

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 8 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700315

研究課題名(和文) 嗅球新生顆粒細胞の匂い入力依存的な回路への組み込み様式の解明

研究課題名(英文) Analysis of activity-dependent integration mechanism of adult-born granule cells in the olfactory bulb

研究代表者

成塚 裕美 (Naritsuka, Hiromi)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00511388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：齧歯類の嗅覚系の一次中枢である嗅球では、成体においても抑制性介在ニューロンが新生され続けており、投射ニューロンとのシナプス形成を経て、既存の回路に組み込まれている。この組み込みのメカニズムについては先行研究の知見から、「新生細胞は、匂い入力に依存的に回路へ組み込まれる。」という仮説が提唱されていた。しかし、技術的な制約からその検証は行われてこなかった。

本研究では、この仮説を検証する為に光遺伝学を用いた実験系を立ち上げ、新生細胞の組み込み様式の解明にアプローチした。

研究成果の概要(英文)：The olfactory bulb is the first relay center in the mammalian olfactory system and its major local inhibitory interneurons, granule cells (GCs), are continually produced throughout adulthood. These adult-born GCs are integrated into the pre-existing neuronal circuit through forming synapses with projection neurons. Based on the previous studies, it has been hypothesized that new-born neurons are integrated in an activity-dependent manner. Due to technical difficulties, this hypothesis has not been tested.

In this project, we developed the experimental system using optogenetics to overcome technical difficulties and the hypothesis about the integration mechanism of adult-born granule cells was approached through this system.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経科学一般

キーワード：嗅球 成体神経 顆粒細胞

## 1. 研究開始当初の背景

齧歯類の嗅覚系の一次中枢である嗅球では、成体においても抑制性介在ニューロンが新生され続けており、投射ニューロンとのシナプス形成を経て、既存の回路に組み込まれている。これまで、新生細胞の分化に関わる分子機構や電気生理学的性質などが明らかにされてきたが、新生細胞が既存の神経回路にどのような様式で組み込まれるかは明らかになっていなかった。

成体の脳室下帯で新生した細胞は嗅球まで移動し、その多くが GABA 作動性抑制性介在ニューロンである顆粒細胞に分化する。顆粒細胞は軸索を持たず、シナプスの入出力を樹状突起上で行う。先行研究では、新生顆粒細胞はその樹状突起を外叢状層まで伸ばしてスパインを形成し、投射ニューロンの樹状突起との間にシナプスを形成することが明らかになっている。このシナプスは双方向性で、投射ニューロンから顆粒細胞からへの興奮性入力と、顆粒細胞から投射ニューロンへの抑制性出力から成り立っている。

これまでの先行研究において、マウスに多くの種類の匂い物質を嗅がせると、嗅球で生き残る新生細胞の数が増えることが明らかになっている (Rocheffort et al., JNS, 2002)。一方、匂い入力の遮断により、嗅球で生き残る新生細胞の数も減ることも示されている (Yamaguchi and Mori, PNAS, 2005)。以上の研究から、「新生細胞は、匂い入力に依存して回路へ組み込まれる (投射ニューロンとシナプス形成を形成する)」と推測されてきたが、その検証は行われてこなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、この仮説を検証する為の実験系を立ち上げ、新生細胞の組み込み様式の解明にアプローチすることを目的とする。この仮説の検証には以下のステップが考えられる。

(1) 新生顆粒細胞を標識する

(2) 入力によって嗅球回路の一部を活性化

(3) 新生顆粒細胞が活性化部位に組み込まれるか、すなわち投射ニューロンとシナプス形成を行うかを検証する

これまで仮説が検証されてこなかったのは、以上の(2)と(3)のステップにおいて技術的な制約があった為である。まず(2)については、通常、嗅球回路の活性化は匂い分子をマウスに嗅がせることで行われてきたが、匂い分子の不安定性の為に、繰り返し効率的に嗅球神経回路を活性化することは難しかった。また、(3)においては、嗅球の投射ニューロンが c-Fos や Zif といった活性化マーカーを特異的に発現しないことから、活性化された部位を特定するのが困難であった。さらに、これまで外叢状層において顆粒細胞が投射ニューロンの樹状突起にコンタクトさせるスパイン

