

<平成 22 年度助成>

食において匂いの快・不快感を誘起する 脳内神経回路の解明

坪井昭夫

(奈良県立医科大学 脳神経システム医科学)

1 はじめに

大脳皮質の視覚野や海馬の神経回路は、ニューロンがその活動に応じて樹状突起の発達やスパイン形成を行うことにより、精密化されたものに成熟する。匂い分子を受容する嗅細胞の接続先である、嗅球の介在ニューロン(顆粒細胞と傍系球細胞)は、胎生期のみならず成体期においても新生され続け、新たな神経回路を再構築している¹⁾(図1)。このことは、影山龍一郎博士(京都大)のグループにより、嗅球ニューロンによる新たな神経回路の形成は、古い神経細胞と新生された神経細胞が置き換わることに依るといふ知見から示された²⁾。また、この成体における嗅球の神経回路形成は神経活動の影響を受けることも知られている。これ

は、森憲作博士(東京大)のグループにより、片側の鼻孔を閉じて匂い刺激を遮断すると、閉じた側の嗅球では新生ニューロンの細胞死が促進されていることから示された³⁾。更に、澤本和延博士(名古屋市大)のグループにより、新生ニューロンが嗅球に移動する際、SLITを分泌しながら、周囲のアストロサイトに働きかけ、高速移動する場を創出することが明らかにされた⁴⁾。しかしながら、嗅球介在ニューロンの神経活動依存的な回路形成機構については不明な点が多い。そこで本研究では、嗅球介在ニューロンをモデルとして、レンチウイルスを用いた嗅神経活動依存的な遺伝子の機能解析を行うことにより、感覚入力依存的な神経回路の可塑性の分子機構を解明すると共に、“食における健康”というQOLの追及を目指した。

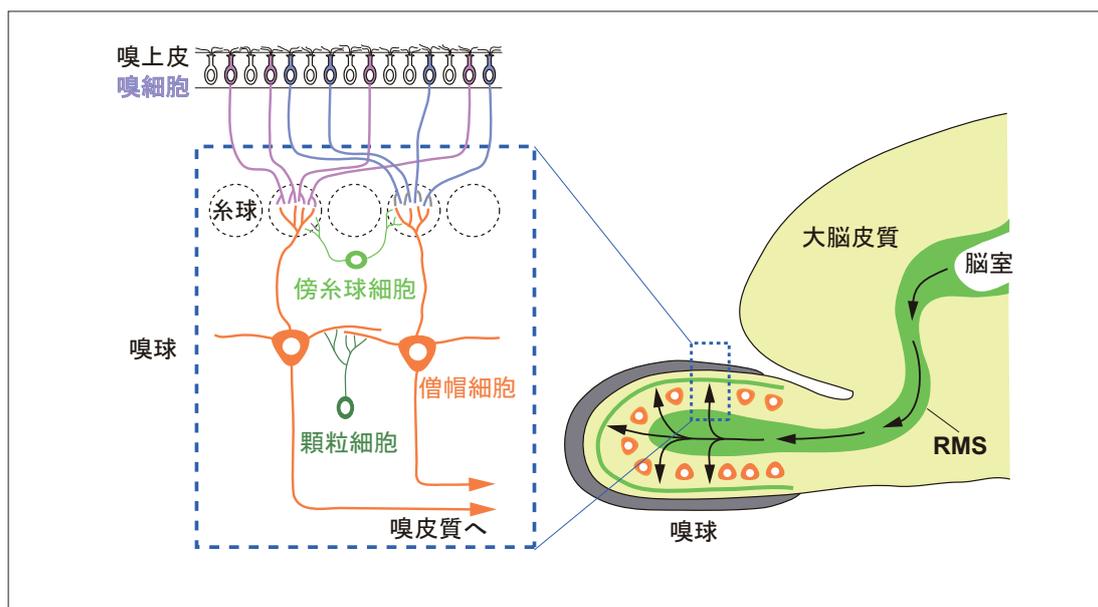


図1 マウス嗅覚神経回路の模式図

嗅球介在ニューロン(傍系球細胞・顆粒細胞)は脳室周辺で産生され、RMS(rostral migratory stream)という経路を通じて嗅球へ移動し、新たな神経回路を形成する。

2. 匂いの快・不快な環境における新生ニューロンの解析

【目的】

私共が対象にしている嗅球の介在ニューロンは、胎生期のみならず成体時においても、常に、神経新生や新たな神経回路が生じているというユニークな特徴を持っている。また生後、脳内の神経回路は、外界からの刺激に反応して適切な回路に修正されることが知られている。そこで本研究では、嗅覚系をモデルとして、快・不快な匂いの環境下における脳における新生ニューロンの動態を解析した。嗅覚系においては、特定の匂い分子は特定の神経細胞のみを活性化するので、刺激とそれに反応する神経細胞の対応が明確であり、従来の刺激 enriched な環境での実験に比べて、より精密な実験を行うことが可能である。

【方法1】

私共は、GFP遺伝子を搭載したレンチウイルスをマウス脳室に注入して、その2週間後に嗅球切片を解析した。その結果、GFP遺伝子が新生された嗅球介在ニューロンにのみ取り込まれていたため、私共は、嗅球における新生ニューロンの動態を *in vivo* で解析することに成功した⁵⁾(図2)。

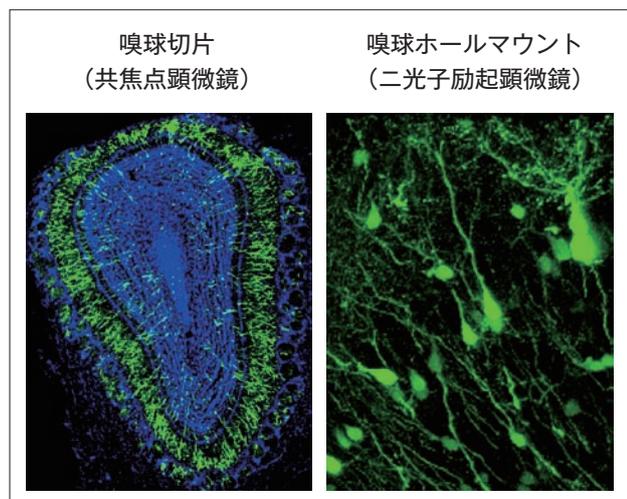


図2 GFPレンチウイルスを用いた新生嗅球介在ニューロンの可視化
GFP遺伝子を搭載したレンチウイルスを仔マウスの脳室に注入して、2週間後に嗅球切片とホールマウントを解析した。

【結果1】

このレンチウイルスの系を用いて、マウスの鼻孔を閉塞したところ、閉じた側の嗅球が縮退することが判明した⁵⁾(図3)。このことは、嗅球の介在ニューロンの産生や既存の嗅神経回路への新たな介在ニューロンの付加が、神経活動依存的であることを示唆している。

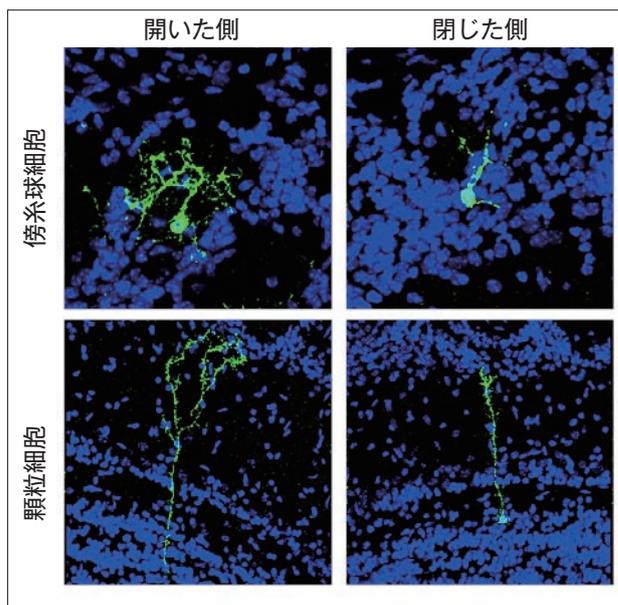


図3 嗅球介在ニューロンの発達は神経活動依存的である
GFPレンチウイルスを用いて、新生する嗅球介在ニューロンを可視化した後、片鼻を閉じて神経活動を低下させたところ、ニューロンの樹状突起の発達が抑制された。

【方法2】

次に、レンチウイルスを用いた *in vivo* でのGFP発現系を、快・不快な匂いの環境に暴露したマウスに適用して解析を行った。具体的には、快適な匂いと不快な匂いを充満させたケージ内で、GFPレンチウイルスを注入したマウスを数日間飼育した。この場合、マウスにとって快適な匂いとは、餌の匂いや好んで長時間嗅ぎに来る匂いを意味し、不快な匂いとは腐敗臭、刺激臭や猫などの天敵臭といったマウスに忌避反応を誘起する匂いを意味する。

【結果2】

クローバの香りであるオイゲノールをマウスに嗅がせたところ、それを受容するOR-EG細胞に

対する糸球の大きさが顕著に変化していないことを見出した(未発表データ)。神経細胞の発達には、NGF (nerve growth factor) や BDNF (brain-derived neurotrophic factor) などの神経成長因子や細胞骨格形成の制御因子が関与することが知られている。そこで今後、神経細胞の発達に異常が見られた場合には、これらの遺伝子発現を解析することにより、神経細胞の発達段階の、どの段階で異常をきたしたのかを明らかにする予定である。

3. 匂いの快・不快な環境において活性化される神経回路の解析

【目的】

これまでの研究により、快・不快の情動は、海馬や扁桃体などからなる大脳辺縁系によりもたらされると考えられている。この大脳辺縁系は、匂いの情報が直接入力される領域であり、快・不快な匂いの刺激により神経活動が活発に行われていると考えられる。

【方法】

私共は、匂いにより誘起される快・不快の環境下で飼育したマウスに対して以下の実験を行った。快適な匂いまたは不快な匂いを充満させたケージで飼育したマウスを解剖して、*c-fos* や *zif268* (神経活動依存的に発現が誘導される遺伝子) が、脳内のどのニューロンで発現しているのかを、免疫組織染色法を用いて解析した。この際、脳内でも特に、快・不快の情動を司る扁桃体などの大脳辺縁系に焦点を絞って解析を行った。扁桃体は多数の神経核が集まった複雑な構造を呈しているが、快・不快の条件下で扁桃体のどの領域が特異的に活性化されるのかは全く分かっていない。

【結果】

私共が、クローバの香りであるオイゲノールをマウスに嗅がせたところ、扁桃体の基底外側核(BLA)のニューロンが活性化されることが判明した(未発表データ)。このような実験を通して、

食べ物の香りによる心地良さ(癒し)を感知する脳内の活動領域を、分子・細胞レベルで解析することが可能になると考えられる。

4. おわりに

我々は、匂いの快適か不快かによって、それぞれ癒しやストレスを日常的に感じて生活している。この匂いの快・不快を感知するメカニズムを解明することは、“食における匂いの快感とは何かを科学する”上で極めて重要である。私共は、五感の中でもとりわけ、“嗅覚”に着目して研究を行っている。本研究では、マウスの嗅覚系をモデルとして、匂いの快・不快な環境のもたらす新生ニューロンの発達の影響を検討すると共に、快・不快感を誘起する脳内の神経回路を解析した。夜行性であるマウスは、視覚が未発達代わりに、嗅覚が高度に発達しており、複雑な神経回路を形成している。嗅覚は他の感覚とは異なり、匂い情報が視床下部を経由せずに直接、情動を司る扁桃体や海馬といった大脳辺縁系へと伝わる。従って、嗅覚はマウスやヒトにとって快・不快の情動と密接に係る感覚であると云える。また、マウスとヒトの脳では、その構造は大きく異なるように見えるが、神経領域の部位、並びに、異なる領域間の連結は、両者で多くの共通な部分を有することが知られている。従って、本研究において、匂いの快・不快感に関与するマウスの神経回路が解明されれば、ヒトにおいて対応する領域の神経活動を調べることにより、ヒトで匂いの快・不快感を客観的に評価することが可能となり、“食における健康”というQOLの追及にも繋がると期待される。

謝辞

本研究を遂行するに当たり、ご支援を賜りました(公財)浦上食品・食文化振興財団に厚くお礼を申し上げます。

文献

- 1) Lledo PM, Merkle FT, Alvarez-Buylla A: *Trends Neurosci.* **31**, 392-400 (2008).
- 2) Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Takao K, Miyakawa T, Yamaguchi M, Mori K, Ikeda T, Itohara S, Kageyama R: *Nat Neurosci* **11**, 1153-1161 (2008).
- 3) Yamaguchi M, Mori K: *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 9697-9702 (2005).
- 4) Kaneko N, Marin O, Koike M, Hirota Y, Uchiyama Y, Wu JY, Lu Q, Tessier-Lavigne M, Alvarez-Buylla A, Okano H, Rubenstein JL, Sawamoto K: *Neuron* **67**, 213-223 (2010).
- 5) Yoshihara S, Takahashi H, Nishimura N, Naritsuka H, Shirao T, Hirai H, Yoshihara Y, Mori K, Stern PL and Tsuboi A: *J Neurosci* **32**, 2217-2226 (2012).

成果発表

〔原著論文〕

1. Yoshihara S, Takahashi H, Nishimura N, Naritsuka H, Shirao T, Hirai H, Yoshihara Y, Mori K, Stern PL and Tsuboi A: 5T4 glycoprotein regulates the sensory-input dependent development of a specific subtype of newborn interneurons in the mouse olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience* **32**: 2217-2226 (2012).
2. Tsuboi A, Imai T, Kato H, Matsumoto H, Igarashi K, Suzuki M, Mori K and Sakano H: Two highly homologous mouse odorant receptors encoded by tandemly linked *MOR29A* and *MOR29B* genes differently respond to phenyl ethers. *European Journal of Neuroscience* **33**: 205-213 (2011).

〔和文総説〕

1. 吉原誠一、坪井昭夫
嗅球における感覚入力依存的な神経回路再編の分子機構
「AROMA RESEARCH」第13巻第3号 pp.235-239 (2012).

2. 高橋弘雄、坪井昭夫
脳における匂い感覚地図の形成メカニズム
「Foods & Food Ingredients Journal of Japan」第216巻 第2号 pp.100-106 (2011).

〔国際学会・シンポジウム〕

1. Tsuboi A, Takahashi H, Nishimura N, Kinoshita M, Mori K, Stern PL and Yoshihara S. Sensory input regulates the dendritic development of specific neuronal subtypes in the mouse olfactory bulb. **The 16th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT)**, Stockholm, Sweden (2012).

〔国際学会・一般講演〕

1. Takahashi H, Yoshihara S, Miyazaki N, Nanaura H, Hirono J, Sato T and Tsuboi A: Molecular basis of CO₂ sensing in the mouse olfactory system. **The 16th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT)**, Stockholm, Sweden (2012).
2. Yoshihara S, Takahashi H, Mori K, Stern PL and Tsuboi A: 5T4 glycoprotein regulates the sensory input-dependent

development of a specific subtype of newborn interneurons in the mouse olfactory bulb. **The 19th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (ISDN)**, Mumbai, India (2012).

3. Tsuboi A, Takahashi H, Nishimura N, Mori K, Stern PL and Yoshihara S: Sensory input regulates the development of a specific subtype of newborn interneurons via 5T4 glycoprotein in the mouse olfactory bulb. **IIAS Symposium: Frontiers in Neuroscience: From Brain to Minds**, IIAS Kyoto, Japan (2011).
4. Tsuboi A, Takahashi H, Nishimura N, Mori K, Stern PL and Yoshihara S: Sensory input regulates the development of a specific subtype of newborn interneurons via 5T4 glycoprotein in the mouse olfactory bulb. **EMBO Symposium: The Assembly and Function of Neuronal Circuits**, Ascona, Switzerland (2011).
5. Yoshihara S, Nishimura N, Takahashi H, Mori K and Tsuboi A: The dendrite arborization of olfactory bulb interneurons in an odor-evoked activity-dependent process. **Keystone Symposia: Adult Neurogenesis**, Taos, New Mexico, USA (2011).

〔国内学会・シンポジウム〕

1. Tsuboi A, Takahashi H, Yamada K, Mori K, Stern PL and Yoshihara S: Sensory input regulates the dendritic development of specific neuronal subtypes. *In: Symposium "Molecular basis of odor processing in the brain"*. **Neuroscience 2012**, Nagoya Congress Center (2012).
2. Tsuboi A, Takahashi H, Mori K and Yoshihara S: Olfactory sensory input regulates the dendrite arborization of adult-generated interneurons via transmembrane protein 5T4. *In: Symposium "Plasticity in the olfactory system - genesis, migration, circuit reorganization and function of adult olfactory bulb neurons"*. **Neuroscience 2011**, Pacifico Yokohama (2011).

〔国内学会・一般講演〕

1. 宮崎尚也、高橋弘雄、吉原誠一、坪井昭夫
嗅覚によって油を感知する機構の解明
第59回日本生化学会近畿支部例会、京都大学 宇治
おうばくプラザ (2012).
2. 吉原誠一、西村信城、高橋弘雄、木下雅仁、森憲作、Peter L Stern、坪井昭夫
Oncofetal protein 5T4 regulates the dendrite arborization of olfactory bulb interneurons in an odor-evoked activity-dependent process.
第34回日本神経科学学会大会、パシフィコ横浜 (2011).
3. 高橋弘雄、吉原誠一、七浦仁紀、坪井昭夫
Time-lapse imaging of neuronal migration in the mouse olfactory bulb.
第34回日本神経科学学会大会、パシフィコ横浜 (2011).
4. 吉原誠一、西村信城、高橋弘雄、森憲作、坪井昭夫
The dendrite arborization of olfactory bulb interneurons in an odor-evoked activity-dependent process.

-
- 第33回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド(2010).
5. 高橋弘雄、七浦仁紀、吉原誠一、今井猛、廣野順三、佐藤孝明、坪井昭夫
- Molecular basis of CO₂ sensing in the mouse olfactory system.
- 第33回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド(2010).

Characterization of the neural circuit that elicits pleasure and displeasure for odorants at meals

Akio Tsuboi

*Laboratory for Molecular Biology of Neural System
Nara Medical University*

By whether its smell is pleasant or unpleasant, we tend to feel healing and stress, respectively. When thinking scientifically about what meals are, it is quite important to understand the molecule mechanism which senses pleasure and displeasure via olfaction. Among the five senses, we are focusing on olfaction that is often ambiguous, but sometime brilliant, especially in prodding our memory. We are therefore studying the olfactory system in humans or mice to know how a specific odor exerts an influence on the development of neural circuits that elicit pleasure and displeasure.

First, by injecting a lentiviral vector carrying *CMV promoter – gapEYFP (enhanced yellow fluorescent protein)* gene into the lateral ventricle of unilaterally naris-occluded mice, we found that the sensory input is required for the dendritic elongation and branching in the olfactory bulb (OB) interneurons. Then, we performed immunohistochemistry with c-fos, whose expression is dependent on neural activity, for the mouse OB just after exposing Eugenol, a component of clove flavor. We detected the significant increase of c-fos signals in OB interneurons around glomeruli for Eugenol receptor (OR-EG), although the size of OR-EG glomeruli was almost the same as that from the unexposed mouse OB. After exposing Eugenol, we further examined the c-fos signals for the higher brain region, e.g. a limbic system, the amygdala and hippocampus, which manage emotions directly without passing the hypothalamus. Preliminary data suggest that Eugenol may activate neurons in the basolateral amygdala nucleus (BLA). Future studies about the mouse should result in identification of neural circuits that are activated by pleasant and unpleasant odorants, leading also to revealing how humans feel excellence and displeasure at meals via olfaction, because such neural circuits seem to be conserved between mice and humans.

This work was supported by Research Grant from Urakami Foundation, Tokyo, Japan.