

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290010

研究課題名(和文) 二次嗅覚神経回路の解剖学的および機能的分解

研究課題名(英文) Anatomical and functional dissection of the central olfactory system

研究代表者

平田 かつみ (HIRATA, Tatsumi)

国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・教授

研究者番号：80260587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：一次嗅覚神経回路は匂い情報を空間的に選別して、嗅球に「匂い地図」を作り上げるが、その地図がその後どのように処理されているかは不明である。本研究では、嗅球神経細胞の誕生日の違いを利用することで、二次嗅覚神経回路の分解をめざした。神経細胞の誕生日依存的に遺伝子組換えを誘導できるトランスジェニックマウスシステムを作成し、嗅球神経細胞が誕生日によって異なる軸索投射パターンを示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The olfactory information is spatially represented as an “odor map” over the olfactory bulb. It is yet unclear how this map is transferred to the next level. This study aims at dissecting olfactory secondary circuits by focusing on birthdate differences of olfactory bulb neurons. We made transgenic mouse lines in which DNA recombination is induced in a neuronal birthdate-dependent manner. Using the mouse lines, I revealed that olfactory bulb neurons with different birthdates have different projection patterns.

研究分野：神経発生学

キーワード：嗅覚系 誕生日タグづけシステム トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

一次嗅覚神経回路の基本原則は、匂い情報の高度な選別である。同じ匂い受容体を発現する嗅神経が、嗅球の特定の糸球体に収束することで、匂いの質的違いを空間的に表現する「匂い地図」を作りあげる。この情報は、嗅球の投射神経細胞によって、10領域ほどに分類される二次嗅覚中枢へと伝えられる(図1)。この時に、「匂い地図」がどのような形で受け渡されていくのかについてはよく判っていない。古典的な軸索標識実験でも、最新の発生遺伝子工学を使った研究でも、ごく限られた一部の領域を除いて、嗅球と二次嗅覚中枢との間の軸索結合にトポグラフィックな関係は見つからない。さらに、少なくともほ乳類において、嗅球の各糸球体からの投射は、ほぼ全ての二次嗅覚中枢に拡散的に広がると考えられており、二次中枢領域間における受容情報の違いや特異的機能を想像することすら難しい。

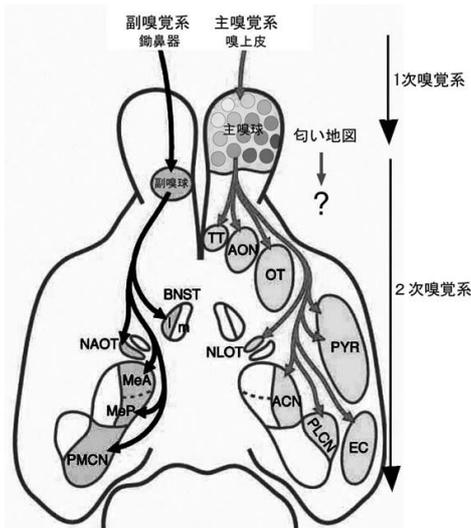


図1. 二次嗅覚神経系
嗅球神経細胞は、多くの二次中枢に投射する。

しかし、せっかく巧妙に作り上げられた「匂い地図」が、その後ただランダムに入り交じってゆくとは考えにくい。何らかの隠されたルールがあるはずである。そしてその鍵は、嗅球以降の並列処理システムにあるのではないかと我々は予想している。各糸球体には数~十数個の投射神経が接続する。これらの神経細胞は、これまで想定されてきたよう均一集団ではな

く、異なる軸索ガイド制御を受けて、異なるパターンで中枢に接続し、並列経路を形成するのではないだろうか。もしそうならば、これまでに行われてきたような、嗅球の空間位置だけを指標にしたバルク的な軸索投射解析では、投射の特異性が検出できないのは当然である。

我々は、偶然得られた幼弱軸索に対するモノクローナル抗体を用いて、嗅球の投射神経細胞がその誕生日に応じて、異なる投射パターンを持つ可能性を示唆してきた(Yamatani, et al., 2004)。主嗅球の中では、投射神経細胞は空間的にほぼ均一に生まれるので、最終的に、誕生日の異なる投射神経がまんべんなく混在することになる。つまり、同じ日に生まれた投射神経細胞は、主嗅球全体に分散して様々な糸球体の情報を受け取ることになるわけだが、それらの軸索は挙動を共にして嗅索中をまとめて伸長するのが観察される。当時の方法では、技術的な問題から、軸索の最終的な標的位置までは確認できなかったが、少なくとも遅生まれの投射細胞の軸索は、腹側中枢に選択的に伸長するように観察された。これらの結果は、誕生日の違う嗅球投射細胞が、それぞれ異なる軸索ガイド制御を受けて、異なるパターンで二次中枢に結合する可能性を示唆する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、二次嗅覚神経回路を分解して、並列経路の存在を解剖学的に明らかにすることである。これまでの申請者らの研究の決定的な問題は、発生期には並列経路の存在を示唆できながらも、技術的な問題から、成体での経路の投射部位や生理機能を調べることができなかった点である。本研究では、新しいマウス系統を作製することでこの問題の克服をめざした。具体的には、誕生時期の異なる神経細胞を遺伝子組換えにより標識し、永続的にその軸索末端まで可視化する技術を確立した。そしてその技術を用いて、誕生日によって異なる二次嗅覚投射領域を解析した。

3. 研究の方法

トランスジェニックマウス作成

操作したい遺伝子を含むゲノム BAC クローンに対して、遺伝子組換えにより Cre 組換え酵素やレポーター遺伝子を挿入した。これら組換えコンストラクトを使って、理研 LARGE との共同開発により、トランスジェニックマウスを作出した。得られたマウスは適当なレポーターやエフェクター系統と組み合わせ交配をして、次世代目で期待する表現系を示すかどうかを検定した。

4. 研究成果

(1) 誕生日依存的組換えシステムの構築

神経細胞の誕生時期依存的に遺伝子組換えを起こすための新規トランスジェニックマウスを作成した。神経分化関連遺伝子の中には、神経分化直後に一過的に発現する遺伝子が見つかり知られている。このような遺伝子を含むゲノム BAC クローンを入手し、その遺伝子領域にタモキシフェン誘導型 Cre 組換え酵素 (Cre-ER) 遺伝子を組換えてトランスジェニックマウスを作出した。期待される結果は、これらのマウス系統において、多くの神経細胞で誕生後一過的に Cre-ER が発現する (図 2)。発生の一時期にタモキシフェンを投与すれば、ちょうどその時に Cre-ER を発現している生まれたばかりの神経細胞でのみ loxP 組換えが誘

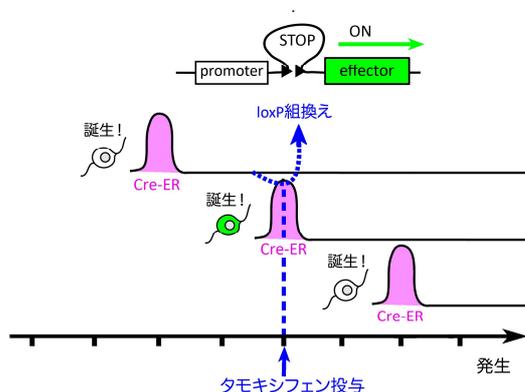


図 2 誕生日依存的組換えの原理

神経細胞は誕生後一過的に CreER を発現する。タモキシフェン (TAM) 投与により、ちょうどその時点で CreER を発現している神経細胞でのみ loxP 組換えが起こる。

導されるはずである。

神経分化後一過的に発現する遺伝子として 4 つ選び、各遺伝子について複数個のゲノム BAC クローンをを用いて合計 23 系統のトランスジェニックマウスを作出した。得られたマウス系統を、それぞれ全て loxP-STOP 配列をもつレポーター系統と交配して、タモキシフェン投与により、遺伝子組換えが誘導されるものを検索した。ほとんどの系統に置いてタモキシフェン依存的遺伝子組換えが誘導されたが、組換え効率と組換え神経細胞の脳内分布を詳細に解析した結果、特に有用な 5 系統を選抜した。

(2) 嗅球特異的レポーターマウスの作成

上記の誕生日依存的組換えマウス系統では、嗅球以外の神経細胞でも遺伝子組換えが誘導されるため、脳の他の領域も標識されてしまい、二次嗅覚投射領域の観察の妨げになる。そこで、嗅球特異的プロモーターを使ったレポーターマウスを作成した。嗅球特異的プロモーターとしては *Cdhr1* 遺伝子を用いて、loxP-STOP-loxP 配列が切り出されると、レポーター遺伝子が発現する設計にした。14 系統を作成し、嗅球の解析に最も相応しいものを選び出した。

