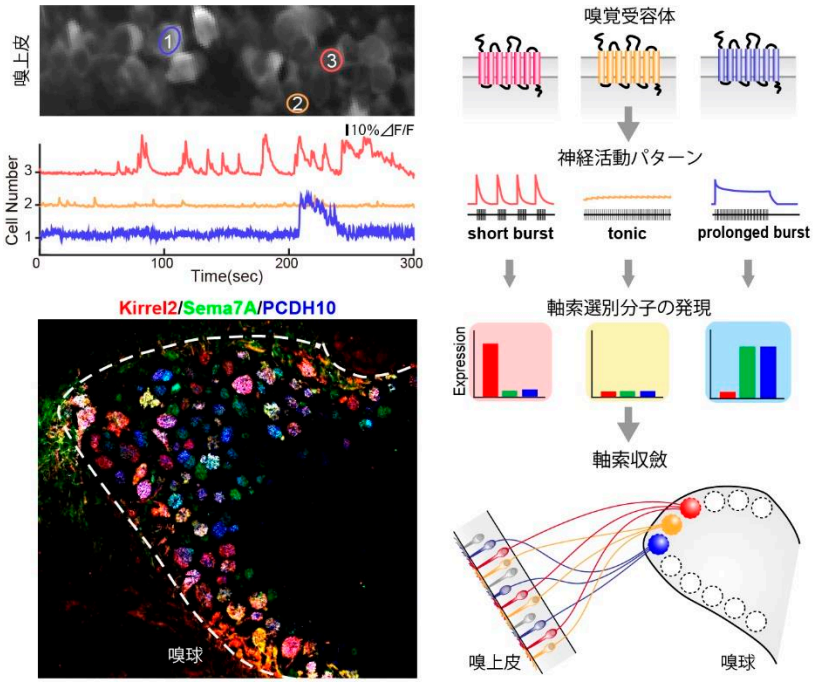
40　神経活動依存的な嗅覚回路の形成原理の解明	竹内　春樹

【目的】高等動物の神経回路は、遺伝的プログラムに加え発達期に生じる電気的な神経活動を介した精緻化を経て完成される。マウス嗅覚系では、個々の嗅細胞は発生の過程で一種類の嗅覚受容体遺伝子を発現し、その発現した受容体の種類に応じて軸索の選り分けが行われる。我々の先行研究から、発現した嗅覚受容体分子は神経活動を介して多数の軸索選別分子の発現を調節し軸索末端にそれらの分子の組み合わせからなる分子コードを作り出すことによって、受容体の種類に依存した軸索収斂を制御していることを明らかにしてきた。しかしながら、多数存在する”嗅覚受容体の種類”という情報が神経活動、即ち発火パターンの中にどの様に書き込まれ、どのような細胞内シグナル伝達経路を介して受容体の種類を反映した軸索選別分子群の発現量へと変換されているのかについてはほとんど解明されていない。

【方法】本研究では、マウス嗅覚系における神経活動依存的な回路形成機構を明らかにするために、以下に示す1．神経活動の記録、2．光遺伝学による神経活動操作とそれに伴う軸索選別分子の発現変化の検証の二つの実験を実施した。

【結果】その結果、嗅細胞は発達段階において匂い入力がない状況において自発的に活動すること、そしてその自発的な神経活動の時間パターンは、発現する嗅覚受容体によって規定されていることが分かった。また、光遺伝学的手法による嗅細胞の神経活動操作実験より、異なる神経活動パターンは異なる軸索選別分子の発現を制御していることが分かった。以上より、発現する嗅覚受容体の種類という情報は、神経活動の時間的なパターンへと変換されることで軸索末端に軸索選別分子の発現パターンが形成されることが分かった。