( "dendritic-targeting spine" ) が主要なシナプス形成の場として指標にされてきたが、投射ニューロンの樹状突起は、外叢状層において密に走行している為、活性化された投射ニューロンの樹状突起にコンタクトする dendritic-targeting spine を同定するのは困難であった。従ってシナプス形成の解析対象が、投射ニューロンの樹状突起にコンタクトする新生顆粒細胞からのスパインを指標にしている限りは、「新生顆粒細胞の入力依存的な回路への組み込み」を検証することは非常に困難であった。

そこで本研究では、遺伝子改変マウスとウイルスを用いた光遺伝学を使い、さらに独自に発見したスパイン構造を利用することで上記の技術的制約を乗り越えた実験系を作り、仮説の検証にアプローチすることにした。まず、(2)については投射ニューロンにチャンネルロドプシンを発現させて発火活動を引き越すことで、再現性良く効率的に回路を活性化する。(3)の前者の問題については投射ニューロンに発現させたチャンネルロドプシンとフュージョンしている蛍光タンパク質を指標に活性化した投射ニューロンを同定する。(3)の後者の問題については、申請者の観察から同定された、投射ニューロンの細胞体にコンタクトするスパイン ( "perisomatic-targeting spine" ) を指標に、新生顆粒細胞の回路への組み込み様式の解明を目指す。これは、投射ニューロンの個々の細胞体が、区別できる程度の密度で存在していることから、活性化された投射ニューロンの細胞体にコンタクトする perisomatic-targeting spine を同定することが可能になる為である。

以上のように本研究では、「新生細胞は、入力に依存して回路へ組み込まれる (投射ニューロンとシナプス形成を形成する)」という仮説を検証する為の実験系を立ち上げ、新生顆粒細胞が投射ニューロンの活動依存的に perisomatic-targeting spine を形成するかを調べる。

## 3. 研究の方法

(1) 新生顆粒細胞の標識と投射ニューロンの標識

新生顆粒細胞の標識は GFP をコードするレトロウイルスとレンチウイルスを用いて行った。特に、レンチウイルスについては標識の為に蛍光タンパクが強く光るという利点がある。また、投射ニューロンは抗 PGP9.5 抗体を用いた免疫染色で標識した。

(2) perisomatic-targeting spine におけるシナプス形成

perisomatic-targeting spine を新生顆粒細胞の匂い入力依存的な回路に組み込みの指標にする前に、まず perisomatic-targeting spine がシナプス構造を持つのかについて明らかにする。顆粒細胞は GABA 作動性ニュー

ロンであり、嗅球の投射ニューロンはグルタミン作動性のニューロンであることから、「perisomatic-targeting spine では、投射ニューロンから新生顆粒細胞への興奮性シナプスと、新生顆粒細胞から投射ニューロンへの抑制性シナプスが形成されている」と予想した。

新生顆粒細胞の dendritic-targeting spine については、シナプスマーカーを用いた免疫染色によって、投射ニューロンの樹状突起とのシナプス形成が解析されている。本研究でも、同様の手法を用いる。

投射ニューロンから perisomatic-targeting spine への興奮性入力を明らかにする為に、perisomatic-targeting spine 側に興奮性のポストシナプスマーカーである PSD95 が発現しているかを調べる。また、perisomatic-targeting spine から投射ニューロンへの抑制性出力を明らかにする為に、perisomatic-targeting spine に抑制性のプレシナプスマーカーである GAD65 が発現しているかを調べる。

(3) 新生顆粒細胞が投射ニューロンの活動依存的に perisomatic-targeting spine を形成するかを調べる為に、チャンネルロドプシンを用いた光遺伝学を利用して以下の手順で実験を行う。

嗅球において投射ニューロン特異的に Cre タンパクを発現するマウス (Protocadherin21-Cre マウス) の嗅球にチャンネルロドプシンと蛍光タンパクの逆向きの配列が loxp で挟まれたアデノ随伴ウイルスを注入して2週間待ち、嗅球の投射ニューロン特異的にチャンネルロドプシンと蛍光タンパクを発現させる。

嗅球の上部に光刺激用カニューラを固定する。また、subventricular zone で新生する顆粒細胞を GFP をコードするウイルスで標識する。

の手術の2日後から、自由行動下のマウスにおいて、連日に渡って青色光による刺激を行い、嗅球の投射ニューロンの発火活動を引き起こす。

灌流固定後に免疫染色を行い、シナプス形成の指標として perisomatic-targeting spine を解析する。

また、予備実験として、投射ニューロンの発火活動が光刺激により引き起こされるのか、さらに、どのような光刺激のパラダイムが匂い入力による発火活動と類似した活動を引き起こすのかを調べる。この為に、in vivo 麻酔下のマウスにおける電気生理実験を行い、投射ニューロンから記録を取り、光刺激に伴った活動電位を記録する。

#### (4) 行動実験

これまでの先行論文から、嗅覚系における成体の神経新生は匂いの学習や記憶の形成

に重要な役割を持つと考えられている (Lazarini and Lledo, Trends Neurosci. 2011)。このことから、嗅球の新生顆粒細胞は、匂い学習の際に、その匂い分子によって活性化された投射ニューロンに特異的にシナプスを形成する可能性がある。この可能性に備えて、自由行動下での光照射に加えて、匂い刺激の代わりに、光刺激による投射ニューロンの活性化を用いた学習をマウスに行わせる為の実験の立ち上げを始めた。

#### 4. 研究成果

(1) perisomatic-targeting spine におけるシナプス形成

perisomatic-targeting spine にシナプスが形成されるかをシナプスマーカーを用いて解析した。まず、投射ニューロンから新生顆粒細胞の perisomatic-targeting spine へ興奮性のシナプスが形成されているかを、ポスト側の興奮性シナプスマーカーである PSD95 の抗体を用いて調べた。その結果、新生顆粒細胞が生まれて10日の時点では約60%の perisomatic-targeting spine が、4週の時点では90%以上の perisomatic-targeting spine が PSD95 を発現していた。次に、新生顆粒細胞の perisomatic-targeting spine から投射ニューロンへ抑制性のシナプスが形成されているかを調べる為に、プレ側の抑制性シナプスマーカーである GAD65 に対する抗体を用いて調べた。その結果、新生顆粒細胞が生まれて10日の時点では約20%の

perisomatic-targeting spine が、4週の時点では約80%の perisomatic-targeting spine が GAD65 を発現していた。以上の結果から、新生顆粒細胞は perisomatic-targeting spine にて投射ニューロンの細胞体とシナプスを形成していることが明らかになった。

これまでの先行研究では、新生顆粒細胞のシナプス形成は、主に投射ニューロンの樹状突起に作られるものが着目されてきたが、本研究において、新生顆粒細胞は投射ニューロンの細胞体との間にもシナプスを形成していることが明らかになった。

perisomatic-targeting spine が投射ニューロンの細胞体とシナプスを形成することが確認できたことから、この perisomatic-targeting spine を組み込みの指標とすることができる。次の段階として、この perisomatic-targeting spine に着目し、新生顆粒細胞の嗅球回路への組み込みメカニズムを調べることが可能になる。

(2) チャンネルロドプシンを用いた実験系の確立

Protocadherin21-Cre マウスの嗅球にチャンネルロドプシンと蛍光タンパクの逆向きの配列が loxp で挟まれたアデノ随伴ウイルスを注入したマウスでは、投射ニューロンの一部にチャンネルロドプシンが発現していた。

