

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500354

研究課題名（和文） 嗅覚の恐怖行動を誘因する神経回路の解明

研究課題名（英文） Studying the neural network involving the innate behavior in the olfactory system

研究代表者

斉藤 治美 (HARUMI SAITO)

東京大学・大学院理学系研究科・特任助教

研究者番号：20311342

研究成果の概要（和文）：本研究は、嗅覚という感覚から誘導される行動の中でも特に天敵臭によって誘引されるマウスの恐怖行動をモデルに、神経回路を探索しようとするものである。まず初めに恐怖行動を誘因する匂い物質（2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline）TMTと結合する嗅覚受容体（OR）を同定し、この受容体を用い TMT に活性化される 1 次嗅覚神経を人為的に活性化・不活化させる改変マウスを作製した。また、改変マウスの解析のために行動実験装置をセットアップした。

研究成果の概要（英文）：The aim of present study is to investigate the neural network of fear response behavior coursed by the stimulation of fox odor “2,4,5-trimethylthiazoline (TMT)”. In order to clarify the functional domain of freezing behavior in the brain, we first identified the ORs (olfactory receptors) specifically activated by TMT and making the knock-out and knock-in mouse for the deletion and activation of olfactory neurons using these ORs. We also established the assay system analyzing the neural activity and behavior using unanesthetized mouse.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：嗅覚受容体 恐怖行動 神経回路

1. 研究開始当初の背景

脳内で機能を実現するには多くの神経細胞がシナプスを介して結合した神経回路という構成要素の中で情報の統合・処理が必要であり、特に高等動物における神経回路は構造が非常に複雑で、思考・情動・意識などの心理的な要素が脳内でどのように情報処理され実

現されているのかを解明するのはとても難しく、未知な部分が多い。神経回路を知るために今後さらに神経細胞の神経回路としての機能発現やさらにネットワークの集合体である領域・領域間での動作原理およびこれらの学習による可変性の解明を推し進めていく必要がある、このような課題に取り組むにあつ

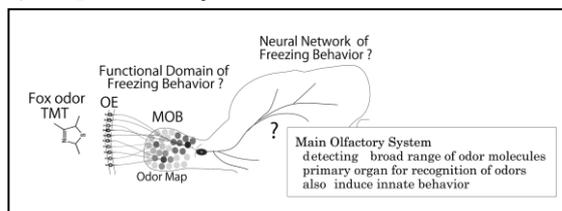
て実験モデルおよび神経回路の明確な提示が必要である。

嗅覚は動物の生命維持のために必要な行動に密接に関与する最も重要な感覚の1つで、進化の過程で原始から現在に至るまで保存されてきた感覚である。自然界には数十万といわれる匂い分子が存在し、あらゆる動物は、これらの匂い分子を情報コードとして受容し、種の保存あるいは個体の生命維持に必要な情動行動を誘起する。自然界に数十万といわれる匂い分子を情報コードとしてどのように受容識別されているのか長年謎であったが、1991年に嗅覚受容体が同定されて以来、受容体の匂い識別の機序が明らかにされ、これに続き受容体の1次ニューロンにおける分子生物学的発現制御のメカニズム、神経軸索の投射するための分子機構、標的器官である嗅球内における匂い地図 (odor map) が解剖学的、生理学的に明らかにされるなど、近年、嗅覚系の末梢 (嗅上皮や嗅球) において、複雑な嗅覚神経系の構造や機能を知るための重要な知見が次々と報告されて来た。これらの報告は、外界からの感覚刺激が緻密な神経回路形成の元で情報処理されていることを理解する上で非常に重要な知見であると共に、神経回路の根本原理をより深く理解するために、今後さらに末梢から高次中枢へと神経回路の探索を進め、外界からの刺激の受容から脳内で情動行動に変換されるまでの機能単位を解明し、記憶学習による情報伝達経路の可変性のメカニズムを解明することが期待されている。本研究は、嗅覚を神経回路の研究のモデルシステムとして用い、情動行動を誘因する神経回路と記憶学習による神経回路の可変性をテーマに、嗅覚情報の伝達経路を末梢から高次中枢へと解剖学的、分子生物学および生理学的見地から探ろうとするものである。情動行動の中でも特に狐の肛門腺から単離された匂い物質 2,4,5-trimethylthiazoline (TMT) によりマウスが恐怖行動を起す情動行動に着目し、神経回路を探索を始めた。

2. 研究の目的

嗅覚は動物の生命維持のために必要な行動に密接に関与する最も重要な感覚の1つで、進化の過程で原始から現在に至るまで保存されてきた感覚である。自然界には数十万といわれる匂い分子が存在し、あらゆる動物は、これらの匂い分子を情報コードとして受容し、種の保存あるいは個体の生命維持に必要な情動行動を誘起する。自然界に数十万といわれる匂い分子を情報コードとしてどのよ

うに受容識別されているのか長年謎であったが、1991年に嗅覚受容体が同定されて以来、受容体の匂い識別の機序が明らかにされ、これに続き受容体の1次ニューロンにおける分子生物学的発現制御のメカニズム、神経軸索の投射するための分子機構、標的器官である嗅球内における匂い地図 (odor map) が解剖学的、生理学的に明らかにされるなど、近年、嗅覚系の末梢 (嗅上皮や嗅球) において、複雑な嗅覚神経系の構造や機能を知るための重要な知見が次々と報告されて来た。これらの報告は、外界からの感覚刺激が緻密な神経回路形成の元で情報処理されていることを理解する上で非常に重要な知見であると共に、神経回路の根本原理をより深く理解するために、今後さらに末梢から高次中枢へと神経回路の探索を進め、外界からの刺激の受容から脳内で情動行動に変換されるまでの機能単位を解明し、記憶学習による情報伝達経路の可変性のメカニズムを解明することが期待されている。本研究は、嗅覚を神経回路の研究のモデルシステムとして用い、情動行動を誘因する神経回路と記憶学習による神経回路の可変性をテーマに、嗅覚情報の伝達経路を末梢から高次中枢へと解剖学的、分子生物学および生理学的見地から探ろうとするものである。



匂い分子はまず嗅覚受容体によって受容される。この受容体は多数のアミノ酸配列の異なった (相同性 60~98%) 受容体ファミリーで構成されている (ヒトでは 300、マウスでは 1000 種のメンバーから成る。) ことが知られており、1次ニューロンには受容体の発現の制御機構によってそれぞれ1種類の受容体のみが発現し、同じ受容体を発現するニューロンの軸索は集束し、やがて嗅球の表層で糸球体というクラスター (one glomerulus-one receptor) を形成し、2次ニューロンの樹状突起と接続する。嗅球における糸球体群には種々の匂い分子の刺激によって活性化される領域がパターン化されている傾向があり、これは受容体の発現パターンと匂い物質の結合様式を反映することが分子生物学的、生理学的実験により明らかにされており、これを「匂い分子受容体地図」(odor

map) という。この 1 次ニューロンにおける情報入力の仕組みは視覚と大きく異なる点であるが、今回この嗅覚の特性を生かし、遺伝子操作によって恐怖を誘因させる単一のあるいは限局した特定の糸球体を人為的に活性化あるいは不活化することのできるマウスを作製した。このマウスを用いることにより限局した入力から発信する脳内の神経活性や動物の行動を観察し、神経回路の形成単位の検索を行うと共に、神経回路網内の情報伝達に不可欠な神経活動とは如何なるものか、学習による神経活動の可変性とはいかなるものか、意識とはどのように形成されるのかその謎を解き明かす。

3. 研究の方法

マウスの恐怖行動を誘因する神経回路を探索するためにまず、TMT に活性化される受容体を同定し、この受容体を用いて TMT に特異的に活性化される単一の糸球体を人為的に活性化・不活化させることのできる改変マウスを作製した。さらにこのマウスの解析のために無麻酔状態のマウスの神経活性と行動様式の詳細を、時間経過を追って同時解析できる装置をセットアップした。

(1) 受容体の同定

まず第 1 の方法として申請者が DUKE 大学で松波宏明准教授と共に開発した HANA Cell-*を用い、受容体の Highthroughput Screening を行った。第 2 の方法は、生理学的手法(オプティカルイメージング、DiI staining) および分子生物学的手法(single cell RT-PCR) を駆使し、嗅球の背側後方に位置し TMT に活性化される神経細胞に発現する受容体の同定に焦点を当てた。

(2) 改変マウスの作製

同定された TMT に最も親和性の高い受容体のノックアウトを行い、TMT に活性化される糸球体の除去を行った。また、TMT に活性化される糸球体にチャンネルロドプシンを発現するマウスを作製した。

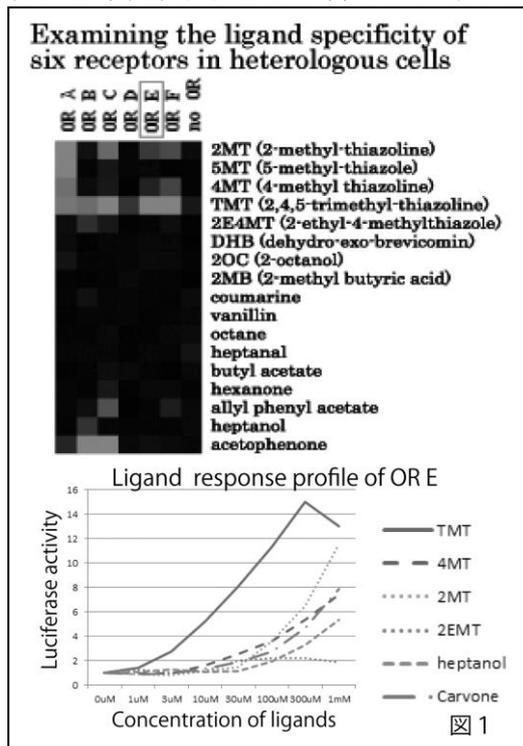
(3) 行動学実験

行動実験装置とオプティカルイメージングを併用し、無麻酔状態のマウスの神経活性と行動様式の詳細を、時間経過を追って同時解析できる装置をセットアップした。

*RTP Family Members Induce Functional Expression of Mammalian Odorant Receptors
Saito H et. al Cell, 2004 Volume 119, Issue 5, 679-691

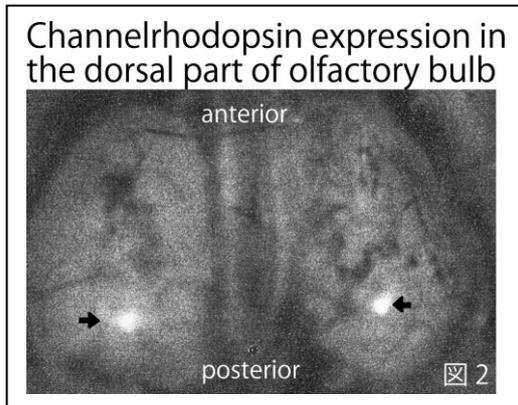
4. 研究成果

受容体の同定に当たって以下の過去の報告に留意した。① main olfactory system において情動を誘引する匂い物質に対して活性化される領域が、背側領域であるという報告がある。② 背側の神経細胞すべてを除去したマウスでは恐怖行動が消失した。③ 背側の神経細胞のうち嗅球の後方に軸索を投射する神経細胞が TMT に高い親和性が見られる。これらの報告を考慮に入れ、恐怖行動を誘因する神経回路に関与する可能性の最も高い受容体を同定出来るよう実験方法をデザインした。Highthroughput screening の結果 18 種類の嗅覚受容体が検出された。得られた受容体のうち、背側に発現する受容体は腹側に発現する受容体と比べ、TMT に対して親和性が高いことが分かった。第 2 の方法では 3 種の受容体が検出された。さらに 2 つの方法で検出された受容体のうち特に TMT に対する親和性の高い受容体 6 種の匂い物質の選択性を調べた。60 種以上の匂い物質に対する反応性の結果 TMT に特異性の高い受容体が 1 種 (OR E 図 1) あることが明らかになった。



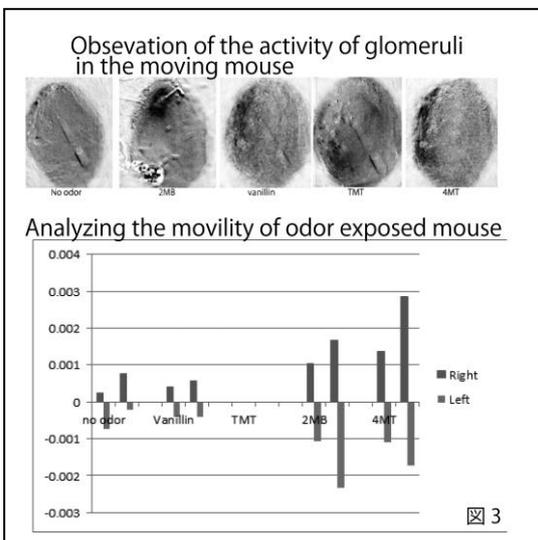
次にこの受容体に焦点を当て、この受容体を発現する単一の糸球体にのみチャンネルロドプシンを発現させるノックインマウスを作製した(図 2)。作製したマウスのチャンネルロドプシンの発現を調べたところ、チャンネルロドプシン陽性の糸球体は嗅球の背側後方に集約し、TMT に対して活性化されることがオプティカル

イメージングの実験によって明らかにされた。現在このマウスを用いてどのような光刺激によって嗅球内での神経活性が誘起されるのかを電気生理学的手法により検証している。



改変マウスはこの他にも、受容体のノックアウトマウスの準備も完了した。

これらのマウスを用いて行動実験を行っていくために情動行動を解析する装置をセットアップした。行動実験装置を用いて TMT に暴露された糸球体の活性およびマウスの行動の推移を同時観察したところ、TMT の刺激による特異的な神経の活性と恐怖行動を同時に観察することができた。そしてこの現象は他の匂い物質で刺激された際のマウスの神経活性・行動とは異なるものであることが分かった (図 3)。



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)

① Agonist-Independent Receptor Activity Regulates Axon Targeting of Olfactory Neurons Nakashima A, Takeuchi H Imai T Saito H Nishizumi H Sakano H In Press

[学会発表] (計 3 件)

① 齊藤治美, Isolation of odorant receptor genes for fearful responses in the mouse , 日本生理学会 2012 3 30 信州大学 (長野・松本)

② 齊藤治美, Isolation of odorant receptor genes for fearful responses in the mouse, 日本分子生物学会 2011 12 13 横浜パシフィコ (神奈川・横浜)

③ 齊藤治美, Isolation of odorant receptor genes for fearful responses in the mouse, *Frontiers in Neuroscience* 2011 12 6 国際高等研究所 (京都府・木津川市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 治美 (SAITO HARUMI)

東京大学・大学院理学系研究科・特任助教

研究者番号：20311342