

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290015

研究課題名(和文) 嗅球における匂い経験依存的な神経回路再編の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms that regulate the sensory experience-dependent development of dendritic spines in newborn olfactory bulb interneurons

研究代表者

坪井 昭夫 (Tsuboi, Akio)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20163868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：嗅球介在ニューロンは、胎生期のみならず成体期でも常に新生され、既存の神経回路に編入されている。また嗅球の神経回路は匂い経験に依存して再編されると考えられているが、その分子機構は不明である。私共はこれ迄に、匂い経験依存的な介在ニューロンの樹状突起の発達やスパインの形成に關与する膜蛋白質5T4や転写因子Npas4を同定した。そこで本研究では、嗅球介在ニューロンの樹状突起において、Npas4がその発現量に応じて、Mdm2のコピキチン化を介して、微小管結合蛋白質のダブルコルチンを分解することにより、スパイン形成を制御していることを明らかにした(Cell Reports, 8, 843, 2014)。

研究成果の概要(英文)：Sensory experience regulates neuronal development in various brain structures, including the cortex, hippocampus and olfactory bulb (OB). However, little is known about the developmental role of sensory experience in major OB populations of inhibitory interneurons, such as granule cells (GCs). In this study, we identified a transcription factor Npas4 gene, which is expressed in a subset of OB GCs following sensory experience. Npas4 overexpression in newborn OB GCs increased the spine density even under sensory deprivation. Conversely, Npas4-KO mice resulted in a significant reduction in the spine density of OB GCs. Furthermore, we identified, as a novel target of Npas4, an E3 ubiquitin ligase Mdm2 gene, which is expressed at low levels in the wild-type OB but at higher levels in the Npas4-KO OB. These results suggest that Npas4 regulates Mdm2 expression to ubiquitinate and degrade a microtubule-associated protein Dcx for shaping the dendritic spines of OB GCs after sensory experience.

研究分野：分子生物学、神経科学

キーワード：成体神経新生 嗅球介在ニューロン 神経活動依存性 神経可塑性 神経再生 嗅覚系

## 1. 研究開始当初の背景

嗅細胞で受容された匂い情報は、投射先である嗅球に送られ、そこで処理されてから、更に嗅皮質へ伝えられ認識される。嗅球における抑制性の介在ニューロン（傍系球細胞・顆粒細胞）は、二次ニューロンである房飾細胞や僧帽細胞とシナプスを形成し、側方抑制などにより匂い情報を処理している。また、嗅球介在ニューロンは、例外的に胎生期のみならず成体期でも常に新生され、既存の神経回路に編入され続けているというユニークな特徴を持ち、再生医療の分野からも注目されている（図1）。

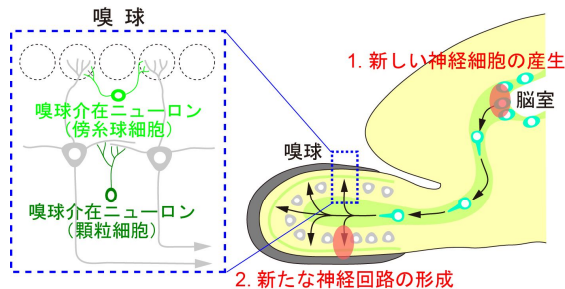


図1 嗅球介在ニューロンの発達

抑制性の嗅球介在ニューロン（顆粒細胞）は大人になっても脳室周辺で新しく産まれて、嗅球へ移動し、新たな神経回路を形成している。

## 2. 研究の目的

申請者らは、1回膜貫通型の糖蛋白質 5T4 が、匂い刺激に応じて嗅球介在ニューロンの樹状突起の枝分れの度合いを制御していることを報告した<sup>1)</sup>。しかし、嗅球介在ニューロンの樹状突起でのスパイン（シナプスを構築する棘突起）形成のメカニズムについては不明のままであった。そこで、本研究では、嗅球介在ニューロンにおける匂い刺激依存的なスパイン形成の分子機構を解明した<sup>2)</sup>。

## 3. 研究の方法

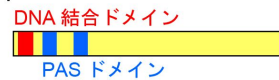
- (1) 鼻孔遮蔽により嗅球介在ニューロンにおいて発現が変化する遺伝子の DNA マイクロアレイ解析
- (2) レンチウイルスベクターを用いた嗅球介在ニューロンにおける *Npas4* 遺伝子の過剰発現やノックダウン解析
- (3) *Npas4* 抗体を用いたクロマチン免疫沈降シーケンシング (ChIP-Seq) 解析
- (4) 野生型と *Npas4* ノックアウトマウスの嗅球において合成量が変化する蛋白質のプロテオミクス解析

