

14. 神経活動の時間情報をデコードする細胞内シグナル機構の解明

東京大学大学院薬学系研究科 助教 中嶋 藍

概要

神経活動は、活動電位という電気パルスを単位とするスパイク列であり、そのパターンは時間情報である。活動依存的な神経回路形成に関する研究は古くから行われているものの、経時的に変化する情報をいかにして神経細胞の個性に応じた遺伝子発現・回路形成と変換しているのかについて、これを説明する具体的な機構は明らかになっていない。本研究は、一次嗅覚系をモデルとして、神経細胞が神経活動パターンの中にどのように神経細胞の個性を表現しているのか、さらにスパイクパターンという時間情報をいかにして細胞内マシーナリーが解読しているのか、その基本原理を領域横断的な実験手法を駆使して明らかにすることを目的とした。

二光子顕微鏡と遺伝子改変マウスを用いて、発達期の嗅細胞における生体内(in vivo) 神経活動イメージング系を確立した。この系を用いて、嗅細胞全体および特定の OR を発現する嗅細胞の神経活動パターンの解析を進めた。解析の結果、近接する嗅細胞同士でも同期活動は見られず、OR 発現細胞ごとに特徴的な神経活動パターンが観察された。さらに、Hybridization Chain Reaction (HCR)によるマルチプレックス蛍光 RNA-FISH 技術を用いた解析により、これらの神経活動パターンと軸索選別分子の発現量との間に明確な相関関係が認められ、特に発火間隔の短さと発火頻度の高さが軸索選別分子の発現と強く相関することが明らかになった。これらの結果は、生理条件下で発達期の嗅細胞の神経活動を記録した世界初の研究であり、神経活動パターンの違いが遺伝子発現制御を介して嗅覚回路形成に重要な役割を果たしていることを示すものである。

背景および目的

神経回路の形成は、遺伝的プログラムによる大まかな投射領域の決定と、神経活動による精緻化の2段階を経て行われる。マウスの嗅覚系は、この神経回路形成の仕組みを研究するための優れたモデルである。嗅細胞は、ゲノム中に多数存在する嗅覚受容体(OR)遺伝子の中から一種類のみを発現し、同じ OR を発現する細胞は嗅球の同一の糸球体へと軸索を取込させる。

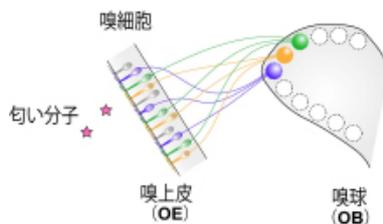


図 1. マウス一次嗅覚回路の模式図

個々の嗅細胞は、一種類の嗅覚受容体を発現し、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、取込させる。この過程は神経活動によって制御されている。

他の感覚系、例えば視覚や聴覚では、発達期特異的に感覚器内を伝播する神経活動の波が生じ、これにより隣接する細胞や投射先の細胞において一過的な発火活動が誘導される。この同期活動が機能的な感覚マップを形成する上で重要であると考えられている。一方、マウス嗅覚系においては、*ex vivo* の条件において嗅細胞に生じる神経活動パターンが発現する OR の種類に応じて異なることが示唆されている(Nakashima et al., 2019)。この神経活動パターンが軸索収斂を制御する軸索選別分子の発現量を調節することが知られている。これらの先行研究から、嗅細胞の神経活動は、正常な神経回路を形成するための情報、すなわち OR の種類という情報をコードしていると考えられる。しかし、生理条件下で発達期の嗅細胞がどのような神経活動パターンを示しているのかについては明らかにされていない。

以上の背景から、本研究では、非侵襲的に組織深部のイメージングが可能な二光子顕微鏡と遺伝子改変マウスを組み合わせて、発達期の嗅細胞における神経活動を *in vivo* 条件下で記録する系の確立を目指した。この系を用いて、嗅細胞全体の神経活動パターンや同期活動の有無を解析するとともに、特定の OR を発現する嗅細胞の神経活動パターンを記録し、軸索選別分子の発現との関連を調べることで、嗅覚回路形成における神経活動の役割を明らかにすることを目的とした。

方法

嗅細胞特異的カルシウムイメージングを行うにあたっては、Cre 組み換え酵素の発現依存的に GCaMP6f を発現する遺伝子改変マウスと成熟嗅細胞において Cre を発現する OMP-Cre マウスを掛け合わせ、生後 2 週齢前後のマウスにおいてカルシウムイメージングを行った。嗅上皮は硬い骨と血管に覆われているため、これらを丁寧に除去し、嗅上皮を露出させた。二光子顕微鏡で嗅上皮を観察し、得られたカルシウムシグナルから嗅細胞間の活動同期性や自発活動の有無を解析した。また、特定の OR 発現細胞の神経活動を記録する実験においては、CRISPR/Cas9 システムを用いて OR-Cre マウスを複数ライン作製し、RCL-GCaMP6f マウスと交配した。記録したカルシウムシグナルから、各細胞種の発火パターンを解析するとともに、Hybridization Chain Reaction (HCR) によるマルチプレックス蛍光 RNA-FISH により軸索選別分子の発現量との関連を調べた。これらの方法により、生理条件下での発達期嗅細胞の神経活動を記録し、一次嗅覚回路形成における神経活動の役割を検討した。

結果および考察

本研究では、*in vivo* 二光子カルシウムイメージングにより、発達期の嗅細胞から自発的な神経活動を記録することに成功した。まず初めに成熟嗅細胞すべてで GCaMP6f を発現する遺伝子改変マウスを用いて嗅細胞間の活動同期性を解析したところ、近傍に存在する嗅細胞同士での有意な同期活動は見られなかった。さらに、同じ OR を発現する嗅細胞同士についても同様の実験・解析を実施した場合においても同期的活動は認められなかった。これは同期的活動を回路形成に必要とする他の感覚系とは大きく異なっている。一方で、特定の OR を発現する細胞の神経活動を記録したデータについて発火間隔や発火持続時間といった時間的パターンに着目した場合、受容体の種類によって発火活動の時間的パターンは異なっており、同じ OR 発現する嗅細胞同士ではパターンが類似していた。さらに、マルチプレックス HCR の結果との対応を検証したところ、軸索選別分子の発現量は神経活動のパターンと相関があり、特に発火間隔の短さと発火頻度の高さが軸索選別分子の発現と相関することが明らかになった。

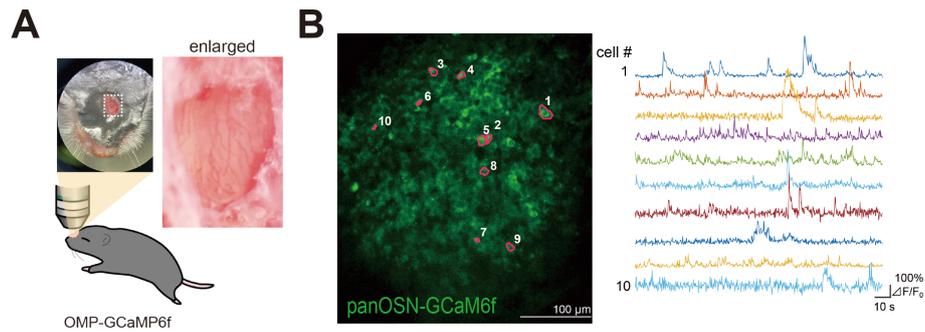


図2. 嗅細胞の in vivo イメージング

A, マウス嗅上皮における in vivo 二光子イメージング系の構築。嗅細胞で GCaMP6f を発現するマウスを用い、嗅細胞特異的なカルシウムイメージングを行った。嗅上皮を覆う骨を取り除くと拡大図のように嗅上皮を露出させることができた。B, 嗅細胞(OSN)の in vivo カルシウムイメージングによって得られたカルシウムトレース。

これらの結果から、生理的条件下においても発達期の嗅細胞は自発的な神経活動を示し、さらに嗅細胞間の同期活動は見られないことが明らかになった。このことは、嗅覚系では視覚や聴覚系とは異なる回路形成メカニズムが働いていることを示唆している。また、OR 発現細胞ごとに異なる神経活動パターンが観察され、これが軸索選別分子の発現量と相関することから、神経活動パターンの違いが遺伝子発現制御を介して嗅覚回路形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

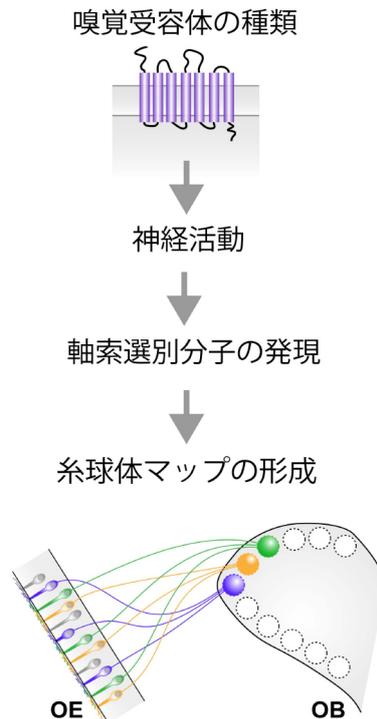


図3. モデル図

実験結果から想定される嗅神経回路形成のモデル図。カルシウムイメージングの結果より、生理的条件下においても嗅細胞は OR 特異的な神経活動パターンを示すことが明らかとなった。また、神経活動パターンと軸索選別分子の発現には相関関係が見られたことから、神経活動パターンが分子の発現制御を介して回路形成を指令していると考えられる。

今後の展望

今回の研究においては、in vivo カルシウムイメージングにより、生体内での嗅細胞の神経活動を解析し、特定の OR と既知の軸索選別分子に関連して神経活動パターンを詳細に解析したが、今後はより多くの OR、遺伝子を対象に網羅的解析を行い、神経活動パターンと軸索選別分子の発現の関係性をさらに明らかにする必要がある。また、神経活動パターンを人為的に操作することで、軸索選別分子の発現や嗅覚回路形成への影響を直接的に検証することが望まれる。特に、今回の研究で同定された発火間隔と発火頻度の重要性をさらに検証し、これらの時間的情報が細胞内シグナル伝達系においてどのように処理されるかを解明することが課題である。これらの関係性の全貌を明らかにすることで、遺伝子発現制御に関わる神経活動のコードが明らかにされると期待される。さらに、嗅細胞の自発的な神経活動の発生メカニズムや、その生理的な意義についても解明が待たれる。確立した in vivo イメージング系と HCR によるマルチプレックス蛍光 RNA-FISH 技術を組み合わせることで、上記の課題に取り組む上で有力なツールになると期待される。

(完)

発表論文

- 1) Roles of odorant receptors during olfactory glomerular map formation. Nakashima A †, Takeuchi H †. *Genesis*. 2024 Jun;62(3):e23610. doi: 10.1002/dvg.23610.
- 2) Shaping the olfactory map: cell type-specific activity patterns guide circuit formation. Nakashima A †, Takeuchi H †. *Front Neural Circuits*. 18:1409680. 2024 doi: 10.3389/fncir.2024.1409680.

引用文献

- 1) Structured spike series specify gene expression patterns for olfactory circuit formation. Ai Nakashima, Naoki Ihara, Mayo Shigeta, Hiroshi Kiyonari, Yuji Ikegaya, Haruki Takeuchi *Science* 365(6448) 2019