

# 研究報告書

## 「神経スパイク列の再構成から迫る神経活動依存的な神経回路形成機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 竹内 春樹

### 1. 研究のねらい

高等動物の脳のもつ高度な情報処理能力は、 $10^8$ を超える神経細胞が構築する複雑かつ精緻な神経回路によって担われている。この神経回路の形成不全は様々な神経疾患の原因となることから、『神経回路がどのように作られるのか』を明らかにすることは脳機能の理解、並びに神経疾患治療の観点からも重要であると考えられる。

高等動物の神経回路は、臨界期と呼ばれる生後の限られた期間に生じる神経活動を介して成熟することが知られている。神経活動は、活動電位と呼ばれる電氣的パルス単位とするスパイクの列として検出されるが、経時的に変化するスパイク列のパターンがどのように細胞内のシグナル伝達系に読み取られ適切な回路が形成されるのかに関しては殆ど解明がなされていない。本研究では、解剖学的に回路構造が単純で神経回路形成研究の優れたモデルであるマウス嗅覚系を用いて、神経活動依存的な回路形成メカニズムの解明に挑む。

マウスの嗅覚系では、個々の嗅覚神経細胞(以下嗅神経)で発現する単一の嗅覚受容体(olfactory receptor: OR)遺伝子が細胞の個性を決定する。同種のORを発現した嗅神経の軸索は互いに収斂して嗅球の特定の糸球体へと投射する。このOR依存的な軸索投射は、OR分子が複数の軸索ガイダンス分子の遺伝子発現を調節し軸索末端に『分子コード』を作り出すことによって達成される。その際、これら軸索ガイダンス分子群の発現は嗅神経で生じる自発的な神経活動によって影響を受けることから、ORの種類に依存した『分子コード』は神経活動を介して形成されると考えられる。しかしながら、OR分子の違いがどのように神経活動の中に表現されるのか、また神経活動がどのように複数の軸索ガイダンス分子の発現を制御しているのかといった具体的なメカニズムについては殆どわかっていない。そこで本研究では、近年目覚ましい発展を遂げた光遺伝学、光イメージングの手法を用いて神経活動を観察・操作し、神経活動依存的な回路構築メカニズムの解明を目指す。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

マウス嗅覚系におけるOR分子依存的な軸索投射は、神経活動を介した複数の軸索ガイダンス分子の発現制御によって達成される。個々の軸索ガイダンス分子の発現は発現するOR分子に依存しているものの、軸索ガイダンス分子間での発現パターンは大きく異なっている。このことから、以下の2つ疑問が想定される。一つは、どのようにORの種類という情報が神経活動の中に表現されるのか(研究テーマ1)、もう一つは神経活動を介してどのように軸索選別分子の多様な発現パターンが作り出されるのか(研究テーマ2)である。そこで本研究では、嗅神経の神経活動を観察・操作することを通じて上記の2つ問題の解明に努めた。まず一つ目の問題を明らかにするために、カルシウムイメージング法を用いて嗅神経の神経活動

を可視化し、時間変化のパターンを解析した。その結果、発生期に生じる神経活動のパターンと発現するORの種類との間に相関関係があることを明らかにした。

次に、神経活動がどのようにして軸索ガイダンス分子の多様な発現パターンを作り出しているかを明らかにするために、光遺伝学的手法を用いて嗅神経の神経活動を操作する系を構築した。その後、嗅神経に光照射によって人為的に様々な神経活動パターンを作り出し軸索ガイダンス分子群の発現変化を調べた。その結果、神経活動の異なる発火パターンに対して異なる軸索ガイダンス分子の発現が影響を受けることがわかった。これらの光刺激依存的な遺伝子の発現上昇はカルシウムイオン依存的であったことから、神経活動に伴って変化する細胞内のカルシウム濃度変化を細胞内の複数の転写因子がそれぞれ独自の読み枠で読み取ることによって多様な発現パターンを生み出しているという可能性が示唆された。

