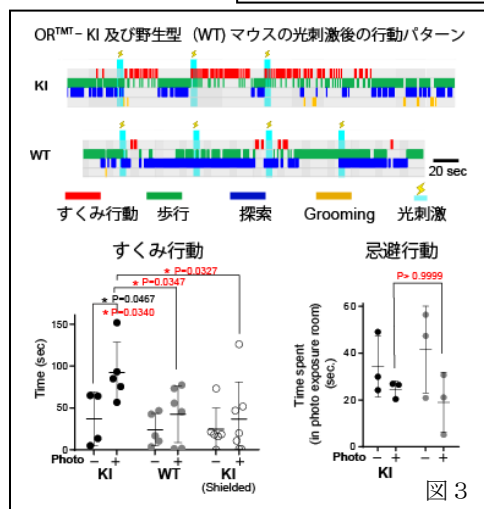
#### (1) マウスの嗅覚神経回路の探索

TMT に対する受容体遺伝子の同定は、optical イメージングや DiI 染色と single cell RT-PCR, および cAMP 依存性ルシフェラーゼ アッセイにより受容体を単一嗅細胞から単離する方法と、high-throughput スクリーニング (2, 3) による受容体遺伝子の特定する方法の 2 つの手法を組み合わせを行った。次にこれら TMT 反応性受容体の中からリガンド選択性の高い Olfr1019 (ORTMT) の遺伝子に対し、ChRWR (改変型チャンネルロドプシン) の遺伝子をつないだノックイン (KI) 及び受容体をノックアウトした (KO) マウスを作製し (図 2)、ORTMT を発現する糸球体に接続する 2 次ニューロンの活性や、2 次ニューロンの投射領域である嗅皮質における活性パターンの解析、及び行動実験を行った。また、KI マウスとウイルスベクターを用いた DREAD システムを用いることによって、嗅皮質の特異的な領域を不活化し、情動行動に影響を与える領域を検索した。



#### (2) マカクザル大脳皮質視覚野における神経回路の探索

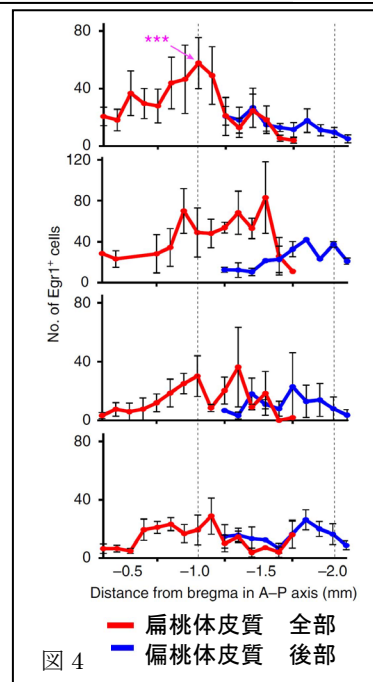
マカクザルの脳スライスを準備し、レーザー顕微鏡によって 1 次視覚野と前頭葉から層毎に細胞を採取し、mRNA を抽出し、遺伝子ライブラリーを作製した。マカクザルの脳は、脂質が多く、げっ歯類の脳細胞に比べ、mRNA の回収率が低かったため、効率よく mRNA を回収できる条件検討を行った。



### 4. 研究成果

#### (1) マウスの嗅覚神経回路の探索

KI マウスの解析の結果、ORTMT を発現する神経細胞からの情報は、すくみ行動) を選択的に誘因し、忌避行動には影響しないことが明らかになった。また、KO マウスの解析では、この 1 対の糸球体が消失しても、すくみ行動が完全に消失することはなかった (図 3)。更に 2 次ニューロン及び嗅皮質 (嗅結節、梨状用皮質、扁桃皮質、前嗅核) において、単一の受容体からの情報を受け取る領域が匂い分子の入力と比べ、明瞭なパターンとして観察でき、ORTMT からの情報は、他の受容体と比較すると、扁桃皮質の一部の領域への情報入力が顕著に見られた (図 4)。このことによって嗅球で集約された単一の受容体からの情報は、嗅皮質の各領域への投射は法則性を持ち、受容体によって非常に特徴的に収束している領域が存在するということが分かった。DREAD システムによる嗅皮質の不活化の実験から、特徴的な分布を示す領域は、受容体の機能を反映することが示唆された。



#### (2) マカクザル大脳皮質視覚野における神経回路の探索

マカクザルの第 1 次視覚野 (V1) において遺伝子発現を背景とした神経集団を特定するために、各層毎に局在する細胞群、あるいは、層内の類似した形状を持つ細胞に対して遺伝子ライブ

ラリーを作製し、発現パターンの解析を行った結果、V1 には前頭葉と異なる遺伝子群が存在することが確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Saito Harumi, Nishizumi Hirofumi, Suzuki Satoshi, Matsumoto Hideyuki, Ieki Nao, Abe Takaya, Kiyonari Hiroshi, Morita Masahiko, Yokota Hideo, Hirayama Nozomi, Yamazaki Takahiro, Kikusui Takefumi, Mori Kensaku, Sakano Hitoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Immobility responses are induced by photoactivation of single glomerular species responsive to fox odour TMT	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 16011 ~ 16011
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/ncomms16011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齋藤 治美, 西住 裕文, 鈴木 悟, 松本 英之, 家城 直, 阿部 拓哉, 清成 寛, 横田 秀夫, 森田 正彦, 平山 望, 菊水 健史, 森 憲作, 坂野 仁
2. 発表標題 Immobility responses are induced by photoactivation of single glomerular species responsive to fox odour TMT. 光遺伝学操作による単一の糸球体の活性により誘因される恐怖行動の探索
3. 学会等名 第56回 日本生物物理学会 シンポジウム 化学感覚の新コンセプト(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤治美 西住 裕文, 鈴木 悟, 松本 英之, 家城 直, 阿部 拓哉, 清成 寛, 横田 秀夫, 森田 正彦, 平山 望, 菊水 健史, 森 憲作, 坂野 仁
2. 発表標題 Elucidating the Neural Circuit Inducing a Fear/Aversive Behaviors in the Mouse Main Olfactory System..
3. 学会等名 第1回 大脳基底核機能研究会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤治美
2. 発表標題 Photo-activation of a single pair of glomeruli specific to a fox odorant elicits an immobility response in mice.
3. 学会等名 第40回神経科学学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>[招待講演] 1. 齊藤治美 Photo-activation of a single pair of glomeruli specific to a fox odorant elicits an immobility response in mice. 招待講演 広島大学医学部 (広島) 2017年7月 26日 2. 齊藤治美 Studying the Neural Network with a Focus on a Single Olfactory Receptor (OR) Module in the Mouse Main Olfactory System 招待講演 名古屋大学理学部 2017年11月22日</p>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----