

<平成 25 年度助成>

味覚認識時における嗅覚の役割

西住 裕文・齊藤 治美・坂野 仁
(福井大学 医学部高次脳機能)

緒言

ヒトにとって食嗜好への欲求は本能的なものであり、生命維持に必要な養分摂取のみならず、幸福感を生み人生をより豊かにするために重要な役割を担っている。これまでの研究から、摂食時、食物の味は舌上の味蕾細胞で発現する味覚受容体を介して知覚され、甘味、酸味、塩味、苦味、旨味として認識されることが明らかとなっている¹⁾。しかし舌を介した味覚知覚は非常に曖昧で、目を塞いで視覚を遮断したり、風邪で鼻が詰まり嗅覚が働かない場合には、料理の味が十分味わえないことを我々は実体験として知っている。このように味覚は、視覚や嗅覚など他の感覚から多大な影響を受ける。そこで本研究では、食の嗜好に対し嗅覚情報がどのような影響を及ぼすかについて理解するために、マウスの嗅覚系からアプローチを試みた。

大きな目標の一つは、味覚・嗅覚両方の感覚から、マウスにとって相反する“快(好き)の情報”と“不快(嫌い)の情報”を同時に与えた場合に、脳内のどこで両感覚情報がぶつかった後に統合され、情動判断や意思決定を行うに至るかを理解することである。例えば、天敵臭はマウスにとって非常に強いストレスを与え、忌避ならびに恐怖反応を引き起こす。しかし我々が行った予備実験では、空腹時のマウスは食欲が勝り、天敵臭がする餌であっても接近して食べようとする。このような意思決定が脳内のどこで生じるかを、将来明らかにしたいと考えている。しかし現在は、ようやく嗅覚一次神経回路形成の分子基盤が明らかになった段階であり、嗅球以降の二次神経回路にどのような原理が存在するのか全く分

かっていない。そこで本研究では先天的本能回路に着目し、天敵臭がどのような神経回路を介してマウスに忌避や恐怖行動を誘起するのかについて解析を行った。

方法および結果

これまでのマウスを用いた嗅覚研究により、個々の嗅神経細胞の発現する嗅覚受容体(OR)は1,000種類の遺伝子ファミリーの中から1種類に限られ、同じ種類のORを発現する軸索は互いに収斂し、嗅球上の特定の位置に糸球体構造をつくって投射することが知られている^{2,3)}。従ってマウスの嗅球表面には、ORの種類に対応して約1,000個の糸球体を素子とするデジタルマップが形成され、糸球体の発火パターンとして二次元展開された匂い地図を脳の中枢が識別することによって、情動や行動の判断が行われていると考えられている。当グループでは以前、マウスにとって天敵の一つであるキツネが分泌する物質(TMT)をマウスに嗅がせると、嗅球上の複数の糸球体が活性化し、背側の本能回路を介して忌避や恐怖行動が誘引され、腹側の学習回路を介して学習判断することを報告した⁴⁾(図1)。そこでまず本能回路を特定することを念頭に、TMTを受容し、嗅球背側に位置する糸球体のORを単離することを試みた。具体的には、イメージングと神経細胞のラベリングを組み合わせる方法をとった。まず麻酔下にあるマウスにTMTを嗅がせ、発火する糸球にDiIを注入した。これにより、発火した糸球に投射する嗅神経細胞が蛍光標識される。続いて嗅上皮組織を摘出して、トリプシンによって細胞分離させ、顕微鏡

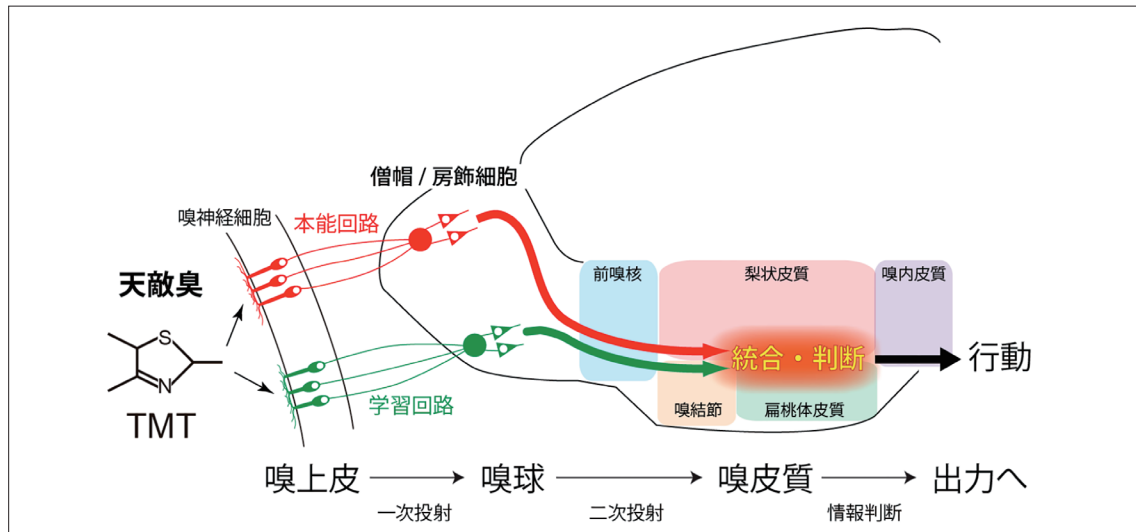


図1 マウス嗅覚系における天敵臭TMTの情報を処理する二種類の神経回路
一つは本能判断のための回路（赤色の経路）で嗅上皮の背側で、もう一つは学習判断のための回路（緑色の経路）で嗅上皮の腹側の神経細胞で受容される。

下で蛍光標識された嗅神経細胞を単離した。この単離した細胞からRNAを抽出し、逆転写反応によりcDNAを回収した。OR遺伝子に対する縮重プライマーによるPCRを行うことにより、単離された嗅神経細胞で発現するOR遺伝子を同定した。同定されたOR分子が実際にTMTに応答するかは、既に確立されているheterologousな再構成系を用いた。即ち、HEK293細胞株にOR遺伝子を発現させ、TMTの添加により細胞が活性化するかどうかをルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイにより検定した。その結果、TMTに反応するORを複数単離することに成功した。その中でTMTに対して特異性が高く、親和性が最も高かったものをOR^{TMT}と命名し、以降の実験に用いた。

OR^{TMT}の生理的な機能を解析するため、loss-of-functionの実験としてOR^{TMT}を欠失させたノックアウト（knockout: KO）マウスと、gain-of-functionの実験としてOR^{TMT}にチャネルロドプシンを繋いだノックイン（knockin: KI）マウスをそれぞれ樹立した（図2）。KIマウスでは、蛍光標識されたOR^{TMT}の糸球体が嗅球背側後方に位置することが分かった。また光学イメージングを行うことによって、OR^{TMT}の糸球体がTMTを嗅がせた時に活性化する複数の糸球体の一つであることが確認された。一方KOマウスでは、選択したがOR^{TMT}欠損し、新たに

別のORを選び直しているため、蛍光標識された嗅神経細胞の軸索が複数の糸球体に紛れ込んでいる様子が観察された。

我々はまず、光照射によって活性化された糸球体に接続する二次神経細胞が、匂い分子で刺激された

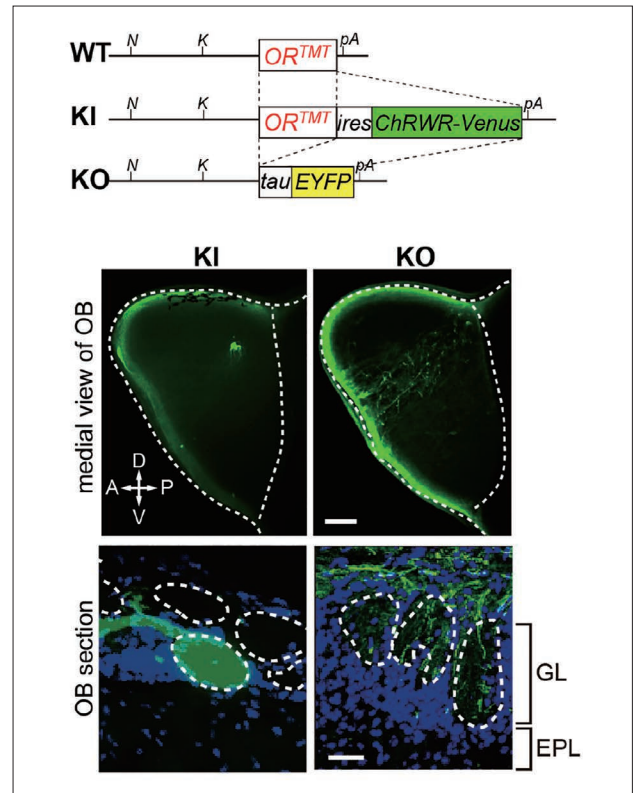


図2 OR^{TMT}KIマウスおよびKOマウスの樹立
KIマウスでは、蛍光標識されたOR^{TMT}の糸球体が嗅球背側後方に観察された。KOマウスでは、蛍光標識された嗅神経細胞の軸索は複数の糸球体に紛れ込んでいた。

時と同様に活動するかどうかを電気生理学的に解析した。その結果、光量が弱いと房飾細胞だけが活性化し、光量が十分に強いと房飾細胞と共に僧房細胞も活性化され、高次中枢へ電気信号が伝達されることを確認できた。この結果は、TMT の濃度に依存して房飾細胞および僧房細胞がそれぞれ発火する様式と同様であった。

次に我々は、immediate early gene の一つである *Egr1* の発現を指標として、TMT を嗅いだ時と同様に、光照射した KI マウスでも嗅皮質の各領野が活性化されるかを網羅的に解析した。その結果、活性化される嗅皮質細胞の数はおしなべて減少するが、恐怖行動を誘引する領野として報告されている BNST や CoA などは、光照射で顕著に活性化されることを見出した。

光照射によって、匂いを嗅がせた時と同様に電気信号が嗅球から嗅皮質へと伝達されることが確認されたので、我々は光刺激後のマウスの行動について解析を行った。KO マウスに TMT を嗅がせた場合、野生型より反応性はやや落ちるが、やはり忌避ならびに恐怖行動を示した。これは他の TMT 応答性 OR が残存するので、TMT の天敵臭としての情報を補完的に伝えているものと予想された。次に、KI マ

ウスの頭部に光ファイバーを挿入し、光照射を行って OR^{TMT} の糸球体のみを活性化した。その結果、KI マウスは体の動きを停止してすくむ行動 (freezing) を示すことが判明した (図 3)。勿論この光刺激によりすくみ行動が誘引される現象は、野生型マウスや、頭部をアルミホイルで遮蔽して光が当たらないようにした KI マウスでは認められなかった。以上の結果は、高等動物の主嗅覚系において、単一糸球体の光刺激によって本能行動を誘導した最初の例である。

考察・展望

本研究で得られた成果は、単一糸球体の光刺激により、天敵臭に対する恐怖反応の gain-of-function を神経回路レベルで再現した画期的なものである。今後 OR^{TMT} の糸球体から順を追って神経回路をトレースすることによって、匂い情報がすくみ行動を引き起すまでの本能回路の全容が明らかになると期待される。しかし実験を行っていて一つ不思議だったのは、KI マウスに光照射すると、忌避反応を示すことなくいきなり freezing を示した点である。天敵臭 TMT を嗅がせた時、一般にマウスはまず匂い源から逃避し、逃げ切れないと判断した後にすくんで

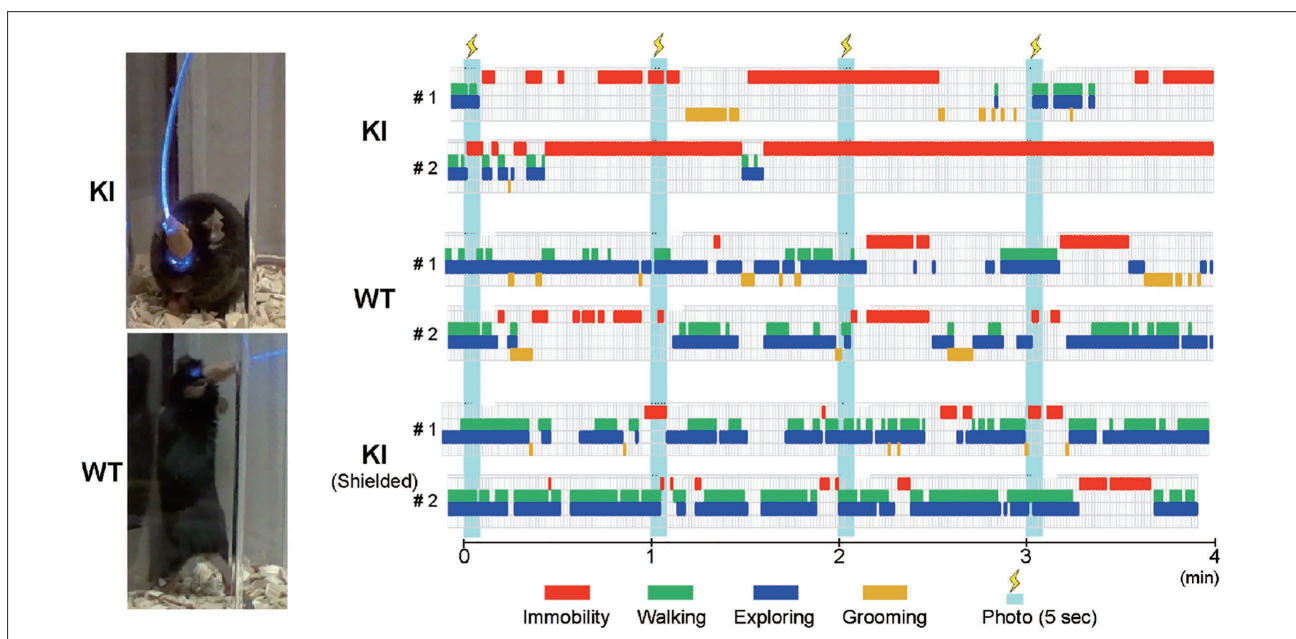


図3 光照射により KI マウスと野生型 (WT) マウスが示す行動

各マウスの頭部に光ファイバーを挿入し、1分ごとに5秒間光照射して、発現しているチャンネルロドプシンを活性化した時にマウスが示す行動を解析した。KI マウスは光照射によって顕著にすくみ行動を示したが、WT マウスや頭部をアルミホイルで覆って光照射を遮った KI マウスは、歩いたり散策行動をしたり、毛づくろいを行い、特に変わった行動は示さなかった。

死んだふり (freezing) を示すからである。これについては、嗅球背側後方にある OR^{TMT} 以外の TMT 応答性 OR の糸球体を介して、忌避反応は別ルートで情報処理されていると予想される。現在、TMT 応答性 OR として同定した OR^{TMT} 以外の OR に対しても、同様の gain-of-function の実験を行って検証中である。

本研究の期間内では手が回らず実施できなかったが、味覚情報が、OR^{TMT} の糸球体から始まる先天的本能回路とどの領域で出合うのか、また、もし味覚情報と嗅覚情報が相反するとすれば、両情報が高次中枢のどこで統合され意思決定が行われるかを明らかにする研究に今後は挑戦したい。天敵臭を提示した場合でも、空腹時にはマウスはその空間にある餌に敢えて近づくことが予備実験で明らかになっている。そこで、対立する2つの先天的判断が同時に誘起された場合、脳内でどう情報が balancing されるのかを調べるため、イメージングや組織免疫学的手法を用いて、嗅球および嗅皮質上で活性化される領域を同定していく。こうした一連の研究から得られるであろう知見は、食嗜好が味覚や嗅覚情報処理を介し、脳のどの領域で生まれているかを解明するのみならず、将来的にはヒトの心の葛藤や意識の理解にも役立つものと期待される。

謝 辞

上述の研究成果は、文献 5) にて報告することができました。本研究を遂行するにあたり、ご支援を頂いた公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼を申し上げます。

参考文献

- 1) D.A. Yarmolinsky, C.S. Zuker, and N.J. Ryba, Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell* 139, 234-244 (2009).
- 2) K. Mori and H. Sakano, How is the olfactory map formed and interpreted in the mammalian brain? *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 467-499 (2011).
- 3) H. Nishizumi and H. Sakano, Developmental regulation of neural map formation in the mouse olfactory system. *Dev. Neurobiol.* 75, 594-607 (2015).
- 4) K. Kobayakawa et al., Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb. *Nature* 450, 503-508 (2007).
- 5) H. Saito, H. Nishizumi et al., Immobility responses are induced by photoactivation of single glomerular species responsive to fox odour TMT. *Nat. Commun.* 8, 16011 (2017).

Photo-activation of a single glomerulus for the fox odorant TMT is sufficient to induce immobility responses in mice

Hirofumi Nishizumi, Harumi Saito, Hitoshi Sakano

Department of Brain Function, School of Medical Sciences, University of Fukui

Abstract

Fox odor trimethyl-thiazoline (TMT) is known to activate multiple glomeruli and elicits strong fear responses. However, it was unclear whether individual glomeruli are functionally specialized to instruct particular responses, or if a pattern of activated glomeruli as a whole can be recognized to elicit behavioral decisions. In this study, we generated knockin (KI) and knockout (KO) mice for OR^{TMT}, a TMT-responsive odorant receptor (OR) with high ligand affinity and selectivity. We found that photo-stimulation of a single glomerular module for OR^{TMT} activated the TMT-responsive cortical regions, leading to the induction of immobility, but not aversive behavior. In the KO mice of OR^{TMT}, immobility responses were reduced, but not entirely abolished, most likely due to the compensatory functions of other TMT-responsive glomeruli. These results demonstrate that the activation of a single OR^{TMT} glomerulus in the posterior part of the dorsal OB is sufficient to elicit immobility responses in mice, and show that TMT-induced fear can be separated into at least two different components: immobility and avoidance.

This work was supported by Research Grant from Urakami Foundation.