

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14712

研究課題名（和文）神経活動依存的な嗅回路構築の原理の解明

研究課題名（英文）Cell-type-specific patterned activities specify gene expression patterns for olfactory circuit formation

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）：本研究では、マウス嗅覚系における神経活動依存的な神経回路の形成機構を解明すべく、嗅細胞における神経活動の記録および操作の実験を行った。その結果、個々の嗅細胞に発現する嗅覚受容体という情報は神経活動の自発発火パターンへと変換されること、それぞれの神経活動パターンは異なる軸索選別分子の発現を誘導すること、嗅覚受容体の種類という情報は神経活動パターンを介して分子発現を誘導し、それらの分子発現によって回路の精緻化が行われることを明らかにした。この結果は、『神経活動の同期性』を前提としたヘブ則とは異なる『神経活動の時間的なパターン』に基づいた新奇の回路形成機構が存在することを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発達期における神経細胞の適切な活動とそれに伴う回路の成熟は、その後の我々の高度な行動・機能発現に極めて重要な役割を果たすことが知られている。したがって、その機構の解明は神経科学における重要なテーマの一つである。本研究課題の成果は、神経活動依存的な回路形成の新奇メカニズムの存在を意味しており、嗅覚系のみならず他の脳領域においても複雑なネットワークを構築する仕組みとして敷衍できる可能性があると期待される。

研究成果の概要（英文）：During development, axons from various olfactory neurons expressing the same olfactory receptor (OR) segregate into specific glomeruli in an activity-dependent manner. We found that OSNs exhibited OR-specific temporal patterns of spontaneous activities. Moreover, differing patterns of neuronal activity induced different expression patterns of axon-sorting molecules that regulate glomerular segregation. We propose an activity-dependent mechanism that is fundamentally different from the Hebbian plasticity theory in which cell-type-specific patterned activity contributes to generating the combinatorial code of axon-sorting molecules for the olfactory map refinement.

研究分野：分子神経科学

キーワード：嗅覚 発生 神経活動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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、嗅神経の大まかな投射の位置は遺伝的に決定されており、神経活動は最終的な軸索収斂の過程において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。申請者の所属する研究グループは、嗅細胞の神経活動が軸索同士の選り分けに機能する複数の細胞接着分子の発現を制御しており、発現する OR の種類特異的にこの細胞接着分子群の発現プロファイルが決定されることが OR 特異的な軸索収斂の分子的基盤であることを明らかにした。しかしながら、神経活動のどのようなパラメーター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。

我々は、軸索選別分子の中でも Kin of IRRE-like protein 2 (Kirrel2)、Protocadherin-10 (PCDH10)および Semaphorin-7A (Sema7A)に着目し、嗅球上の約 1,800 個の糸球体における軸索選別分子の発現レベルを調べた。その結果、PCDH10 と Sema7A の間には強い相関関係が見られた一方で、Kirrel2 と PCDH10 の間には相関関係が見られなかった。これらの結果から、神経活動を介して発現する軸索選別分子の中でも、PCDH10 と Sema7A には共通の発現制御機構が存在し、Kirrel2 と PCDH10 では異なる発現制御機構が存在すると想定された。この結果をもとに、本研究課題ではこれらの異なるクラスに分類される軸索選別分子の発現が嗅覚受容体および神経活動によってどのように制御されているかを明らかにすることを試みた。

2. 研究の目的

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、同じ OR を発現する多数の嗅細胞からの神経活動記録と統計解析を通じて、軸索収斂分子の神経活動を介した具体的な遺伝子発現制御を明らかにし、当グループが提唱したモデルの妥当性、普遍性の検証を目指す。具体的な実験は、

神経活動の可視化、活動電位と対応関係の検証

神経活動の記録と大規模解析

神経活動と回路構築の人為的操作

の3つのサブテーマに分割して遂行する。

3. 研究の方法

神経活動の可視化、活動電位と対応関係の検証

神経活動は、活動電位と呼ばれるパルス単位とするスパイク列として表現される。神経活動を記録する方法としては、古典的なパッチ電極を用いた電気生理学的手法とカルシウムイメージングの二つの方法が挙げられる。カルシウムイメージング法はカルシウムイオンとの結合により蛍光強度の変化するセンサータンパク質を利用する。神経細胞において活動電位が発生すると、電位依存性カルシウムチャンネルが活性化し、細胞内におけるカルシウム濃度が一過的に上昇する。このカルシウム濃度変化をモニターすることによって細胞の神経活動を間接的・視覚的に検出することができる。近年カルシウムセンサーの改良が進められ、単一スパイクレベルでの神経活動を記録できるようになった。本申請課題では、現時点で最も時間分解能の高いカルシウムセンサータンパク質である GCaMP6f を嗅細胞特異的に発現するマウスを作製し、神経活動パターンの検出に用いた。

神経活動の記録と大規模解析

異なる種類の嗅覚受容体を発現する嗅細胞で特異的に GCaMP6f を発現する遺伝子改変マウスを作製し、カルシウムイメージングを行った。記録したカルシウム変動パターンから、様々な特徴量を抽出し、多変量解析、機械学習によって、嗅細胞において発現する OR の種類と神経活動パターンの関係性、発現する軸索選別分子の発現と神経活動パターンの関係性をそれぞれ解析した。

神経活動と回路構築の人為的操作

神経活動パターンと軸索選別分子の発現の因果関係を検証するため、青色光依存的に活性化する陽イオンチャンネルであるチャンネルロドプシン 2 (ChR2) を用いた光遺伝学的手法により嗅細胞の神経活動を操作する実験を行った。当該課題の準備段階において、ChR2 を発現する嗅細胞に対しパルス状に青色光を照射することで、ミリ秒の単位で神経活動を人為的に操作可能であるという結果を予備的実験により明らかにした。

4. 研究成果

まず、回路が発達する時期の嗅神経の自発的な神経活動を観察するため、生後 1 週以下の嗅細胞特異的 GCaMP6f マウスについて、嗅上皮急性スライスに対するカルシウムイメージングを試みた。今回、我々は高感度カルシウムセンサーを用いたことで、嗅細胞の自発的な神経活動を検出することに成功した。嗅細胞においては、発達期の他の脳領域で観察されるような同期した神経活動の波は観察されず、一方で、頻度・持続時間などの点について細胞ごとにユニークなカルシウム流入パターンが観察された (図 1)。

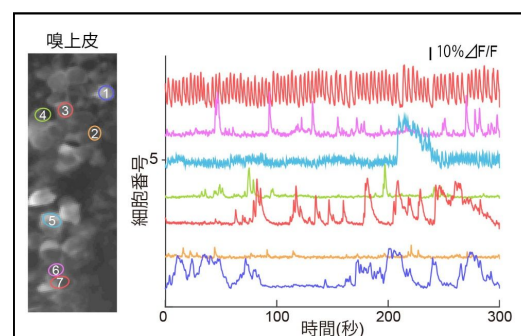


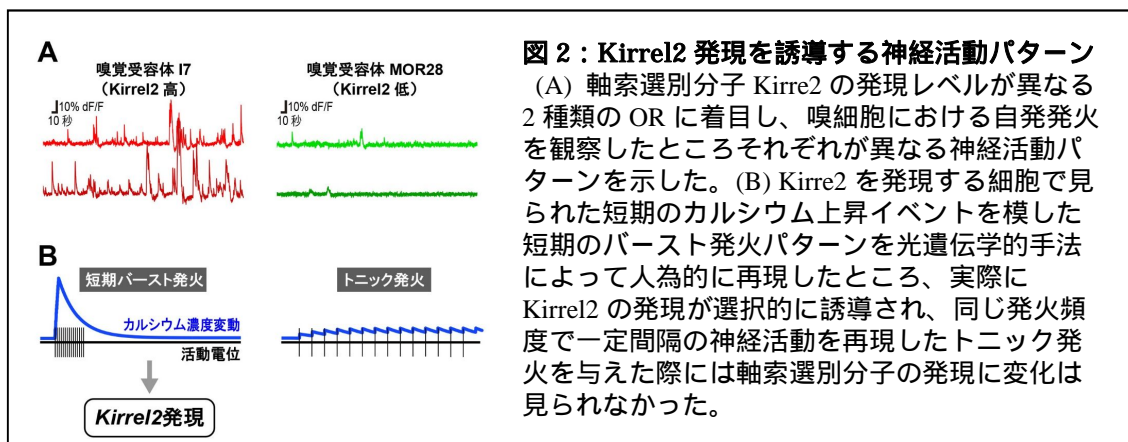
図 1: 嗅細胞における自発活動の可視化
嗅細胞においてカルシウムセンサータンパク質である GCaMP6f を発現するマウスにカルシウムイメージング法を適用し、神経活動を観察したところ、細胞ごとに異なる多様なパターンの自発的な神経活動が見られた。

次に、特定の嗅覚受容体を発現する嗅細胞ごとの神経活動パターンを比較した。着目する

軸索選別分子の発現量に基づき、2種類の嗅覚受容体 I7(Kirrel2 高発現)と MOR28(Kirrel2 低発現)を選択し、それぞれの受容体を発現する嗅細胞で神経活動のパターン(カルシウムスパイク頻度、スパイクの形、スパイク間の間隔)を解析した。その結果、同じ受容体を発現する嗅細胞の集団は同様の神経活動のパターンを示す一方で、異なる嗅覚受容体を発現する嗅細胞は異なる神経活動のパターンを示すことが見出された(図 2A)。また、軸索選別分子の発現レベルの違いに着目して神経活動パターンを比較したところ、神経活動パターンと各軸索選別分子の発現パターンに対応関係が見られた。

-1

生後2週令の嗅細胞特異的 ChR2 マウスを用い、青色光を照射することで様々な神経活動パターンを人為的に誘導可能な実験系を構築した。まず I7 発現細胞に見られた繰り返し生じる短期のバースト発火を模した神経活動パターンを誘導し、3つの軸索選別分子の mRNA 発現レベルを検証したところ、Kirrel2 の発現のみが選択的に上昇された(図 2B)。また、このとき全体の発火頻度を保ったまま、均等な間隔で刺激を行うトニック発火を誘



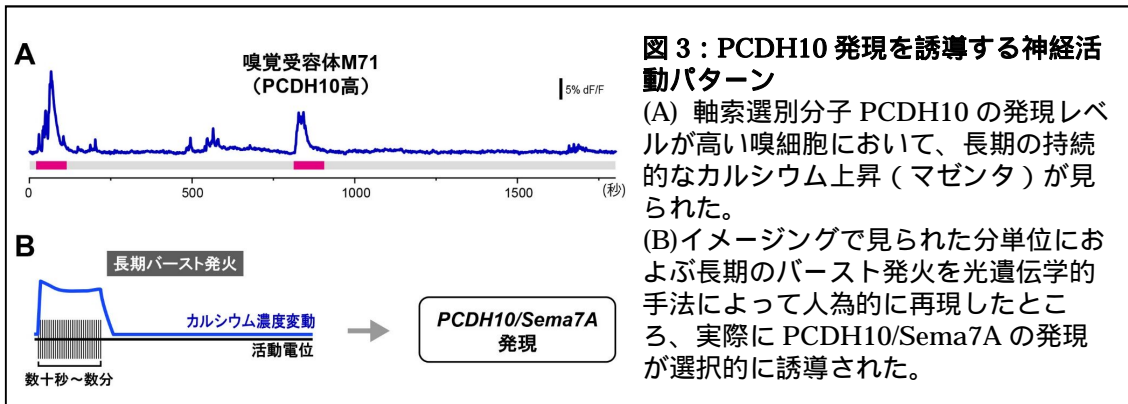
導した場合には、Kirrel2 の発現の上昇は見られなかった。この結果から、細胞における発火の頻度そのものではなく、“繰り返し起こる短期の一過性のバースト発火”という特定の時間的な神経活動パターンが Kirrel2 という特定の軸索選別分子の発現誘導に重要であることが示唆された。

-2

Kirrel2 の発現を誘導する短期の一過性のバースト状発火を再現した際には、PCDH10 および Sema7A の発現に変化は見られなかった。この結果より、軸索選別分子の大規模発現解析の結果からも示唆されていた通り、PCDH10/Sema7A の発現誘導には Kirrel2 とは異なる神経活動パターンが寄与していることが予想された。そこで、PCDH10 の発現量が異なる 2 種類の OR、M71 (PCDH10 高発現) および MOR28 (PCDH10 低発現) に着目し、

の実験よりも長時間にわたって神経活動の記録を行った(図 3A)。嗅覚組織スライスを用いた 1 時間近くに及び長期カルシウムイメージングにより、M71 を発現する嗅細胞においてのみ、20 秒を超えた長期間の持続的なカルシウム濃度上昇を伴う特徴的なカルシウムスパイクが観察された。この結果を受けて、嗅細胞に対して光遺伝学的手法を用い、長期バースト発火を模倣的に誘導した。具体的には、前述と同様のマウスの嗅上皮に対し、1 時間に一回、数十秒から数十分に及び 100 ミリ秒間隔の光刺激を行った。この操作により、

PCDH10/Sema7A の発現は上昇し、一方で Kirrel2 の発現量は変化しないことがわかった (図 3B)。このことから、“一過性の長時間に及ぶバースト発火” は PCDH10/Sema7A の特異的な発現誘導に必要なパターンであると結論づけた。



以上の一連の結果より、嗅細胞の回路構築は、「神経活動パターン」という時間的な情報に基づいて行なわれることが明らかとなった。また、異なる神経活動パターンは、異なる軸索選別分子の発現を活性化したことから、発現する嗅覚受容体の情報が多様な神経活動パターンへと変換され、個々の神経細胞の個性を反映した多様かつ特異的な軸索選別分子の「分子コード」を作り出すことで、嗅球上の複雑かつ精緻な回路構築が可能にしていると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakashima, A., Ihara, N., Shigeta, M., Kiyonari, H., Ikegaya, Y., Takeuchi, H.	4. 巻 365
2. 論文標題 Structured spike series specify gene expression patterns for olfactory circuit formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 eaaw5030
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.aaw5030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katori K, Manabe H, Nahashima A, Eerdunfu, Ikegaya Y, and Takeuchi H	4. 巻 48
2. 論文標題 Sharp wave-associated activity patterns of olfactory cortical neurons in the mouse piriform cortex	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 3246-3254
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ejn.14099	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 1件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Nakashima, A., Ihara, N., Ikegaya, Y., Takeuchi, H.
2. 発表標題 The temporal pattern of neuronal activity rather than its synchronicity refines olfactory codes in the brain
3. 学会等名 The 48th Naito Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakashima, A., Ihara, N., Ikegaya, Y., Takeuchi, H.
2. 発表標題 Cell-type-specific patterned activities specify gene expression patterns for olfactory circuit formation
3. 学会等名 ISMNTOP/YRUF/AISCRIB2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中嶋藍、伊原尚樹、池谷裕二、竹内春樹
2. 発表標題 嗅神経回路形成のメカニズム
3. 学会等名 第140回日本薬理学会関東部会シンポジウム・次世代薬理学セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中嶋藍、伊原尚樹、池谷裕二、竹内春樹
2. 発表標題 神経活動パターン依存的な嗅覚回路形成
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊原尚樹、中嶋藍、池谷裕二、竹内春樹
2. 発表標題 神経活動パターン依存的な嗅覚神経回路の形成機構
3. 学会等名 日本味と匂学会第53回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中嶋藍、伊原直樹、香取和生、池谷裕二、竹内春樹
2. 発表標題 嗅覚梨状皮質の細胞種分類
3. 学会等名 第53回日本味と匂学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊原尚樹、中嶋藍、池谷裕二、竹内春樹
2. 発表標題 神経活動パターンに依存した嗅覚神経回路の形成機構
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中嶋藍、伊原尚樹、池谷裕二、竹内春樹
2. 発表標題 Structured spike series specify gene expression patterns for olfactory circuit formation
3. 学会等名 第22回日韓薬理合同セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 香取和生、竹内春樹
2. 発表標題 梨状皮質における睡眠時の神経活動
3. 学会等名 The 6th Chemosensation and Behavior Workshop
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内春樹、中嶋藍、伊原尚樹、池谷裕二
2. 発表標題 A non-Hebbian activity-dependent mechanism underlying olfactory circuit formation
3. 学会等名 日本味と匂学会第52回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山下龍馬、中嶋藍、野仲航司、伊原尚樹、井ノ口霞、エルドンフ、池谷裕二、竹内春樹
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第139回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 香取和生、眞部寛之、中嶋藍、エルドンフ、佐々木拓哉、池谷裕二、竹内春樹
2. 発表標題 嗅覚皮質における睡眠時の規則的な神経活動
3. 学会等名 東京大学こころの多様性と適応の統合的研究機構シンポジウム「こころの適応を探る」
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeuchi H, Nakashima A, Ihara N and Ikegaya Y
2. 発表標題 Patterned, but not synchronous spontaneous activity of developing olfactory neurons regulates olfactory receptor-specific axon sorting
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Molecular Mechanisms of Neuronal Connectivity
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Katori, K., Manabe, H., Nakashima, A., Sasaki, T., Ikegaya, Y., Takeuchi H
2. 発表標題 Sequential activities of cortical neurons in the mouse piriform cortex during sharp wave
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia Conference
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeuchi H, Nakashima A, Ihara N and Ikegaya Y
2. 発表標題 Patterned, but not synchronous spontaneous activity of developing olfactory neurons regulates olfactory receptor-specific axon sorting
3. 学会等名 Gordon Research Conference: Molecular and Cellular Neurobiology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ihara N, Nakashima A, Nonaka K, Ihara N, Ikegaya Y, and Takeuchi H
2. 発表標題 A Combinatorial expression of axon-sorting molecules ensures robustness to neural activity changes for neural map formation in the mouse olfactory system
3. 学会等名 Gordon Gordon Research Conference: Molecular and Cellular Neurobiology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakashima A, Ihara N, Ikegaya Y, Takeuchi H
2. 発表標題 Patterned, but not synchronous spontaneous activity of developing olfactory neurons regulates olfactory receptor-specific axon sorting
3. 学会等名 22nd Biennial Meeting of the International Society of Developmental Neuroscience
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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