

# 博士論文

## 神経活動パターン依存的な嗅覚神経回路の 形成機構

伊原 尚樹

## 目次

1. 要旨	2
2. 序論	3
3. 方法	5
4. 結果	9
4-1. 軸索選別分子は多様な発現様式を示す	9
4-2. 軸索選別分子群の発現は複数のクラスターに分類される	9
4-3. 軸索選別分子発現の多様性を作り出す因子は <b>CNG</b> チャネルの寄与と同様の傾向を示す	10
4-4. 軸索選別分子は神経活動依存的かつ <b>OR</b> の種類に依存した発現量を示す	12
4-5. 嗅細胞は多様な自発的神経活動を示す	12
4-6. 発現する <b>OR</b> の種類は神経活動パターンを規定する	13
4-7. <i>Kirrel2</i> は繰り返し生じる短期バースト状発火によって発現が誘導される	14
4-8. <i>Sema7A</i> および <i>PCDH10</i> は長期バースト状発火によって発現が誘導される	16
4-9. 慢性的な神経活動パターンの誘導によって軸索投射に変化が見られる	17
5. 図	19
6. 考察	46
7. 参考文献	49
謝辞	52

## 1. 要旨

高等動物の神経回路は、遺伝的プログラムに加え神経活動を介した精緻化の過程を経て機能的な回路へと成熟する。本研究では、マウス嗅覚系をモデル系として嗅神経細胞(嗅細胞)が嗅球上に形成される神経回路の構築メカニズムの解明を目指し、嗅細胞における神経活動の観察と操作を行った。嗅覚系では、嗅細胞で発現する嗅覚受容体遺伝子が細胞の個性を決定し、細胞接着分子の発現を介して適切な神経軸索の接続を制御する。

嗅細胞における神経活動の観察により、接続先を同じくする同一の嗅覚受容体を発現する神経細胞集団は時間的に同期した活動を示さないものの、互いに類似した活動パターンを示すことを明らかにした。さらに光遺伝学的手法を用いて人為的に嗅細胞の神経活動パターンの操作を行った結果、異なる神経活動パターンは異なる細胞接着分子の発現を制御することを明らかにした。これらの結果は、神経細胞の個性に対応した神経活動の時間パターンが分子の発現へと変換されることで、嗅覚神経回路の形成が制御されることを示している。

この結果は、これまで神経活動依存的な回路形成の唯一のモデルであった『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。

## 2. 序論

哺乳類の脳における精巧な神経回路は、内在的な遺伝的プログラムに続く神経活動を介した精緻化を経て完成する<sup>1,2</sup>。マウス嗅覚系においては、個々の嗅覚神経細胞(嗅細胞)は約 1,000 種類存在する嗅覚受容体(olfactory receptor: OR)遺伝子の中から 1 種類のみを選択的に発現し<sup>3</sup>、同一の種類の OR を発現する嗅細胞の軸索は嗅球上の同一の箇所へと収斂して投射し、糸球体と呼ばれる構造を形成する<sup>4</sup>。従って、嗅球上には OR の数に対応した糸球体からなる二次元上の糸球体地図が形成される。この糸球体地図の形成は、軸索の大まかな投射位置の決定と糸球体分離の 2 つの過程を経て完成する<sup>5</sup>。前者の過程では、嗅細胞の軸索は遺伝的に規定された濃度勾配をもって発現する軸索誘導分子に従っておおまかな投射位置へと誘導される<sup>6,7</sup>。また後者の過程では、嗅細胞で発生する神経活動に依存して特定の糸球体へと軸索が選別される<sup>8</sup>。この糸球体分離においては、発現する OR の種類によって嗅細胞の軸索が選別されるため、特定の OR 遺伝子をコードする DNA 配列を異なる OR 遺伝子のコーディング配列へと置換すると、元の糸球体とは異なる異所性の糸球体が形成される<sup>9</sup>。さらに、嗅細胞における自発的な神経活動を抑制すると糸球体分離は乱れることから<sup>10</sup>、OR 分子は神経活動を介して OR 固有の糸球体分離を行っていると考えられる。しかしながら、約 1,000 種類も存在する多様な OR の種類という情報はどのように神経活動を介して表現され、糸球体の分離を可能としているのか、その機構は不明であった。

神経活動依存的な回路形成を説明する最も広く知られているモデルとして、Donald O. Hebb が提唱したヘブ則がある<sup>11</sup>。これは、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。しかしながら、嗅細胞の軸索選別はシナプス形成前に起こる現象であること、またシナプス結合の相手を欠損した変異マウスにおいても糸球体様構造は見られる<sup>12</sup>ことから、一次嗅



覚系の神経活動依存的な神経回路の形成機構には既存のモデルには当てはまらない新奇の機構が存在すると考えられる。

### 3. 方法

#### 実験動物

全ての動物実験は東京大学動物実験実施マニュアルに従い、動物実験委員会の承認を得た上で、実験動物への苦痛を最小限に抑える努力の下行った（承認番号：P29-15）。

嗅球における発現解析の実験には、日本 SLC より購入した 2 週齢の ICR マウスを用いた。*Ai95D*, *Ai32*, *M71-ires-Cre* および *CNG-KO* マウスは、Jackson Laboratory から購入して実験に用いた。*Goofy-Cre* および *Kirrel2* conditional KO(BRRC06340)マウスは、理研 BSI 吉原良浩博士および福井大学坂野仁博士から提供していただいた。*H-I7* (Accession No. CDB0537T: [www2.clst.riken.jp/arg/TG%20mutant%20mice%20list.html](http://www2.clst.riken.jp/arg/TG%20mutant%20mice%20list.html))および *H-MOR28* (Accession No. CDB0536T: [www2.clst.riken.jp/arg/TG%20mutant%20mice%20list.html](http://www2.clst.riken.jp/arg/TG%20mutant%20mice%20list.html))の minigene コンストラクトの作製には、C57BL/6 マウス(RP23-306I18) の BAC クローンから *MOR23* 遺伝子を含む 10.1 kb の *SacI* 断片を pBluescript II SK(+)にクローニングした。2.1 kb の *H enhancer* 断片を *MOR23* minigene の 5'末端に結合し、*ires-Cre-ires-mcherry* 断片を minigene の 3'-UTR へ挿入した。930 bp の *MOR23* コーディング配列は *I7* もしくは *MOR28* へと置換した。Transgene 配列は *AscI* 制限酵素処理によって切断し、スクロース勾配によって vector DNA から分離し、CD-1 胚の前核へと microinjection した。

#### 切片作製

マウスにペントバルビタール (50 mg/kg) を腹腔内投与し、麻酔下で氷冷の 4% PFA/PBS 溶液を灌流した。灌流固定後脳を摘出し嗅球および嗅上皮を O.C.T. compound 内に包埋し液体窒素を用いて凍結させ、-80 °C で保存した。クライオスタット (Leica, CM3050S) を用いて嗅上皮切片(10 μm)および嗅球切片(12 μm)を作製し、MAS コート付きスライドガラス (MATSUNAMI, MAS-01)に切片を貼り付けた。

## 免疫染色

まず、作製した切片を PBS で 5 分間、3 回の洗浄を行った。その後、0.3% (v/v) Triton-X100/PBS (PBST) に 5% スキムミルクを溶解した溶液に 30 分間インキュベーションしブロッキングを行った後、1% スキムミルク/PBST 溶液で各一次抗体を希釈し混合した溶液で一晩インキュベーションを行った。次に、PBST で 5 分間、3 回の洗浄を行い、PBS で各二次抗体を希釈し混合した溶液で 1 時間インキュベーションした。さらに、PBS で 5 分間、3 回の洗浄を行い、Permafluor (ThermoShandon, Pittsburgh, PA)で封入した。全てのインキュベーションは室温下で行った。

一次抗体には、guinea pig anti-Kirrel2 抗体 (1:1000)、goat anti-Kirrel2 抗体 (1:1000, AF2930; R&D systems)、goat anti-Sema7A 抗体 (1:500, AF1835; R&D systems)、rat anti-PCDH10 抗体 (1:500, MABT20; Merck Millipore)、mouse vGlut2 抗体 (1:500, MAB5504; Merck Millipore)、goat anti-NQO1 抗体 (1:500, ab2346; Abcam)、guinea pig anti-PCDH17 抗体 (1:500) (Hoshina et al. 2013)、guinea pig anti-MOR28 抗体、guinea pig anti-MOR10 抗体、guinea pig anti-MOR256-17 抗体(generous gift from Dr. Breer)、guinea pig anti-I7 抗体、guinea pig anti-EG 抗体(guinea pig anti-EG antibodies)、guinea pig anti-M71 抗体( generous gift from Dr. Barnea)、chicken anti-GFP 抗体(ab13970; abcam)を用いた。

## 蛍光 *In situ* hybridization

まず、氷冷の 4% PFA/PBS 溶液に 15 分間インキュベーションし、PBS で 5 分間洗浄を行った。次に、7 µg/ml Proteinase K/10 mM Tris-Cl, pH 7.4, 1 mM EDTA 溶液に 37 °C で 10 分間インキュベーションし、再び氷冷の 4% PFA/PBS 溶液で 10 分間の固定の後、PBS で 5 分間洗浄を行った。続いて、0.25% 無水酢酸 0.1 M トリエタノールアミン (pH 8.0) に室温で 10 分間インキュベーションしアセチル化を行った後、PBS で 5 分間、2 回の洗浄を行った。さらに、ハイブリダイゼーションバッファー に 85 °C で変性させた各種プローブ

(1:100) を加えて混合し、あらかじめ 51 °C に温めたプレパレート上に乗せてパラフィルムで封入し 51 °C で 16-20 時間インキュベーションを行った。その後、65 °C の 5×SSC でパラフィルムを取り除き、2×SSC 50%ホルムアルデヒド、2×SSC、0.2×SSC の順に 55°C で 15 分間の洗浄を行った。ブロッキング試薬 (11096176001; Roche) で 1 時間のブロッキングを行い、Anti-Digoxigenin-AP (1:1000, 11093274910; Roche) で 1 時間インキュベーションし、染色溶液 (100 mM Tris-Cl pH 8.0, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) に浸した後、HNPP/FastRed (11758888001; Roche) で発色を行い、PBS で 5 分間、3 回の洗浄を行った。

二重蛍光 *in situ* hybridization には、Anti-Digoxigenin-AP (1:1000, 11093274910; Roche) に加えて anti-Fluorescein-POD (1:100, 11426346910; Roche) を用い、バッファー溶液 (100 mM マレイン酸 pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.3% Tween-20) で 3 回洗浄した後、TSA-Biotin (1:100, NEL700001KT; PerkinElmer) を 1×AMPLIFICATION DILUENT に溶かし室温で 10 分間インキュベーションした。streptavidin-conjugated Alexa Fluor 488 (1:400, S11223; Molecular Probes) を PBS に溶解し 1 時間インキュベーションして発色した後、PBS で 3 回の洗浄を行って HNPP/FastRed で発色を行い、PBS で 3 回の洗浄を行った。

## 蛍光画像の取得・解析

全ての蛍光画像は、蛍光顕微鏡 (BZ-X700; Keyence) を用いて撮影した。糸球体は vGlut2 の染色画像における蛍光シグナルによって定義した。すべての軸索選別分子の染色強度および蛍光 *in situ* hybridization におけるシグナル強度は ImageJ (NIH) を用いて、蛍光画像において測定を行った。軸索選別分子の染色強度は、背景のシグナル強度を差し引いた後、0 から 100 の強度に標準化し発現レベルとした。

## データ解析

標準化した軸索選別分子の発現強度データをもとに、Origin Pro (Origin Lab) を用いて軸索選別分子間の相関係数を計算した。Affinity propagation および主成分分析には、それぞれ MATLAB (MathWorks) および Origin Pro を用いて解析を行った。全ての統計解析は Origin Pro を用いて行った。

### *Ex vivo* 培養

*Ex vivo* 培養実験では、氷上麻酔後すぐに断頭し中隔鼻軟骨と嗅上皮を含む嗅覚組織をまとめて取り出した。サンプルを酸素循環させた aCSF 中に素早く移動し、35 °C で 6 時間培養を行った。培養後、嗅上皮組織は 4% パラホルムアルデヒド中で一晩の後固定を行った。

## 4. 結果

### 4－1．軸索選別分子は多様な発現様式を示す

糸球体の分離は、嗅神経細胞の軸索末端に発現する分子の接着性もしくは反発性の軸索の相互作用によって制御されている。この基準を満たす候補分子として、Kin of IRRE-like protein 2 (Kirrel2)、Semaphorin-7A (Sema7A)、Protocadherin-10 (PCDH10)および Protocadherin-17 (PCDH17)の軸索選別分子を選んだ。Kirrel2 は免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、同親和性の接着によって糸球体分離に関与している<sup>8</sup>。Sema7A は、膜結合型セマフォリンで軸索の誘導と剪定する分子として作用する<sup>13</sup>。PCDH10 と PCDH17 は、非クラスター型デルタプロトカドヘリンサブファミリーに属し、細胞接着に重要な役割を果たす<sup>14,15</sup>。

嗅球切片に対する軸索選別分子の免疫染色像から、全ての分子は位置に依存しないモザイクな発現が見られたが、それらの発現様式は同一ではないことが分かった (Figure 1A, 右)。軸索選別分子間の発現の関係性を明らかにするため、全嗅球の連続切片を軸索選別分子の抗体で免疫染色した (Figure 1B 上)。全嗅球から糸球体における軸索選別分子の染色強度を測定することで発現情報を取得した。この発現情報から、軸索選別分子の発現間の相関係数を全て計算した (Figure 1B 下および Figure 2)。この結果から、Sema7A と PCDH10 の発現の間には強い正の相関関係が見られ、Sema7A と Kirrel2 の間にも弱い正の相関関係が見られた。ここで見られた正の相関関係は、これらの分子の発現に共通の制御機構が存在することが示唆された。一方で、Kirrel2 と PCDH10 の間には、有意な相関関係が見られなかった。また、PCDH17 と PCDH10 の間には弱い負の相関関係が見られた。分子の発現間の関係性は、背側と腹側の糸球体の位置によって発現情報が異なるものがあり、背側と腹側の嗅神経細胞で異なる発現制御機構が存在する可能性が示唆された。

### 4－2．軸索選別分子群の発現は複数のクラスターに分類される

一つの糸球体は多変数によって表現される一つのデータユニットと考えることが出来る。軸索選別分子発現情報という多変量のデータを解析するために、多変量データに対する教師なしクラスタリングの手法である affinity propagation<sup>16</sup>を行った。affinity propagationによって、1799 個の糸球体を 8 個のサブクラスターに分離された (Figure 3A)。それぞれのサブクラスターは、固有の軸索選別分子の発現情報によって定義された (Figure 3B)。サブクラスター6-8 における Sema7A と PCDH10 の平均発現レベルは全体の平均よりも有意に低く、サブクラスター3 における Sema7A と PCDH10 の平均発現レベルは全体の平均よりも有意に高いことが分かった。これらの結果から、サブクラスター3, 6, 7 および 8 が Sema7A と PCDH10 の発現間の強い正の相関関係を作り出していることが示唆された。Sema7A と Kirrel2 の発現間の正の相関関係に関しても同様の方法で説明が出来たが、Sema7A と Kirrel2 の正の相関関係に合致するのは、サブクラスター2, 4, 5 および 8 であった。つまり、異なるサブクラスターが、軸索選別分子間の発現相関に別々に寄与することで両方の相関関係が作り出されていると考えられた。

#### 4-3. 軸索選別分子発現の多様性を作り出す因子は CNG チャネルの寄与と同様の傾向を示す

次に、軸索選別分子の遺伝子発現の多様性を作り出す最も主要な成分は何であることを明らかにするために主成分分析(principal component analysis: PCA)を行った。主成分分析では、最もデータのばらつきが大きくなるように第一座標軸、さらにそれぞれの座標軸には残りのばらつきが最も大きくなるように新たな座標軸を設定する手法である。軸索選別分子の発現データに対して主成分分析を行い、第一主成分、第二主成分および第三主成分を座標軸として発現データをプロットした(Figure 4A および 4B)。第一主成分、第二主成分および第三主成分はそれぞれ、全てのばらつきの 41.7%、28.2%および 22.1%を説明するものであった (Figure 4C)。第一主成分の因子負荷量においては、Sema7A、PCDH10 および

Kirrel2 は正の因子負荷量を示したが、PCDH17 は異なっていた (Figure 4C)。一方、第二主成分および第三主成分においては、PCDH17 は正の因子負荷量を示した。第二主成分において、Kirrel2 は正の因子負荷量を示したが PCDH10 は負の因子負荷量を示し、一方で、第三主成分においては、PCDH10 は正の因子負荷量を示したが Kirrel2 は負の因子負荷量を示し、第二主成分および第三主成分において Kirrel2 および PCDH10 は逆の傾向が見られた。また、背側の糸球体(Figure 4A における青の点) と腹側の糸球体 (Figure 4A における橙の点) は第二主成分と第三主成分における座標空間において最も良く分離された。このことから、第二主成分と第三主成分は嗅神経細胞の位置に関係する要素である可能性が示唆された。affinity propagation によって作られたサブクラスターは、主成分分析の座標空間においても良く分離され (Figure 4B)、affinity propagation に基づくクラスタリングと主成分分析に基づく軸の再定義が妥当であることが確認された。

それでは、軸索選別分子の発現制御に最も重要であると考えられる第一主成分は何であるのだろうか。第一主成分は、次に挙げる 2 つの知見をもとに神経活動と関連していると考えられる。1 つ目は、糸球体の収斂は神経活動の抑制によって大きく乱れる<sup>7,10</sup> という知見である。2 つ目は、いくつかの軸索選別分子は神経活動依存的に発現する<sup>8,14,17</sup> という知見である。環状ヌクレオチド依存性 (CNG; cyclic nucleotide-gated) チャネルは、嗅覚シグナル伝達系において OR の下流に位置する<sup>18</sup>。CNG チャネルの機能に重要な因子である *CNGA2* 遺伝子を欠損した (*CNG-KO*) において、*in situ* hybridization を行い、軸索選別分子の発現を調べた。*CNG-KO* マウスにおいて *Sema7A*、*PCDH10* および *Kirrel2* の発現は大きな低下が見られた一方、*PCDH17* では低下が見られなかった (Figure 4D)。タンパク質に関しても、*CNG-KO* マウスにおいては *Sema7A*、*PCDH10* および *Kirrel2* の発現はほとんど消失していたが、一方で *PCDH17* はモザイクな発現が見られ影響が見られなかった (Figure 4F)。この結果から、CNG チャネルは *Sema7A*、*PCDH10* および *Kirrel2* の発現の主要な決定因子であることが明らかである。発現レベルにおける CNG 依存の変化率のパターンは、*Sema7A*、*PCDH10* および *Kirrel2* が正の値を示す第一主成分における因子負荷量 (Figure



