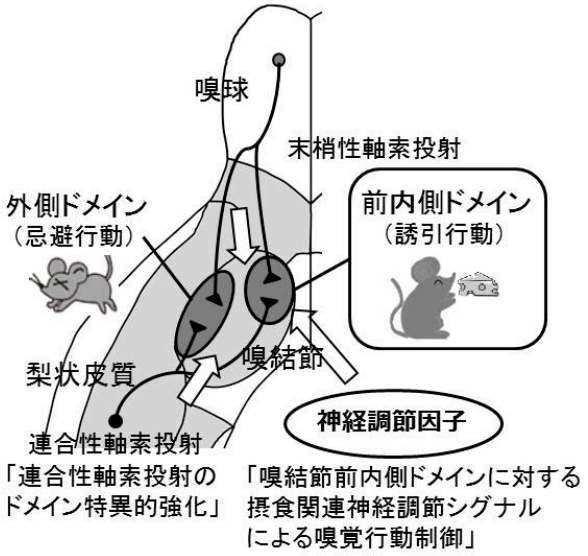
54　嗅覚行動学習を担う神経投射の可塑性と分子機構の解明	山口　正洋

【目的】嗅覚刺激は意欲を促進して行動を導く。また嗅覚行動の多くは学習によって獲得され、同じ匂いであっても経験次第でその匂いが好きにも嫌いにもなる。我々はマウス嗅覚系において、匂いを学習によって意欲的行動に結びつける特定領域を見出した。嗅皮質の一領域である「嗅結節」の「前内側ドメイン」は匂いの誘引行動学習の際に活性化し、「外側ドメイン」は忌避行動学習の際に活性化する。しかし、匂いが学習に応じて特定の嗅覚脳領域を活性化する神経回路の可塑性機構は不明である。本研究では嗅結節ドメインを足掛かりに、匂いを特定の意欲的行動に結びつける神経回路の可塑性機構を、匂いの誘引行動の代表例である食行動を題材に、「強化される神経投射」の同定および「神経調節因子」の役割から明らかにする。そのために、食行動に関係する神経調節因子の嗅覚脳領域における発現を調べ、神経調節性シグナルが匂いの意欲的行動と神経回路の可塑性に与える役割を検討する。

【方法】遺伝子改変マウスに対するウイルス投与によって、特定の嗅覚神経回路にチャネルロドプシンと赤色蛍光蛋白を発現させ、光刺激とえさ報酬あるいは電気ショックとの連合学習を行い、学習成立後に嗅結節ドメインにおける活性化軸索末端の構造変化を組織学的に検討した。また、嗅覚脳領域において摂食調節に関わる神経調節シグナル分子の発現を調べ、嗅結節前内側ドメインに高発現する分子に着目してその嗅覚行動学習における役割を検討した。

【結果】1. 強化される神経投射の同定について：嗅結節は、嗅球からの末梢性軸索投射によって匂い情報を受けるだけでなく、梨状皮質など他の嗅皮質領域や扁桃体など様々な領域から連合性軸索投射を受ける。しかし、どの投射入力が強化されるかは全く分かっていない。光遺伝学を用いて解析したところ、連合性軸索投射の光刺激と誘引行動の連合学習を行った場合には軸索末端が嗅結節前内側ドメイン特異的に大きく発達した。反対に、連合性軸索投射の光刺激と忌避行動の連合学習を行った場合には軸索末端が嗅結節前外側ドメイン特異的に大きく発達した。2. 神経調節因子の役割の解明について：神経活動を調節する神経調節因子のうち、摂食行動に関わる分子を選んで発現レベルを調べ、多くの分子が嗅結節前内側ドメインに高発現していることを見出した。その中で摂食促進に働くオレキシン受容体に着目し、アンタゴニストを嗅結節前内側ドメインに局所投与したところ、匂い刺激に対する誘引行動学習が抑制され、更に匂いの忌避行動が促進された。

嗅覚行動学習による嗅結節への連合性軸索の可塑的変化と前内側ドメインへの摂食関連シグナルの役割



54. 嗅覚行動学習を担う神経投射の可塑性と分子機構の解明

山口　正洋

高知大学 教育研究部 医療学系 基礎医学部門 生理学講座 統合生理学

Key words：嗅覚，学習，嗅結節，軸索投射，神経調節因子

緒　言

動物の行動は行動意欲、モチベーションに支えられており、適切な意欲は適切な行動を導く一方で、異常な意欲は様々な病態をもたらす。行動意欲の神経機構は生理的な行動メカニズムとその病態を理解する鍵となる。

嗅覚刺激は意欲を促進して行動を導く。また嗅覚行動の多くは学習によって獲得され、同じ匂いであっても経験次第でその匂いが好きにも嫌いにもなる。我々はマウス嗅覚系において、匂いを学習によって意欲的行動に結びつける特定領域を見出した［1，3］。嗅皮質の一領域である「嗅結節」には匂いの誘引行動学習によって活性化する「前内側ドメイン」と、忌避行動学習によって活性化する「外側ドメイン」が存在する。しかし、なぜ匂いが学習に応じて特定の嗅覚脳領域を活性化するようになるか、その神経回路の可塑性機構は不明である。

本研究では嗅結節ドメインを足掛かりに、匂いを特定の意欲的行動に結びつける神経回路の可塑性機構を、匂いの誘引行動の代表例である食行動を題材に、「強化される神経投射」の同定および「神経調節因子」の役割から明らかにする。そのために、光遺伝学の手法を用いて特定の神経回路の活性化とその可塑的構造変化を解析する。また、食行動に関係する神経調節因子の嗅覚脳領域における発現を調べ、神経調節性シグナルが匂いの意欲的行動と神経回路の可塑性に与える役割を検討する。

方法および結果

1. 強化される神経投射の同定

嗅結節は、嗅球からの末梢性軸索投射によって匂い情報を受けるだけでなく、梨状皮質など他の嗅皮質領域や扁桃体など様々な領域から連合性軸索投射を受ける。しかし、どの投射入力が強化されるかは全く分かっていない。

1）マウス嗅結節への「梨状皮質からの連合性軸索投射」を、光遺伝学を用いて活性化し、食べ物報酬と結びつけて学習させた。そのマウスでは、

・光刺激によって誘引行動をとるようになった。

・神経細胞の活性化をマーカー分子 c-fos 発現で検討し、嗅結節前内側ドメイン特異的な活性化が観察された。

・光刺激によって活性化した連合性神経軸索を赤色蛍光蛋白で可視化して解析し、軸索末端が嗅結節前内側ドメイン特異的に大きく発達していた（図１左）。

2）比較実験として、上記 1）と同様の連合性神経軸索の光遺伝学による活性化を、電気ショック（忌避的刺激）と結びつけて学習させた。

・光刺激によって忌避行動をとるようになった。

・嗅結節前外側ドメイン特異的な活性化がおこった。

・光刺激によって活性化した連合性神経軸索末端が嗅結節前外側ドメイン特異的に大きく発達した（図１右）。

以上の結果より、梨状皮質からの連合性軸索投射が学習に応じて可塑的に変化する性質を持っていることが明らかとなった。

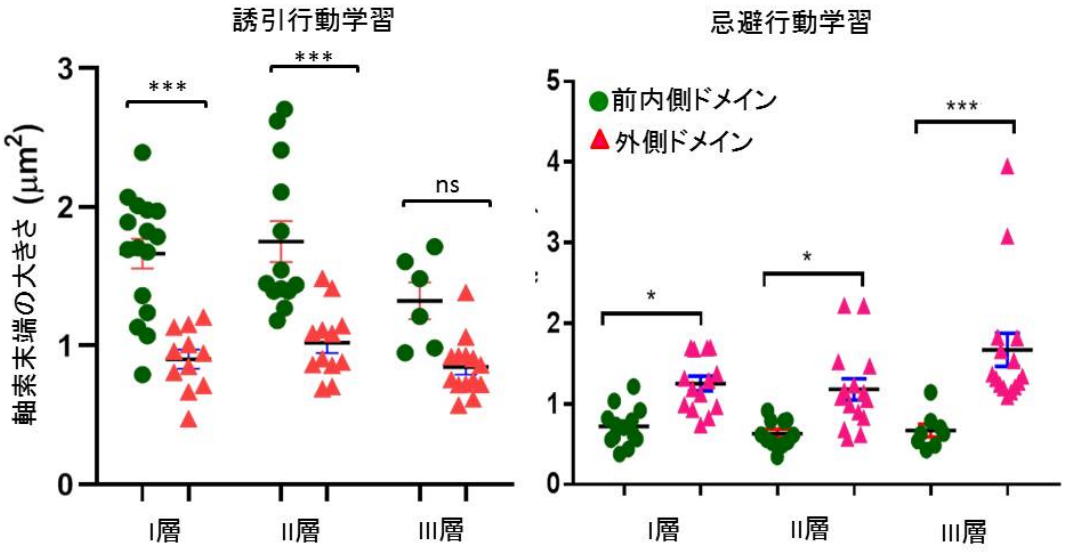


図 1. 連合性神経軸索の学習による領域特異的発達

梨状皮質からの神経軸索を光刺激し、連合学習を行った。

左）誘引行動学習を行うと、嗅結節前内側ドメインに投射する軸索末端が大きく発達した。

右）忌避行動学習を行うと、嗅結節外側ドメインに投射する軸索末端が大きく発達した。

*p＜0.05、***p＜0.001、ns：not significant（Student t-test）。

3）マウス嗅結節への「嗅球からの末梢性軸索投射」を、光遺伝学を用いて活性化し、食べ物報酬、あるいは電気ショックと結びつけて学習させた。そのマウスでは、

・光刺激によってそれぞれ誘引、忌避行動をとるようになった。

・神経細胞の活性化がそれぞれ嗅結節前内側ドメイン、外側ドメイン特異的におこった。

・光刺激によって活性化した末梢性神経軸索末端の形態変化を現在解析中である。

2. 神経調節因子の役割の解明

神経活動を調節する一群の分子である神経調節因子のうち、特に摂食行動に関わるものを選んで発現レベルを定量的 RT-PCR によって調べ、多くの分子が嗅結節前内側ドメインに高発現していることを見出し論文報告した（図 2）[4]。

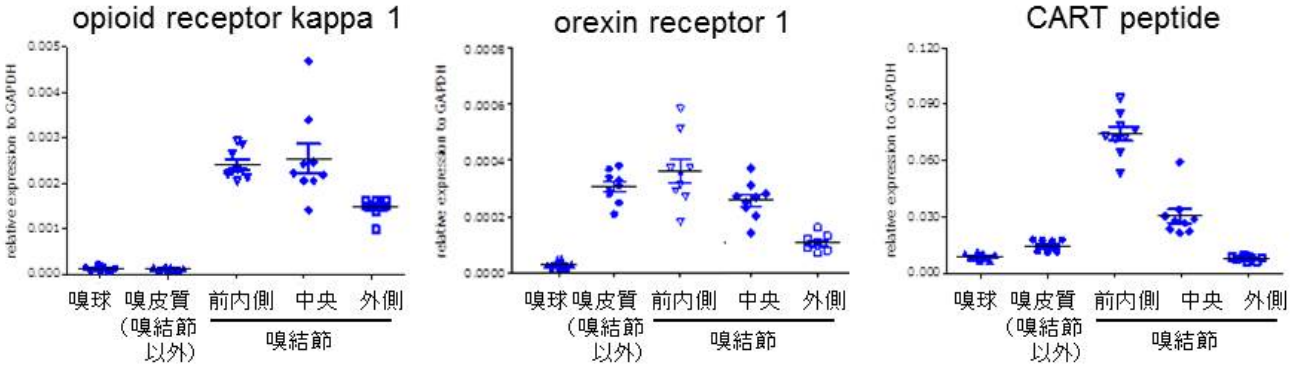


図 2. 摂食行動に関わる神経調節シグナル分子の嗅覚脳領域における発現

各嗅覚脳領域より mRNA を回収し、定量的 RT-PCR により発現量を比較した。多くの分子が嗅結節前内側ドメインで高い発現を示した。（左）オピオイド kappa 受容体。（中央）オレキシン受容体 I 型。（右）CART peptide。

その中で摂食促進に働くオレキシン受容体に着目し、アンタゴニストを嗅結節前内側ドメインに局所投与した。そのマウスでは、

・匂いの誘引行動学習が抑制された（図3左）。

・興味深いことに、匂いの忌避行動が促進された（図3右）。

・アンタゴニストの嗅結節外側ドメイン投与は行動変化を誘導しなかった。

・現在、光刺激した梨状皮質あるいは嗅球からの軸索末端の大きさ変化に対するオレキシン受容体アンタゴニストの影響を解析中である。

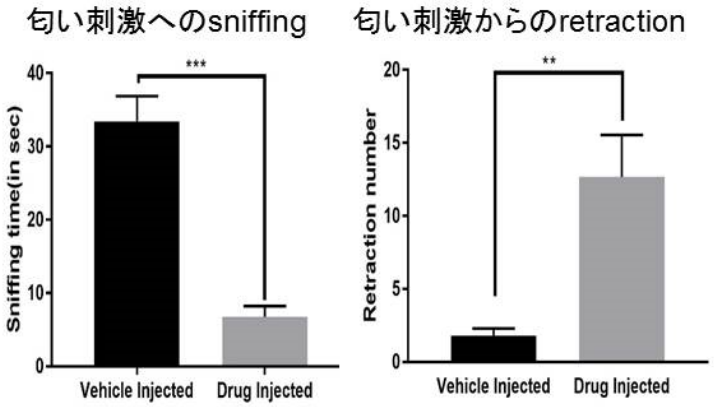


図3. オレキシン受容体アンタゴニストの嗅結節前内側ドメインへの局所投与による嗅覚行動の変化

末梢性匂い刺激に対する誘引行動学習の際、嗅結節前内側ドメインにアンタゴニストを注入した。

左）匂い刺激に対する誘引行動が抑制された。

右）匂い刺激に対する忌避行動が促進された。

p＜0.01、*p＜0.001（Student t-test）。

考　察

1. 強化される神経投射の同定

以上の結果より、梨状皮質から嗅結節への連合性軸索投射が、匂い学習の内容（誘引・忌避）に応じて可塑的に変化し、誘引学習の際は前内側ドメイン特異的に発達促進し、忌避学習の際は外側ドメイン特異的に発達促進することが明らかとなった。この軸索投射の変化が、学習による嗅結節ドメイン特異的活性化の可塑性機構の1要素を担っていると考えられる。

嗅球から嗅結節への末梢性軸索投射の可塑的変化は現在解析中である。一般的に、連合性シナプスに較べて末梢からの情報を伝えるシナプスの可塑性は低いと考えられているが、この点の理解を引き続き推進する。

2. 神経調節因子の役割の解明

摂食に関する神経調節シグナル分子（主に受容体）が嗅結節ドメインごとに異なる発現レベルを示し、多くのものが前内側ドメインで高発現を示していた。また、それらは摂食促進分子、摂食抑制分子の両方を含んでいたことから、嗅結節前内側ドメインが代謝情報を受ける主な領域であり、代謝状態に応じて摂食の促進のみならず抑制にも関与している可能性が考えられた。実際、オレキシン受容体アンタゴニストの嗅結節前内側ドメイン投与が匂いの忌避行動を促進したことは、この可能性を支持している。

我々は、嗅結節前内側ドメインのドーパミン受容体1型発現細胞（D1細胞）が誘引行動の促進に、2型発現細胞（D2細胞）が忌避行動の促進に働くことを見出した［5］。以上より、神経調節シグナルのターゲットとして、軸索投射の前内側・外側ドメインのバランスに加えて、同一ドメイン内のD1・D2細胞のバランスという新たな視点を得ることがで

きた。この点を検討するべく軸索投射のターゲット細胞を同定する実験を構築中である。

以上本研究を通じて、学習による脳領域特異的活性化を担う神経回路可塑性機構の一端を明らかにし、新たな進展の足掛かりを得ることができた。

共同研究者

本研究の共同研究者は、高知大学医学部統合生理学講座の谷口睦男准教授、村田芳博助教、Md Monjurul Ahasan 研究員、大学院生の古賀由里子氏、Md Fazley Rabbi Sha 氏である。

文　献

1） Murata K, Kanno M, Ieki N, Mori K, Yamaguchi M. Mapping of learned odor-induced motivated behaviors in the mouse olfactory tubercle. J Neurosci. 2015 Jul 22;35(29):10581-99. PMID:26203152 doi: 10.1523/JNEUROSCI.0073-15.2015.

2） Yamaguchi M. Functional sub-circuits of the olfactory system viewed from the olfactory bulb and the olfactory tubercle. Front Neuroanat. 2017 Apr 11;11:33. PMID:28443001 doi: 10.3389/fnana.2017.00033.

3） Murofushi W, Mori K, Murata K, Yamaguchi M. Functional development of olfactory tubercle domains during weaning period in mice. Sci Rep. 2018 Sep 4;8(1):13204. PMID:30181622 doi: 10.1038/s41598-018-31604-1.

4） Nogi Y, Ahasan MM, Murata Y, Taniguchi M, Sha MFR, Ijichi C, Yamaguchi M. Expression of feeding-related neuromodulatory signalling molecules in the mouse central olfactory system. Sci Rep. 2020 Jan 21;10(1):890. PMID:31964903 doi: 10.1038/s41598-020-57605-7.

5） Murata K, Kinoshita T, Fukazawa Y, Kobayashi K, Yamanaka A, Hikida T, Manabe H, Yamaguchi M. Opposing roles of dopamine receptor D1- and D2-expressing neurons in the anteromedial olfactory tubercle in acquisition of place preference in mice. Front Behav Neurosci. 2019 Mar 15;13:50. PMID: 30930757 doi: 10.3389/fnbeh.2019.00050.