以上より、嗅覚系における神経活動はORの種類という神経個性を自身の経時的な発火のパターンへと変換し、ORの種類に固有な遺伝子発現を制御すると考えられた。このモデルは、既存のよく知られたヘブ則とは異なるものであり、本研究を通じて活動依存的な回路構築の新しいメカニズムの存在を見出すことが出来た。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A 「どのように嗅覚受容体(OR)の種類という情報が神経活動の中に表現されるのか→カルシウムイメージング法による嗅神経の神経活動の可視化」

嗅神経の自発的な神経活動を可視化するためにカルシウムイメージング法を導入した。我々は、遺伝子改変技術を用いて現時点(2016年12月現在)で最高感度の蛍光カルシウムセンサーである GCaMP6f を嗅神経特異的に発現する変異マウスを作製し、嗅神経の自発的な神経活動の可視化に初めて成功した。またこのマウスの嗅覚組織スライスをニポウディクス型共焦点顕微鏡下で観察することで、一度に大多数の嗅神経から長期間に及ぶ神経活動の記録に成功した。特定のORを発現する嗅神経における神経活動に着目して解析を進めたところ、発生期に生じる神経活動のパターン(カルシウムスパイク頻度、スパイクの形、スパイク間の間隔)と発現するORの種類との間に相関関係があることがわかった。

続いて、遺伝子改変技術を用いてOR遺伝子のプロモーターを変えずにOR遺伝子だけを入れ替えた変異マウスを用いて同様の実験を行ったところ、発現するORに依存して神経活動パターンが変化した。このことから、嗅神経における自発的な神経活動は発現するORによってそのパターンが制御されているものと推察された。

### 研究テーマ B 「神経活動を介してどのように軸索選別分子の多様な発現パターンが作り出されるのか→光遺伝学を用いた神経活動操作による遺伝子発現変化の観察」

研究テーマ1で、ORの種類と神経活動パターンに相関が見られたことから、神経活動のパターンが軸索ガイダンス分子群の多様な発現を作り出している可能性が考えられた。この仮説を検証するために、まず遺伝子改変技術を用いてチャネルロドプシン2という光活性化型オプシンを嗅神経特異的に発現させる遺伝子改変動物を作製した。この変異マウスの嗅神経に光パルス照射することで、40Hz までの高周波数の神経活動をシング

ルスパイクレベルで制御できることを確認した。その後、発火頻度を揃えて嗅神経に様々な神経活動パターンを作り出し、軸索ガイダンス分子群の発現への影響を検討した。その結果、異なる神経活動のパターンに対して異なる軸索ガイダンス分子の発現量が上昇することがわかった。カルシウムイオンをキレートした状態では軸索ガイダンス分子の発現上昇は観察されなかったことから、神経活動に伴って変動する細胞内のカルシウム濃度が重要であることが示唆された。

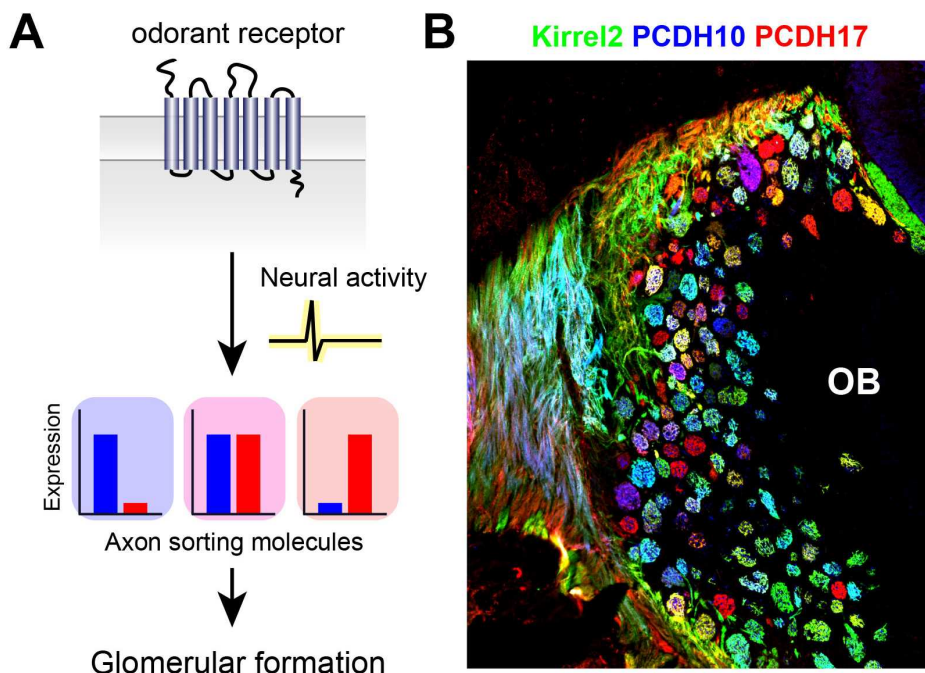


図1. 本研究を通じて明らかとなったマウス嗅覚系における  
神経活動依存的な回路形成メカニズム

(A) 嗅覚受容体 (OR) は、嗅神経の自発的な神経活動のパターンを制御する。OR に固有な神経活動のパターンは複数の軸索ガイダンス分子 (axon sorting molecule) の発現量を調節する。これにより軸索末端に OR の種類に固有な『分子コード』が作り出され、適切な神経回路 (glomerular formation) が形成される。

(B) 3 種類の軸索ガイダンス分子の嗅神経軸索における発現パターン。軸索末端では軸索ガイダンス分子の種類と量からなる『分子コード』が形成される。OB: olfactory bulb

### 3. 今後の展開

本研究では、神経活動パターンが遺伝子の発現制御を介して回路構築に貢献するというメカニズムの存在を明らかにした。これは、ヘブ則として知られる神経細胞間の同期的な活動を利用したこれまでの回路形成メカニズムとは、時間スケールの長さや遺伝子発現を介するという点で大きく異なっている。従って、本研究で得られた知見は活動依存的な回路形成原理の新しいメカ

ニズムであると考えられる。

今後は、嗅覚受容体がどのように自身の種類を反映した神経活動パターンを作り出すのか、また経時的に変化するカルシウム動態をどのように下流の因子がパターン特異的に読み取るのといった問題を明らかにしていく必要がある。また、本研究で見出された回路形成のメカニズムが他の脳領域にも当てはまる敷衍的な原理であるかどうかを検証することも重要な課題であると考えられる。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

本研究の目的は、嗅覚系における神経活動依存的な回路構築メカニズムを明らかにすることであった。研究結果に示した通り、既存のモデルに当てはまらない新しいモデルの存在を示唆するデータを得ることが出来た。また単純な観察結果に留まらず、光遺伝学を使って神経活動パターンと遺伝子発現との間の因果関係を明らかにすることが出来た点には満足している。当初予定していた目的については概ね計画どおり達成することが出来たと考えている。しかしまだ一本の細い道筋がついた程度に過ぎず、今後より実験を積み重ねることでより信頼性の高いモデルとして主張することが出来るようになると思われる。また、本研究を通じて更なる疑問が生まれてきている。これらを一つ一つ解決していくことを通じて、回路形成に関するより本質的な理解を深めると共に、研究のオリジナリティを高めていく必要があるだろう。

また本研究領域では、領域内メンバーとの交流、共同研究が強く奨励された。本領域は異分野の研究者が集まる非常にヘテロな集団であり、さきがけ研究開始当初、共同研究はおろか、研究内容すら理解することができなかった。しかしながら数回に及ぶ勉強会の甲斐もあり、複数の研究者と気軽に情報交換できるところまで親密になれたこと、また複数の共同研究に発展する可能性のあるプロジェクトを開始できたことについてはとても満足している。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

特定の嗅覚受容体を発現する神経細胞を遺伝子改変技術によって蛍光標識し、電気生理学的手法によって神経活動の記録に成功し、その結果、発現する嗅覚受容体ごとに神経発火のパターンが異なっていることが判明した。神経細胞の発火パターンを得意とする池谷研究室との連携が功を奏したと言える。さらに、カルシウムインディケータである GCAMP6f を用いたカルシウムイメージングによって一度に多数の神経細胞の活動パターンを記録することに成功し、細胞間の同期的活動性の有無などを検証することが出来たことは、今後の発展につながる大きな成果と評価できる。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 論文(原著論文)発表

1. Eerdunfu, Ihara N, Bao Ligao, Ikegaya Y, and Takeuchi H

<p>“Differential timing of neurogenesis underlies the dorsal–ventral topographic projection of olfactory sensory neurons” <i>Neural. Dev</i> submitted</p>
<p>2. Ihara N, Nakashima A, Hoshina N, Ikegaya Y and <u>Takeuchi H</u>  “Differential expression of axon–sorting molecules in mouse olfactory sensory neurons” <i>Eur. J. Neurosci</i> 2016, Vol.44(3), 1998–2003  <b>Featured in World biomedical Frontiers</b>[ISSN:2328–0166]</p>
<p>3. <u>竹内春樹</u>  “嗅覚情報処理を担う神経地図形成の分子基盤”  <b>生体の科学</b> 増大特集 生命動態システム 2014, Vol.65,10月号</p>
<p>4. <u>Takeuchi H</u>, and Sakano H  “Neural Map Formation in the Mouse Olfactory System.”  <b>CMLS</b>, 2014, Vol71, 3049–57</p>
<p>5. *Nakashima A, *<u>Takeuchi H</u>, Imai T, Saito H, Kiyonari H, Abe T, Chen M, Weinstein LS, Yu CR, Storm DR, Nishizumi H, and Sakano H  “Agonist–Independent Receptor Activity Regulates Axon Targeting of Olfactory Neurons.”  <b>Cell</b>, 2013, Vol.154 1314–1325 ※ equally contributed</p>

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【学会発表】

1.Nakashima A, Ihara N, Ikegaya Y and Takeuchi H “Patterned spontaneous activity regulates OR–specific axon sorting”Keystone Symposia “Synapses and Circuits” (New Mexico, USA), 2017/3/5–8

2.Nakashima A, Ihara N, Ikegaya Y and Takeuchi H “An instructive role for spontaneous neural activity in glomerular map formation”CSHL meeting “Axon Guidance, Synapse Formation & Regeneration” (New York,USA), 2016/9/20–24

3.Takeuchi H “Patterned spontaneous activity regulates OR–specific axon sorting”  
KoSCL symposium (Seoul, Korea), 2016/10/28–29

4.Takeuchi H, Ihara N, Nakashima A and Ikegaya Y “Differential expression of axon–sorting molecules in mouse olfactory sensory neurons”Society for Neuroscience 2016 (San Diego, USA), 2016/11/12–16

5.Takeuchi H, Nakashima A, Ihara N and Ikegaya Y “Activity–dependent olfactory neural circuit formation” 日本神経科学大会, 横浜, 2016/7/20–22

6. Nakashima A, Ihara N, Ikegaya Y and Takeuchi H “Activity dependent mechanisms of the olfactory map formation” ISOT2016 17<sup>th</sup> International Symposium on Olfaction and Taste, 2016/6/5-9

7. 竹内春樹、中嶋藍 “嗅覚神経地図形成の分子基盤” 生命動態システム科学四拠点・CREST・PREST 合同シンポジウム, 2015/3/16-17

**【受賞】**

1. 日本神経科学学会「奨励賞」(2016)