4C) と類似した傾向が見られた。これらの結果は、CNG チャネルを介する神経活動によってこれらの分子の多様な発現が作られるということを示唆している。

#### 4－4．軸索選別分子は神経活動依存的かつ OR の種類に依存した発現量を示す

上記の結果を基に、糸球体分離に関与し神経活動によって正に制御される軸索選別分子である *Kirrel2*, *Sema7A* および *PCDH10* に着目した。遺伝子のノックアウト実験の結果から、これらの分子はマウス嗅覚系における神経回路形成に関与していることが示されている<sup>8,13,14</sup>(Figure S1)。これらの分子の発現レベルは発現する OR の種類に固有である<sup>8,17,19</sup>が、嗅球上の糸球体間で異なる発現パターンを示す(Figure 5A)。例えば、*Kirrel2* の発現レベルは I7 の糸球体においては高いが、*MOR28* および *M71* の糸球体においては低い。一方で、*PCDH10* の発現レベルは *M71* 糸球体で高く、*I7* 糸球体では中程度、*MO28* 糸球体では低い(Figure 5B, C)。前述の通り、嗅覚シグナル伝達を司る CNG チャネルの KO マウスにおいてこれらの分子の発現は、検出できないレベルまで大幅に減少する(Figure 4D-F)。また、*ex vivo* で嗅覚組織の培養において、高濃度の KCl 処置を行うとこれらの遺伝子発現は上昇し、この効果は細胞外カルシウムイオンの除去もしくは L 型カルシウムチャネルの阻害によって抑制された(Figure S2)。これらの結果から、神経活動に伴うカルシウム流入が軸索選別分子の組み合わせコードを作り出すために必要であることが示唆される。

#### 4－5．嗅細胞は多様な自発的神経活動を示す

嗅細胞における神経活動を可視化するために、*Cre/loxP* システムを用いて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<sup>20</sup> を発現するマウス(*pGoofy-Cre;pCAG-LSL-GCaMP6f[Ai95D]*マウス)を作製した(Figure 6A)。嗅細胞特異的 GCaMP6f マウスにおいては、嗅細胞において生じる活動電位が GCaMP6f の蛍光強度の一過的な上昇として検出することが出来る(Figure S3)。発生期マウスの嗅上皮急性切片において嗅細胞から記録し関連

解析を行った結果、自発的なカルシウムイベントには空間的もしくは時間的な相関は見られず、近傍の嗅細胞と同期しない自発活動を示した(Figure 6A, B)。一方で、*CNG-KO* マウスにおいて自発活動は見られる<sup>18</sup> (Figure S3E)ものの、野生型マウスと比較してイベント頻度は低くなりイベント間隔(inter-event interval: IEI)は長くなっており、自発活動のパターンが変化していた(野生型マウス : frequency =  $0.90 \pm 1.02$  times/ m and IEI =  $59.09 \pm 61.52$  s; mean  $\pm$  SD, N = 230 cells、*CNG-KO* マウス : frequency =  $2.05 \pm 2.48$  times/ m and IEI =  $48.14 \pm 53.09$  s, respectively; mean  $\pm$  SD, N = 252 cells, \*\*\* $P < 0.001$  and \*\* $P < 0.01$ , Mann-Whitney U test.)。

CNG チャネルは *Kirrel2*, *Sema7A* および *PCDH10* の発現に必須である(Figure 4D-F)ことから、軸索選別分子の発現には神経活動が存在することではなく、神経活動中の特定の特徴量(例：頻度やイベント間隔)が重要であると考えられる。

#### 4－6．発現する OR の種類は神経活動パターンを規定する

次に、異なる種類の OR を発現する嗅細胞において自発的なカルシウム活動パターンの比較を行った。本研究では、2 種類の嗅覚受容体 I7 (*Kirrel2* 高発現)と MOR28 (*Kirrel2* 低発現)に着目し(Figure 5B, C および S4)、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(*H-I7-Cre-mcherry:Ai95D* マウスおよび *H-MOR28-Cre-mcherry:Ai95D* マウス)を作製し、カルシウムイメージングを行った(Figure 6C および S4)。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(N = 59 cells for I7, 61 cells for MOR28, respectively)。2 種の遺伝子改変マウスは同一の MOR23 プロモーター下で異なる受容体を発現する<sup>21</sup> (Figure 6C および S4A)にも関わらず、I7 発現細胞と MOR28 発現細胞では異なるカルシウム変動パターンが見られた(Figure 6C)。I7 発現細胞では MOR28 発現細胞と比較して高頻度かつ高い振幅のカルシウムイベントを示した。さらに、多次元スケーリング(multi-dimensional scaling:

MDS)を行い、相対距離に基づいて I7 発現細胞と MOR28 発現細胞のデータをプロットした (Figure 6E)。MDS 空間では、異なる OR を発現する嗅細胞は線形サポートベクターマシーン(support vector machine: SVM)によって有意に分離され(Figure 6E における灰色の点線,  $F1 = 0.775$ ,  $P < 0.0001$ )、異なる OR は異なる自発的なカルシウム変動パターンを誘導し得ることが示唆された。

次に、嗅細胞におけるカルシウム変動パターンの多様性を調べるため、より多くの嗅細胞からカルシウム変動パターンの特徴量を収集した[N = 3,214 cells; N = 59 for I7 (赤), N = 61 for MOR28 (緑), N = 45 for M71 (青) and N = 3,049 for randomly-selected OSNs (灰色)]。PCA を用いて、得られたデータセットの次元縮減を行った。2 次元の PCA 空間において、嗅細胞は発現する OR の種類に対応したクラスターが見られた(Figure 6F および Figure S5)。これらの結果から、同種の OR を発現する嗅細胞は類似したカルシウム変動パターンを示すことが示唆された。

#### 4 – 7. *Kirrel2* は繰り返し生じる短期バースト状発火によって発現が誘導される

神経活動パターンと軸索選別分子の発現との因果関係を調べるために、本研究では光遺伝学的手法を用いて嗅細胞における神経活動の操作を行った。嗅細胞特異的 ChR2 (Channelrhodopsin-2)マウスは、*pGoofy-Cre* マウスと *pCAG-LSL-ChR2 (Ai32)*マウス<sup>22</sup>を掛け合わせることで作製した(Figure 7A 上)。3 ms の青色光をパルス状に照射することで、光強度によらず 40 Hz までの神経活動を単一スパイクレベルで制御することを可能とした(Figure S6)。この嗅細胞特異的 ChR2 マウスの嗅上皮に対して、バースト状発火 (15 秒に 1 回、バースト内スパイク頻度 10 Hz、全体の発火頻度 1 Hz)とトニック発火 (1 秒間隔で 1 発、全体の発火頻度 1 Hz)の 2 つの異なるプロトコルで青色光刺激を行った(Figure 7B)。嗅細胞における自発活動の発火頻度の中央値が 1.1 Hz であった(Figure S7)ため、両方の光刺激プロ

トコルの全体の発火頻度を 1 Hz とした。それぞれの刺激プロトコルをマウス嗅上皮片側の背外側に対して *in vivo* で 12 時間光照射を行い、嗅上皮の遮光側と光刺激側で軸索選別分子の発現変化を調べた(Figure 7A 下)。その結果、バースト状発火のプロトコルにおいて、光照射側で遮光側と比較して *Kirrel2* の発現が上昇していた。一方で、トニック刺激では有意な変化が見られなかった(Figure 7B)。バースト刺激内のスパイク間隔(inter-spike interval: ISI)を変化させていくと、200 ms 以内のスパイク間隔では *Kirrel2* の発現上昇が見られた(Figure 7C)。異なるバースト内スパイク間隔において単一細胞レベルで定量を行った結果、各スパイク間隔での *Kirrel2* の発現上昇の度合いが異なることが示唆された (ISI: 50 ms  $d = 0.74$ : 効果中; ISI: 100 ms  $d = 1.54$ : 効果非常に大; ISI: 200 ms  $d = 1.09$ : 効果大) (Figure 7D 左)。また、内在性の *Kirrel2* 発現レベルが低い MOR28 発現細胞においても *Kirrel2* の発現上昇が見られた(Figure 7D 右)ことから、嗅細胞において発現する受容体の種類によらず *Kirrel2* の発現が誘導されることが示唆された。さらに、バースト内で誘導するスパイク数を変化させても *Kirrel2* の発現に影響が見られた(Figure 7E)。

内在性の自発発火と光遺伝学的に誘導した発火パターンとの関係性を調べるために、*Kirrel2* の発現レベルに基づいて SVM による分類を行った。*Kirrel2* が高い嗅細胞(I7)と *Kirrel2* が低い嗅細胞(MOR28)の内在性の神経活動パターンに基づいた非線形の SVM 分類器によって、光刺激による *Kirrel2* の発現上昇を予測することが出来た(Figure 7F 左)。*Kirrel2* の発現を上昇させる光刺激プロトコル(Figure 7F, a to d)は、グラフ上の *Kirrel2*-high 側にプロットされた一方で、*Kirrel2* の発現変化を生じない光刺激プロトコル(Figure 7F, e to g)は *Kirrel2*-low 側にプロットされた。さらに、I7 クラスターの嗅細胞では、一過性のバースト刺激に類似した高振幅のカルシウム変動パターンが見られた(Figure 7F 右, calcium event frequency =  $0.047 \pm 0.031$  Hz and calcium event amplitude =  $10.25 \pm 4.06\%$ ; mean  $\pm$  SD)。一方で、そのような高振幅のカルシウム変動は MOR28 および M71 クラスターにおいては多くは観察されなかった(MOR28, frequency =  $0.011 \pm 0.008$  Hz and amplitude =  $8.28 \pm 2.98\%$ ; mean  $\pm$  SD; M71, frequency =  $0.036 \pm 0.033$  Hz and amplitude =  $4.11 \pm 1.17\%$ ; mean  $\pm$  SD)。したがっ

て、一過性のバースト刺激は生理的な *Kirrel2* 発現誘導のための神経活動パターンを模していると考えられる。

#### 4－8. *Sema7A* および *PCDH10* は長期バースト状発火によって発現が誘導される

次に、軸索選別分子の大規模な発現解析の結果から *Kirrel2* と異なる発現制御が存在すると想定された *PCDH10* および *Sema7A* の発現に必要な神経活動パターンを調べた。青色光による光刺激プロトコルのバースト持続時間を 1.5 秒から 720 秒にまで伸ばして多様な神経活動パターンの誘導を行った(Figure 8A)。このとき、全体発火頻度は 1 Hz、バースト内のスパイク頻度は 10 Hz と固定した。これらの多様な光刺激プロトコルを行い軸索選別分子の発現変化を調べた結果、*Sema7A* は 10 秒以上、*PCDH10* は 20 秒以上のバースト持続時間のプロトコルによって発現が誘導された(Figure 8B)。バースト持続時間が 360 秒と 720 秒のプロトコルにおいては、*Sema7A* および *PCDH10* の発現が上昇する一方で *Kirrel2* の発現には上昇が見られなかった(Figure 8B, C)。

さらに、*Sema7A* および *PCDH10* の発現誘導に必要な最小のバースト持続時間を調べるため、全体の発火頻度は考慮せず 1 時間の中で様々なバースト持続時間で 12 時間の光刺激プロトコルを行った(バースト内スパイク頻度: 10 Hz、バースト持続時間 10 秒から 360 秒)(Figure 8D)。その結果、*Sema7A* と *PCDH10* の発現は長期のバースト発火で発現が誘導されたものの、バースト持続時間が 20 秒のプロトコルにおいて、*PCDH10* の発現が上昇する一方で *Sema7A* の発現には変化が見られなかった(Figure 8E)。この両者の発現誘導の違いは、嗅細胞の軸索末端において *Sema7A* と *PCDH10* とは類似した発現パターンを示すものの、一部異なる発現パターンを示すものを作り出す要因となっていると考えられる。また、一連の実験プロトコルで *Kirrel2* の発現には変化が見られなかった(Figure 8E)。これらの結果から、*Sema7A* および *PCDH10* の発現は低頻度の長期バースト状発火によって誘導され、*Kirrel2* の発現は高頻度の短期バースト状発火という異なる神経活動パターンによっ

て異なる分子の発現が誘導されることが示唆された。

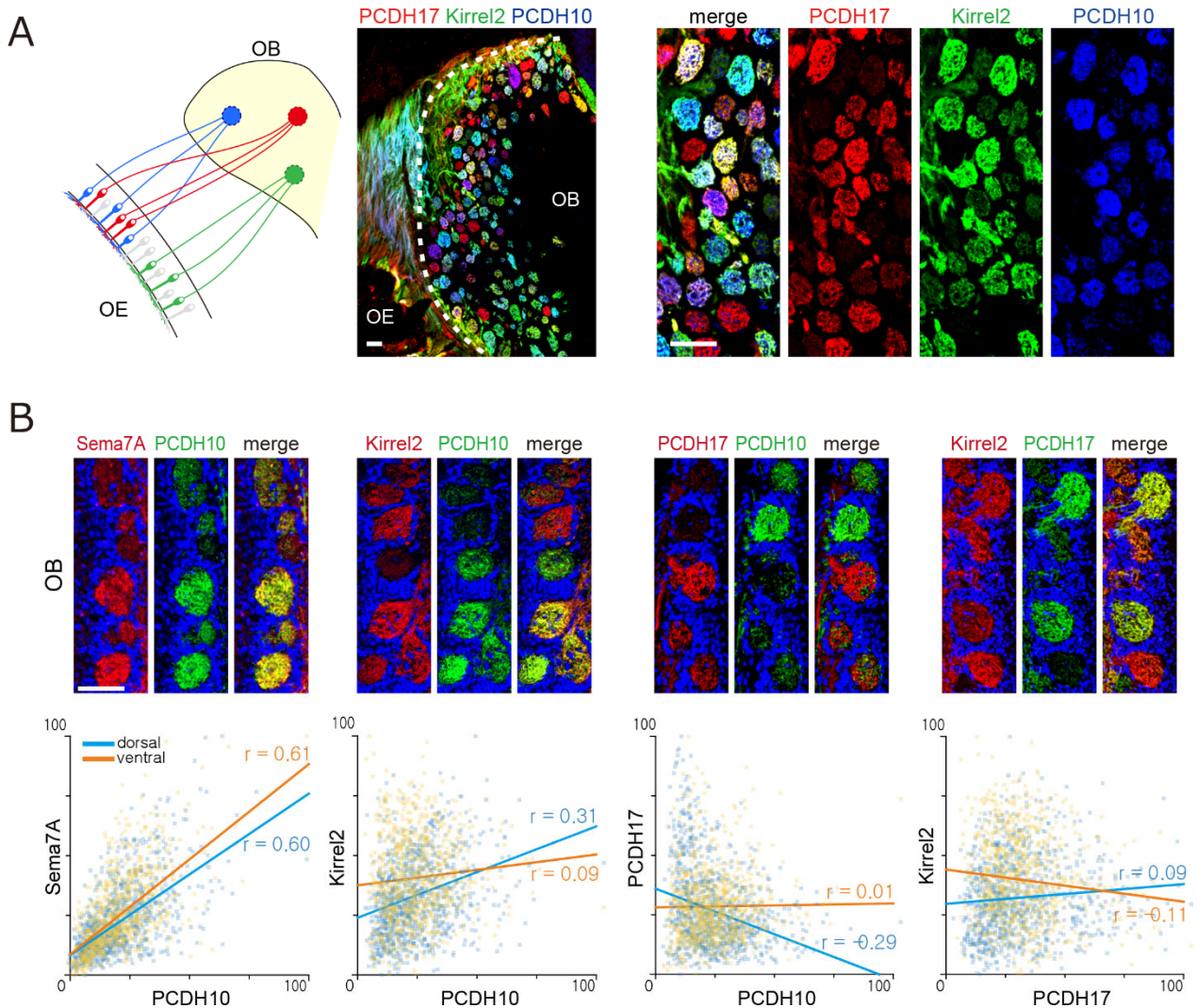
また、PCDH10 の発現レベルが高い M71 発現細胞と PCDH10 発現レベルの低い MOR28 発現細胞で長期カルシウムイメージングを行った。Figure 8F に示すように、両方の種類の嗅細胞においてほとんどの記録時間では静止状態(stationary state)であった。しかしながら、M71 発現細胞においては 1 時間の中で数回の長期カルシウム活動が観察された(Figure 8F)。記録したカルシウム変動の振幅が平均より 20 秒以上高くなる状態を活動状態(active state)と定義して定量した結果、M71 発現細胞では  $34.14 \pm 13.47$  秒 with IEI of  $445.85 \pm 376.03$  s (mean  $\pm$  SD)であった。これは、PCDH10 の発現誘導に十分な神経活動パターンである。一方で、MOR28 発現細胞において活動状態はほとんど見られなかった(event number:  $2.4 \pm 1.90$  times/ hr, N = 10 cells for M71,  $0.09 \pm 0.30$  times/ hr, N = 11 cells for MOR28; mean  $\pm$  SD, \*\*\* $P < 0.001$ , Student's  $t$ -test)。これらの結果は、長期のバースト発火と長期バースト発火による PCDH10 および Sema7A の遺伝子発現誘導は生理的状态を模したものであることを示唆してる。

#### 4－9．慢性的な神経活動パターンの誘導によって軸索投射に変化が見られる

さらに、*in vivo* での光遺伝学的手法による神経活動の操作によって実際に嗅細胞の軸索の糸球体分離に影響を与えるかどうかを検証するために、長期間での慢性的な光刺激を行った。この実験においては、トランスジェニックマウスである *H-Cre* マウス<sup>6</sup>を用いた。このマウスでは、OR の負のフィードバックシグナル<sup>23</sup>を介することで一部の嗅細胞において Cre リコンビナーゼを発現する。したがって、*H-Cre* マウスと *Ai32* マウスを掛け合わせるによって、同一個体において同種の OR を発現する嗅細胞の中でも ChR2 陽性細胞と ChR2 陰性細胞が共存する個体を作製することが可能となる(以下、嗅細胞特異的 ChR2 モザイクマウス)(Figure 9A, B)。

嗅細胞特異的 ChR2 モザイクマウスの新生児に対して、Figure 7B で用いた一過性のバースト発火を 1 日に 5-6 時間照射した。1 週間の光刺激後、ChR2 陽性細胞の軸索末端に Kirrel2 タンパクの発現上昇が見られ、PCDH10 および Sema7A の発現には変化が見られなかった(Figure 9C, D)。また、内在性の Kirrel2 発現が減少している *CNG-KO* 条件でも同様に Kirrel2 の発現上昇が見られた(Figure S9)。さらに、ChR2 モザイクマウスの嗅球において、MOR28 発現細胞の軸索が ChR2 陽性/陰性により分離が見られた(Figure 9D, E)。I7 発現細胞においても類似した軸索分離が見られた(Figure S10A, B)。この ChR2 依存的な軸索分離は、光刺激を行わない条件では見られなかった(Figure 9D, E および S10)。これらの結果は光遺伝学的手法によって誘導した一過性のバースト状発火が Kirrel2 の発現上昇を介して軸索分離を生じたと考えられる。

## 5. 図



**Figure 1. 嗅球における軸索選別分子の発現様式は異なる**

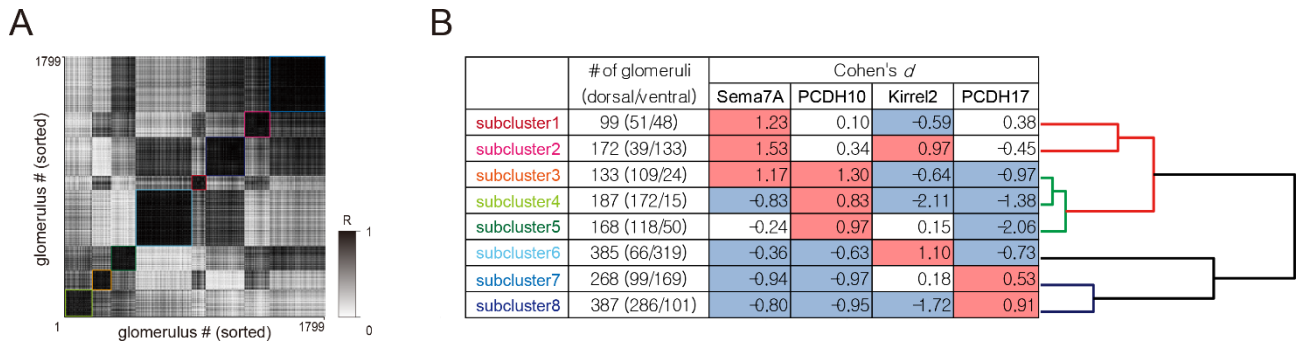
- (A) 2週齢のマウスから作製した嗅球傍矢状切片に対して PCDH17 (赤)、Kirrel2 (緑) および PCDH10 (青) の抗体で免疫染色を行った。右に拡大図を示した。
- (B) 軸索選別分子の発現レベルの関係性。嗅球切片に対して Sema7A、PCDH10、Kirrel2 および PCDH17 で免疫染色を行った(上図)。Sema7A、PCDH10、Kirrel2 および PCDH17 の各糸球体における染色強度を測定し、プロットした(下図)。各点は一つの糸球体を表す。糸球体は、背側嗅神経細胞のマーカである NQO1 の免疫染色をもとにして背側(青)と腹側(橙)の2つのグループに分けられた。背側と腹側の糸球体の回帰直線は、それぞれ青と橙で示した。合計 1799 個 (背側領域から 940 個、腹側領域から 859 個) の糸球体を解析した。スケールバー, 100  $\mu\text{m}$  嗅球(OB: olfactory bulb)、嗅上皮(OE: olfactory epithelium)



	dorsal OB		ventral OB		whole OB	
	#1(n=940)	#2(n=934)	#1(n=859)	#2(n=751)	#1(n=1799)	#2(n=1685)
PCDH10/Sema7A	<b>0.60*</b>	<b>0.61*</b>	<b>0.61*</b>	<b>0.57*</b>	<b>0.54*</b>	<b>0.50*</b>
PCDH10/Kirrel2	<b>0.31*</b>	<b>0.19*</b>	0.09	0.14	0.03	0.05
PCDH10/PCDH17	<b>-0.29*</b>	<b>-0.17*</b>	0.01	<b>-0.17*</b>	<b>-0.18*</b>	<b>-0.19*</b>
Kirrel2/PCDH17	0.09	<b>0.21*</b>	-0.11	0.08	0.02	<b>0.18*</b>
Sema7A/Kirrel2	<b>0.45*</b>	<b>0.49*</b>	<b>0.25*</b>	<b>0.45*</b>	<b>0.37*</b>	<b>0.51*</b>
Sema7A/PCDH17	0.03	0.09	<b>0.14*</b>	0.03	0.09	<b>0.10*</b>

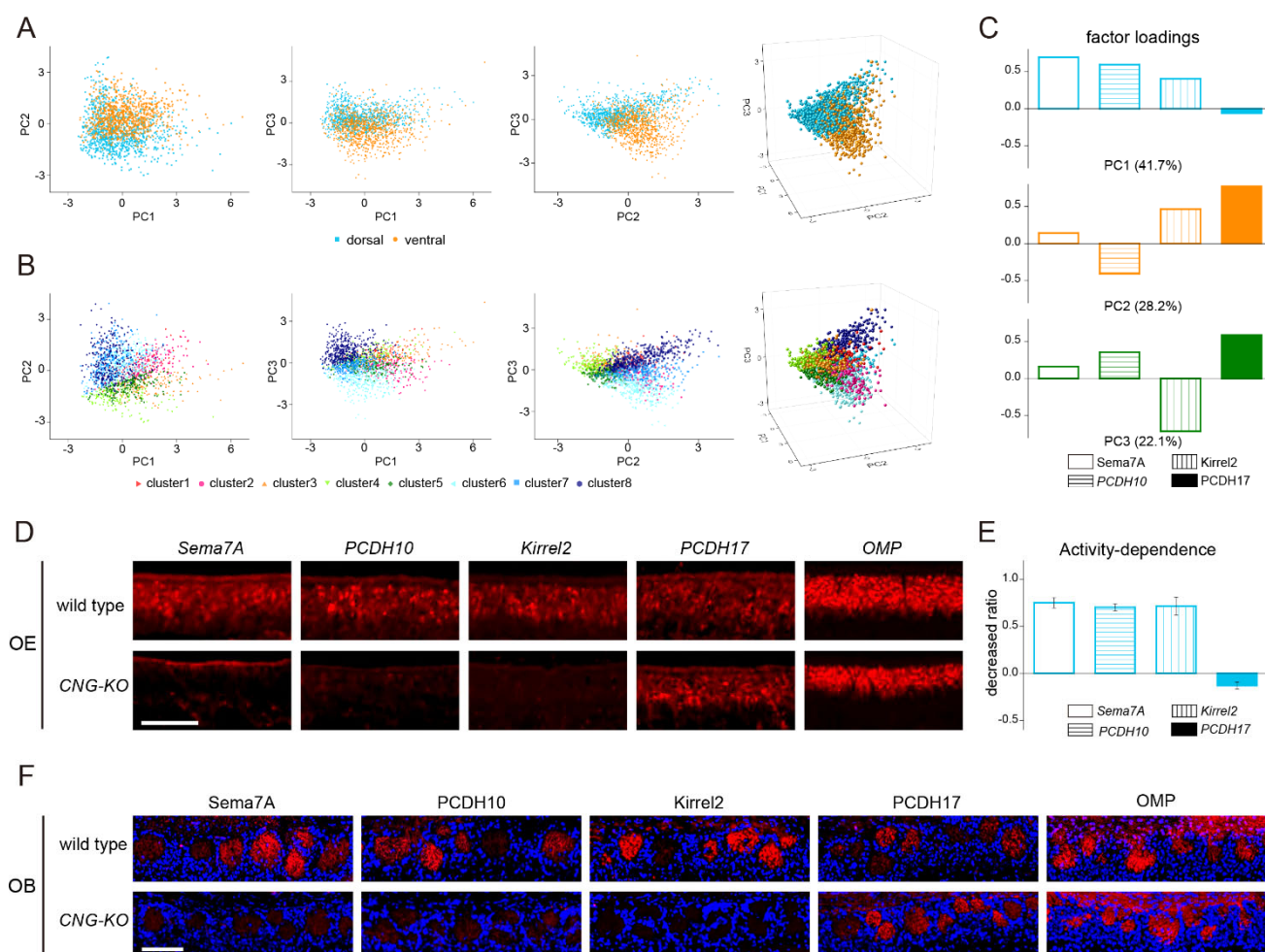
**Figure 2. 軸索選別分子発現情報間の相関係数の概要**

嗅球における軸索選別分子 (Sema7A、PCDH10、Kirrel2 および PCDH17) の発現情報の相関係数を糸球体の位置で分けて示した。有意な相関はアスタリスクで示した (\* $P < 0.0001$ )。太字で示した値は、相関係数が 0.4 より大きい強い相関を表す。



**Figure 3. 軸索選別分子の発現情報は affinity propagation によってクラスターに分類される**

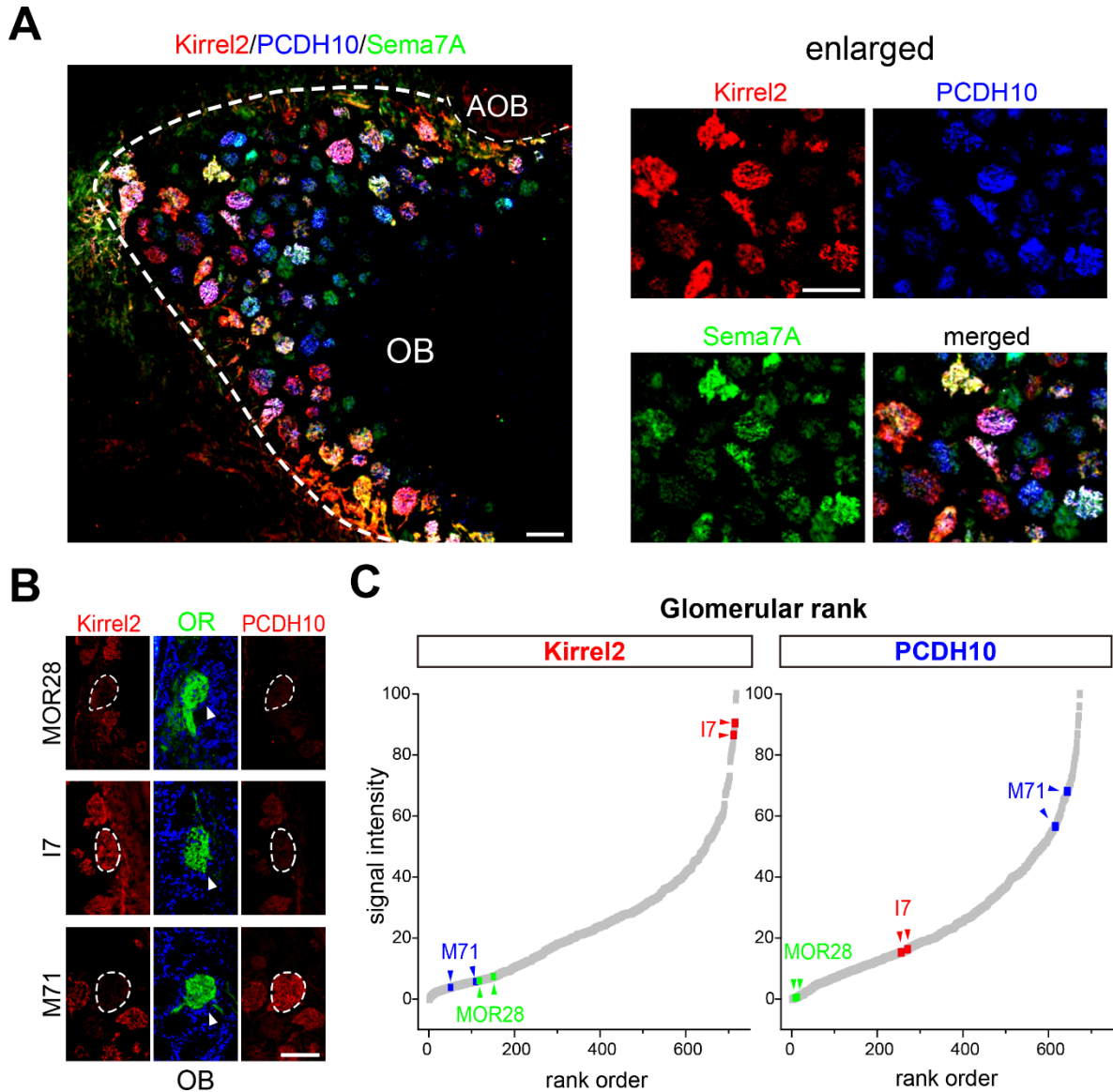
- (A) 軸索選別分子 (Sema7A、PCDH10、Kirrel2 および PCDH17) の発現情報の相関係数を全ての組み合わせで計算を行い、相関行列を作成した。1799 個の糸球体から取得した相関行列は affinity propagation によって仕分けられ、8 つのサブクラスターに分類された。
- (B) それぞれのサブクラスターは固有の遺伝子発現情報によって特徴付けられた。全体のデータにおける各サブクラスターの Cohen's *d* 効果量をテーブルに示した。全体に対して、各クラスターの平均値が有意に高いクラスターを赤色、有意に低いクラスターを青色の網掛けで示した ( $P < 0.001$ )。



**Figure 4.** 主成分分析によって得られた第一主成分は、軸索選別分子発現の神経活動への依存性と類似した

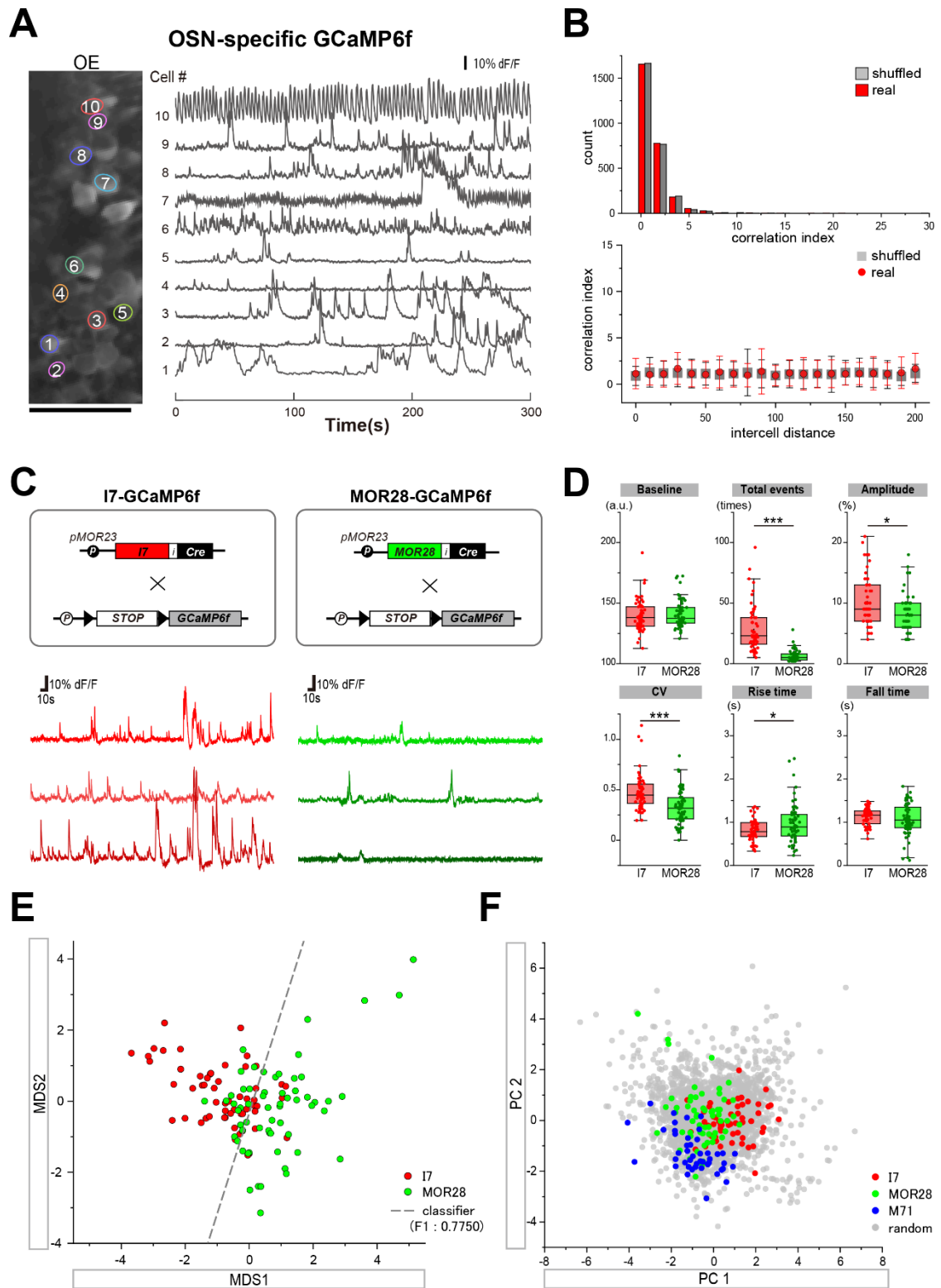
- (A) 主成分分析における全てのデータセットのスコアのバイプロット(第一主成分 vs. 第二主成分、第一主成分 vs. 第三主成分および第二主成分 vs. 第三主成分)。背側の糸球体を青、腹側の糸球体を橙の点で示した。クラスター同士の密集度や分離度を測る Dunn's index を背側の糸球体と腹側の糸球体間で計算した(第一主成分 vs. 第二主成分において 0.47、第一主成分 vs. 第三主成分において 0.47、および第二主成分 vs. 第三主成分において 0.64)。主成分分析におけるスコアの三次元プロットは右に示した。
- (B) Figure 2 における affinity propagation により分離されたサブクラスターを(A)と同様にプロットした。
- (C) 第一主成分、第二主成分および第三主成分における *Sema7A*、*PCDH10*、*Kirrel2* および *PCDH17* の因子負荷量。第一主成分、第二主成分および第三主成分の固有値は、それぞれ 1.67、1.13 および 0.88 であった。
- (D) 野生型および *CNG-KO* マウスの嗅上皮切片において、*Sema7A*、*PCDH10*、*Kirrel2*、*PCDH17* および *OMP* の RNA プローブを用いて *in situ* hybridization を行った。

- (E) 軸索選別分子発現の神経活動への依存性。野生型と *CNG-KO* との間で軸索選別分子のシグナル強度を比較した。嗅覚神経細胞マーカーである *OMP* の発現を標準化に用いた。*CNG* チャネルを介した神経活動への依存度合いは染色強度の減少度合いから計算した。エラーバーは標準誤差を表す。  $N = 4$  animals
- (F) 2週齢野生型もしくは *CNG-KO* マウスの嗅球切片に対して *Sema7A*、*PCDH10*、*Kirrel2*、*PCDH17* および *OMP* に対する抗体を用いて免疫染色を行った。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を表す。主成分(PC: principal component)



**Figure 5. 軸索選別分子の OR 固有の発現**

- (A) 軸索選別分子の糸球体固有の発現。2 週齢マウス嗅球傍矢状切片に Kirrel2(赤)、PCDH10(青)および Sema7A(緑)の抗体免疫染色を行った。拡大図を右に示す。副嗅球 (AOB: accessory olfactory bulb)
- (B) 特定の OR を発現する嗅細胞における軸索選別分子の発現レベル。MOR28、I7 および M71 糸球体の位置はそれぞれの抗体免疫染色により同定した(矢頭)。隣接切片に対して Kirrel2 および PCDH10 の抗体染色を行った。スケールバー, 100  $\mu$ m
- (C) Kirrel2 および PCDH10 の発現レベル順位。各糸球体での Kirrel2 および PCDH10 のシグナル強度を定量し、順番にプロットした(Kirrel2 は 718 個、PCDH10 は 673 個の糸球体から定量を行った)。

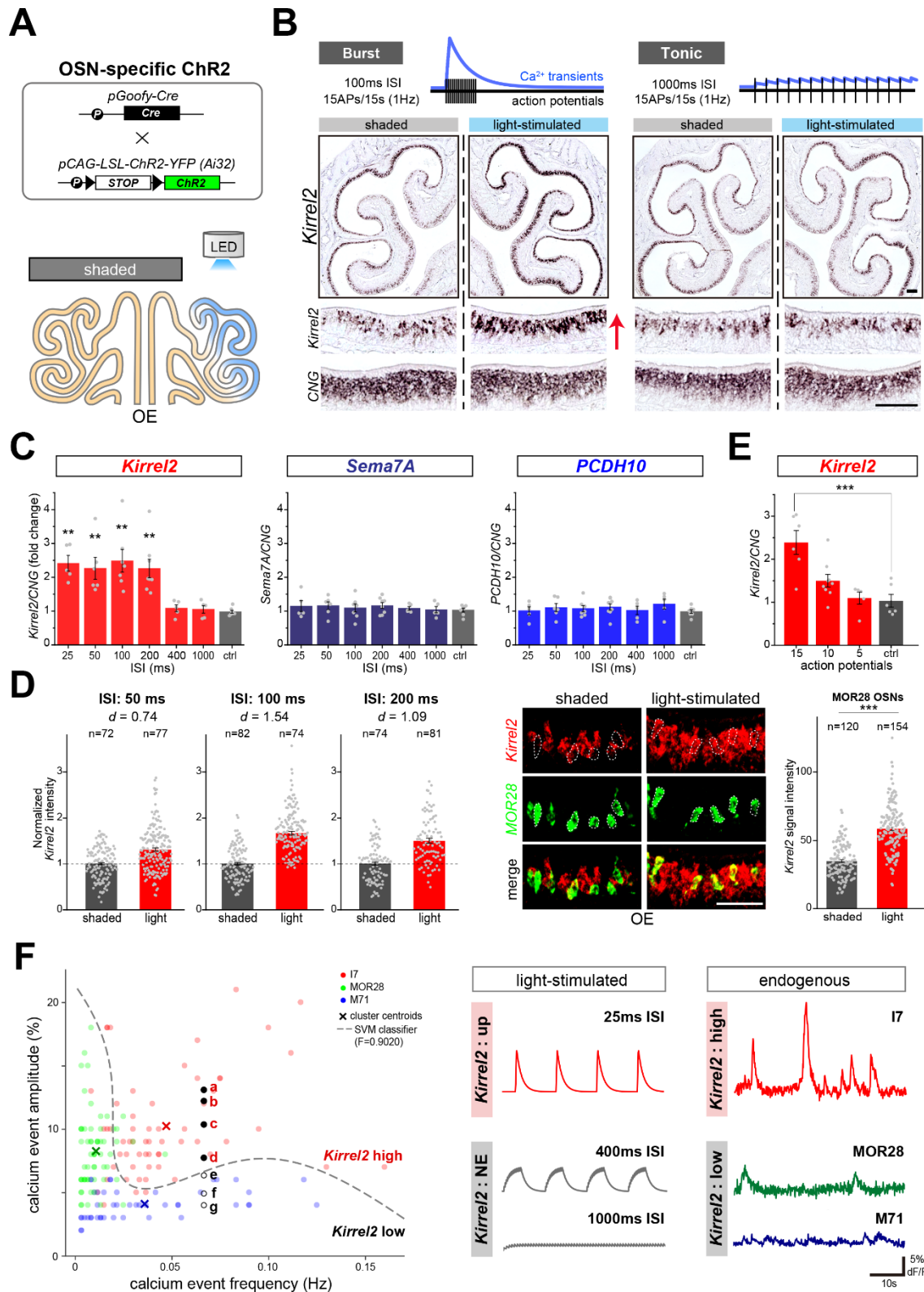


**Figure 6. OR の種類と 관련된 自発活動パターン**

(A) 嗅上皮急性切片の画像。嗅細胞におけるカルシウム変動は右に示す。スケールバー, 50  $\mu\text{m}$

- (B) すべての組み合わせに対してペアワイズ相互相関分析を行った( $N = 2701$  pair)。実際のデータとシャッフルデータの相関指数の分布には有意な差が見られなかった(上: Mann-Whitney U test)。すべての細胞ペアの細胞間距離の関数として相関指数をプロットした(下)。各データは平均 $\pm$ 標準誤差を示す。
- (C) *H-OR-Cre* ラインと *Ai95D* マウスを掛け合わせ特定の OR 発現下で GCaMP6f を発現するマウスを作製した(上)。記録した代表的なカルシウム変動を示す(下)。
- (D) I7 発現または MOR28 発現嗅細胞の自発的なカルシウム変動特徴量を解析した。結果を箱ひげ図で示す。変動係数(CV: coefficient of variation)  $***P < 0.001$ ,  $*P < 0.05$ , Mann-Whitney U test.
- (E) 各 OR を発現する嗅細胞におけるカルシウムイメージングのデータセットを用いて多次元スケーリング(MDS: multi-dimensional scaling)を行った。サポートベクターマシーン(SVM: support vector machine)による分類器を灰色の線で示す。
- (F) 3,214 個の嗅細胞から記録したカルシウムイメージングのデータセットに対して主成分分析を行い、結果のスコアをバイプロットで示した。



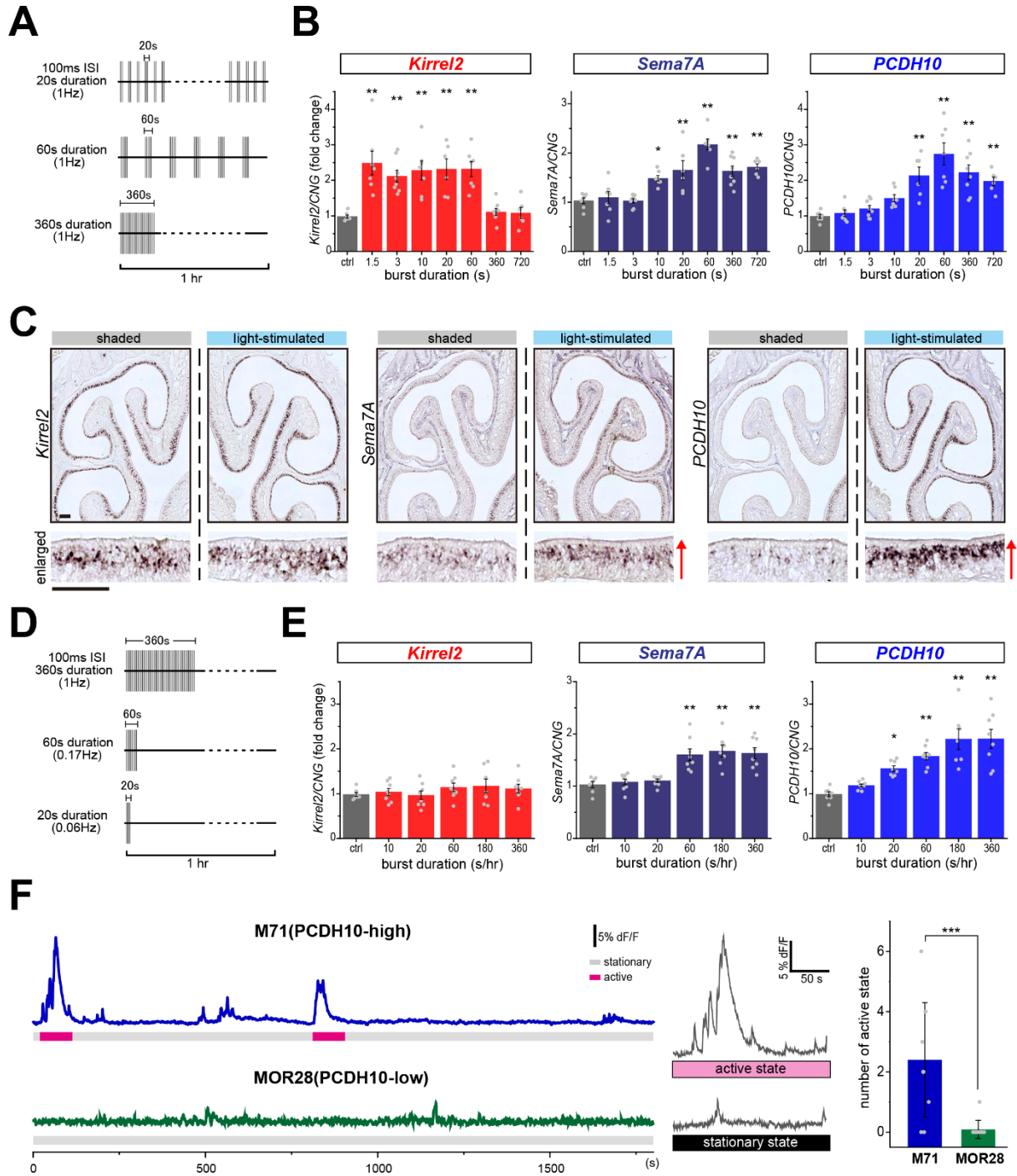


**Figure 7. 一過性のバースト刺激は *Kirrel2* の発現を上昇させる**

(A) 嗅細胞特異的に Cre を発現する *pGoofy-Cre* マウスと *Ai32* マウスを掛け合わせることで嗅細胞特異的 ChR2 マウスを作製した(上)。in vivo での光遺伝学的手法による光刺激実験の模式図(下)。



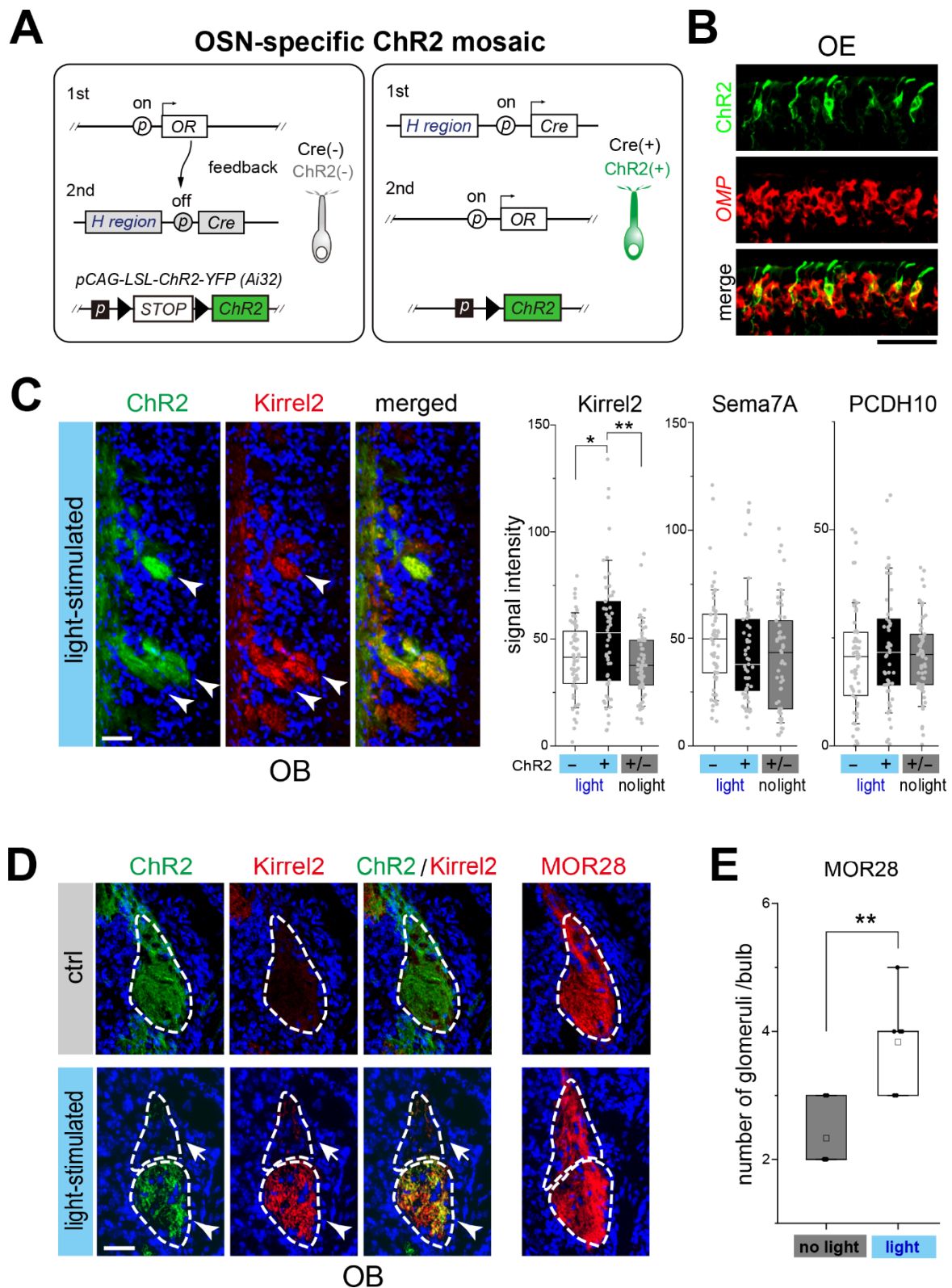
- (B) *Kirrel2* および *CNG* チャネル(成熟嗅細胞マーカー)のプローブを用いた嗅上皮切片に対する *in situ* hybridization 像。
- (C) 軸索選別分子の相対的な発現レベルは定量 RT-PCR によって比較した(N = 5-8 mice per group)。
- (D) 単一細胞解析による遺伝子発現変化(左)。バースト発火の各スパイク間隔における *Kirrel2* の相対強度を比較し、棒グラフおよび効果量  $d$  を示した。*MOR28* 発現嗅細胞における *Kirrel2* のシグナル強度を光刺激側と遮光側で比較した(右)。\*\*\* $P < 0.001$ , Student's  $t$ -test.
- (E) 異なるスパイク数から成るバースト刺激は異なる度合いで *Kirrel2* 発現を誘導する。*Kirrel2* の相対的な発現レベルは定量 RT-PCR によって比較した。N = 5-9 mice per group. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , one-way ANOVA with post-hoc Tukey's test in (C) and (E)。 (C)-(E) のエラーバーは標準誤差を示す。
- (F) 左：カルシウムイメージングデータの散布図。*Kirrel2* の発現レベルに基づいて、SVM 分類器は嗅細胞を分離した(灰色点線)。光刺激によって想定されるカルシウム変動も同様にプロットした。a, 25 ms ISI/15 APs/15 s; b, 50 ms ISI/15 APs/15 s; c, 100 ms ISI/15 APs/15 s; d, 200 ms ISI/15 APs/15 s; e, 400 ms ISI/15 APs/15 s; f, 200 ms ISI/10 APs/15 s; g, 200 ms ISI/5 APs/15 s. 右：それぞれの OR クラスターの重心から最も近いカルシウム変動パターンと光刺激により想定されるカルシウム変動パターンを比較した。活動電位 (AP: action potential), NE: no effect. スケールバー, 50  $\mu\text{m}$ .



**Figure 8. 持続的なバースト刺激は *Sema7A* および *PCDH10* の発現を上昇させる**

- (A) 様々な光刺激パターンの概要図。すべてのプロトコルは、全体の発火頻度を 1 Hz と固定して行った。
- (B) 様々な光刺激プロトコルによる軸索選別分子の発現変化。定量解析は Figure 7C と同様に行った。エラーバーは標準誤差を示す(N = 6-8 mice per group)。

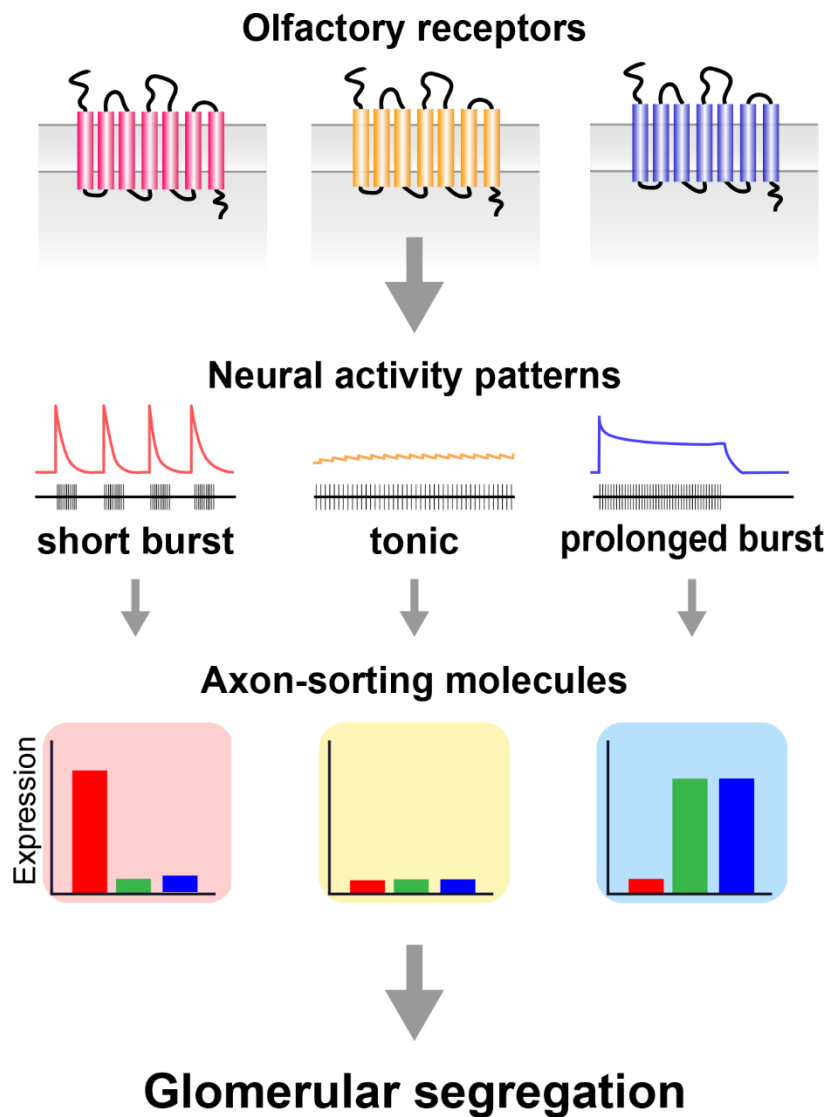
- (C) 嗅細胞特異的 ChR2 マウスに対して長期のバースト発火パターン(100 ms ISI, 1 時間中で 360 秒のバースト持続時間)で光照射を行い、嗅上皮切片に対して *in situ* hybridization を行った。拡大図は下に示す。スケールバー, 50  $\mu$ m.
- (D) 様々な光刺激パターンの概要図。全体の発火頻度は関係なく、1 時間に 1 回のバースト発火の持続時間を 360 秒から徐々に短く設定したプロトコルで光刺激を行った。
- (E) 様々な光刺激プロトコルによる軸索選別分子の発現変化。定量解析は Figure 7C と同様に行った。エラーバーは標準誤差を示す(N = 7-8 mice per group)。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , one-way ANOVA with post-hoc Tukey's test in (B) and (E).
- (F) 左 : M71 発現細胞(PCDH10 発現レベル高)および MOR28 発現細胞(PCDH10 発現レベル低)における長期カルシウムイメージング。右 : M71 発現細胞と MOR28 発現細胞での 1 時間に生じる活動状態(active state)の回数を比較した。データは平均 $\pm$ 標準偏差で示す。N = 10 細胞(M71), 11 細胞(MOR28), \*\*\*  $P < 0.001$ , Student's *t*-test.



**Figure 9. 光刺激は軸索分離に影響を及ぼす**

(A) 嗅細胞特異的 ChR2 モザイクマウスの作製。H-Cre マウスと Ai32 マウスを掛け合わせることで、同一個体において同種の OR を発現する嗅細胞で ChR2 陽性/陰性が共存するマウスを作製した。

- (B) ChR2 モザイクマウス嗅上皮切片に対する二重染色。OMP プローブ(赤)を用いて *in situ* hybridization を行い、さらに抗 GFP 抗体(緑)によって免疫染色を行った。
- (C) 慢性的な光刺激(バースト内発火頻度: 10 Hz; バースト中の発火数: 15; スパイク間隔: 15 秒)を行った後、嗅球切片に対して GFP および Kirrel2 の免疫染色を行った。光刺激に伴った Kirrel2 の発現上昇を矢頭で示す(左)。軸索選別分子のタンパクレベルの定量(右)。箱ひげ図の箱は 25-75 パーセンタイル、ひげは 10-90 パーセンタイルを示す。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , one-way ANOVA with post-hoc Tukey's test.
- (D) 嗅球切片に対する Kirrel2, GFP および MOR28 の染色像。MOR28 陽性の軸索の中で、Kirrel2 陽性と Kirrel2 陰性の軸索をそれぞれ矢頭、矢印で示す。
- (E) ChR2 モザイクマウスにおいて、光刺激有りもしくは無し条件での嗅球における MOR28 糸球体の個数を比較した。糸球体構造は vGlut2 の免疫蛍光シグナルに基づいて半自動で定義した。箱ひげ図の箱は 25-75 パーセンタイル、ひげは 10-90 パーセンタイルを示す。スケールバー, 50  $\mu\text{m}$ . N = 6 糸球体, \*\* $P < 0.01$ , Student's *t*-test.

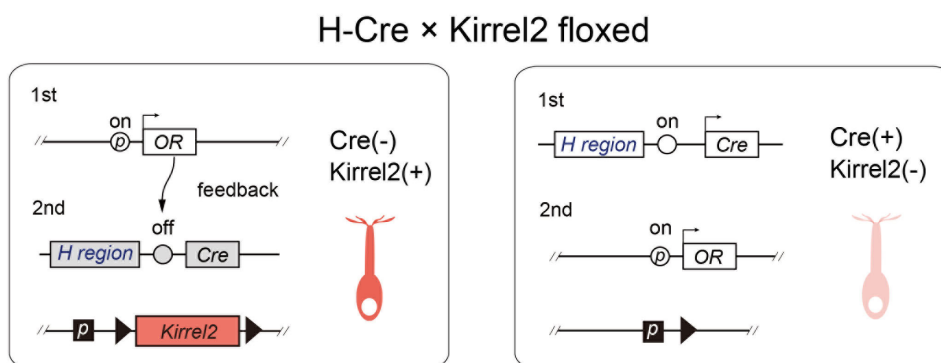


**Figure 10. 神経活動パターンに依存した回路形成機構**

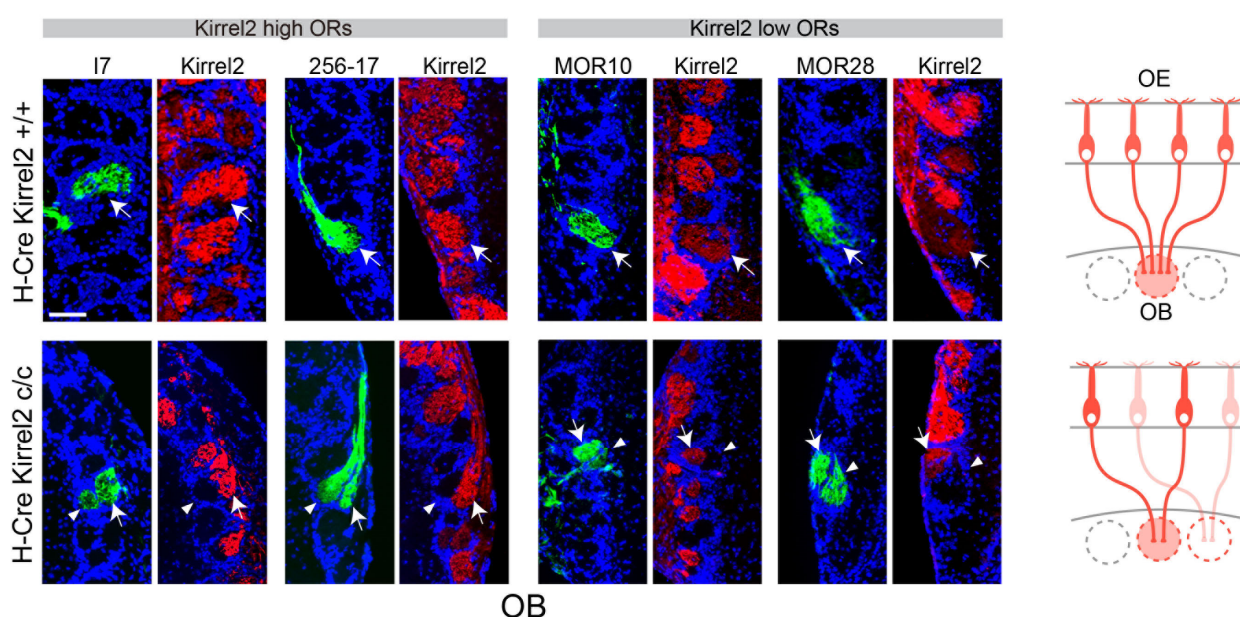
嗅細胞は発現する OR の種類ごとに固有の自発活動パターンを示し、異なる神経活動パターンは異なる軸索選別分子の発現を誘導することが示された。これにより、発現する OR の種類に依存した軸索選別分子の分子コードが軸索末端に形成され、OR 特異的な糸球体の分離が生じる。

## 補足図

A



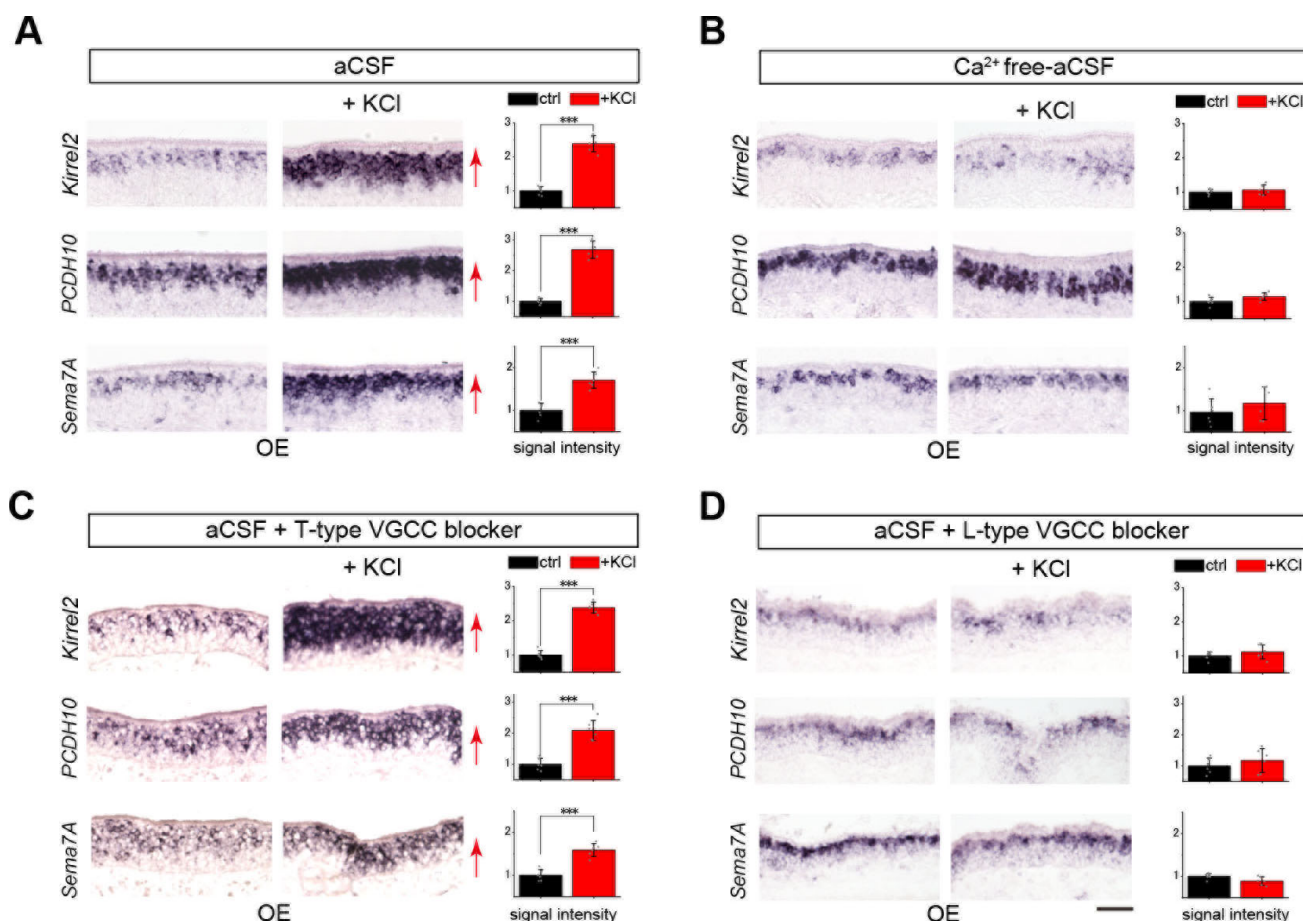
B



**Figure S1. Kirrel2 モザイク KO マウス**

- (A) *H-Cre* モザイクシステムの概要図。*H-Cre* マウスでは一部の嗅細胞で Cre リコンビナーゼが発現するため、同一個体内において特定の OR を発現する嗅細胞では、Cre 陽性と Cre 陰性の 2 種類の集団が作り出される。*H-Cre* マウスと *Kirrel2* floxed マウスを掛け合わせることで *Kirrel2* モザイクマウスを作製した。
- (B) *Kirrel2* モザイク KO マウスにおける糸球体の分離。嗅球水平切片における MOR28, MOR10, MOR256-17, I7 発現嗅細胞の糸球体を各 OR 抗体で同定した(矢印)。隣接切片に対して *Kirrel2* 抗体を用いて免疫染色を行った。*Kirrel2* 陰性糸球体は矢頭で示す。コントロールマウス(*H-Cre/Kirrel2*<sup>+/+</sup>, 上)では、同種の OR を発現する嗅細胞の軸索は単一の糸球体構造を形成する。一方で、*Kirrel2* モザイク KO マウスにおいては同種の OR を発現する糸球体で分離が見られる(下)。マウスは生後 21 日齢で解析を行った。結果の概要図は右に示す。スケールバー, 100 μm

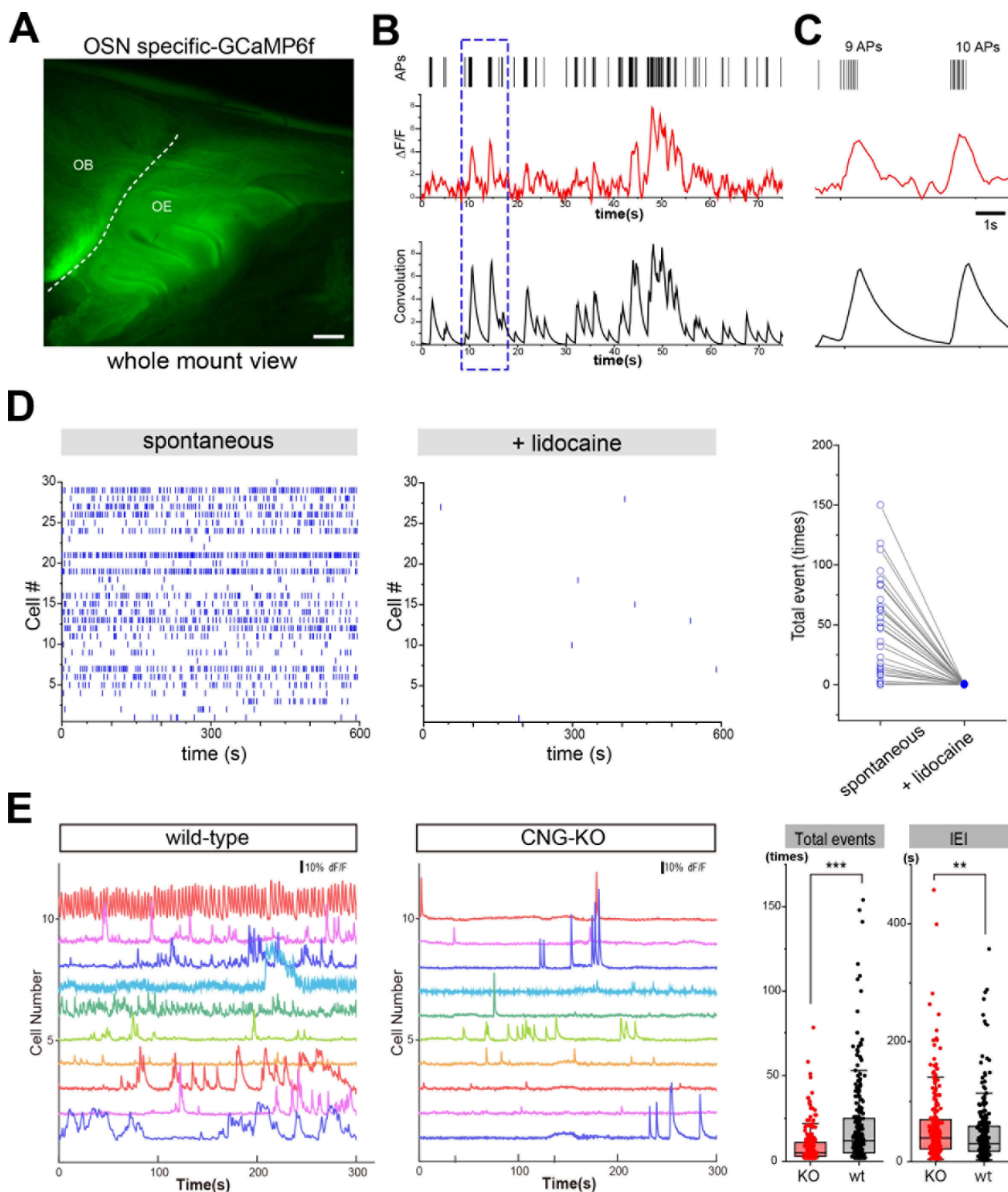




**Figure S2. 軸索選別分子は L 型電位依存性カルシウムチャネル(voltage-gated calcium channel: VGCC)を介したカルシウム流入に依存して発現する**

- (A) 生後 10 日マウスから中隔鼻軟骨と嗅上皮を取り出し aCSF 溶液中で 6 時間の培養を行った。左: *ex vivo* 培養後、嗅上皮サンプルに対して *Kirrel2*, *Sema7A* および *PCDH10* のプローブを用いて *in situ* hybridization を行った。*Kirrel2*, *Sema7A* および *PCDH10* は、25 mM KCl による膜の脱分極によって発現が上昇した。右: 軸索選別分子の発現レベルの定量。*Kirrel2*, *Sema7A*, *PCDH10* および *OMP* のプローブを用いて、蛍光 *in situ* hybridization を行った。N = 6 slices. \*\*\* $P < 0.001$ , Student's *t*-test.
- (B) KCl による発現上昇は細胞外カルシウムイオンの除去によって抑制される。N = 6 slices.
- (C) (D) VGCC の薬理的阻害による軸索選別分子の発現への作用。(C) T 型 VGCC 阻害薬 ML218(5  $\mu$ M)、(D) L 型 VGCC 阻害薬 Nimodipine (5  $\mu$ M)を *ex vivo* 培養実験の sCSF 中に加えた。N = 6 slices. \*\*\* $P < 0.001$ , Student's *t*-test. スケールバー, 50  $\mu$ m. エラーバーは標準偏差を示す。



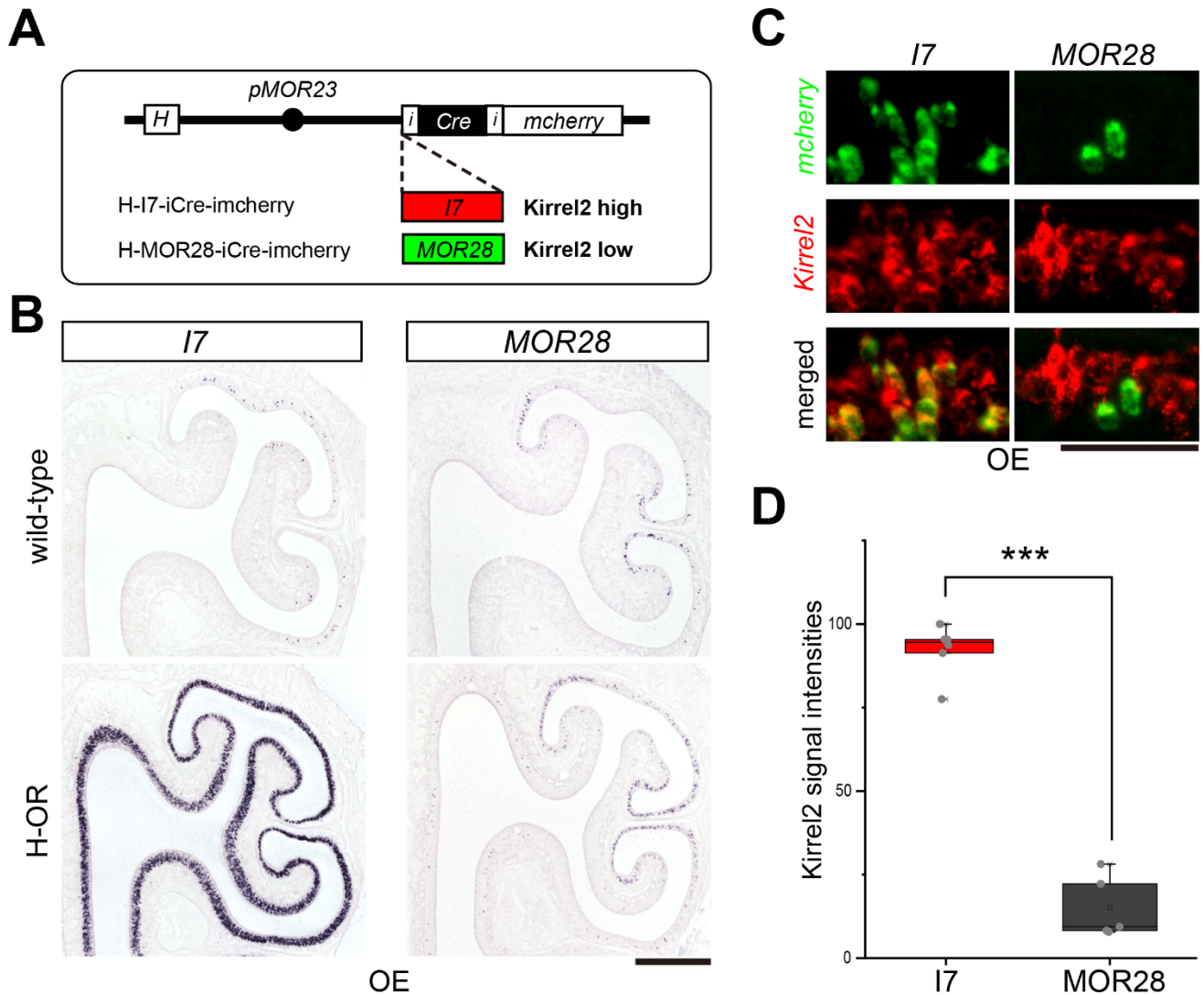


**Figure S3. GCaMP6f を用いた嗅細胞の自発活動イメージング**

- (A) 嗅細胞特異的 GCaMP6f マウスの嗅覚組織を内側から観察した全体像。
- (B) 嗅細胞におけるセルアタッチ記録とカルシウムイメージングの同時記録。GCaMP6f によるカルシウムイメージングでは、電気的な活動電位の発生に対応して蛍光変化を示す。上段：嗅細胞における自発的な活動電位(黒の縦線で示す)。中段：GCaMP6f を用いて得られたカルシウム変動。下段：嗅細胞スパイク反応のコンボリューション( $\tau$

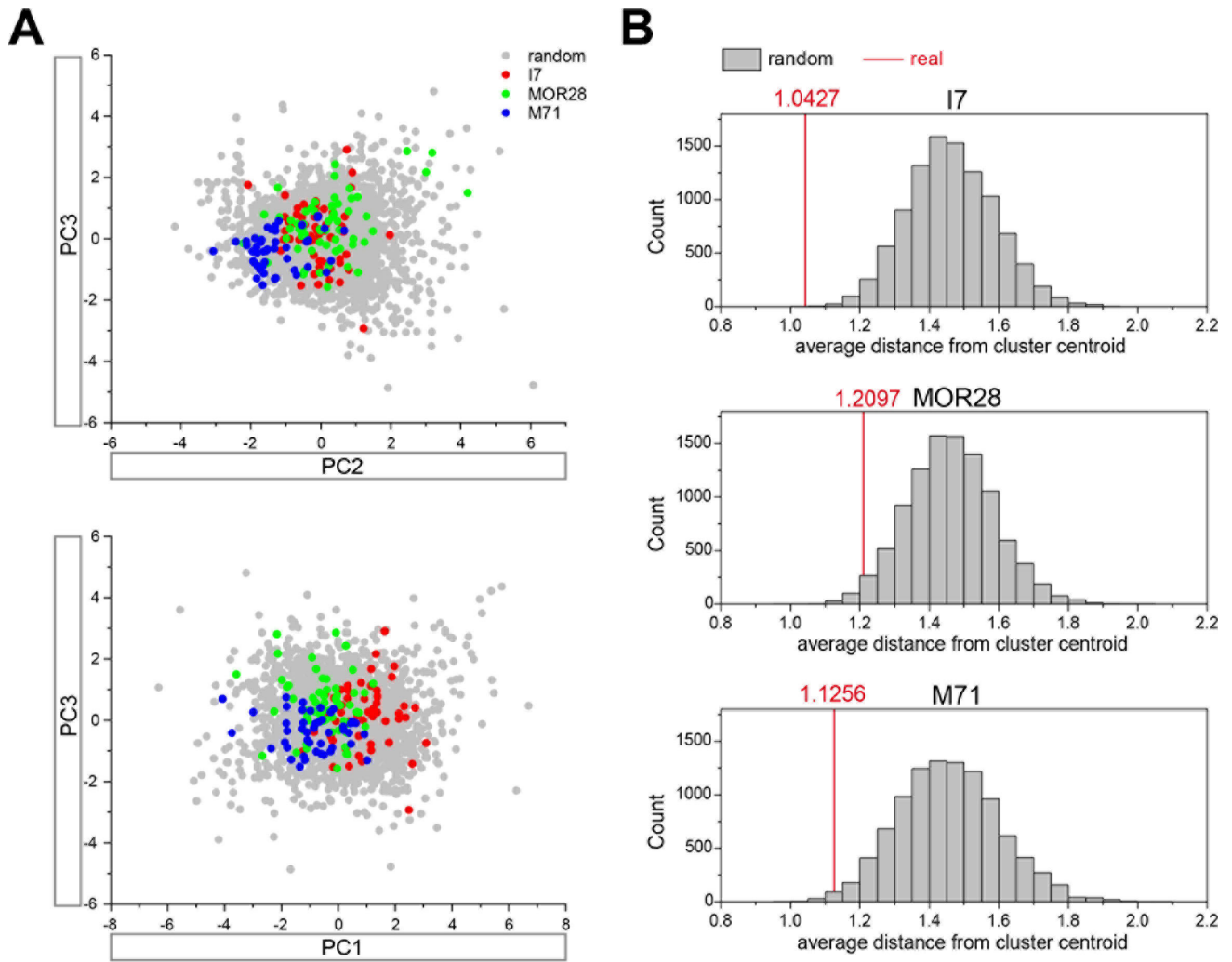
decay = 1,900 ms,  $r = 0.86$ ).

- (C) (B)において点線で囲んだ時間幅における蛍光変化の拡大図。
- (D) 電位依存性ナトリウムチャネルの薬理的阻害が自発的カルシウム変動に与える影響。5 mM lidocaine 処置前後における代表的な 30 細胞のカルシウム変動のラスタープロット。各青の縦線はカルシウム変動の開始と対応している(左)。カルシウムイベント頻度の変化の定量解析(右)。各点は一つの細胞から記録データを示す。
- (E) CNG チャネルの欠失は嗅細胞におけるカルシウム変動パターンに変化が見られる。CNG-KO および野生型コントロールマウスにおける嗅細胞のカルシウム変動の典型例(左)。自発的カルシウム変動のパターンを全体のイベント数と IEI に関して、CNG-KO マウスと野生型マウスとで比較した(右)。活動パターンの変化を箱ひげ図で示す。\*\*\* $P < 0.001$  and \*\* $P < 0.01$ , Mann–Whitney U test.



**Figure S4. H-OR** トランスジェニックマウス

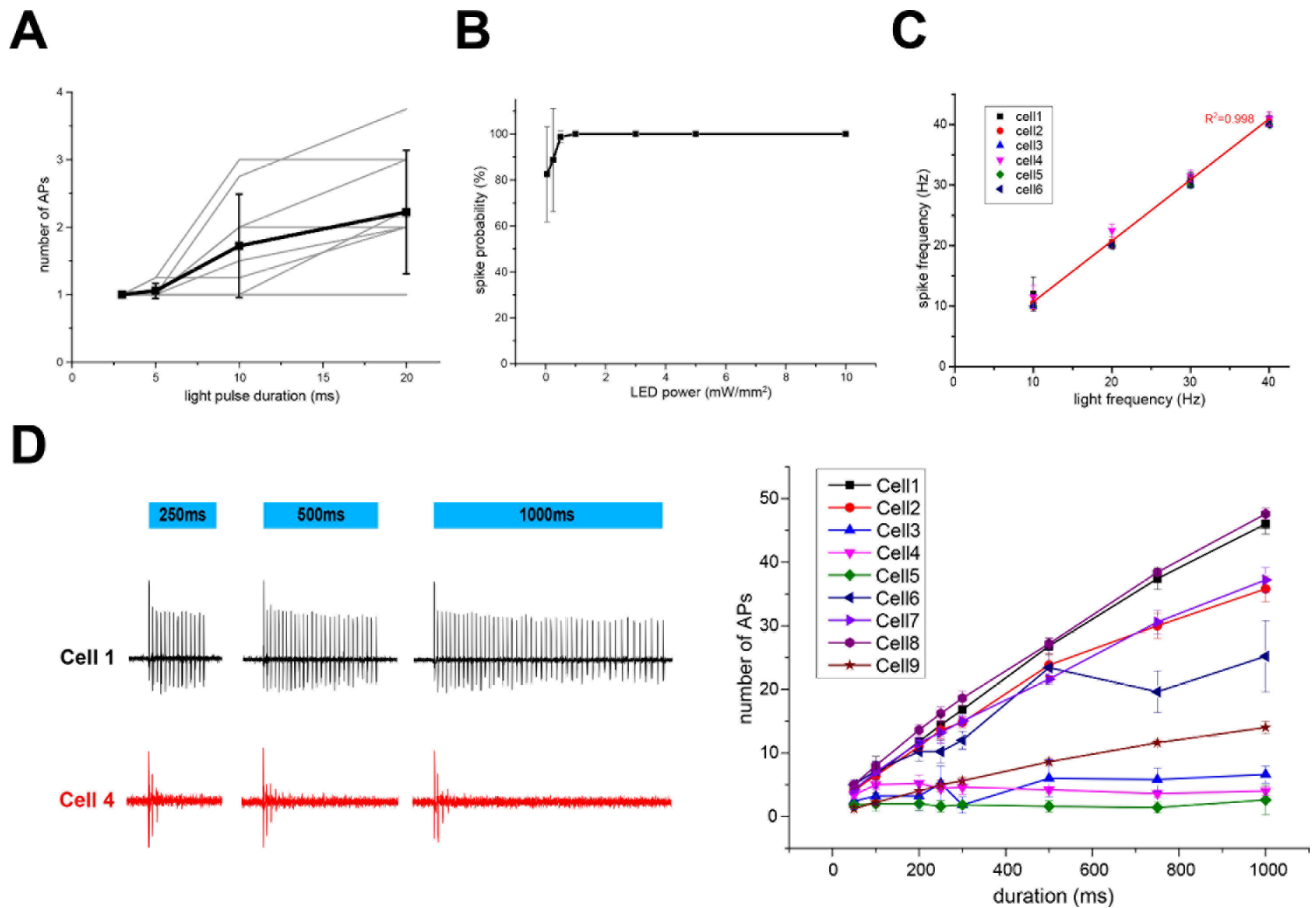
- (A) *H-I7-Cre-mcherry* と *H-MOR28-Cre-mcherry* トランスジェニックマウス作製の DNA コンストラクト概要図。MOR23 minigene カセットを用い、MOR23 のコーディング配列を I7 または MOR28 で入れ替えた。発現頻度を上昇させるため、嗅細胞特異的エンハンサーである *H* element を MOR23 プロモーターの 5' 側上流領域に導入した。
- (B) 嗅上皮におけるトランスジーンが発現パターン。H-OR トランスジェニックマウスの嗅上皮切片に対して、*mcherry* のプローブを用いて *in situ* hybridization を行った。野生型マウスに対しては、I7 と MOR28 のプローブを用いて *in situ* hybridization を行った。スケールバー, 500  $\mu$ m
- (C) H-OR トランスジェニックマウスの嗅上皮切片に対して、*mcherry*(緑)と *Kirrel2*(赤)のプローブを用いて二重 *in situ* hybridization を行った。スケールバー, 500  $\mu$ m
- (D) *Tg I7* と *Tg MOR28* のそれぞれの糸球体における *Kirrel2* の染色蛍光強度を比較した。結果を箱ひげ図で示す。\*\*\* $P < 0.001$ , Student's *t*-test. N = 6 for I7 glomeruli and 5 for MOR28 glomeruli.



**Figure S5. カルシウム変動パターンの PCA 解析**

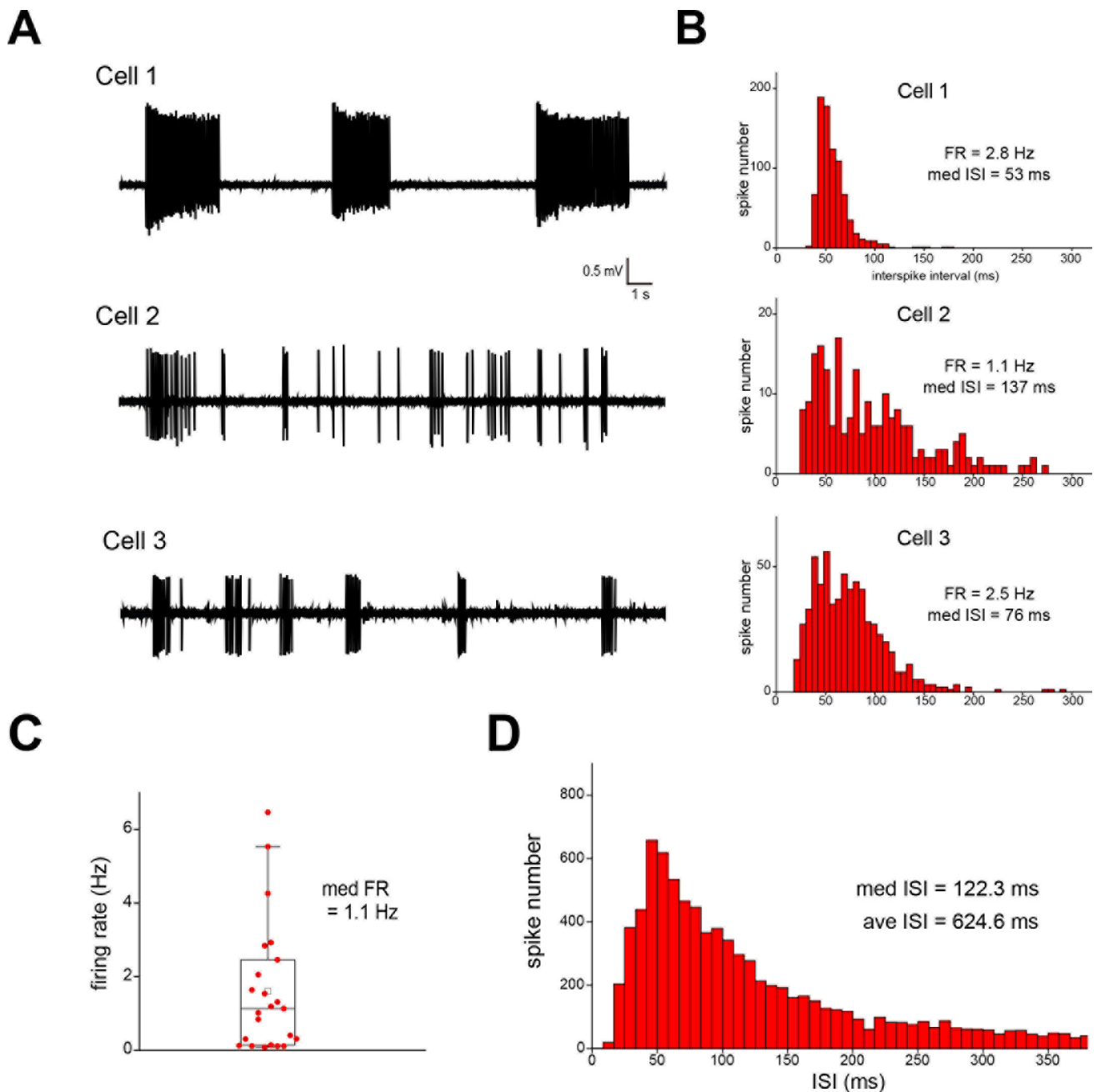
(A) すべてのデータセットの PCA バイプロット(PC2 vs. PC3 and PC1 vs. PC3)

(B) 特定 OR 発現細胞から記録したデータのクラスター化傾向の確認。ランダムなデータと比較して有意な差が見られるか確認するため、すべてのデータセットからランダムにサンプリング(10,000 回繰り返し行った)することで surrogate data を作成した。各点と各クラスターの重心との距離の平均(赤線)をそれぞれの OR クラスターに関して計算を行い、surrogate data と比較を行った。



**Figure S6. 様々な光刺激プロトコルへの嗅細胞の発火応答**

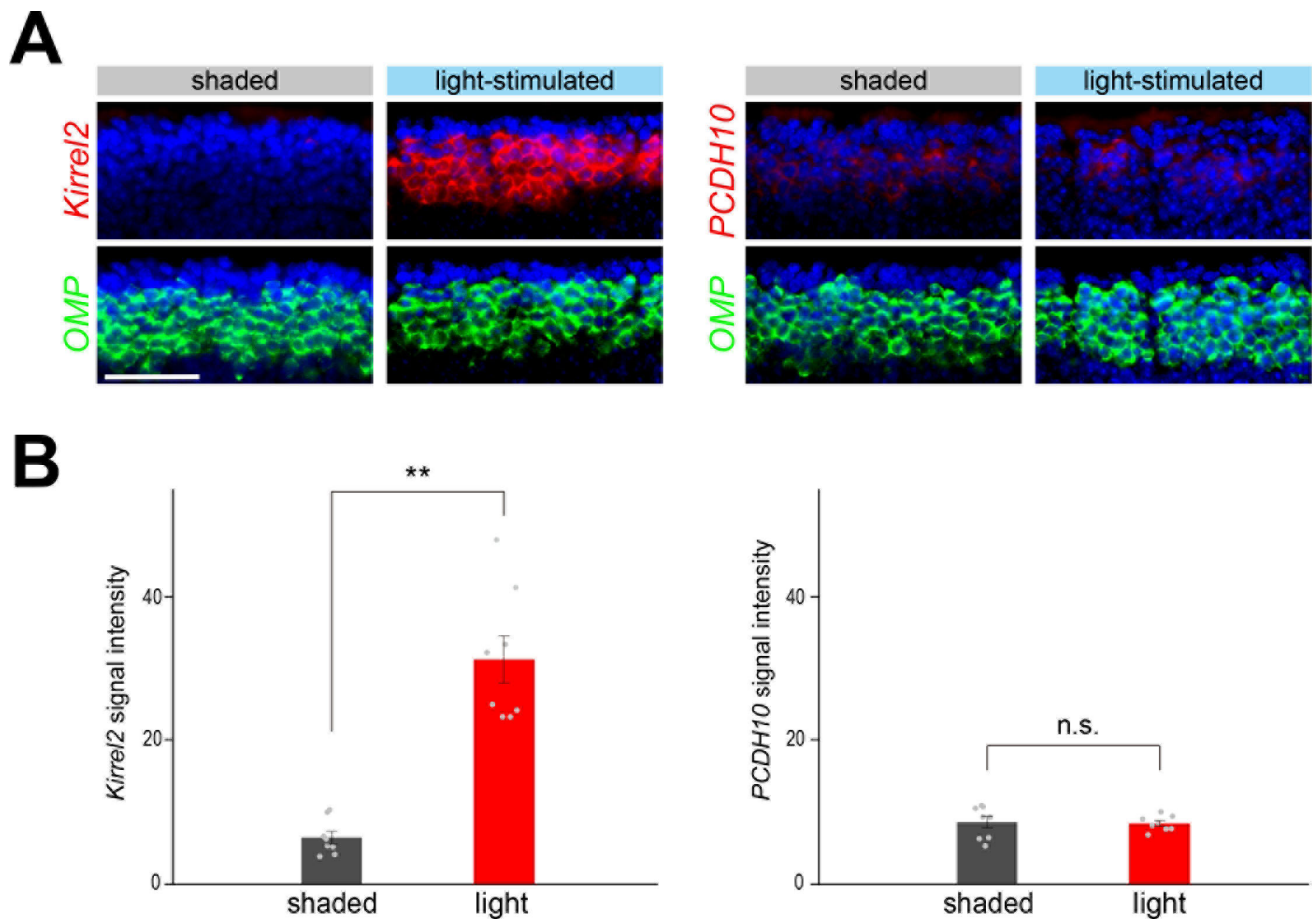
- (A) 光刺激のパルス持続時間を変化させた際の嗅細胞の発火応答。持続的な光刺激は複数の活動電位を誘導する。個々の嗅細胞に対して発火応答は5回計測を行った。灰色の線は個々の嗅細胞における平均の発火応答を示す。
- (B) LED 光パワーを増加させた際の嗅細胞のスパイク確率。データポイントは平均±標準偏差を示す。
- (C) 青色光パルスの頻度を変化させた際の嗅細胞の発火応答。3 ms のパルス(LED light power per unit area = 1 mW/mm<sup>2</sup>)では、最大で 40 Hz まで単一の活動電位が正確に誘導された。
- (D) 光パルスの持続時間を変化させた際(LED light power per unit area = 10 mW/mm<sup>2</sup>)の発火応答。嗅細胞は持続的な光刺激に対して異なる発火パターンを示した。



**Figure S7. 嗅細胞の自発発火パターン**

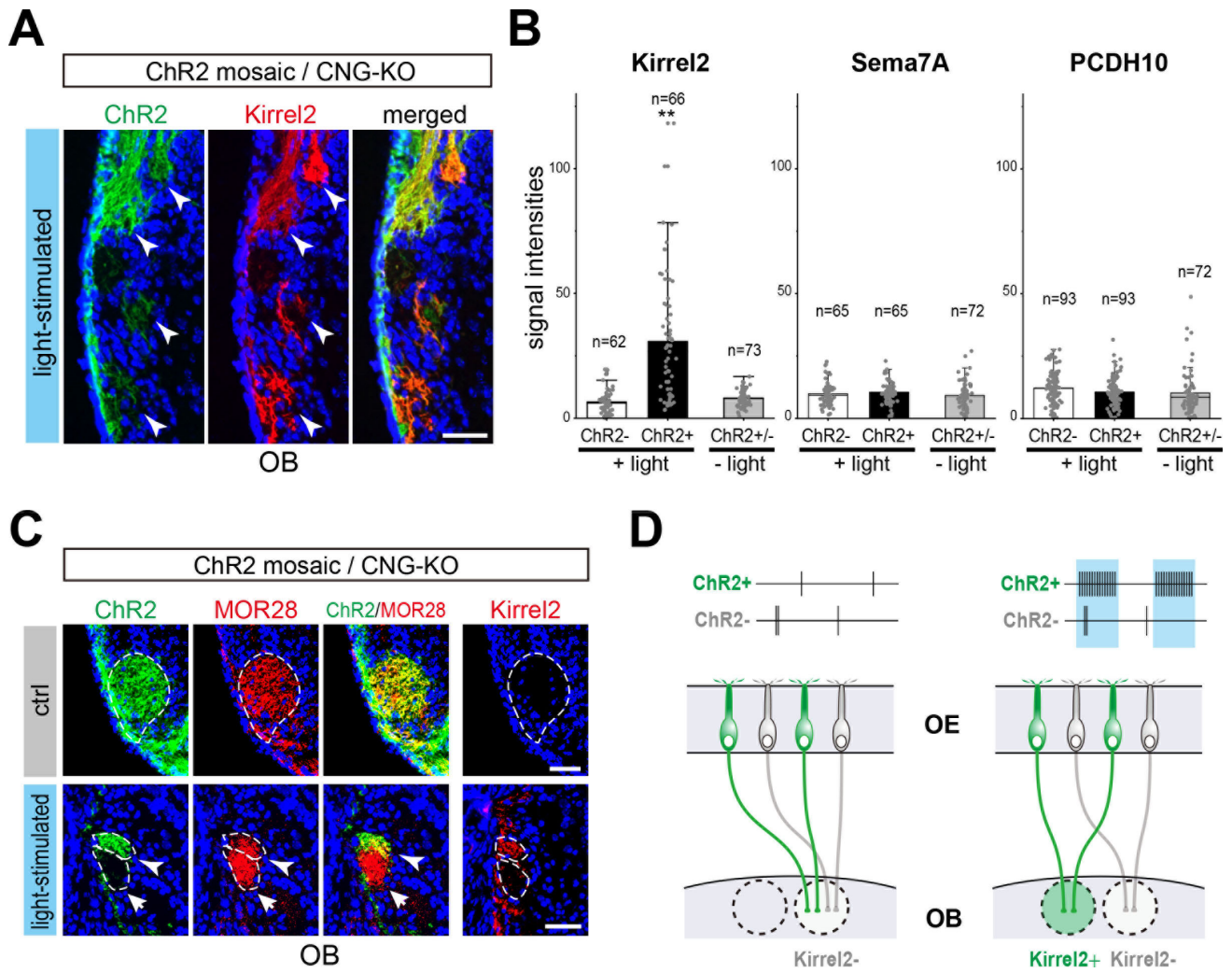
- (A) 個々の嗅細胞は異なる自発発火パターンを示す。活動電位はセルアタッチ記録によって記録した(Cells #1-3)。
- (B) Cells #1-3 におけるスパイク間隔のヒストグラムを 10 ms のビンで区切り示した。
- (C) 嗅細胞の平均発火頻度。各店は単一の細胞での記録時間中の平均発火頻度を示す。
- (D) 記録したすべての細胞のスパイク間隔のヒストグラムを 10 ms のビンで区切り示した。N = 23 cells from 4 animals.





**Figure S8. 一過性のバースト発火は *CNG-KO* においても *Kirrel2* の発現を誘導する**

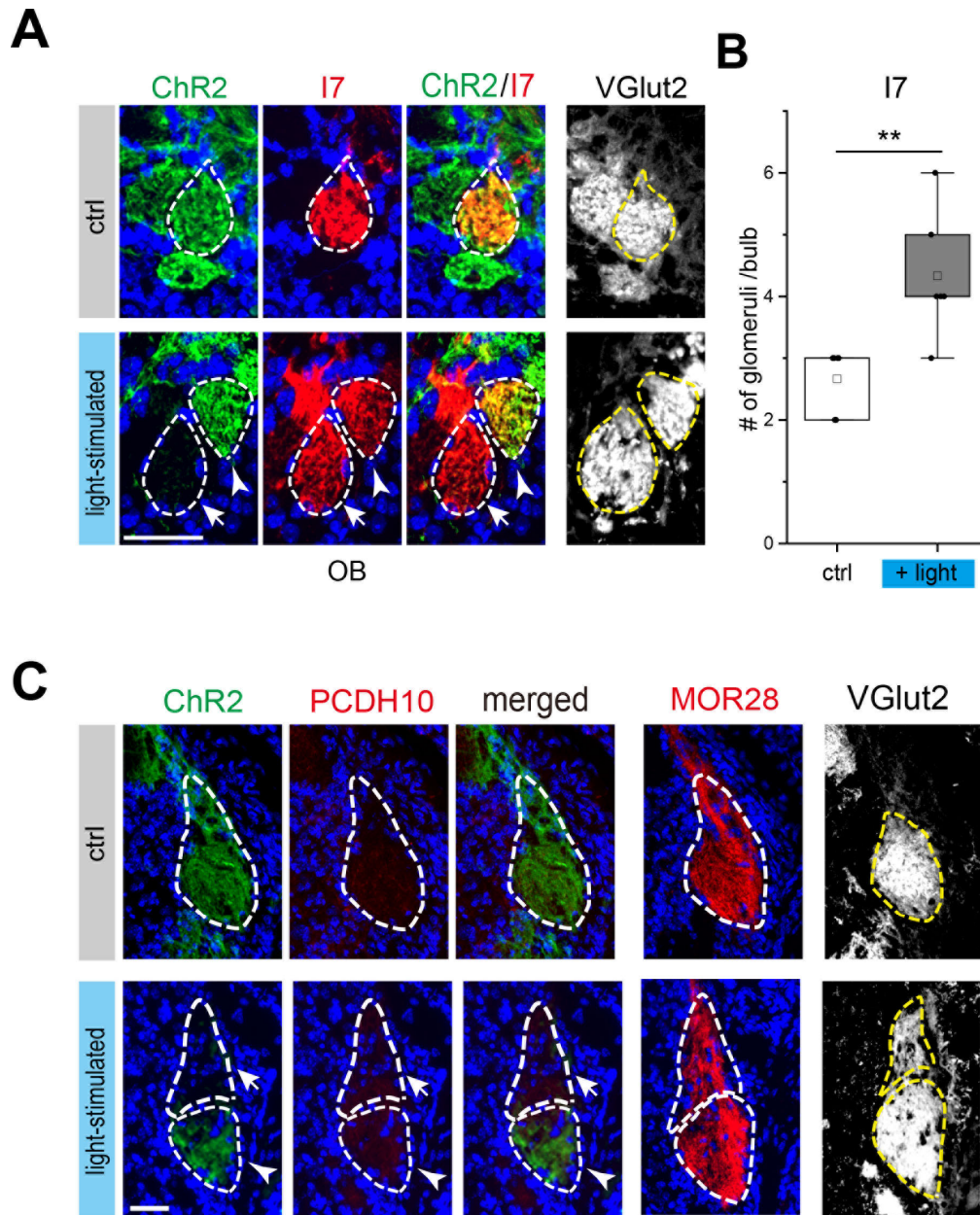
- (A) *CNG-KO*/嗅細胞特異的 ChR2 マウスにおける嗅上皮切片に対して *Kirrel2*, *PCDH10* および *OMP* のプローブを用いて *in situ* hybridization を行った。マウスの片鼻に対して一過性のバーストのプロトコル(15 APs in 15 s, 100 ms ISI, 1 Hz)で青色光を照射した。*Kirrel2* 発現は光刺激側で大幅に上昇した(上段左)。一方で、*PCDH10* の発現に変化は見られなかった(上段右)。コントロール遺伝子として *OMP* を示す(下段)。
- (B) 光刺激による *Kirrel2* および *PCDH10* の発現変化の定量。エラーバーは標準偏差を示す。\*\* $P < 0.01$ , Student's *t*-test.  $N = 8$  sections.



**Figure S9. CNG-KO 条件において光刺激は軸索分離に影響を及ぼす**

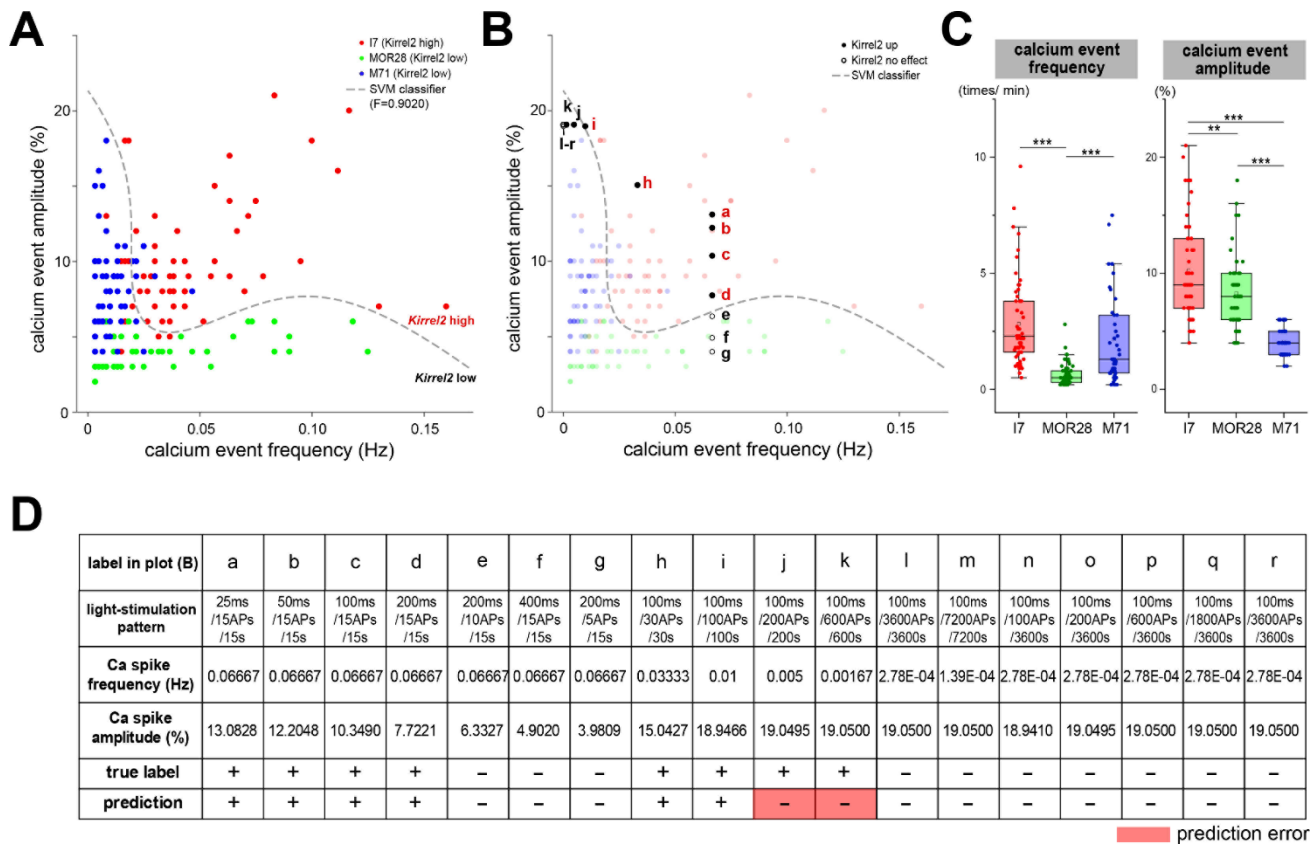
- (A) ChR2 モザイク/CNG-KO の新生児マウスに対してバースト発火プロトコルで光刺激を行った。1 週間の光刺激後、嗅球切片を抗 GFP 抗体および Kirrel2 抗体で免疫染色を行った。光刺激に伴って ChR2 陽性の糸球体において Kirrel2 の発現が上昇した(矢頭で示す)。
- (B) Kirrel2, Sema7A および PCDH10 のタンパクレベルの定量。\*\*\* $P < 0.001$ , one-way ANOVA with post-hoc Tukey's test. スケールバー, 50  $\mu\text{m}$
- (C) ChR2 モザイク/CNG-KO マウスにおいて光刺激は軸索分離に影響を及ぼす。嗅球切片に対して MOR28, GFP および Kirrel2 抗体を用いて免疫染色を行った。ChR2 陽性 MOR28 軸索は光刺激に応じて ChR2 陰性 MOR28 軸索と分離した。ChR2 陽性と陰性の MOR28 軸索はそれぞれ矢頭と矢印で示す。The number of MOR28 glomeruli per olfactory bulb was  $2.25 \pm 0.5$  glomeruli/bulb (control mice) and  $2.75 \pm 0.5$  glomeruli/blub (light-stimulated mice). スケールバー, 50  $\mu\text{m}$
- (D) 表現型の概要図。





**Figure S10. 光刺激は軸索分離に影響を及ぼす**

- (A) ChR2 モザイクに対してバースト発火プロトコルで1日に5-6時間の光刺激を行った。1週間の光刺激後、嗅球切片に対してGFP, I7 および VGlut2(シナプスマーカー)で免疫染色を行った。ChR2 陽性 I7 軸索は光刺激によって ChR2 陰性の軸索と分離した。ChR2 陽性と陰性の I7 軸索はそれぞれ矢頭と矢印で示す。
- (B) 1つの嗅球あたりの I7 系球体の個数を光刺激マウスとコントロールマウスとで比較した。N = 6 bulbs,  $**P < 0.001$ , Student's *t*-test.
- (C) 嗅球切片に対して GFP, PCDH10, MOR28 および VGlut2 で免疫染色を行った。慢性的な光刺激によって PCDH10 の発現レベルには影響を及ぼさなかった。ChR2 陽性と陰性の MOR28 軸索はそれぞれ矢頭と矢印で示す。スケールバー, 50  $\mu$ m



**Figure S11. 内在性の自発発火パターンを用いた SVM 分類器は光刺激によって誘導される *Kirrel2* 発現上昇を予測する**

- (A) 特定の OR を発現する細胞から記録したカルシウムイメージングデータの散布図(最大振幅および頻度)。合計 165 細胞(59 from I7, 61 from MOR28 and 45 from M71)を非線形の SVM にかけた。SVM 分類器(灰色の点線)は、*Kirrel2* の発現レベル[*Kirrel2*-high(I7 発現細胞)と *Kirrel2*-low(MOR28 発現細胞および M71 発現細胞)]に基づいて嗅細胞を 2 つの集団に分類した。各点は 1 つの嗅細胞を示す。
- (B) Figure 7 および 8 で行った様々なバーストプロトコルでの光刺激によって想定される細胞内カルシウム変動パターンを計算し(A)にプロットした。黒丸は *Kirrel2* の発現上昇が見られた光刺激プロトコルを示し、白丸は *Kirrel2* の発現に変化が見られなかったプロトコルを示す。
- (C) 特定の OR 発現細胞における自発カルシウム変動パターンの頻度と振幅を解析した。  
\*\*\* $P < 0.001$ , \* $P < 0.05$ , one-way ANOVA with post-hoc Tukey's test.
- (D) SVM 分類器による予測精度。+; *Kirrel2* 上昇, -; *Kirrel2* 変化なし

## 6. 考察

### 軸索選別分子の多様な発現制御

糸球体分離が神経活動によって制御されているということは広く知られている。CNG チャネル<sup>8,17</sup> および HCN チャネル<sup>24,25</sup> のような候補となるチャネルが糸球体分離に関与していると示されてきた。ここでは、軸索選別分子の発現データを仮説に基づかないデータマイニングの手法で解析を行った。既存のモデルやバイアスと独立して得られた結果にも関わらず、軸索選別分子発現の多様性の多くは CNG チャネルを介した神経活動によって作られること示唆する結果を得た。この結果は、CNG チャネルが糸球体分離のために軸索選別分子群の発現の組み合わせを作り出すことに最も大きく寄与していることを強く示唆している。

*PCDH17* の発現は *CNG-KO* において影響を受けなかったが、*PCDH17* の発現はどのように制御されているだろうか。一つの可能性としては、HCN チャネルのような CNG チャネル以外のチャネルを介した神経活動によって発現が制御されていることが考えられる。*CNG-KO* マウスにおいて発現する OR の種類によって軸索収斂に異なって影響が出ること知られている<sup>26</sup> が、CNG チャネルに依存しない *PCDH17* の発現によって軸索収斂が担われているということが考えられる。

また、*Kirrel2*, *Sema7A* および *PCDH10* の発現は、CNG チャネルを介した神経活動にほとんど完全に依存しているにも関わらず、異なる発現パターンを示すことが分かった。この結果から、前述の遺伝子の発現制御が単なる発火頻度の高低といった単一のパラメーターによって規定されているのではなく、神経活動中に含まれている情報がより複雑な発現制御を可能としていると考えられた。

### 発現する OR の種類と神経活動パターン

OR の種類を入れ替えた嗅細胞におけるカルシウムイメージングの解析結果から、発現する OR の種類が自発活動のパターンを規定することが示された。それでは、自発活動のパターンは OR によってどのように制御されているだろうか。OR を含む G タンパク質共役型受容体(G protein-coupled receptor: GPCR)はリガンド非依存的に固有の cAMP 基礎活性を作り出す<sup>7,27,28</sup>ため、OR に由来する基礎活性が自発活動パターンに寄与することが考えられる。しかし、GPCR に変異を加えることで cAMP の基礎活性レベルを変化させたところ、嗅細胞における軸索選別分子の発現には影響が見られなかった<sup>7</sup>。したがって、OR 由来の基礎活性が自発活動パターンを規定する可能性は低いと考えられる。本研究では、個々の嗅細胞は持続的な光遺伝学的な刺激に対して異なる発火応答を示すことが分かった。さらに、いくつかの電位依存性カルシウムチャネルや TRP(transient receptor potential)チャネルは一部の嗅細胞に発現している<sup>29-32</sup>。そのため、異なる OR を発現する嗅細胞では受容体の種類ごとに異なる固有の膜特性を示すことによって OR 固有の自発活動パターンが作られる可能性が考えられる。しかし、発現する OR と膜特性との関係性は未だ不明である。

### 神経活動パターン依存的な軸索選別分子の発現制御

本研究では、光遺伝学的な神経活動の操作によって発火パターン依存的な軸索選別分子の発現が示された。SVM 分類の結果から、光遺伝学的な刺激パターンは生理学的状態を模倣していることが示唆された(Figure 7F および Figure S11)。一過性の繰り返し生じるバースト発火パターンは *Kirrel2* の発現を誘導し、一方で長期の持続的なバースト発火パターンは *Sema7A* および *PCDH10* の発現を誘導することが分かった。*Kirrel2* の発現上昇度は一過性のバースト刺激のバースト中のスパイク数およびスパイク間隔に依存していた(Figure 7D, E)。また、*PCDH10* と *Sema7A* の発現はそれぞれ 20 秒、60 秒を超えるバースト持続時間の発火によって統計的に有意に発現増加が認められ(Figure 8E)、*PCDH10* と *Sema7A* とでは発火持続時間に応じて異なる感度で発現が誘導されることが示唆された。この発火パターン依存

的な発現は、嗅細胞において軸索選別分子の種類と量を別々に制御し、糸球体分離のための分子発現の組み合わせコードを作り出すことを可能としている(Figure 10)。

それでは、嗅細胞における経時的に変化する神経活動パターンはどのように多様な軸索選別分子の発現へと変換されるのだろうか。これまでの研究から、異なるカルシウム変動パターンによって活性化する転写調節因子が明らかになっている<sup>33-35</sup>。例えば、CaMKII は高頻度のカルシウム振動によって活性化し、NFAT は低頻度振動によって活性化する<sup>36</sup>。カルシウム依存性転写調節因子の異なる特性(例：感度、親和性や反応速度)は、神経活動パターンを異なる読み方の分子基盤となっていることが考えられる。

### 神経活動パターン依存的な回路形成機構

神経活動依存的な回路形成は脳の至る領域で観察される現象であるものの、これまでそれを説明するモデルとしてはヘブ則がほぼ唯一のモデルであった。発達期の視覚系では、retinal wave のような近傍のシナプス前細胞の同期発火活動<sup>37</sup>が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る。しかし、嗅覚系では嗅細胞の自発発火に細胞間の同期的な活動は観察されなかった。一方、個々の嗅細胞の神経活動の時間的な変動パターンに着目すると、発現する OR の種類に固有であった。特定の神経活動パターンが特定の軸索選別分子の発現を選択的に誘導できることを考慮すると、嗅覚系では OR によって規定された自発的な神経活動パターンが軸索選別分子の発現の組み合わせコードを作り出し、これらの分子発現によって OR の種類に依存した糸球体分離を可能としていると考えられる(Figure 10)。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』に基づいた新奇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<sup>38</sup>。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。

## 7. 参考文献

- 1 Katz, L. C. & Shatz, C. J. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* **274**, 1133-1138 (1996).
- 2 Kirkby, L. A., Sack, G. S., Firl, A. & Feller, M. B. A role for correlated spontaneous activity in the assembly of neural circuits. *Neuron* **80**, 1129-1144, doi:10.1016/j.neuron.2013.10.030 (2013).
- 3 Buck, L. & Axel, R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* **65**, 175-187 (1991).
- 4 Mombaerts, P. *et al.* Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* **87**, 675-686 (1996).
- 5 Takeuchi, H. & Sakano, H. Neural map formation in the mouse olfactory system. *Cell Mol Life Sci* **71**, 3049-3057, doi:10.1007/s00018-014-1597-0 (2014).
- 6 Takeuchi, H. *et al.* Sequential arrival and graded secretion of Sema3F by olfactory neuron axons specify map topography at the bulb. *Cell* **141**, 1056-1067, doi:10.1016/j.cell.2010.04.041 (2010).
- 7 Nakashima, A. *et al.* Agonist-independent GPCR activity regulates anterior-posterior targeting of olfactory sensory neurons. *Cell* **154**, 1314-1325, doi:10.1016/j.cell.2013.08.033 (2013).
- 8 Serizawa, S. *et al.* A neuronal identity code for the odorant receptor-specific and activity-dependent axon sorting. *Cell* **127**, 1057-1069, doi:10.1016/j.cell.2006.10.031 (2006).
- 9 Ishii, T. *et al.* Monoallelic expression of the odourant receptor gene and axonal projection of olfactory sensory neurones. *Genes to Cells* **6**, 71-78 (2001).
- 10 Yu, C. R. *et al.* Spontaneous neural activity is required for the establishment and maintenance of the olfactory sensory map. *Neuron* **42**, 553-566 (2004).
- 11 D. O. Hebb, *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory* (Wiley, 1949).
- 12 Bulfone, A. *et al.* An olfactory sensory map develops in the absence of normal projection neurons or GABAergic interneurons. *Neuron* **21**, 1273-1282 (1998).
- 13 Pasterkamp, R. J., Peschon, J. J., Spriggs, M. K. & Kolodkin, A. L. Semaphorin 7A promotes axon outgrowth through integrins and MAPKs. *Nature* **424**, 398-405, doi:10.1038/nature01790 (2003).
- 14 Williams, E. O. *et al.* Delta Protocadherin 10 is Regulated by Activity in the Mouse Main Olfactory System. *Front Neural Circuits* **5**, 9, doi:10.3389/fncir.2011.00009 (2011).
- 15 Hayashi, S. *et al.* Protocadherin-17 mediates collective axon extension by recruiting actin regulator complexes to interaxonal contacts. *Dev Cell* **30**, 673-687, doi:10.1016/j.devcel.2014.07.015 (2014).
- 16 Frey, B. J. & Dueck, D. Clustering by passing messages between data points. *Science* **315**, 972-976, doi:10.1126/science.1136800 (2007).

- 17 Kaneko-Goto, T., Yoshihara, S., Miyazaki, H. & Yoshihara, Y. BIG-2 mediates olfactory axon convergence to target glomeruli. *Neuron* **57**, 834-846, doi:10.1016/j.neuron.2008.01.023 (2008).
- 18 Brunet, L. J., Gold, G. H. & Ngai, J. General Anosmia Caused by a Targeted Disruption of the Mouse Olfactory Cyclic Nucleotide-Gated Cation Channel. *Neuron* **17**, 681-693, doi:10.1016/s0896-6273(00)80200-7 (1996).
- 19 Ihara, N., Nakashima, A., Hoshina, N., Ikegaya, Y. & Takeuchi, H. Differential expression of axon-sorting molecules in mouse olfactory sensory neurons. *Eur J Neurosci* **44**, 1998-2003, doi:10.1111/ejn.13282 (2016).
- 20 Chen, T. W. *et al.* Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* **499**, 295-300, doi:10.1038/nature12354 (2013).
- 21 Vassalli, A., Rothman, A., Feinstein, P., Zapotocky, M. & Mombaerts, P. Minigenes Impart Odorant Receptor-Specific Axon Guidance in the Olfactory Bulb. *Neuron* **35**, 681-696, doi:10.1016/s0896-6273(02)00793-6 (2002).
- 22 Madisen, L. *et al.* A toolbox of Cre-dependent optogenetic transgenic mice for light-induced activation and silencing. *Nat Neurosci* **15**, 793-802, doi:10.1038/nn.3078 (2012).
- 23 Serizawa, S. *et al.* Negative feedback regulation ensures the one receptor-one olfactory neuron rule in mouse. *Science* **302**, 2088-2094, doi:10.1126/science.1089122 (2003).
- 24 Mobley, A. S. *et al.* Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in olfactory sensory neurons regulate axon extension and glomerular formation. *J Neurosci* **30**, 16498-16508, doi:10.1523/JNEUROSCI.4225-10.2010 (2010).
- 25 Nakashima, N., Ishii, T. M., Bessho, Y., Kageyama, R. & Ohmori, H. Hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated channels regulate the spontaneous firing rate of olfactory receptor neurons and affect glomerular formation in mice. *J Physiol* **591**, 1749-1769, doi:10.1113/jphysiol.2012.247361 (2013).
- 26 Zheng, C., Feinstein, P., Bozza, T., Rodriguez, I. & Mombaerts, P. Peripheral Olfactory Projections Are Differentially Affected in Mice Deficient in a Cyclic Nucleotide-Gated Channel Subunit. *Neuron* **26**, 81-91, doi:10.1016/s0896-6273(00)81140-x (2000).
- 27 Kobilka, B. K. & Deupi, X. Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* **28**, 397-406, doi:10.1016/j.tips.2007.06.003 (2007).
- 28 Bond, R. A. & Ijzerman, A. P. Recent developments in constitutive receptor activity and inverse agonism, and their potential for GPCR drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* **27**, 92-96, doi:10.1016/j.tips.2005.12.007 (2006).
- 29 Pyrski, M. *et al.* Trpm5 expression in the olfactory epithelium. *Mol Cell Neurosci* **80**, 75-88, doi:10.1016/j.mcn.2017.02.002 (2017).
- 30 Pyrski, M. *et al.* P/Q Type Calcium Channel Cav2.1 Defines a Unique Subset of Glomeruli in the Mouse Olfactory Bulb. *Front Cell Neurosci* **12**, 295, doi:10.3389/fncel.2018.00295 (2018).

- 31 Kanageswaran, N. *et al.* Deep sequencing of the murine olfactory receptor neuron transcriptome. *PLoS One* **10**, e0113170, doi:10.1371/journal.pone.0113170 (2015).
- 32 Omura, M. & Mombaerts, P. Trpc2-expressing sensory neurons in the main olfactory epithelium of the mouse. *Cell Rep* **8**, 583-595, doi:10.1016/j.celrep.2014.06.010 (2014).
- 33 Behar, M. & Hoffmann, A. Understanding the temporal codes of intra-cellular signals. *Curr Opin Genet Dev* **20**, 684-693, doi:10.1016/j.gde.2010.09.007 (2010).
- 34 Tyssowski, K. M. *et al.* Different Neuronal Activity Patterns Induce Different Gene Expression Programs. *Neuron* **98**, 530-546 e511, doi:10.1016/j.neuron.2018.04.001 (2018).
- 35 Smedler, E. & Uhlen, P. Frequency decoding of calcium oscillations. *Biochim Biophys Acta* **1840**, 964-969, doi:10.1016/j.bbagen.2013.11.015 (2014).
- 36 Fujii, H. *et al.* Nonlinear decoding and asymmetric representation of neuronal input information by CaMKIIalpha and calcineurin. *Cell Rep* **3**, 978-987, doi:10.1016/j.celrep.2013.03.033 (2013).
- 37 Wong, R. O., Meister, M. & Shatz, C. J. Transient period of correlated bursting activity during development of the mammalian retina. *Neuron* **11**, 923-938 (1993).
- 38 Greer, P. L. & Greenberg, M. E. From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. *Neuron* **59**, 846-860, doi:10.1016/j.neuron.2008.09.002 (2008).



## 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 池谷裕二 教授に心よりお礼申し上げます。終始温かく見守り励ましていただき、感謝の念が堪えません。いつも優しく気にかけてくださり、より良い実験環境の配慮からデータ解析に関する助言まであらゆる面でサポートを頂きました。ご迷惑をおかけしてばかりでしたが、ここまで育てて頂き心から感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました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社会連携講座 特任准教授 竹内春樹先生に心よりお礼申し上げます。実験手技から研究への向き合い方、一からすべてを指導していただきました。研究室に入ってきたとき最初に聞かせていただいた研究への熱い姿勢が今でも鮮明に思い出されます。これからも先生の背中を追いかけて研究に精進してまいりたいと思います。

本研究を行うにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 助教 中嶋藍先生に心よりお礼申し上げます。実験手技から研究への向き合い方、一からすべてを指導していただきました。困難なときにもいつも気遣ってくださり、先生の存在が無ければここまで研究を続けてくることが出来なかったと思います。心から感謝致します。このご恩は必ず研究でお返し出来るように今後も精進いたします。

本研究に対する有益なご助言を賜りました東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 准教授 小山隆太先生、助教 佐々木拓哉先生に心よりお礼申し上げます。終始温かく見守っていただき励ましの言葉を頂きました。

本研究を行うにあたり遺伝子改変マウスの作製にご協力を賜りました理研 生命機能科学研究センター 生体モデル開発チーム 清成寛チームリーダー、繁田麻葉テクニカルスタッフに心よりお礼申し上げます。

本研究を行うにあたり *pGoofy-Cre* マウスや anti-I7 抗体を提供していただいた理研 BSI シナプス分子機構研究チーム シニア・チームリーダー 吉原良浩博士に心よりお礼申し上げます。

研究を行うにあたり guinea pig/rabbit anti-PCDH17 抗体を提供していただいた Harvard Medical School 研究員 星名直祐博士に心よりお礼申し上げます。

日々の研究生活を送る中で、温かいサポートをいただきました薬品作用学教室の先輩、後輩、そして同期の皆様に心よりお礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、マウスの飼育で大変お世話になりました薬学部南館動物施設職員の皆様に心よりお礼申し上げます。

最後に、研究生活を温かく見守り支えてくれた両親、兄、祖父母の家族、さらには支えてくれた友人たちに感謝の意を表し、本論文の結びとさせていただきます。