## 4. 研究成果

(1) 申請者らは、匂い刺激依存的なスパイン形成の分子メカニズムを明らかにするために、鼻孔の開いている側と閉じている側の嗅球の間で発現量が変動している遺伝子を、DNA マイクロアレイ法を用いて探索した<sup>2)</sup>。その結果、転写因子である *Npas4* 遺伝子の発現が、

嗅球介在ニューロンにおいて匂い刺激依存的に誘導されていることを見出した（図2）。

### A *Npas4* 蛋白質



### B *Npas4* 遺伝子の発現

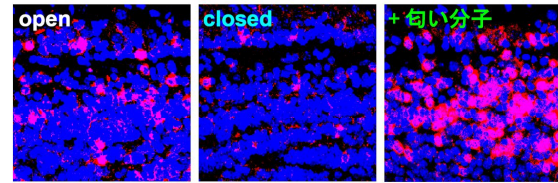


図2 *Npas4* 遺伝子の嗅球介在ニューロンでの発現

(A) *Npas4* は PAS ドメインを持つ転写因子であり、下流の遺伝子の発現を制御する。  
(B) 鼻を閉じて匂い刺激を遮断したマウスの嗅球では、嗅球介在ニューロン（灰色は核を示す）での *Npas4* の発現（白）が顕著に減少した。逆に、匂いで刺激すると、嗅球ニューロンでの *Npas4* の発現が強く誘導された。

(2) 申請者らは、嗅球介在ニューロンにおける *Npas4* の機能を明らかにするために、レンチウイルスベクターを用いて、その過剰発現を行った。その結果、*Npas4* を過剰発現した嗅球介在ニューロンでは、コントロールに比べて、樹状突起のスパイン密度が増加していた。逆に、*Npas4* 遺伝子の発現を shRNA により抑制した場合やノックアウトした場合には、野生型の嗅球介在ニューロンに比べて、樹状突起のスパイン密度が減少していた。これらの結果から、嗅球介在ニューロンでは、匂い刺激により *Npas4* 遺伝子の発現が誘導され、その発現量に応じてスパイン数の増減が制御されていることが明らかになった。

(3) 申請者らは、*Npas4* は DNA 領域に結合して遺伝子の発現を調節する転写因子であるので、その下流にあるスパイン形成に関与する遺伝子の発現を制御していると推測した<sup>2)</sup>。そこで、*Npas4* が発現制御している下流遺伝子を、*Npas4* 蛋白質が結合する DNA を同定する ChIP-Seq 法を用いて探索した。得られた候補遺伝子について、嗅球介在ニューロンでの発現を調べたところ、蛋白質の分解を促進する E3 ユビキチンリガーゼの1つである *Mdm2* 遺伝子の発現が、*Npas4* ノックアウトマウスでは野生型よりも増加していた。

(4) 申請者らは、*Mdm2* が分解する標的蛋白質を、プロテオミクスを用いて探索した。その結果、*Npas4* ノックアウトマウスの嗅球介在ニューロンでは、*Mdm2* 蛋白質の増加に伴って、微小管結合蛋白質であるダブルコルチン (Dcx) の分解が促進していた。さらに、ダブルコルチン遺伝子を嗅球介在ニューロンで過剰発現させると、スパイン密度が増加することが判明した。以上の結果から、嗅球介在ニューロンでは、*Npas4* の発現量に応じて、スパイン形成に関わるダブルコルチンが *Mdm2* のユビキチン化により分解され、スパ

イン密度が制御されていることが明らかになった(図3)。

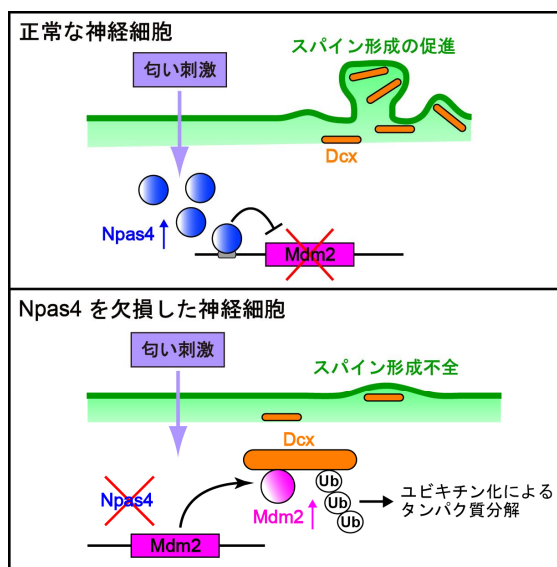


図3 Npas4によるスパイン形成の分子メカニズム  
(上) 野生型の嗅球介在ニューロンでは、匂い刺激によりNpas4の発現量が増加し、Mdm2の発現を抑制している。(下) Npas4を欠損した嗅球介在ニューロンでは、Mdm2の発現量が増加して、ダブルコルチン(Dcx)タンパク質の分解が促進される。Dcxはスパイン形成を促進するので、Npas4がDcxの量を調節することにより、新たに作られるスパインの数を制御している。

匂い刺激により神経活動が盛んになった嗅球介在ニューロンでは、Npas4の発現量が増加し、それに伴ってスパイン密度が増加して、より多くの二次ニューロンと接続できるようになると推測される。実際に、嗅球介在ニューロンで特異的にNpas4を欠損させたマウスは、構造的に似通った2つの匂い分子を弁別学習することができないことを見出している<sup>2)</sup>、匂い刺激によるスパイン密度の増加は精密な嗅覚情報処理に必須であることが示唆された。

今後、嗅球介在ニューロン特異的なNpas4ノックアウトマウスを用いて、匂いの情報処理を電気生理学的に解析することにより、新生ニューロンによる匂い刺激依存的な嗅球神経回路の再編に関する生理的意義が明らかになると期待される。また、脳梗塞モデルマウスにおいて嗅球介在ニューロンの一部は、損傷した脳の領域へ移動し、修復する性質を持つことが知られている<sup>3)</sup>。従って、本研究は脳梗塞などの脳血管障害を回復させるための新規治療法の開発にもつながると期待される。

## 参考文献

- 1) Yoshihara, S. et al. : *J Neurosci* 32, 2217-26 (2012).
- 2) Yoshihara, S. et al. : *Cell Reports* 8: 843-57 (2014).
- 3) Yamashita, T. et al. : *J Neurosci* 26, 6627-36 (2006).

## 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9件)  
(欧文論文、査読有)

- Yoshihara S, Takahashi H, Tsuboi A: Molecular mechanisms regulating the dendritic development of newborn olfactory bulb interneurons in a sensory experience-dependent manner. *Frontiers in Neuroscience* 9: 514 (2016).
- Muroi C, Kashiwagi Y, Rokugawa T, Tonomura M, Obata A, Nevzati E, Tsuboi A, Okuchi K, Mishima K, Abe K, Fujioka M: Evaluation of a filament perforation model for mouse subarachnoid hemorrhage using 7.0 Tesla MRI. *The Journal of Clinical Neuroscience* 28: 141-147 (2016).
- Sato T, Kobayakawa R, Kobayakawa K, Emura M, Itoharu S, Kawasaki T, Tsuboi A, Matsumura H: Supersensitive odor discrimination is controlled in part by initial transient interactions between the most sensitive dorsal olfactory receptors and G-proteins. *Receptors & Clinical Investigation* 3: e1117 (2016).
- Sato T, Kobayakawa R, Kobayakawa K, Emura M, Itoharu S, Kizumi M, Hamana H, Tsuboi A, Hirono J: Supersensitive detection and discrimination of enantiomers by dorsal olfactory receptors: evidence for hierarchical odour coding. *Scientific Reports* 5: 14073 (2015).
- Yoshihara S, Takahashi H, Nishimura N, Kinoshita M, Asahina R, Kitsuki M, Tatsumi K, Furukawa-Hibi Y, Hirai H, Nagai T, Yamada K, Tsuboi A: Npas4 regulates Mdm2 and thus Dcx in experience-dependent dendritic spine development of newborn olfactory bulb interneurons. *Cell Reports* 8: 843-857 (2014).

(和文総説)

- 吉原誠一, 坪井昭夫: 転写因子 Npas4 による神経活動依存的なシナプス形成の制御機構. *生化学* 第88巻 第2号 pp.220-224 (2016).
- 高橋弘雄, 坪井昭夫: 嗅覚系におけるCO<sub>2</sub> センシングの分子機構. *におい・かおり環境学会誌* 第46巻 第3号 pp.209-217 (2015).
- 吉原誠一, 高橋弘雄, 坪井昭夫: 嗅球ニューロンにおける匂い刺激依存的なシナプス形成の分子機構. *AROMA RESEARCH* 第15巻 第3号 pp.248-249 (2014).
- 高橋弘雄, 坪井昭夫: 嗅覚系におけるCO<sub>2</sub> センシングの分子機構. *化学と生物* 第51巻 pp.438-440 (2013).

〔学会発表〕(計 22 件)

(国際学会・シンポジウム)

Takahashi H, Yoshihara S, Ogawa Y, Asahina R, Kitano T, **Tsuboi A**: A specific subtype of olfactory bulb interneurons is necessary for odor detection and odor-background segregation. **The 17th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT2016)**, Yokohama, Japan (2016).

**Tsuboi A, Yoshihara S, Ogawa Y, Asahina R, Kinoshita M, Takahashi H**: A specific subtype of interneurons in the olfactory bulb is required for controlling odor detection and discrimination. **Current Trends in Biomedicine 2015: Development and Adult Neurogenesis in the Central Nervous System**, Baeza, Spain (2015).

(国際学会・一般講演)

Takahashi H, Yoshihara S, Ogawa Y, Asahina R, Kinoshita M, **Tsuboi A**: A specific subtype of newborn interneurons in the olfactory bulb is required for behaviors on odor detection and discrimination. **Fusion Conference on Neurogenesis: Implications for Lifelong Development and Disease**, Cancun, Mexico (2016).

**Tsuboi A, Takahashi H, Yoshihara S, Ogawa Y, Stern PL**: A specific subtype of newborn interneurons in the olfactory bulb is required for controlling odor detection and discrimination. **The 2015 Bridging Biomedical Worlds Symposium: From Neural Circuitry to Neurotechnology**, Tokyo, Japan (2015).

Takahashi H, Yoshihara S, Nishimura N, Kinoshita M, Asahina R, Furukawa-Hibi Y, Nagai T, Yamada K, **Tsuboi A**: Npas4 regulates the sensory experience-dependent development of dendritic spines in newborn olfactory bulb interneurons. **Cold Spring Harbor Meeting: Axon Guidance, Synapse Formation & Regeneration**, Cold Spring Harbor, USA (2014).

**Tsuboi A, Takahashi H, Nishimura N, Kinoshita M, Asahina R, Furukawa-Hibi Y, Nagai T, Yamada K, Yoshihara S**: 5T4 and Npas4 regulate the sensory experience-dependent development of dendrites in newborn olfactory bulb interneurons.

**Keystone Symposia: Adult Neurogenesis**, Stockholm, Sweden (2014).

Yoshihara S, Takahashi H, Nishimura N, Kinoshita M, Asahina R, Furukawa-Hibi Y, Nagai T, Yamada K, **Tsuboi A**: Npas4 regulates the sensory experience-dependent development of dendritic spines in newborn olfactory bulb interneurons. **Cold Spring Harbor Meeting: Neuronal Circuits**, Cold Spring Harbor, USA (2014).

(国内学会・一般講演)

朝比奈諒, 高橋弘雄, 吉原誠一, 坪井昭夫: 脳梗塞時に発現する神経活動依存的遺伝子Npas4の解析. 第121回日本解剖学会総会全国学術集会, 福島県郡山市 (2016).

高橋弘雄, 吉原誠一, 小川陽一, 木下雅仁, 朝比奈諒, 坪井昭夫: 特定のサブタイプの嗅球介在ニューロンは匂いの検出と識別行動に必須である. 第38回日本分子生物学会年会, 神戸ポートピア (2015). 吉原誠一, 高橋弘雄, 木下雅仁, 北野達郎, 朝比奈諒, 坪井昭夫: 感覚入力依存的に嗅球介在ニューロンのシナプス形成を制御するNpas4に関するマイクロRNAの解析. 第38回日本分子生物学会年会, 神戸ポートピア (2015).

Takahashi H, Yoshihara S, Ogawa Y, Kinoshita M, Asahina R, **Tsuboi A**: A specific subset of newborn granule cells in the olfactory bulb are required for maintaining odor-detection thresholds and acquiring two-odor discrimination tasks. 第38回日本神経科学学会大会, 神戸ポートピア (2015). Yoshihara S, Takahashi H, Kinoshita M, Asahina R, **Tsuboi A**: MicroRNAs downstream of Npas4 that regulates the sensory experience-dependent development of dendritic spines in newborn olfactory bulb interneurons. 第38回日本神経科学学会大会, 神戸ポートピア (2015).

高橋弘雄, 吉原誠一, 小川陽一, 朝比奈諒, 玉田喜規, 坪井昭夫: 5T4 oncofetal trophoblast glycoprotein regulates the sensory experience-dependent dendritic development of olfactory bulb interneurons. 第92回日本生理学会大会, 神戸ポートピア (2015). 吉原誠一, 高橋弘雄, 西村信城, 木下雅仁, 朝比奈諒, 日比陽子, 永井拓, 山田清文, 坪井昭夫: Transcription factor Npas4 regulates the sensory experience-dependent development of dendritic spines in newborn olfactory bulb interneurons. 第92回日本生理学会大会, 神戸ポートピア (2015).

高橋弘雄, 吉原誠一, 小川陽一, 朝比奈諒, 玉田喜規, 坪井昭夫: 5T4 oncofetal trophoblast glycoprotein regulates the sensory experience-dependent dendritic development of olfactory bulb interneurons. 第37回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜 (2014).

吉原誠一, 高橋弘雄, 西村信城, 木下雅仁, 朝比奈諒, 日比陽子, 永井拓, 山田清文, 坪井昭夫: Transcription factor Npas4 regulates the sensory experience-dependent development of dendritic spines in newborn olfactory bulb interneurons. 第37回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜 (2014).

高橋弘雄, 吉原誠一, 小川陽一, 西村信城, 木下雅仁, 玉田喜規, 坪井昭夫: 5T4 glycoprotein regulates the sensory experience-dependent dendritic development of olfactory bulb interneurons. 第37回日本神経学会大会, パシフィコ横浜 (2014).

吉原誠一, 高橋弘雄, 西村信城, 木下雅仁, 朝比奈諒, 日比陽子, 永井拓, 山田清文, 坪井昭夫: Transcription factor Npas4 regulates the sensory experience-dependent development of dendritic spines in newborn olfactory bulb interneurons. 第37回日本神経学会大会, パシフィコ横浜 (2014).

高橋弘雄, 吉原誠一, 辰巳加奈, 坪井昭夫: Time-lapse imaging of neuronal migration in the mouse olfactory bulb. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド (2013).

吉原誠一, 高橋弘雄, 西村信城, 木下雅仁, 永井拓, 山田清文, 坪井昭夫: Npas4 regulates the sensory experience-dependent development of dendritic spines in olfactory bulb granule cells. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド (2013).

②1 高橋弘雄, 吉原誠一, 玉田喜規, 廣野順三, 佐藤孝明, 坪井昭夫: Molecular basis of CO<sub>2</sub> sensing in the mouse olfactory system. 第36回日本神経学会大会, 京都国際会館 (2013).

②2 吉原誠一, 高橋弘雄, 木下雅仁, 西村信城, 永井拓, 山田清文, 坪井昭夫: Npas4 transcription factor regulates the sensory experience-dependent dendritic spine development of newborn interneurons in the mouse olfactory bulb. 第36回日本神経学会大会, 京都国際会館 (2013).

〔図書〕(計2件)

**Tsuboi A**, Sakano H: Odorant receptor gene regulation. *In: HANDBOOK OF OLFACTION & GUSTATION, THIRD EDITION* (editor, Doty RL), **Wiley-Blackwell**, Chapter 6, pp.123-132 (2015).

Takahashi H, Yoshihara S, Asahina R, Tamada Y, **Tsuboi A**: Characterization of newborn interneurons in the mouse olfactory bulb using postnatal electroporation. *In: Electroporation Methods in Neuroscience* (editor, Saito T), **Springer Protocols**, Vol. 104, pp.93-103 (2015).

〔その他〕

(新聞報道)

坪井昭夫

脳内の新たな神経回路 - 特定遺伝子の発現で作製 - 奈良県立医科大学・教授ら  
読売新聞(全国版)平成26年8月25日

坪井昭夫

かぎ分ける能力を育てるたんぱく質、  
奈良県立医科大学・脳治療に活用も  
朝日新聞(全国版)平成26年8月21日

坪井昭夫

匂いによる神経同士のつながりの  
メカニズムを解明 奈良県立医科大  
QLifePro(医療NEWS)平成26年8月12日

坪井昭夫

神経細胞の接続増やすタンパク質を発見、  
奈良県立医科大研究グループ  
産経新聞(近畿版)平成26年8月1日

坪井昭夫

神経細胞のつながり促進  
- 県医大グループが仕組み解明 -  
奈良新聞(奈良版)平成26年8月1日

(ホームページ)

<http://www.naramed-u.ac.jp/~amrc-lab1/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

坪井 昭夫 (TSUBOI AKIO)  
奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 20163868

(2) 研究分担者

吉原 誠一 (YOSHIHARA SEIICHI)  
奈良県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 90360669

高橋 弘雄 (TAKAHASHI HIROO)  
奈良県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 20390685

(3) 連携研究者

駒井 章治 (KOMAI SHOUJI)  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授  
研究者番号: 50420469