嗅覚系における神経活動依存的な軸索収斂の分子機構



40. 神経活動依存的な嗅覚回路の形成原理の解明

竹内　春樹

東京大学 大学院薬学系研究科 化学物質安全性評価システム構築講座

Key words：嗅細胞，嗅覚受容体，軸索投射，自発活動，軸索選別分子

緒　言

高等動物の神経回路は、遺伝的プログラムに加え発達期に生じる電気的な神経活動を介した精緻化を経て完成される。マウス一次嗅覚系において、個々の嗅細胞はゲノム中に約 1,000 種類存在する嗅覚受容体（olfactory receptor：OR）遺伝子［1］の中から 1 種類のみを選択して発現し、同種の OR を発現する嗅細胞は、発生の過程で互いに軸索を収斂させて投射し嗅球の特定の箇所に糸球体構造を形成する（図 1A）。従って、投射先である嗅球においては OR の種類に対応する糸球群からなるデジタルマップが形成され、OR 分子によって検出される匂い情報は“どの糸球が活性化したか”という位置情報に変換される。

この匂いの情報処理を支える神経回路は、遺伝的プログラムによる大まかな軸索の位置決めの過程を経た後、嗅細胞で生じる神経活動によって同じ OR を発現した細胞の軸索が収斂することで完成する［2］。この軸索収斂の過程において、嗅細胞で発現する OR が重要な役割を果たすことがわかっている。これに関して我々は、OR 分子が神経活動（自発活動）を介して多数の軸索選別分子の発現を調節し軸索末端にそれらの分子の組み合わせからなる分子コードが作られることを明らかにした（図 1B）［3，4］。しかしながら、多数存在する“OR の種類”という情報が神経活動、即ち発火パターンの中にどの様に書き込まれ、どのような細胞内シグナル伝達経路を介して OR の種類に固有な軸索選別分子群の発現量へと変換されているのかについてはほとんど解明されていない。

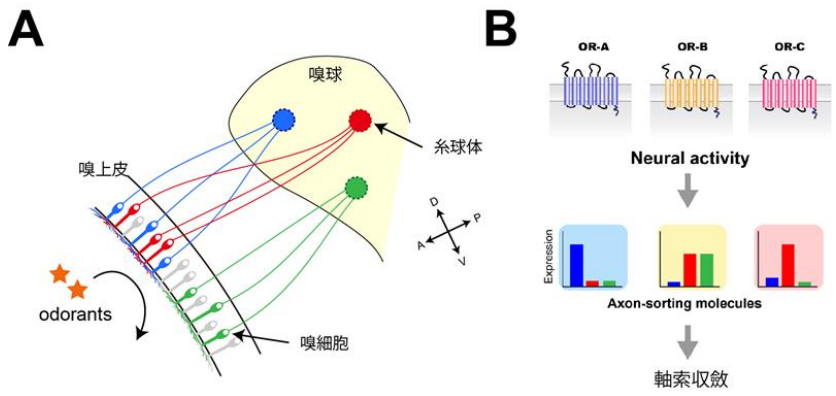


図 1. マウス嗅覚系の神経回路と軸索収斂機構

A）　嗅覚神経回路の概略図。同種の嗅覚受容体を発現した嗅細胞（異なる色で表示）の軸索は嗅球の特定の箇所に糸球体構造を形成して投射する。

B）　嗅覚受容体は神経活動依存的な発現を示す軸索選別分子の発現を制御し、受容体の種類に固有な軸索の収斂を制御する。

方法および結果

本研究では、マウス嗅覚系における神経活動依存的な回路形成機構を明らかにするために、以下に示す 1. 神経活動の記録、2. 光遺伝学による神経活動操作とそれに伴う軸索選別分子の発現変化の検証の 2 つの実験を実施した。

1. 嗅細胞の神経活動の記録

神経細胞では、活動電位の発生に伴ってカルシウムイオンの流入が生じるため、カルシウムイオンとの結合依存的に蛍光強度が変化するカルシウムセンサーを神経細胞に導入することで、神経活動の発生を可視化することができる。我々は、嗅細胞特異的にカルシウムセンサータンパク質である GCaMP6f を発現する遺伝子改変マウスを作製し、カルシウムイメージング法を用いて発達期にある嗅細胞の自発的な神経活動の記録を行った。その結果、嗅細胞間の自発的な神経活動パターンには目立った相関は見られず、嗅細胞ごとに多様な活動パターンを示すことが分かった。

次に、特定の OR を発現する嗅細胞について神経活動パターンを解析した。我々は、2 種類の嗅覚受容体 I7 と MOR28 に着目し、それぞれの受容体を発現する嗅細胞で特異的に GCaMP6f を発現する遺伝子改変マウスを作製し、カルシウムイメージングを行った。記録したカルシウム変動パターンから、様々な特徴量（標準蛍光強度、カルシウムスパイクのイベント回数、イベント間隔、ピーク振幅、変動係数、上昇・下降時間など）を抽出し、両者の間で比較した。その結果、異なる OR を発現する嗅細胞では異なるカルシウム変動パターンを示すことが明らかとなった（図 2A、B）。この実験では、異なる 2 つの OR 遺伝子を発現させる際に、同じ遺伝子プロモーターを用いていることから、単に OR の種類と神経活動パターンとの間に相関があるというだけでなく、発現する OR 分子自身が嗅細胞の自発的な神経活動パターンを規定する大きな要因であることが示唆された。

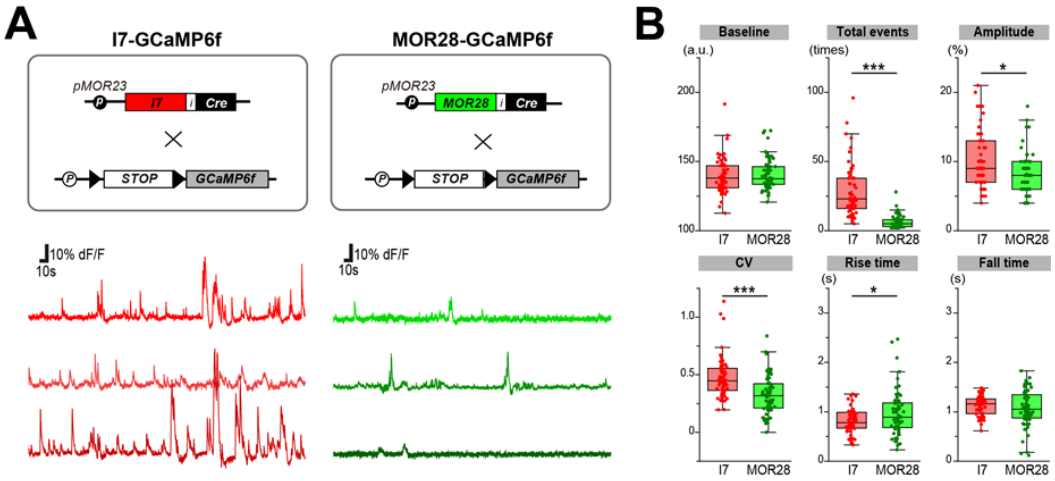


図 2. 嗅細胞のカルシウムイメージング

A) 嗅細胞特異的に GCaMP6f を発現するマウスの概略図（左上）。特定の OR を発現する細胞（MOR I7 と MOR28）の代表的なカルシウム動態（左下）。

B) カルシウム動態の比較。 ***p＜0.001、*p＜0.05（Mann-Whitney U test）。CV : coefficient of variation。

2. 光遺伝学による神経活動操作とそれに伴う軸索選別分子の発現変化の検証

続いて、神経活動パターンと軸索選別分子の発現の因果関係を検証するため、青色光依存的に活性化する陽イオンチャネルであるチャネルロドプシン 2 を用いた光遺伝学的手法により嗅細胞の神経活動を操作する実験を行った。チャネルロドプシン 2 を発現する嗅細胞に対しパルス状に青色光を照射することで、ミリ秒の単位で神経活動を人為的に操作することが可能となる。このマウスを用いて I7 を発現する嗅細胞に見られた繰り返し生じる短期のバースト発火を模した刺激［15 秒に 1 回、100 ミリ秒間隔で 15 発（1.5 秒間）の刺激を繰り返し、全体の発火頻度 1 Hz］を誘導し、軸索選別分子の発現レベルを検証したところ、Kirrel2 という軸索選別分子［3］の発現のみが選択的に上昇された（図 3A、B）。また、このとき全体の発火頻度を 1 Hz の同じ条件として均等な間隔で刺激を行うトニック発火を誘導

した場合には、Kirrel2 の発現の上昇は見られなかった。この結果から、“繰り返し起こる短期の一過性のバースト発火”という特定の神経活動パターンが Kirrel2 という特定の軸索選別分子の発現誘導に重要であることが示唆された。

軸索収斂に関わる分子として Kirrel2 以外に Semaphorin-7A（Sema7A）と protocadherin-10（PCDH10）が知られている［5，6］。前述の軸索選別分子 Kirrel2 の発現を誘導する短期の一過性のバースト状発火を再現した際には、PCDH10 および Sema7A の発現に変化は見られなかった。そこで異なる神経活動パターンとして短いバースト発火ではなく、長時間に及ぶバースト発火がこれらの遺伝子発現に与えるかどうかを検証した。具体的には、前述と同様のマウスの嗅上皮に対し、1 時間に一回、数十秒から数十分に及ぶ 100 ミリ秒間隔の光刺激を行った。その結果、PCDH10/Sema7A の発現は上昇し、一方で Kirrel2 の発現量は変化しないことがわかった（図 3C）。このことから、“一過性の長時間に及ぶバースト発火”は PCDH10/Sema7A の特異的な発現誘導に必要なパターンであると結論づけた。一連の光遺伝学的実験から、OR によって制御される神経活動の時間的なパターンが異なる軸索選別分子の発現誘導に重要であることが示唆された。

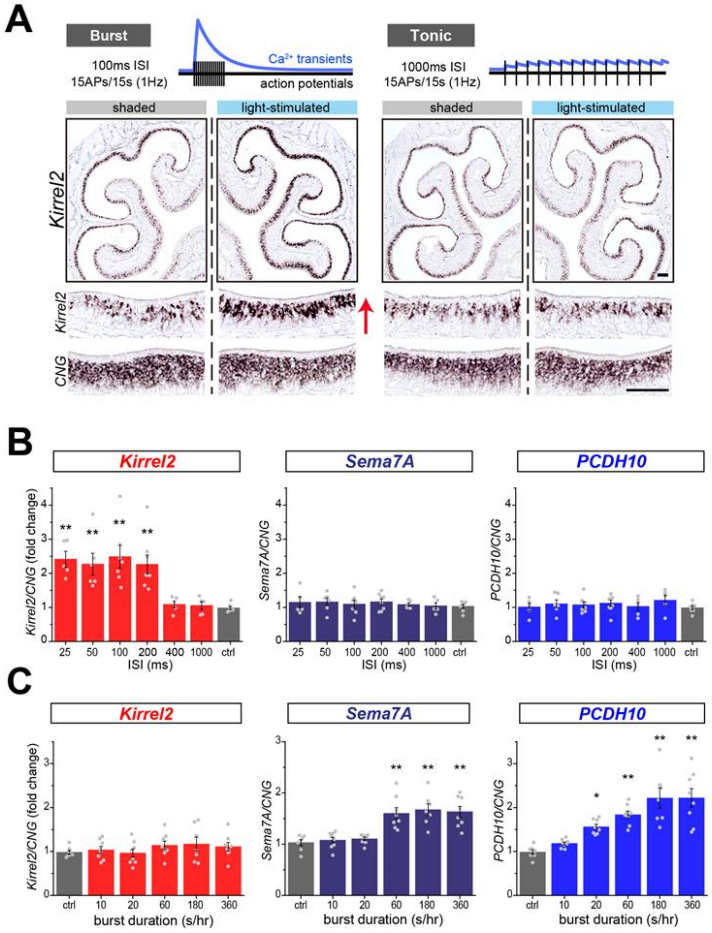


図 3. 光遺伝学による神経活動操作に伴う軸索選別分子の発現変化

A） 光遺伝学的手法用いた嗅細胞の神経活動操作実験。嗅上皮切片の *in situ* hybridization の図。繰り返し生じる短期バースト発火によって Kirrel2 の発現が上昇する一方、トニック発火では発現量に変化は見られない。スケールバー：50 μ m。

B） 定量 PCR 法による光刺激に伴う軸索選別分子の発現変化の定量解析。Kirrel2 はスパイク間隔（ISI）が 200 ms 以下の繰り返し生じる短期バースト発火において発現が上昇する。ISI：interspike interval、**p＜0.01（one-way ANOVA with post hoc Tukey test）。

C） 定量 PCR 法による光刺激に伴う軸索選別分子の発現変化の定量解析。Sema7A/PCDH10 は長期バースト発火において発現が上昇する。ISI：interspike interval、*p＜0.05、**p＜0.01（one-way ANOVA with post hoc Tukey test）。

考　察

神経活動に依存した回路形成は脳の至る領域で観察される普遍的な現象であるものの、これまでそれを説明するモデルとしてはヘブ則［7］がほぼ唯一のモデルであった。このモデルは、シナプス前細胞と後細胞が同期的に神経活動を生じることでシナプス結合が強化される一方で、非同期的もしくは活動が見られない場合には結合が弱まるというシナプス前細胞と後細胞の相互作用を想定したモデルである。実際に発達期の視覚系では、retinal wave と呼ばれる網膜を波上に伝播する神経活動が近傍のシナプス前細胞の同期的発火活動を誘導し、ヘブ則に基づくシナプス前細胞と後細胞との結合性を強める主要な要因となっている。しかし、嗅覚系では嗅細胞の自発活動パターンに細胞間の関連は見られず、むしろ『OR の種類』という細胞内の遺伝子プロファイルに起因する内的な情報によって規定されていることがわかった。また、自発活動に見られた特定の神経活動パターンを光遺伝学的手法により模倣すると、特定の軸索選別分子の発現が上昇することが分かった。これらの結果から、発現する OR によって規定された自発的な神経活動のパターンが軸索選別分子の組み合わせコードを作り出し、この分子コードによって OR 特異的な糸球体分離が可能になると考えられる。この結果は、『神経活動の同期性』を前提としたヘブ則とは異なる『神経活動の時間的なパターン』に基づいた新規の回路形成機構が存在することを示している。神経活動は、発達期の神経回路形成のみならず学習や記憶といった生涯通じて起こる可塑性にも関与する。従って、今回嗅覚系の神経回路形成で見られた神経活動パターン依存的な遺伝子発現制御機構は、生涯通じて起こる脳の可塑性を説明する新たなモデルとして敷衍できる可能性がある。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学研究室の池谷裕二教授、中嶋藍助教である。

文　献

1) Buck L, Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. Cell. 1991;65(1):175-87. PubMed PMID: 1840504.
2) Takeuchi H, Sakano H. Neural map formation in the mouse olfactory system. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2014;71(16):3049-57. doi: 10.1007/s00018-014-1597-0. PubMed PMID: 24638094; PubMed Central PMCID: PMC4111858.
3) Serizawa S, Miyamichi K, Takeuchi H, Yamagishi Y, Suzuki M, Sakano H. A neuronal identity code for the odorant receptor-specific and activity-dependent axon sorting. Cell. 2006;127(5):1057-69. doi: 10.1016/j.cell.2006.10.031. PubMed PMID: 17129788.
4) Nakashima A, Ihara N, Shigeta M, Kiyonari H, Ikegaya Y, Takeuchi H. Structured spike series specify gene expression patterns for olfactory circuit formation. Science (Washington D C). 2019;365(6448):46. doi: 10.1126/science.aaw5030. PubMed PMID: BCI:BCI201900695283.
5) Williams EO, Sickles HM, Dooley AL, Palumbos S, Bisogni AJ, Lin DM. Delta Protocadherin 10 is Regulated by Activity in the Mouse Main Olfactory System. Frontiers in neural circuits. 2011;5:9. doi: 10.3389/fncir.2011.00009. PubMed PMID: 21897809; PubMed Central PMCID: PMC3159872.
6) Pasterkamp RJ, Peschon JJ, Spriggs MK, Kolodkin AL. Semaphorin 7A promotes axon outgrowth through integrins and MAPKs. Nature. 2003;424(6947):398-405. doi: 10.1038/nature01790. PubMed PMID: 12879062.
7) Hebb DO. The organization of behavior; a neuropsychological theory. New York,: Wiley; 1949. xix, 335 p. p.