光刺激により投射ニューロンの発火が引き起こせるかについては、in vivo 麻酔下のマウスにおける電気生理実験を行って確認した。アデノ随伴ウイルスを注入したマウスの嗅球において、投射ニューロンの細胞体が位置する部位にガラス電極を刺入し、嗅球上部から青色光を照射した。5msecの光を10Hzで照射したところ、それに追従する発火活動が記録された。次に、光照射の1パルスあたりの照射時間を徐々に延ばして記録を行っていくと、200msecの光刺激を与えた際にガンマ帯域のLFPのオシレーションが観察された。これは、呼吸時に入る嗅覚入力によって引き起こされるガンマ帯域のオシレーションと同様のものではなかったことから、200msecの光刺激によって、匂い刺激で引き起こされる投射ニューロンの活動を疑似的に引き起こすことが可能となった。

(3) perisomatic-targeting spineの観察  
(2)の実験で同定した、匂い刺激で引き越される活動を疑似的に引き起こす光刺激を、新生顆粒細胞が標識されたマウスにおいて3.5週に渡って行った。その際に単一顆粒細胞が形成するperisomatic-targeting spineの数を観察すると、チャンネルロドプシン陽性の投射ニューロンにコンタクトするspineの数よりも、チャンネルロドプシン陰性の投射ニューロンにコンタクトするspineの数の方が多くなる傾向が見られた。このことから、新生顆粒細胞は生まれて4週の時点では、活性化レベルの高い投射ニューロンよりも、活性化レベルが低い投射ニューロンへシナプスを形成して組み込まれている可能性が示唆された。

#### (4) 行動実験

匂い刺激の代わりに、光刺激による投射ニューロンの活性化を用いた学習をマウスに行わせる為の実験として、水を報酬とした光刺激との関連学習を立案し、トレーニングを進めている。

これまで、齧歯類の嗅覚系における成体の神経新生の分野では、新生細胞がどのような様式を経て既存の回路に組み込まれるかについてはほとんど明らかになっていなかった。本研究において光遺伝学を用いて嗅球投射ニューロンを再現性良く効率的に活性化できる実験系ができたことで、これまで多くの議論がなされてきていたものの具体的な解析方法が無かった「嗅球の新生顆粒細胞は、匂い入力に依存して嗅球の神経回路に組み込まれる」という仮説の検証にアプローチできることになった。

また、今後、本研究での解析を進めることで得られる知見は、新生顆粒細胞が嗅球回路内で、どのような情報処理を担当するかという機能的役割の解明の最初のステップになりうると期待している。もう一つの成体神経

新生の部位である海馬においても、新生された細胞のシナプス形成が回路内の活動に依存して形成されるメカニズムの詳細については明らかになっていない。したがって本研究が進むことで得られる知見は、嗅覚系に加えて海馬の成体神経新生の研究分野への応用も期待できる。

#### 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)

[学会発表](計5件)

(1). 成塚裕美、森憲作、山口正洋  
「マウス主嗅球において投射ニューロンの異なる細胞領域に形成される新生顆粒細胞からのシナプス」  
第35回日本神経科学大会、2012年9月21日、名古屋

(2). Hiromi Naritsuka, Kensaku Mori, Masahiro Yamaguchi  
“Synapse formation of adult-born granule cells at distinct subcellular domains of projection neurons in the mouse main olfactory bulb”  
International Symposium on “Sensory Systems and Neural Circuits”, February 11<sup>th</sup> 2013, Tokyo, Japan

(3). 成塚裕美、森憲作、山口正洋  
「成体で新生した顆粒細胞が嗅球投射ニューロンの異なる細胞領域に形成するシナプス」  
第36回日本神経科学大会、2013年6月21日、京都

(4). Hiromi Naritsuka, Kensaku Mori, Masahiro Yamaguchi  
“Effects of optogenetic activation of projection neurons on adult-born interneurons in the mouse olfactory bulb”  
International Symposium Optogenetics September 26<sup>th</sup> 2013, Tokyo, Japan

(5). Hiromi Naritsuka, Kensaku Mori, Masahiro Yamaguchi  
“Adult-born granule cells form synapses at distinct subcellular domains of projection neurons in the mouse olfactory bulb”  
神経の再生と分化に関する国際シンポジウム Neurogenesis 2013 in Matsushima, October 17<sup>th</sup> 2013, Miyagi, Japan

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

成塚 裕美 (NARITSUKA HIROMI)  
東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00511388

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし