

“塩の匂い”を受容するゼブラフィッシュ嗅覚神経回路とその生理的意義の解明

小出 哲也

理化学研究所脳科学総合研究センター

概要 私たち哺乳類は低濃度の塩を快い味、また、高濃度の塩を不快な味として脳に伝達することにより塩の摂取を調節している。水中に棲息する魚類にとっても塩類の調節は極めて重要である。硬骨魚の体液はNaCl換算で約150 mMであるのに対し、海水はNaCl換算で約450 mMであり、約3倍もイオン濃度が高い。海水魚は常に脱水の危機にさらされ、一方の淡水魚は逆に水の体内への流入とイオンの流失という避けられない問題を抱えている。そのため魚類はエラにイオン輸送に特化した塩類細胞を持ち、その浸透圧調節を行っていることが報告されている。しかしながら、エラのみが環境中の塩を主にモニターしているのかは不明である。

我々は、熱帯魚であるゼブラフィッシュをモデル動物として、本能的な好きな匂い・嫌いな匂いを司る神経回路の解明に取り組んできた。本研究では、塩を検出する感覚として、嗅覚神経系の役割を明らかにすることを目的とし研究を行った。まず、匂いによって活性化される領域を可視化するシステムの確立を目指し、遺伝学的カルシウムインディケーターGCaMPを嗅細胞に発現するトランスジェニック系統を作製した。このGCaMP発現トランスジェニック系統を用いて、「塩」と様々な匂いで活性化される嗅覚神経経路の違いを調べ、塩に強く応答する嗅球の糸球体を同定した。

この糸球体の機能を解析することにより、ゼブラフィッシュの「塩」受容の嗅覚神経回路メカニズムの全貌が明らかになることが期待される。

1. 研究目的

1.1 研究の背景

魚類にとって、体液中の塩類調節は極めて重要である。硬骨魚の体液はNaCl換算で約150 mMであるのに対し、海水はNaCl換算で約450 mMであり、約3倍もイオン濃度が高い。従って、海水魚は常に脱水の危機にさらされ、一方の淡水魚は逆に水の体内への流入とイオンの流失がおこる。そのため魚類はエラにイオン輸送に特化した塩類細胞を持ち、その浸透圧調節を行っていることが報告されている。このエラ塩類細胞は塩濃度の長期・慢性変化に応答するものの、環境中の塩濃度の違いを素早く感知する感覚システムについては不明である。

嗅覚神経系は、環境中の化学物質を検出し、素早い本能的な行動を生み出す。例えば、食物に含まれるアミノ酸は、魚に誘引行動を引き起こす⁽¹⁾。一方、傷ついた皮膚に含まれるアラームフェロモンは、瞬時に二層性のアラ-

ム反応(激しく水槽を泳ぎまわった後にすくみ(フリージング)反応を示す)を引き起こす。したがって、嗅覚神経系は、環境中の化学物質の変化を感知し本能的な行動を制御するといえる。しかしながら、魚類の匂い物質として嗅覚神経系を活性化することが同定されたものは、アミノ酸等の一部の化学物質であり、それ以外の物質は、匂いとして働いているのか、どのような細胞で受容されるのか、また脳のどの領域を活性化するのか、そしてその機能的意義についてほとんど分かっていない。したがって、「塩」が魚にとって匂い物質として機能するのかについても不明である。

1.2 研究の目的

本研究課題では、遺伝学的解析が可能なゼブラフィッシュをモデルとして「塩」が匂いとして嗅覚神経系で受容されるのか、その受容機構の解明を目指した。

嗅覚情報は、①嗅細胞→②嗅球(糸球体船…>僧帽細胞)→③高次嗅覚中枢と情報が伝えられ最終的に行動が

引き起こされると考えられる。この情報伝達のなかでもまず嗅覚の一次中枢である嗅球に注目した。匂いの情報は、嗅球上に類似した化学物質の構造に対応した「匂い地図」として提示される。さらに近年の解析で、「匂い地図」の情報は、特定の本能行動の発現に結びついていることが分かってきた。そこで改良型 GCaMP を嗅細胞に発現するトランスジェニック系統を用いて、カルシウムイメージングを行い、「塩」の匂い地図を明らかにすることを目指した。

さらに、塩によって活性化される嗅細胞ならびに発現する嗅覚受容体の同定を目指した。ゼブラフィッシュ嗅上皮には、形態学的に主に 3 種類(繊毛嗅細胞, 微絨毛嗅細胞, クリプト嗅細胞)の嗅細胞が存在し, 4 種類の嗅覚受容体が発現することが知られている。ゼブラフィッシュゲノム上には 140 個の OR 型嗅覚受容体, 6 個の V1R 型嗅覚受容体, 50 個の V2R 型嗅覚受容体, 108 個の TAAR 型嗅覚受容体が報告されている⁽³⁾。そこで、これら嗅覚受容体遺伝子の中から、塩によって活性化される嗅細胞ならびに発現する嗅覚受容体の同定を目指した。これらの解析を通じて、「塩」の匂いを伝える神経回路の解明を目指した。

2. 研究方法

2.1 ゼブラフィッシュの飼育維持

野生型ゼブラフィッシュとして理研で確立された RIKEN-WAKO 系統を用いた。28°C, 明暗周期 14 時間-明/10 時間-暗で飼育した。

2.2 UAS:GCaMP7 トランスジェニックゼブラフィッシュの作成

pT2UAS:GCaMP7 プラスミドを作成するため、改善された新しい G-CaMP である GCaMP7⁽²⁾をコードする cDNA を pT2MUASMC5 ベクターに挿入した。1細胞期のゼブラフィッシュ受精卵に 25 ng/μl pT2UAS:GCaMP7 と 25 ng/μl Tol2 transposase mRNA を顕微注入した。プラスミドを注入した卵由来の成魚を 3 種類のトランスジェニックフィッシュ OMP:Gal4FF トランスジェニックフィッシュ⁽¹⁾と掛け合わせを行い、次世代で嗅細胞に GCaMP が発現する魚をスクリーニングした。F1 世代のもっとも GCaMP の蛍光が明るい魚を UAS:GCaMP7 トランスジェニック系統として樹立し、OMP:Gal4FF;UAS:GCaMP7 ダブルトランスジェニック系統として維持した。さらに異なる嗅細胞のサブセットに

Gal4 を発現する SAGFF179A, SAGFF27A 系統と UAS:CaMP7 を掛け合わせたダブルトランスジェニック系統⁽¹⁾も合わせて作成した。

2.3 カルシウムイメージングのための匂い物質

匂い物質としては、濃度 10^{-5}M - 10^{-3}M で以下の物質を用いた。NaCl, アミノ酸 (Ala, Cys, His, Lys, Met, Phe, Trp, Val), 胆汁酸 (taurocholic acid, taurodeoxycholic acid, glycocholic acid), アミン (pentylamine, histamine, methylpentylamine, cadaverine, adrenaline, trimethylamine, 2-phenylethylamine)。

2.4 GCaMP カルシウムイメージング

GCaMP カルシウムイメージングは、成魚の脳(生後 5-9 ヶ月), 稚魚の脳(生後 5 日目)を用いた。成魚の脳の場合、鼻が繋がった状態で脳を取り出し、人口脳脊髄液 (artificial cerebrospinal fluid: ACSF) 中で器官培養した⁽⁴⁾ (図 1)。OMP:Gal4FF; UAS:GCaMP7, SAGFF179A; UAS: GCaMP7, SAGFF27A; UAS: CaMP7 ダブルトランスジェニックフィッシュから鼻—脳試料を取り出し、骨を除いた状態で正立顕微鏡下の還流チャンバー内にマウントし ACSF (~3 ml/min) で還流した。稚魚は神経系全体に GCaMP を発現する Huc:Gal4FF;UAS:GCaMP5⁽⁵⁾を用いた。匂い物質は、還流中の ACSF の流れに HPLC injection valve (V-451 injection valve, Chrom Tech Inc.)を用いて投与した。嗅覚順応を防ぐために、刺激は最低 3 分間の間隔を空けた。G-CaMP の蛍光は 10 倍の水浸レンズ (NA, 0.30, Olympus)を用いた。連続した蛍光イメージの取り込みには、顕微鏡に設置した M-CCD camera (iXon+, Andor Technology)によって 2-3 Hz 512 x 512 pixels の条件で取り込んだ。イメージデータは、Metamorph software (Molecular Devices) で解析を行った。

2.5 水槽内のゼブラフィッシュへの匂い物質への暴露

600 ml の飼育水が入ったタンクに生後 5-9 ヶ月のゼブラフィッシュを入れ、水槽に順化した後 600 μl of の匂い物質 (NaCl, 10^{-2}M -5M; アミノ酸 Ala, Cys, His, Lys, Met, Phe, Trp, Val, 10^{-2}M それぞれ単独もしくは混合溶液; 胆汁酸 taurocholic acid, taurodeoxycholic acid, glycocholic acid, 10^{-5}M ; アミン溶液 pentylamine, histamine, methylpentylamine, cadaverine, adrenaline, trimethylamine, 2-phenylethylamine, 10^{-5}M) を加え、魚を 30 分間、匂いに

暴露した。

2. 6 In situ hybridization 法

嗅覚受容体遺伝子コーディング領域を PCR 法によってゼブラフィッシュゲノム DNA から増幅し、*pGEM-T Easy* vector (Promega) に組み込んだ。アンチセンス cRNA プロローブを T7 or SP6 polymerases (Promega) と digoxigenin-labeled UTP (Roche) を用いて合成した。神経活動を検出する *c-fos* probe は、コーディング領域の 1.3 kb を PCR 法によってゼブラフィッシュゲノム DNA から増幅し、*pGEM-T Easy* vector に組み込んだ。アンチセンス cRNA は上記と同様の方法で作製した。

