

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830032

研究課題名(和文) 成体マウス嗅球の新生顆粒細胞への遠心性入力のマッピング

研究課題名(英文) Mapping of centrifugal inputs onto newborn neurons in the adult mouse olfactory bulb

研究代表者

村田 航志 (Murata, Koshi)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：10631913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：嗅覚一次中枢である嗅球には、哺乳類であっても生後もニューロンが新たに生まれ既存の神経回路に組み込まれる。嗅球新生ニューロンは嗅覚記憶の形成に関わると考えられている。申請者のこれまでの研究により、嗅球新生ニューロンの既存の嗅球神経回路への組み込みは嗅覚皮質からの遠心性入力によって制御されることが示唆された。しかし嗅覚皮質から嗅球新生ニューロンへの投射様式はよくわかっていなかった。本研究では改変型狂犬病ウイルスベクターを用いて、嗅球新生ニューロンにシナプス入力を与える嗅覚皮質の分布を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The olfactory bulb is the first relay of olfaction in the central nervous system, and unique in that new neurons are continuously generated and incorporated into the preexisting neuronal circuit throughout life. Newborn neurons in the adult mouse olfactory bulb are suggested to play a role in formation of olfactory memories. Although the incorporation of newborn neurons into the preexisting neuronal circuit is regulated by, at least in part, the centrifugal inputs from the wide areas of the olfactory cortex, the anatomical connection between newborn neurons and neurons in the olfactory cortex is unclear. In this study, I performed retrograde transsynaptic tracing using modified-rabies virus and revealed distribution of the presynaptic neurons in the olfactory cortex onto newborn neurons in the olfactory bulb.

研究分野：神経生物学

キーワード：神経科学 成体ニューロン新生 嗅球 嗅結節 逆行性トレーシング

1. 研究開始当初の背景

嗅覚神経系の一次中枢である嗅球には、哺乳類の脳の中でも生後もニューロンが新たに生まれ、既存のニューロンと入れ替わるといったユニークな性質が備わっている。嗅球新生ニューロンは匂い記憶の形成に関わることが示唆されているが、どのような神経回路基盤によって新生ニューロンが匂い記憶形成に関わるかはほとんどわかっていなかった。

申請者らのこれまでの研究により、嗅球新生ニューロンの既存の嗅球神経回路への組み込みは嗅覚皮質からの遠心性入力によって制御されることが示唆された。嗅球新生ニューロンの匂い記憶形成への寄与を明らかにするうえで、嗅覚経験が嗅覚皮質を介して嗅球新生ニューロンにシナプス入力を与える経路は重要な手がかりになる。しかしながら嗅覚皮質から嗅球新生ニューロンへの投射様式はまだ明らかになっていなかった。

また申請者らは、嗅球新生ニューロンの除去という形での嗅球神経回路の再構成が、食後の休眠という特定の時間枠で起こることを見いだしていた。嗅覚経験を伴う嗅覚記憶形成は、食事だけではなく電気ショック等の忌避刺激との条件付けによってもなされる。しかし、忌避刺激の提示によっても嗅球神経回路の再構成が誘導されるかどうかは不明であった。

2. 研究の目的

(1) 嗅球新生ニューロンの既存の嗅球神経回路への組み込みを制御する嗅覚皮質からの遠心性入力の実態を明らかにする。嗅球新生ニューロンに対してシナプス形成する嗅覚皮質ニューロン群を可視化し、マッピングした。

(2) 忌避刺激提示によって、嗅球新生ニューロンの除去が促進されるかどうかを検証する。

3. 研究の方法

(1) 近年開発された改変型狂犬病ウイルスを用いた逆行性経シナプストレースのシステムは、脳内の特定の神経細胞群への入力様式を明らかにできる点で優れており、本研究でもこのシステムを導入した。このシステムでは2つのウイルスベクターを用いる。1つは改変型狂犬病ウイルスで、野生型のウイルスから envelop が哺乳類細胞には感染しない EnvA へと偽型され、ゲノムから経シナプス感染に必要な G 遺伝子が欠損され代わりに蛍光タンパク質遺伝子が挿入されている。もう1つは標的としたい神経細胞種、すなわち嗅球新生ニューロンに EnvA への受容体である TVA と G 遺伝子を発現させる補助ベクターである。

本研究では、TVA と G 遺伝子の発現誘導にレンチウイルスベクターを選定した。これらの改変型狂犬病ウイルスおよびレンチウイルスを作製し、嗅球新生ニューロンにシナプス入力を与える嗅覚皮質の神経細胞群を蛍光タンパク質で標識することを試みた。

(2) マウスに電気ショックや拘束ストレスを提示する、その直後に嗅球で細胞死が増加するかどうかを active-caspase-3 の発現を指標に組織学的に検証した。また電気ショック提示による細胞死の増加が、嗅覚皮質からの遠心性入力によって制御されるかを検証するため、神経活動阻害剤を嗅覚皮質に局所投与した状態で電気ショックを提示し、嗅球での active-caspase-3 陽性細胞の増加が抑えられるかどうかを検証した。

4. 研究成果

(1) まず逆行性経シナプス性トレーシングに用いる改変型狂犬病ウイルスおよびレンチウイルスをまず作製した。レンチウイルスを成体マウスの側脳室周囲に局所投与し、その後改変型狂犬病ウイルスを嗅球背側部に局所投与した。図1で示すように、逆行性トレーシングの起点となった嗅球新生ニューロンは GFP (緑) と mCherry (赤) で二重標識された。二重標識された嗅球新生ニューロンに対して入力を与えるプレシナプス細胞は mCherry のみで標識された。

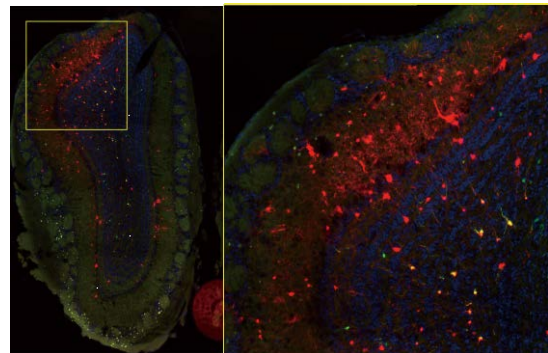


図1. 改変型狂犬病ウイルスによる、マウス嗅球新生ニューロンとそのプレシナプス細胞の網羅的標識。

レンチウイルスを用いて、あらかじめ嗅球新生ニューロンに GFP、改変型狂犬病ウイルスの受容体である TVA、経シナプス感染に必要な G タンパク質を発現誘導した。その後、mCherry をコードする改変型狂犬病ウイルスを嗅球背側部に局所投与することで、嗅球新生ニューロンからの逆行性経シナプストレーシングがなされた。

この標識された動物の嗅覚皮質において mCherry 標識された細胞を観察し、嗅球新生ニューロンに遠心性入力を与える経路を評価した (図2, 3)。

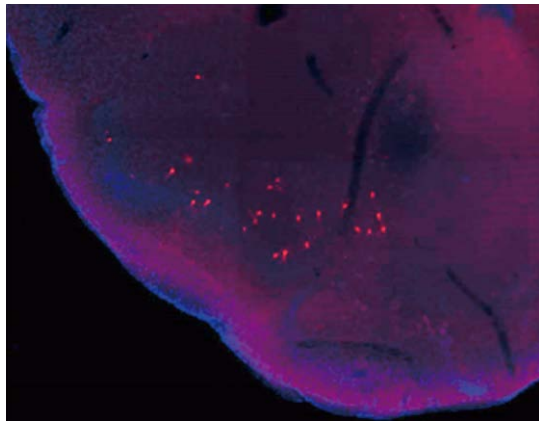


図 2. mCherry 標識された嗅球新生ニューロンに遠心性入力を与える嗅覚皮質領域（梨状皮質）の神経細胞群。

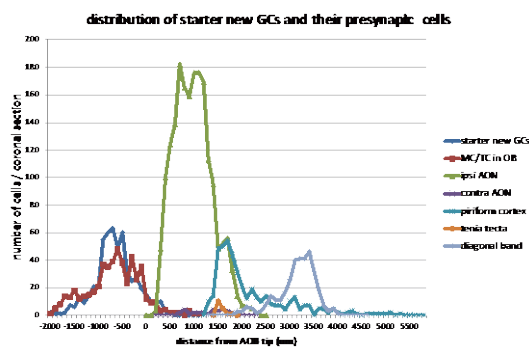


図 3. mCherry 標識されたプレシナプス細胞の分布を嗅覚皮質の亜領域ごとに定量評価した。

嗅球新生ニューロンに対して遠心性入力を与える嗅覚皮質ニューロンの分布を解析から、嗅球新生ニューロンは、前嗅核、tenia tecta、前梨状皮質、後梨状皮質、および対角帯という非常に広範な領域からの遠心性入力を受けることがわかった。

(2) 電気ショックを提示したマウスでは、嗅球において細胞死のマーカである active-caspase-3 を発現する細胞が増加した (図 4)。この細胞死の増加は、電気ショック提示から数分以内に起こる迅速な応答であった。

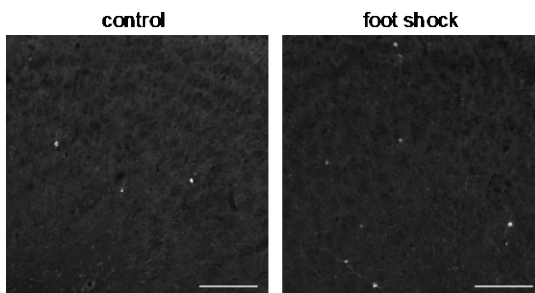


図 4. 電気ショック提示による迅速な嗅球に

おける細胞死の誘導

また嗅皮質の神経活動を薬理的に阻害したままストレス刺激を提示すると、嗅球での細胞死増加は抑えられた (図 5)。

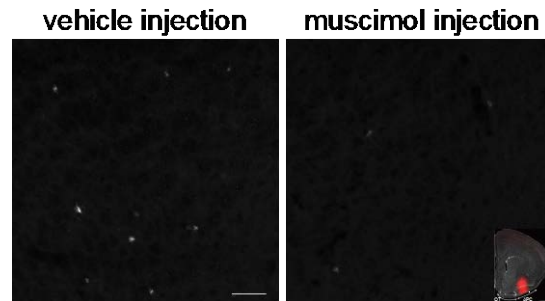


図 5. 嗅覚皮質の薬理的活動抑制により、電気ショック提示による嗅球での細胞死の増加は抑えられた。

右側の写真、右下の赤い領域は、神経活動阻害剤のムシモールの効果が及んだ範囲である。

この結果から、嗅皮質からの遠心性入力を通してストレス性の嗅覚経験が嗅球新生ニューロンの組み込みを制御する可能性が示唆された。

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)

Komano-Inoue S., Murata K., Mori K., and Yamaguchi M.

Rapid induction of granule cell elimination in the olfactory bulb by noxious stimulation in mice
Neuroscience Letters 598: 6-11, 2015

[学会発表] (計 2 件)

村田 航志、菅野 未知子、家城 直、森 憲作、山口 正洋

モチベーション状態依存的な嗅結節の活性化領域の変化
第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

村田 航志、駒野-井上 清香、森 憲作、山口 正洋

恐怖・ストレスによる嗅球背側部の局所的リモデリング
第 10 回成体脳のニューロン新生懇談会、2014 年 12 月、東京大学フューチャーセンター (千葉県・柏市)

[その他]

ホームページ等

<http://morilab.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 航志 (MURATA, Koshi)

東京大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：10631913

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし