

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300140

研究課題名(和文) 嗅覚系二次神経回路形成の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular basis for the secondary neural circuit formation in the mouse olfactory system

研究代表者

西住 裕文(Nishizumi, Hirofumi)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30292832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円、(間接経費) 4,050,000円

研究成果の概要(和文)：嗅覚は、餌への誘引・危険物からの忌避・個体の識別など、生物の生存にとって極めて重要な役割を担う。これ迄のマウスを用いた研究から、嗅上皮と嗅球の間をつなぐ嗅神経の自律的な一次投射の概要がほぼ解明された。本研究では、これに続く二次神経(僧帽/房飾細胞)が、嗅球と嗅皮質をどのような原理に従って接続するのかを、様々な遺伝子改変マウスを用いて解析した。その結果、発生期に二次神経は選り好みせず近傍に位置する糸球体を介して一次神経と接続し、その接続は長期間維持されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In the mouse olfactory system, map topography is largely established by axon-axon interactions of olfactory sensory neurons (OSNs). However, to make the map functional, the OSNs must make proper connections to the mitral/tufted (M/T) cells. Then, how do the M/T cell dendrites find their partner glomeruli for synapse formation with OSN axons? Does the odorant receptor (OR) specificity of glomeruli play an instructive role in matching M/T cell dendrites with OSN axons? To address these questions, we analyzed dendrite selection and synapse formation of mitral cells in various mutant mice in which glomerular formation was perturbed. We also studied synapse reconstitution in adult glomeruli. Our present results support the "proximity model", whereby mitral cells tend to connect primary dendrites to the nearest neighboring glomeruli regardless of OR specificity. The map location or address code of glomeruli plays a key role in matching mitral cells with their partner glomeruli.

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 遺伝子改変マウス 神経回路形成 シナプス結合 再生

1. 研究開始当初の背景

嗅覚は、餌への誘引・危険物からの忌避・個体の識別など、線虫から高等動物に至るまで、生き物の存在にとって極めて重要な役割を担う。これ迄のマウスを用いた研究により、個々の嗅神経細胞の発現する嗅覚受容体 (odorant receptor; OR) は 1,000 種類の OR 遺伝子の中から 1 種類に限られ (1 神経・1 受容体ルール)、その軸索の嗅球での投射先である糸球構造と OR の間には 1:1 の対応関係が成り立つことが知られている (1 糸球・1 受容体ルール)。匂い分子は嗅上皮において複数の種類の OR と様々な強度で結合し、嗅球上の糸球を異なる強さで発火する。従ってマウスの嗅球表面には、ちょうど OR 遺伝子数と同じ約 1,000 個の糸球を素子とする電光掲示板の様に、様々な発火パターンが形成され、この画像を脳の中樞が識別することによって匂い情報に基づく情動や行動の判断が行われると考えられ様になった。

その後の研究から、嗅上皮と嗅球の間をつなぐ嗅神経細胞の自律的な一次投射の概要がほぼ解明されてきた (*Neuron* 67, 530-542, 2010)。また哺乳類であるマウスにも、本能判断の為の hard wired な神経回路と、記憶に基づく学習判断の為の回路が存在する事も分かってきた (*Nature* 450, 503-508, 2007)。つまり先天的な匂い識別の為の神経回路と学習に依存した匂い判断の神経回路は、嗅上皮においてすでに独立して入力を受けている事が明らかになった。この様に嗅覚情報処理の理解は、嗅上皮と嗅球の間をつなぐ嗅神経細胞の一次投射で進んだが、これに続く僧帽/房飾細胞による二次投射、すなわち嗅球と嗅皮質の間をつなぐ logics については依然として不明な点が多い。本研究では、一次投射の結果として自律的に形成される糸球マップが、二次神経である僧帽/房飾細胞にどう接続し、その情報が二次投射先である嗅皮質にどの様に入力するのかを解析する。

2. 研究の目的

嗅覚は、餌への誘引、危険物からの忌避、個体の識別など、線虫から高等動物に至るまで、生き物の存在にとって極めて重要な役割を担う。これ迄の研究により、嗅上皮と嗅球の間をつなぐ嗅神経細胞の一次投射の概要がほぼ解明された。また哺乳類であるマウスにも、本能判断の為の hard wired な神経回路と、記憶に基づく学習判断の為の回路が存在する事も分かってきた。しかしこれに続く僧帽/房飾細胞による二次投射、すなわち嗅球と嗅皮質の間をつなぐ logics については依然として不明な点が多い。本研究では、一次投射の結果として自律的に形成される糸球マップが、二次神経である僧帽/房飾細胞にどう接続し、その情報が二次投射先である嗅皮質にどの様に入力するのかを解明することを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、一次投射の結果として形成される糸球マップが、二次神経である僧帽/房飾細胞にどう接続し、その情報が二次投射先である嗅皮質にどの様に入力するのかについてその分子基盤を明らかにすることを試みた。まず、糸球内シナプス形成に嗅細胞の神経活動などの様な要素が必要であるか、当研究室で保持されている様々な遺伝子操作マウスを用いて解析した。また、特定の糸球体に接続する二次神経が機能的に均一なのか、異なる情報処理機能を持つサブタイプに分類されるのかについて、二次投射のパターンを含め解析した。

(1) 糸球内シナプス形成に必要な要素の同定

糸球内シナプス形成が嗅神経細胞の神経活動に依存するのか、一次神経からの入力無しで二次神経とのシナプス形成が遺伝的プログラムでどこ迄進むのか、異所的に糸球が形成された場合、二次神経細胞への入力为正

常に行われるのか等について、当研究室で保持されている様々な遺伝子操作マウスを用いて解析した。具体的には、Thy1 プロモーターにより YFP を発現するマウスで二次神経細胞を標識し、これを CNG-A2 欠損マウスや嗅球背側に嗅細胞軸索の入力がない D マウス、更には、殆どの系球体で同一の OR を発現する H-OR マウスなどと交配し、二光子レーザー顕微鏡を駆使して一次神経と二次神経のシナプス形成を解析した。

(2) 系球マップの維持

外からの刺激臭やウイルスなどの侵襲が激しい嗅覚系は、嗅上皮を中心とした嗅神経回路が生涯に渡って再生を継続する系である。そこで、出生後に一旦完成する系球マップが、長期的にはどの様に維持、あるいは変化するのかについて解析を加えた。具体的には、一旦系球マップが完成した後、以下の二つの方法で人為的に特定の嗅細胞を死滅させ、一部の系球から嗅細胞軸索がなくなった場合に、系球構造がどうなるか、僧房細胞の主樹状突起はつなぎ替えを起こすのか等について観察を行った。

薬剤 dichlorobenzil を腹腔内投与すると、嗅上皮ゾーン 1 の細胞が特異的に死滅し、再生しなくなることが報告されている。この時、ゾーン 1 の嗅細胞が投射していた嗅球背側の系球体から嗅細胞の軸索が消失することになる。この様な場合、系球で何が起こるかを経時的に観察した。これまでの申請者が行った予備実験では、嗅細胞の軸索がなくなった後でも数ヶ月間以上系球構造は維持され続け、僧帽細胞の主樹状突起も系球に接続したまま維持されているという結果を得ている。これは一旦完成した系球マップは生涯維持され続けるということを示唆していると考えられる。

CNG-A2 遺伝子は X 染色体上に存在して X-linked inactivation を受けるため、CNG-A2

ヘテロ接合体の雌マウスでは、CNG-A2 イオンチャネル陽性の嗅細胞と陰性の嗅細胞がモザイク状に存在し、神経活動の有無のせいで同じ OR を発現していても隣り合った別個の系球を形成することが報告されている。更にこのマウスでは、生後 2 週間経つと、嗅細胞の神経活動がないことが原因で CNG-A2 陰性の嗅細胞の細胞数が減少することも報告されている。本研究ではこの現象を利用し、一旦形成された系球が、CNG-A2 陰性の嗅細胞が徐々に減ることによってどうなるかを観察した。

(3) 僧帽/房飾細胞の機能的な分類

各系球体には、数十の僧帽細胞と数百の房飾細胞が二次神経として接続している。匂い分子による系球活性化の際、同一の系球体に接続する二次神経が同期発火するという報告がある一方、同一系球体に接続するにもかかわらず、発現する K⁺チャネルの組み合わせにより個々の二次神経は異なった発火パターンを示すという報告もある。本研究では、特定の系球体に接続する二次神経が機能的に均一なのか、異なる情報処理機能を持つサブタイプに分けられるのかについて、単一細胞レベルでの遺伝子発現の解析を行った。二次神経を発現遺伝子によってタイプ分け出来た場合には、それら遺伝子のプロモーターを使って、特定の二次神経を標識して可視化し嗅皮質への投射先を調べると共に、神経活動を遺伝的に制御した変異マウスを作製し、個体レベルでの匂い情報処理に於ける異常について検討する。