(3) 誕生日依存的嗅球軸索投射の解析

誕生日依存的組み替えマウス系統と嗅球特異的レポーターマウス系統の交配により、誕生日依存的嗅球軸索投射の解析を行なった。この解析のためにマウス系統の最も良い組み合わせを検討し、嗅球の誕生日による軸索投射の違いが明らかになった。

本研究では、神経細胞の誕生時期依存的組換えを誘導するために、マウス系統を作り直すところから着手した。その甲斐があって、既存の系統とは比べ物にならない効率で誕生日依存的組換えを誘導できるマウス系統を複数得る事ができた。使用した遺伝子ごとにそれぞれ特徴があり、今後、様々な用途への利用が期待できる。本研究だけでなく、他の研究にも応用可能

な有用なリソースが得られたという点で、期待以上の成果であった。

<引用文献>

H. Yamatani, Y. Sato, H. Fujisawa and T. Hirata, Chronotopic organization of olfactory bulb axons in the lateral olfactory tract. (2004) **J. Comp. Neurol.** 475, 247-260.

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5件)

S. Mita, P. Monasterio-Schrader, U. Fünfschilling, T. Kawasaki, H. Mizuno, T. Iwasato, K.-A. Nave, H. B. Werner, and T. Hirata , Transcallosal projections require glycoprotein M6-dependent neurite growth and guidance. (2015) **Cerebral Cortex** 25, 4111-4125 査読有り

DOI: 10.1093/cercor/bhu129

S. Kanatani, T. Honda, M. Aramaki, K. Hayashi, K. Kubo, M. Ishida, D. H. Tanaka, T. Kawachi, K. Sekine, S. Kusuzawa, T. Kawasaki, T. Hirata, H. Tabata, P. Uhlén, K. Nakajima, The COUP-TFII/Neuropilin-2 is a molecular switch steering diencephalon-derived GABAergic neurons in the developing mouse brain. (2015) **Proc Natl Acad Sci USA** 112, E4985-4994.

査読有り

DOI: 10.1073/pnas.1420701112.

I. K. Suzuki and T. Hirata, A common developmental plan for neocortical gene-expressing neurons in the pallium of the domestic chicken *Gallus gallus domesticus* and the Chinese softshell turtle *Pelodiscus sinensis*. (2014) **Front. Neuroanat.** April 8 1-17. 査読有り

DOI: 10.3389/fnana.2014.00020

Y. Ohtani, M. Miyata, K. Hashimoto, T. Tabata, Y. Kishimoto, M. Fukaya, D. Kase, H. Kassai, K. Nakao, T. Hirata, M. Watanabe, M. Kano and A. Aiba, The synaptic targeting of mGluR1 by its carboxyl-terminal domain is crucial for cerebellar function. (2014) **J. Neurosci.** 34 2702-2712. 査読有り

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3542-13.2014.

I. K. Suzuki and T. Hirata, Neocortical neurogenesis is not really “neo”: a new evolutionary model derived from a comparative study of chick pallial development. (2013) **Dev. Growth Differ.** 55, 173-187. 査読有り

DOI: 10.1111/dgd.12020.

[学会発表](計5件)

T. Hirata, Evolutionary conservation of neocortical neurogenetic program in the mammals and birds. 9th World Congress IBRO 2015, Symposium: Evolution of cerebral cortical development, 2015年7月7-11日, Rio de Janeiro (Brazil)

平田たつみ, Origin of the neurogenetic program in the mammalian neocortex .第48回日本発生生物学会 シンポジウム 2015年6月2-5日 つくば国際会議場(茨城県 つくば)

T. Hirata, Mammalian-type neurogenic potential in chick pallial neural progenitors. The Company of Biologists Workshop, Evolution of the Human Neocortex: How Unique Are We?, 2013年9月22-25日, Steyning (UK)

〔図書〕(計2件)

T. Nomura and T. Hirata, The neocortical homologs in non-mammalian amniotes: bridging the hierarchical concepts of homology through comparative neurogenesis. In Evolution of Nervous Systems, 2nd edition, S. Herculano-Houzel and J.H. Kaas (eds) (2016) Elsevier. (in press) ページ数未定

6. 研究組織

(1)研究代表者

平田 たつみ (HIRATA, Tatsumi)
国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・教授
研究者番号：80260587

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし