

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19500286

研究課題名（和文）ゼブラフィッシュの匂い応答行動を制御する神経回路形成機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of neural circuit mechanism underlying olfactory behaviors in zebrafish

研究代表者

小出 哲也 (KOIDE TETSUYA)

独立行政法人理化学研究所・シナプス分子機構研究チーム・研究員

研究者番号：30247837

研究成果の概要：嗅覚は、生物の生存に不可欠な行動（餌の探索行動や危険回避行動など）を支える重要な感覚である。この嗅覚行動を神経回路レベルで理解するため、哺乳動物に比べ単純な嗅覚神経系を持つ脊椎動物ゼブラフィッシュを用い、匂い刺激応答行動に必要な神経回路の解析を行なった。その結果、アミノ酸への誘引行動に必須な神経回路を同定した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：分子・細胞神経科学、行動

1. 研究開始当初の背景

嗅覚は、ヒトを含む多くの生物で、摂食行動、危険回避行動、繁殖行動などの生命活動に不可欠な役割を果たしている。匂いの成分である化学物質（匂い分子）は、鼻の奥に存在する嗅細胞に発現する嗅覚受容体と結合する。嗅覚受容体遺伝子は、ヒトでは約 350 種類、マウスでは約 1,300 種類、魚では約 200 種類存在しているが、それぞれの嗅細胞はそのレパートリーの中からたった 1 種類の嗅覚受容体を選択して発現し、特定の化学構造を持つ匂い分子だけを認識する。その匂いの情報は、嗅細胞の軸索（嗅神経）を介して、脳の前方に位置する嗅球と呼ばれる一次の情報処理中枢に伝わる。嗅球に伝わった匂い

分子の情報は、それらの化学構造を基本要素とした「匂い地図」として嗅球に展開される。同じ受容体を持つ嗅細胞の軸索は、嗅球表面に並ぶ多くの糸球体のうちの特定の糸球体と接続している。このように鼻から脳への精密な神経配線が、多種多様な匂い分子の検出・識別を可能にしている。1991 年の嗅覚受容体遺伝子の発見以来、匂いの受容機構と鼻から脳への神経接続様式については非常に多くのことが解明されてきた。しかしながら「好き」な匂いへの誘引反応や「嫌い」な匂いからの忌避反応といった匂いによって喚起される行動を司る神経配線様式がどのようになっているのかは、これまでほとんど報告されていなかった。

2. 研究の目的

そこで本研究では哺乳動物に比べ単純な嗅覚神経系を持つ脊椎動物ゼブラフィッシュを用い、研究期間内に嗅覚応答行動の神経回路解明の基盤となる実験系を確立し、匂い刺激応答行動に対応する神経回路の同定・解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本申請課題を進めるにあたり、嗅覚応答行動とその神経回路形成機構の解明へ向けて、以下の異なる視点から研究を行った。

(1) 特異的嗅覚神経回路の可視化。

特定の嗅覚神経回路を可視化するために、酵母由来の転写因子 Gal4 を嗅覚神経系に発現する遺伝子トラップゼブラフィッシュを樹立する。Gal4 はその結合配列 UAS に結合することにより下流遺伝子を発現させる。Gal4 遺伝子をゲノム内のさまざまな位置に挿入した Gal4 遺伝子トラップ系統と UAS の下流に GFP をつないだレポーターフィッシュを掛け合わせることで、次世代で Gal4 発現細胞特異的に GFP の蛍光が観察できる(図1)。

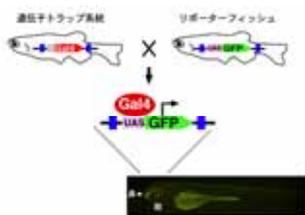


図1 Gal4 / UAS システムを用いた嗅覚神経回路の可視化。鼻に GFP を発現する遺伝子トラップ系統

得られた遺伝子トラップ系統について、嗅覚神経に発現する分子マーカを用いどのような種類の嗅細胞に Gal4 が発現しているのかを明らかにするため、また嗅細胞の軸索が嗅球のどこに投射するのかを調べる。