4. 研究成果

本研究ではまず、発生過程において一次投射の結果として自律的に形成される系球マップが、二次神経である僧帽/房飾細胞にどう接続するか、更にその情報が二次投射先である嗅皮質にどの様に入力するのかを解析

した。僧帽細胞は発生に伴い分枝し、複数の系球体に接続する樹状突起から枝狩りを行い、最終的には1本の主樹状突起を1つの系球体に接続させることが知られている。そこで我々は研究室で保持されている様々な遺伝子操作マウスを用いて、一次神経からの入力無しで二次神経とのシナプス形成が遺伝的プログラムでどこ迄進むのか、異所的に系球が形成された場合、二次神経細胞への入力が正常に行われるのか、系球内シナプス形成が嗅神経細胞の神経活動に依存するのか等について解析した。その結果、相方である嗅神経細胞の軸索は必須であるが、嗅神経細胞で発現している嗅覚受容体の種類や、CNG チャネルを介した嗅神経細胞の神経活動は必須ではなく、僧帽細胞はその細胞体の位置から近傍に形成される系球体に主樹状突起を接続させることが明らかとなった。

本研究では次に、出生後に一旦完成する系球マップが、常時再生を繰り返す嗅覚系にあって、長期的にはどの様に維持、あるいは変化するのかについて解析を加えた。鼻腔奥に存在する嗅上皮の領域特異的に発現する酵素を利用し、嗅上皮の限局した領域の細胞を任意の時期に除去した場合、嗅神経回路がどのような影響を受けるかを調べた。その結果、一旦系球マップが完成すれば、嗅神経細胞の軸索が除去されても、その系球マップは長期的に維持され、僧帽細胞も主樹状突起を系球体に接続したままであることが判明した。また、新たに再生した嗅神経細胞が系球マップに軸索を投射する際は、発生期と異なり誤接続が頻発し、匂い情報を誤って系球マップへと伝達することが分かった。これがヒトでも認められている異臭症の発症原因と考えられる。ここで得られた成果は、嗅球上での嗅覚神経回路形成にも臨界期が存在することを示しており、神経回路形成のメカニズムを理解する上で大変重要なものである。

最後に、二次神経の機能的な分類を、発現

する遺伝子で規定する事を試みた。各系球体には複数の二次神経が接続しているが、系球活性化の際、同一の系球体に接続するのに二次神経が個々に異なった発火パターンを示すという報告がある。そこで、二次神経の機能差が嗅皮質への軸索投射先と関連している可能性を想定し、種々の軸索誘導分子や細胞接着分子等をコードする遺伝子の発現パターンを網羅的に調べ、二次神経を発現遺伝子によってタイプ分けしてみた。その結果、一部の二次神経で細胞接着分子Kirrel3をコードする遺伝子が発現する事を見出した。Kirrel3 タンパク質は軸索末端に、しかも嗅皮質の一部に偏って局在している事から、二次神経軸索の嗅皮質への投射に関与している可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Nakashima A., Takeuchi H., Imai T., Saito H., Kiyonari H., Abe T., Chen A., Weinstein L.S., Yu C.R., Storm D.R., Nishizumi H., and Sakano H.: Agonist-independent GPCR activity regulates anterior-posterior targeting of olfactory sensory neurons. *Cell*, 154, 1314-1325 (2013) 査読有.
DOI: 10.1016/j.cell.2013.08.033.

Aoki M., Takeuchi H., Nakashima A., Nishizumi H., and Sakano H.: Possible roles of Robo1⁺ ensheathing cells in guiding dorsal-zone olfactory sensory neurons in mouse. *Dev. Neurobiol.*, 73, 828-840 (2013) 査読有.
DOI: 10.1002/dneu.22103.

〔学会発表〕(計 5 件)

西住裕文 Formation and maintenance of the mouse olfactory map. 第36回 日本分子生物学会年会 2013.12.3-6 神戸

西住裕文 Genetic manipulation of aversive olfactory circuits in mouse. JST Mini-Meeting 2013. 2.10 東京

西住裕文 マウス嗅覚神経回路の形成と再生の分子機構 日本応用酵素協会 第38回研究発表会 2012.11.19 大阪

西住裕文 Formation and maintenance of the mouse olfactory map. 第34回 日本分子生物学会年会 2011.12.13-16 横浜

西住裕文 Formation and maintenance of the mouse olfactory map. International Conference on Frontiers in Neuroscience: From Brain to Mind 2011.12.6-9 京都

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2013/42.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西住 裕文 (NISHIZUMI, Hirofumi)
東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：30292832

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：