

香りによる快・不快の感情が新生神経細胞の発達に与える影響の研究

奈良県立医科大学先端医学研究機構 脳神経システム医科学

吉原 誠一

Sensory input has been shown to regulate development in a variety of species and in various structures, including the retina, cortex and olfactory bulb (OB). Within the mammalian OB specifically, the development of dendrites in mitral/tufted cells is well known to be odor-evoked activity-dependent. However, little is known about the developmental role of sensory input in the other major OB population of the GABAergic interneurons, such as granule cells and periglomerular cells. Here, we identified, with DNA microarray and in situ hybridization screenings, a trophoblast glycoprotein gene, 5T4, whose expression in a specific subtype of OB interneurons is dependent on sensory input. 5T4 is a type I membrane protein, whose extracellular domain contains seven leucine-rich repeats (LRR) flanked by characteristic LRR-N- and C-flanking regions, and a cytoplasmic domain. 5T4 overexpression in the newborn OB interneurons facilitated their dendritic arborization even under the sensory input-deprived condition. By contrast, both 5T4 knockdown with RNAi and 5T4 knockout with mice resulted in a significant reduction in the dendritic arborization of 5T4⁺ granule cells. Further, we identified the amino-acid sequence in the 5T4 cytoplasmic domain that is necessary and sufficient for the sensory input-dependent dendritic shaping of specific neuronal subtypes in the OB. Thus, these results demonstrate that 5T4 glycoprotein contributes in the regulation of activity-dependent dendritic development of interneurons and the formation of functional neural circuitry in the OB.

1. 緒言

我々の脳の中では、神経細胞同士が複雑に繋がって働いている。匂い情報を処理する嗅球の介在ニューロンは、匂い刺激を受けてよく活性化される神経細胞ほど樹状突起の枝分かれを発達させ、さらに多くの神経細胞と接続して、情報伝達効率を上げている¹⁾。今回、我々の研究グループは、膜タンパク質である5T4の機能を失ったマウスの嗅球介在ニューロンでは、匂い刺激の強弱に関係なく、樹状突起の枝分かれが著しく減少することを見出した。嗅球介在ニューロンは、マウスのみならずヒトにおいても例外的に大人になっても産生され、新しい神経回路を作り続ける神経細胞である²⁾。今回の研究成果は、脳卒中などによって神経細胞が死滅した際に、神経細胞の前駆細胞を損傷部位に移植することで、神経障害を回復させるという再生医療への応用にもつながると期待される。

ほとんどの神経細胞（ニューロン）は大人になってからは新しく生まれることはないが、匂い情報を処理する嗅球の介在ニューロンは大人になっても生まれて新しい回路を作り続けていることが近年の研究から明らかになってきている（図1、2）。この大人になってから新しく作られる神経回路は外界の刺激に応じて環境に適応した回路へと再編

されることが知られているが、その分子メカニズムは分かかっていなかった。今回我々は外界の匂い刺激に応じて発現量に変化する遺伝子に着目して、新しい神経回路の再編される仕組みについて詳しく調べた。

2. 実験方法

2.1 レンチウイルスを用いた嗅球介在ニューロンへの遺伝子導入

新生仔のマウスの脳室にGFP遺伝子を搭載したレンチウイルスを感染させると、新生の嗅球介在ニューロンに効率よく遺伝子導入ができた（図3A、B）。今回の実験はこの系を用いた。

2.2 匂い刺激遮断実験

新生仔のマウスの片鼻をはんだごてを用いて閉塞した。これにより閉塞された側では匂い刺激による神経活動が遮断された（図3C）。

2.3 DNAマイクロアレイ実験

鼻を閉塞した側と開いている側の嗅球において発現の変動している遺伝子についてDNAマイクロアレイを用いて探索した。

2.4 5T4ノックアウトマウス

匂い刺激によって発現が誘導される膜タンパク質である5T4の嗅球介在ニューロンの発達における機能を解析するために英国・マンチェスター大で作成された5T4ノックアウトマウスの嗅球介在ニューロンの形態を解析した。



The development of newborn olfactory bulb interneuron regulated by the various odors.

Sei-ichi Yoshihara

Laboratory for Molecular Biology of Neural System, Advanced Medical Research Center, Nara Medical University

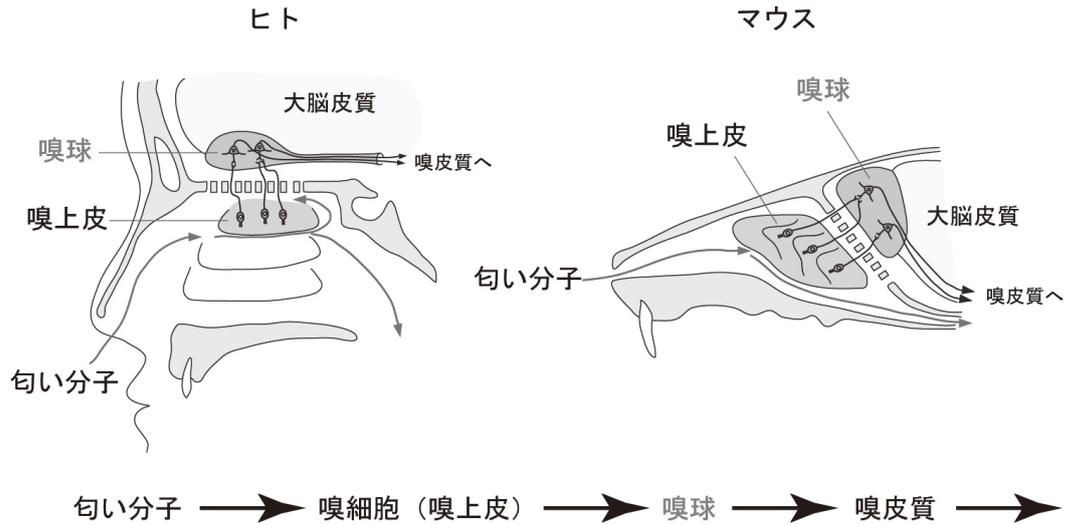


図1 匂い分子は嗅上皮に存在する嗅細胞で感知される。匂いの情報は嗅細胞から嗅球へと伝わり、嗅球で情報処理を行ってから、さらに嗅皮質という脳の奥の領域へと伝えられる。

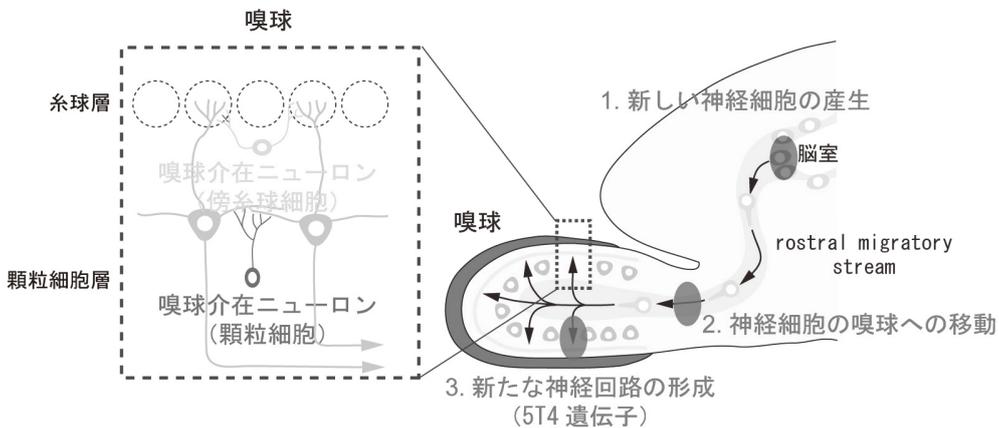


図2 嗅球介在ニューロン (傍糸球細胞・顆粒細胞) は大人になっても脳室周辺で新たに産生されて、rostral migratory stream と呼ばれる経路を移動して嗅球へと移動し、新しい嗅球神経回路を形成し続けている。

3. 結果

3.1 匂い刺激は嗅球介在ニューロンの正常な発達に必要である

鼻を閉塞した新生仔マウスの脳室にGFP遺伝子を搭載したレンチウイルスを感染させた後、3週間成育させた。嗅球介在ニューロンの形態を観察したところ、閉じた側のニューロンの樹状突起は開いている側に比べて長さが短く、樹状突起の枝分かれの数も減少していた(図3C、D)。また、スパインと呼ばれる他の神経細胞とシナプスを作って接続するどげ状の構造の数が閉じた側では開いている側に比べて減少していた。このことから嗅球介在ニューロンの正常な発達には匂い刺激による神経活動が必要であることが明らかになった。

3.2 膜タンパク質 5T4 分子の発現は匂い刺激による神経活動によって誘導される

上で述べた匂い刺激によって神経細胞の発達を制御する分子メカニズムを明らかにするために、鼻の開いた側と閉じた側の嗅球において発現の変動している遺伝子の探索をDNAマイクロアレイによって行った。その結果、c-FosやArc等のこれまでに脳などで報告されている神経活動によって発現が誘導されている遺伝子が嗅球においても変動しているという結果が得られた。さらに、ロイシンリッチリピートを持つ膜タンパク質である5T4の発現が匂い刺激による神経活動によって誘導されることがin situ hybridization及び5T4の免疫組織染色によって明らかになった(図4)³⁾。5T4分子は嗅球介在ニューロンにおいて樹状突起に教区剤していることから、匂い刺激による樹状突起の発達の制御に5T4分子が関与していることが示唆された。

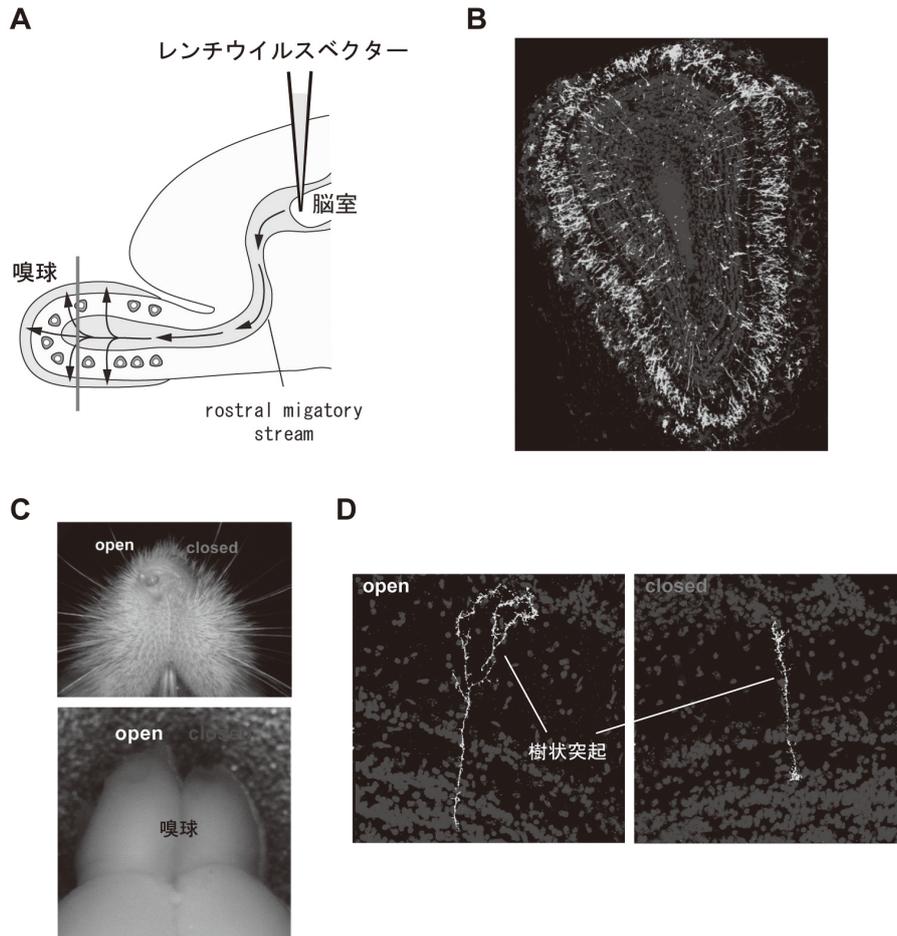


図3
 (A) GFP 遺伝子をもったレンチウイルスベクターを脳室周辺に注入することで新たに生まれた嗅球介在ニューロンが可視化できる。
 (B) GFP 遺伝子レンチウイルスベクターによって可視化された嗅球介在ニューロン。樹状突起と呼ばれる突起構造（写真では白色に見えています）が伸びている様子が観察できる。
 (C) 片鼻を閉じて匂い刺激による神経活動を低下させると嗅球が小さくなる。このことから匂い刺激による神経活動が嗅球の正常な発達に必要であることがわかる。
 (D) 片鼻を閉じた場合に新しく生まれた嗅球介在ニューロンを観察すると鼻を閉じた側の神経細胞の樹状突起は通常に比べて短くなり、枝分かれの数が減っていた。

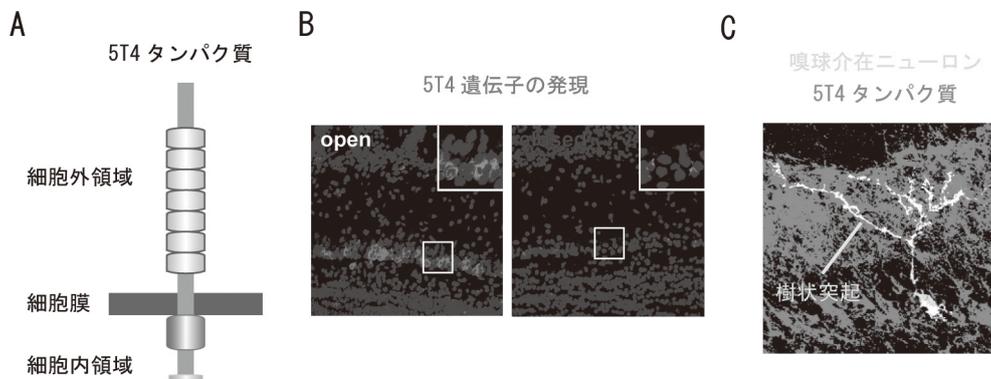


図4
 (A) 5T4 タンパク質の模式図。5T4 は細胞膜を貫通して膜表面に存在するタンパク質の一種である。
 (B) 5T4 遺伝子の嗅球における発現（写真中のシグナルが 5T4 遺伝子の発現を示します）。鼻を閉じた側では 5T4 遺伝子の発現量が減少していた。
 (C) 5T4 タンパク質は嗅球介在ニューロンにおける分布（嗅球介在ニューロンを白色、5T4 タンパク質を灰色で示す）。5T4 タンパク質は嗅球介在ニューロンの樹状突起に主に分布している。

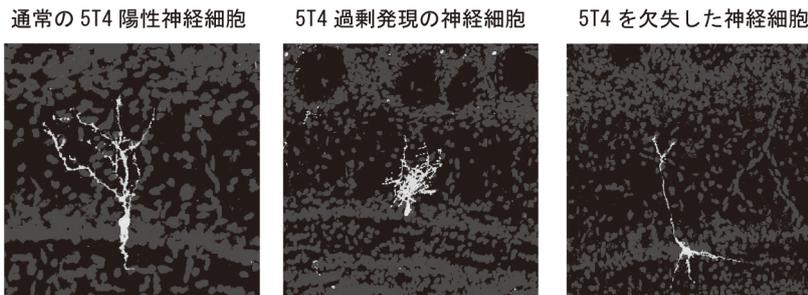


図5 5T4 を過剰に発現した神経細胞と5T4 を欠失した神経細胞の樹状突起を解析した。5T4 を過剰に発現したものでは樹状突起の枝分かれが増大し、5T4 の欠失したものでは樹状突起の枝分かれが減少していることがわかった。5T4 タンパク質の発現量に応じて嗅球介在ニューロンの樹状突起の枝分かれが制御されていることが明らかになった。

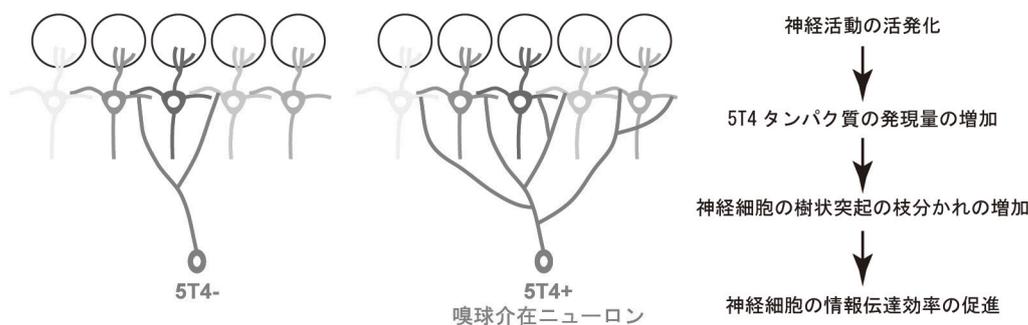


図6 今回の研究成果のまとめ
神経活動の活発な神経細胞ほど5T4 タンパク質の発現量が増加して、複雑に枝分かれした樹状突起をもつことが明らかになった。複雑に枝分かれした樹状突起によって、より多くの他の神経細胞と接続できることになり情報伝達効率が促進されると考えられる。

3.3 膜タンパク質 5T4 分子はその発現量に応じて嗅球介在ニューロンの樹状突起の枝分かれを促進する

5T4分子の嗅球介在ニューロンにおける機能を明らかにするために、レンチウイルスを用いて嗅球介在ニューロンに5T4分子を過剰に発現させる実験を行った。その結果、5T4分子を過剰に発現したニューロンでは樹状突起の枝分かれが促進されていた。5T4ノックアウトマウスの嗅球介在ニューロンを解析すると、5T4分子が存在しない場合には通常と比べて樹状突起の枝分かれが減少していた(図5)。このことから、5T4分子は匂い刺激に応じて嗅球介在ニューロンの樹状突起の枝分かれを制御する分子であることが明らかになった⁴⁾。

4. 考察

今回の研究によって5T4タンパク質の発現量に応じて神経細胞の樹状突起の枝分かれが制御される仕組みになっていることが明らかになった。樹状突起の枝分かれが複雑になると、より多くの他の神経細胞と接続できることになる。神経活動の活発化したよく働く神経細胞は5T4タンパ

ク質の発現量の上昇により、より多くの他の神経細胞と接続して情報伝達効率を上げていると考えられる(図6)。嗅球介在ニューロンは大人になっても新しく生まれるだけでなく、損傷した脳の部位へと移動して神経回路を修復する性質も持っていることが明らかになっている⁵⁾。新しく生まれた神経細胞が適切な神経回路を作る仕組みの解明が今後さらに進むことで、脳卒中などによって神経細胞が死滅した際にiPS細胞を使って作成した神経細胞を移植して神経回路の再生を行う再生医療の治療法の開発へとつながることが期待される。

今回の研究によって匂い刺激による神経活動が嗅球介在ニューロンの正常な発達に必要であることが明らかになった。しかし、匂い刺激の質(快か不快であるか)についてのニューロンの発達への影響については明らかになっていない。今後、マウスにとって快もしくは不快と感じる匂いのもとで生育させた時に、ニューロンの発達を解析する実験を行う予定である。この実験により、快か不快の感情が脳の発達に与える影響が明らかになることが期待される。

(参考文献)

- 1) Saghatelian A, Roux P, Migliore M et al, Activity-dependent adjustments of the inhibitory network in the olfactory bulb following early postnatal deprivation. *Neuron* 46:103-116, 2005.
- 2) Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T et al, Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci* 11:1153-1161, 2008.
- 3) Imamura F, Nagao H, Naritsuka H et al, A leucine-rich repeat membrane protein, 5T4, is expressed by a subtype of granule cells with dendritic arbors in specific strata of the mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol* 495:754-768, 2006.
- 4) Yoshihara SI, Takahashi H, Nishimura N et al, 5T4 Glycoprotein Regulates the Sensory Input-Dependent Development of a Specific Subtype of Newborn Interneurons in the Mouse Olfactory Bulb. *J Neurosci* 32:2217-2226, 2012.
- 5) Yamashita T, Ninomiya M, Hernandez Acosta P et al, Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci* 26:6627-36, 2006.