(2) 嗅覚行動を引き起こす匂い分子の探索

一般的にアミノ酸、胆汁酸などは、魚に対し誘引行動を、魚の皮膚抽出物質は忌避反応を引き起こす匂い物質であることが報告されているが、ゼブラフィッシュにおいて、各種匂い分子と嗅覚行動を網羅的に詳しく調べた報告はない。そこでゼブラフィッシュの嗅覚行動を解析するシステムを確立する。

(3) 特定の神経回路の機能障害による神経回路機能の特定

Gal4 遺伝子トラップ系統は UAS の下流につなげた神経機能調節因子を発現する系統と掛け合わせることで Gal4 発現細胞特異的に神経機能の調節が可能となる。本項目では、

シナプス小胞のエキソサイトーシスを担う synaptobrevin を切断する破傷風毒素を発現させることで神経伝達を遮断することを試みる。

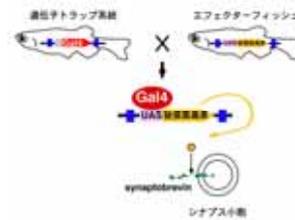


図2 嗅覚神経回路の遮断方法

4. 研究成果

(1) 特異的嗅覚神経回路の可視化。

遺伝子トラップ法により嗅覚神経系の少数の細胞を Gal4 で標識した複数のトランスジェニックフィッシュの作製に成功した。さらに Gal4/GFP を発現する嗅細胞は嗅球内の異なる系球体群に神経線維を投射することが分かった。さらに遺伝子トラップ系統のうち SAGFF27A は、嗅球の外側部に軸索神経線維を投射する微絨毛嗅細胞に主に GFP を発現することを見いだした(図3)。これらの結果から、作製したトランスジェニック遺伝子トラップゼブラフィッシュは、異なった種類の嗅細胞からの情報を伝える嗅覚神経回路を可視化できることが分かった。

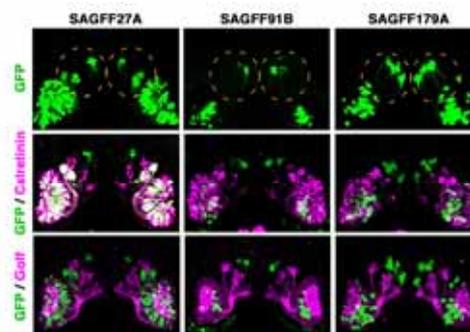


図3 異なる嗅細胞に GFP を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ(稚魚での観察) Calretinin (微絨毛嗅細胞に主に発現する)、Golf (繊毛嗅細胞に発現する)

(2) アミノ酸による誘引行動に嗅覚が必要以前の研究から、アミノ酸が微絨毛嗅細胞を活性化することが報告されていた。そこで、アミノ酸によって喚起されるゼブラフィッシュの行動について観察した。その結果、正常なゼブラフィッシュ(野生型)は、アミノ酸へと誘引されることを見いだした(図4左)。さらに、ゼブラフィッシュの鼻を外科的に除去すると、アミノ酸への誘引反応が消

失することから、この行動が嗅覚に依存することが分かった(図4右)。

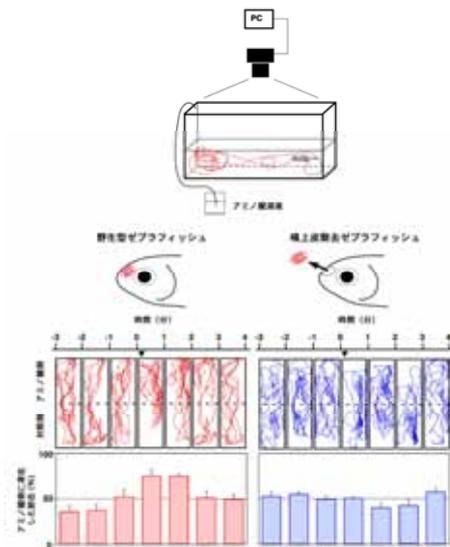


図4 ゼブラフィッシュはアミノ酸への誘引反応を示す(上図)嗅覚行動解析システム

長方形の水槽を泳ぐゼブラフィッシュを上部からビデオ撮影をし、アミノ酸溶液投与前(-3~0分)と投与後(0~4分)の遊泳の軌跡を解析した。

(下図)嗅覚行動解析結果

野生型ゼブラフィッシュに、水槽の片側からアミノ酸溶液を投与すると、アミノ酸投与側への誘引反応を観察(左)。アミノ酸溶液投与の時間、場所を矢尻で示す。鼻を外科的に取り除いた魚ではこの誘引反応は見られない(右)。

(3) アミノ酸による誘引行動を引き起こす神経回路の同定

次に、Gal4/GFPを発現する嗅細胞の機能を明らかにするために、特定の嗅細胞からの神経伝達を遮断したトランスジェニックゼブラフィッシュを作製し(図2)、アミノ酸への誘引行動の変化を観察した。その結果、嗅球の外側部へと入力する微絨毛嗅細胞からの神経伝達を遮断したゼブラフィッシュでは、アミノ酸への誘引反応が消失した(図5)。嗅球の別の領域へと入力する他ほかの神経伝達を遮断しても、正常にアミノ酸へと誘引されることから、嗅球の外側部へと神経線維を投射する微絨毛嗅細胞からの神経回路が、アミノ酸への誘引行動に不可欠なことが示唆された。以上の結果は、感覚入力(匂い)と機能的出力(行動)を介在する神経回路の理解に、大きく貢献すると考えられる。

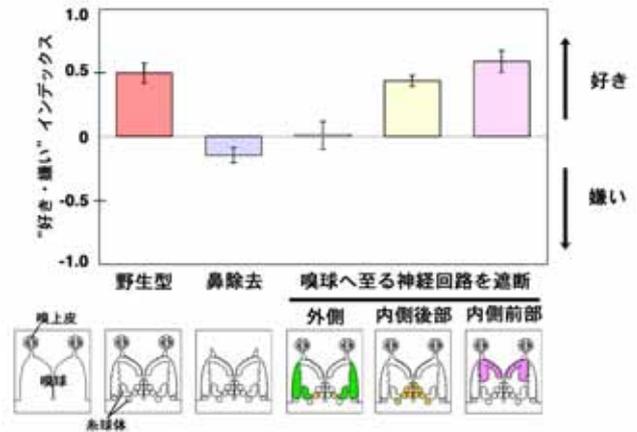


図5 鼻から嗅球の外側部に至る神経回路がアミノ酸への誘引に重要な役割を持つ

鼻から嗅球への異なる神経回路を遮断した時のアミノ酸への誘引度を“「好き・嫌い」”インデックスで示す。嗅上皮除去(鼻除去、青;左から2番目)と微絨毛嗅細胞から嗅球外側部系球体に至る神経回路(緑;左から3番目)を遮断(緑;左から3番目)したゼブラフィッシュではアミノ酸への誘引を示さないが、鼻から内側後部(黄;左から4番目)と内側前部(ピンク;右端)に位置する系球体への神経回路を遮断した場合は、野生型と同様、正常にアミノ酸への誘引を示すことが分かる。

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)

Koide T, Miyasaka N, Morimoto K, Asakawa K, Urasaki A, Kawakami K, Yoshihara Y. Olfactory Neural Circuitry for Attraction to Amino Acids Revealed by Transposon-Mediated Gene Trap Approach in Zebrafish.

Proc Natl Acad Sci USA (in press)査読有

〔学会発表〕(計 3件)

1. Koide T, Miyasaka N, Morimoto K, Kawakami K, Yoshihara Y., Genetic Dissection of Zebrafish Olfactory Circuitry Mediating Attractive Response to Amino Acids、第5回 国際シンポジウム: 味覚嗅覚の分子神経機構、2008年12月6日、九州大学西新国際交流プラザ

2, 小出哲也、宮坂信彦、森本耕造、川上浩一、吉原良浩、アミノ酸への誘引行動を介在するゼブラフィッシュ嗅覚神経回路の遺伝学的解析、味と匂学会第 42 大会、2008 年 9 月 17 日、富山市民プラザ

3, Koide T, Miyasaka N, Morimoto K, Kawakami K, Yoshihara Y., Genetic Dissection of Zebrafish Olfactory Circuitry Mediating Attractive Response to Amino Acids, The 15 th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT) 2008 年 7 月 21 日 ~ 26 日, San Francisco, USA

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

小出 哲也 (KOIDE TETSUYA)
独立行政法人理化学研究所・シナプス分子機構研究チーム・研究員
研究者番号：30247837