

論文の内容の要旨

神経活動パターン依存的な嗅覚神経回路の形成機構

氏 名 伊原 尚樹

【序論】

高等動物の神経回路は、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。

マウス嗅覚系においては、嗅上皮に存在する個々の嗅細胞は約 1,000 種類存在する嗅覚受容体(Olfactory receptor: OR)遺伝子の中からたった 1 種類のみを選択して発現する。また、同種の OR を発現する嗅細胞の軸索は同一の糸球体へと選別される。この軸索選別の過程においては、嗅細胞に発現する OR の種類が軸索選別分子群の発現量を制御することで OR 特異的な回路構築を可能としている。また、嗅細胞における神経活動を抑制すると軸索の収斂は乱れ、かつこれらの軸索選別分子の発現は変動することから、神経活動は OR の種類という情報を軸索選別分子の発現量へと変換し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。そこで本研究では、神経活動依存的な回路の精緻化における新奇の機構に迫った。

【結果・考察】

1. OR に由来する神経活動は軸索選別分子の多様な発現を作り出す

先行研究から OR 分子は接着性もしくは反発性の相互作用を示す軸索選別分子群の発現を制御することが分かっている。これらの分子は軸索末端である糸球体でモザイク状に発現し、個々の糸球体で固有の発現パターンを示す。その結果、OR のアイデンティティは軸索選別分子の固有の発現量の組み合わせコードとして軸索末端に表現され、OR 固有の糸球体分離のための自己を識別するタグとして働く。本研究では、軸索選別分子の中で神経活動によって正に制御される分子である Kin of IRRE-like protein 2(Kirrel2), Protocadherin-10(PCDH10)および Semaphorin-7A(Sema7A)に着目し、嗅球上の約 1,800 個の糸球体における軸索選別分子の発現レベルを調べた。その結果、PCDH10 と Sema7A の間には強い相関関係が見られた一方で、Kirrel2 と PCDH10 の

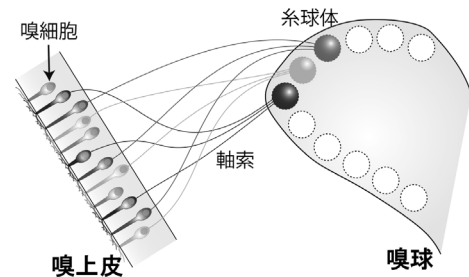


図 1. マウスの嗅覚系
個々の嗅神経細胞(嗅細胞)は、一種類の嗅覚受容体(OR)を発現し、発現した OR の種類に基づいて嗅球上の特定の糸球体へと軸索を伸長し、収斂させる。

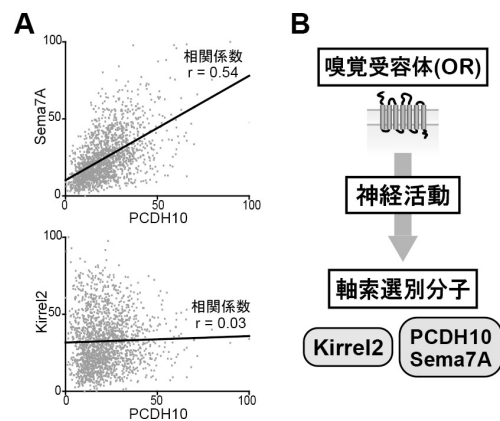


図 2. 軸索選別分子の発現解析
(A) 嗅球の約 1,800 個の糸球体における軸索選別分子の発現レベルを定量し、軸索選別分子の間の発現の相関関係を調べた。
(B) 軸索選別分子間の発現の相関関係から、嗅覚受容体(OR)に由来する神経活動は大きく分類して 2 つの異なるグループの発現制御を行っていることが示唆された。

間には相関関係が見られなかった。これらの結果から、神経活動を介して発現する軸索選別分子の中でも、PCDH10 と Sema7A には共通の発現制御機構が存在し、Kirrel2 と PCDH10 では異なる発現制御機構が存在すると想定された(図 2)。

2. 繰り返し生じる短期のバースト発火は *Kirrel2* の発現を誘導する

まず、*Kirrel2* の発現誘導に重要な神経活動中の特徴を見出すため、*Kirrel2* の発現が異なる 2 種類の嗅覚受容体 I7(*Kirrel2* 高発現)と MOR28(*Kirrel2* 低発現)に着目した。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ところ、嗅細胞では発現する OR の種類ごとに異なるカルシウム変動パターンを示し、I7 を発現する嗅細胞では、数秒単位の短期的のカルシウムスパイクが頻繁に観察された(図 3A)。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一のプロモーターを用いていることから、発現する OR の種類と神経活動パターンの単純な相関があるというだけでなく、OR が自身の種類に固有な神経活動パターンを規定しているということを意味している。

さらに、嗅細胞特異的にチャンネルロドプシン 2 を発現するマウスを用いて 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を誘導し、3 つの軸索選別分子の発現レベルを検証したところ、*Kirrel2* の発現のみが選択的に上昇した (図 3B)。また、このとき誘導する全体の発火頻度を揃えた上で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。

3. 長期の持続的なバースト発火は PCDH10/Sema7A の発現を誘導する

前述の *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ず、これらの分子の発現誘導には異なる神経活動パターンが重要であると考えられた。そこで、PCDH10 の発現量が異なる 2 種類の OR、M71 (PCDH10 高発現) および MOR28 (PCDH10 低発現) に着目し、神経活動の記録を行った。嗅覚組織スライスをを用いた 1 時間に及ぶ長期カルシウムイメージングにより、M71 を発現する嗅細胞においては 20 秒を超えた長期間の持続的なカルシウム濃度上昇を伴う特徴的なカルシウムスパイクが観察されたのに対し、MOR28 を発現する嗅細胞においてはそのようなイベントはほとんど見られないことが分かった(図 4A)。この結果を受けて、光遺伝学的手法を用いて、嗅細胞において分単位にもおよぶ長期の持続的なバースト発火を誘導したところ、PCDH10/Sema7A の発現が選択的

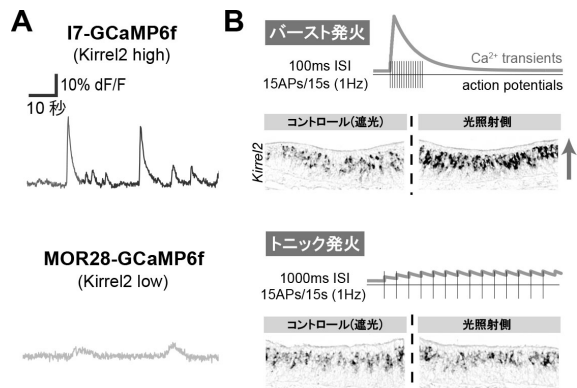


図 3. 繰り返し生じる短期のバースト発火は *Kirrel2* の発現を誘導する

(A) *Kirrel2* の発現が異なる 2 種類の嗅覚受容体を発現する嗅細胞においてカルシウムイメージングを行い、自発活動パターンを調べた。
(B) 短期バースト発火もしくはトニック発火を 12 時間誘導し、*in situ* hybridization によって嗅上皮における *Kirrel2* の発現変化を調べた。

に上昇した(図 4B)。このことから、繰り返し起こる短期のバースト発火は Kirrel2 の発現を選択的に上昇させ、長期の持続的なバースト発火活動は PCDH10/Sema7A の発現を選択的に上昇させることが示された。Kirrel2 と PCDH10/Sema7A は異なる神経活動パターンによって発現が誘導され、PCDH10/Sema7A の発現が共に持続的なバースト発火という神経活動によって誘導されるという 2 つの結果は、嗅球上での軸索選別分子の大規模な発現解析から見出された発現の関係性とよく一致していると言える。

【総括】

本研究により、①嗅細胞における自発活動パターンは発現する OR の種類によって規定されること、②特定の神経活動パターンは特定の軸索選別分子の発現を選択的に誘導することが分かった。この結果から、嗅覚系では発現する OR が固有の自発的な神経活動パターンを介して分子発現の組み合わせコードを作り出し、OR の種類に固有の糸球体分離を可能としていると考えられる。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。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。

【参考文献】

1. Nakashima, A. *, **Ihara, N.***, Shigeta, M., Kiyonari, H., Ikegaya, Y., Takeuchi, H. “Structured spike series specify gene expression patterns for olfactory circuit formation.” *Science*, 2019 Jul 5;365(6448).
2. **Ihara, N.**, Ikegaya, Y., Takeuchi, H. Quadruple-immunostaining of the olfactory bulb for visualizing molecular identity codes of olfactory sensory axons” *J Vis Exp.*, 2017 Jun 5;(124).
3. Eerdunfu*, **Ihara, N.***, BaoLigao, Ikegaya, Y., Takeuchi, H. Differential timing of neurogenesis underlies dorsal-ventral topographic projection of olfactory sensory neurons” *Neural Dev.*, 2017 Feb 13;12(1):2.
4. **Ihara, N.**, Nakashima, A., Hoshina, N., Ikegaya, Y., Takeuchi, H. Differential expression of axon-sorting molecules in mouse olfactory sensory neurons” *Eur J Neurosci.*, 2016 Aug;44(3):1998-2003.

*contributed equally

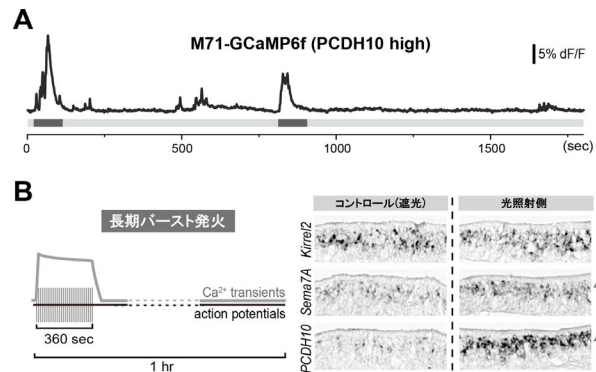


図 4. 長期の持続的なバースト発火は PCDH10/Sema7A の発現を誘導する

(A) PCDH10 の発現レベルが高い M71 を発現する嗅細胞において、長期のカルシウムイメージングを行った。
(B) 長期のバースト発火を 12 時間誘導し、*in situ* hybridization によって嗅上皮における軸索選別分子の発現変化を調べた。PCDH10 および Sema7A の発現が上昇した一方で Kirrel2 の発現に変化は見られなかった。

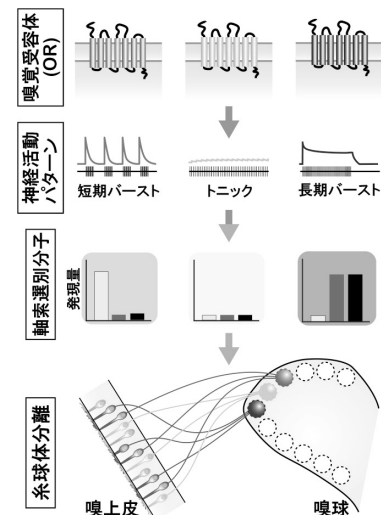


図 5. 神経活動パターンに依存した嗅覚回路形成機構

嗅覚受容体(OR)は固有の自発活動を示し、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。