単離した嗅上皮は、4% PFA/PBS で一晩固定し、30% スクロースに置換した。嗅上皮の切片 (10 μ m) を digoxigenin 標識の嗅覚受容体と fluorescein 標識の *c-fos* プロローブを 60°C でハイブリダイゼーションを行った。HNPP/Fast Red 基質 (Fluorescent 検出キット, Roche) の反応の後、Digoxigenin は alkaline phosphatase 標識の抗 digoxigenin 抗体 (1:500, Roche) を用いて検出した。

3. 研究結果

3. 1 カルシウムイメージングによる嗅球の匂い地図

ゼブラフィッシュの嗅球はおよそ 140 個の糸球体が存在し、大きくいくつかの糸球体クラスターに分類される (図1)。これまでの様々な匂い物質を用いた GCaMP 発現トランス

ジェニックゼブラフィッシュによるカルシウムイメージングの結果、各嗅球糸球体クラスターは、類似の化学構造を持つ化学物質によって活性化することが明らかになってきた。例えば、アミノ酸類は、糸球体の側面全体に広がる外側糸球体 (lateral glomeruli : IG) クラスターを特異的に活性化する。胆汁酸は、背側に位置する背側糸球体 (dorsal glomeruli : dG) クラスターを、アミン類は背側外側に位置する背外側糸球体 (dorsolateral glomeruli : dlG) クラスターを活性化する。また、ゼブラフィッシュの性行動に必須なフェロモンであるプロスタグランジン F2 α は、腹内側糸球体 (ventromedial glomeruli : vmG) を特異的に活性化する。

3. 2 カルシウムイメージングによる塩の匂い地図

我々は、上記の様々な匂い物質によって活性化される嗅球糸球体の探索過程で、背側の最も後部に位置する内背側糸球体 (mediodorsal glomeruli : mdG) クラスターがアミノ酸、胆汁酸、アミンといった通常の匂いとは異なるクラスの匂い物質に応答することを見出した。この糸球体クラスターは、二酸化炭素、酸、アンモニア、そして「塩」濃度の変化に応答することを見出した。mdG は合計 6 個の糸球体から構成され、二酸化炭素、酸、アンモニアは mdG2、塩は mdG3 を特異的に活性化することが分かった。

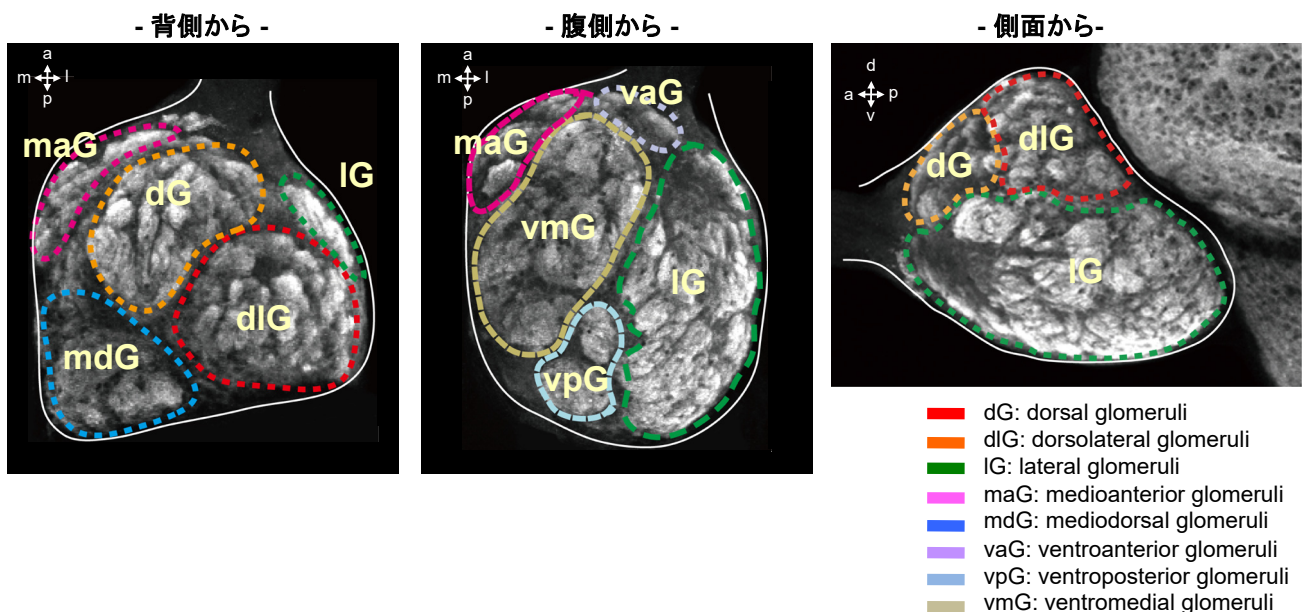


図1. 嗅球糸球体クラスター

3. 3 c-fos の発現を指標とした「塩」応答嗅細胞の同定

塩刺激 30 分後のゼブラフィッシュ嗅上皮切片を用いた c-fos の発現を指標にして、「塩」応答嗅細胞の同定を試みた。その結果、嗅上皮の中央部位の表層に位置する嗅細胞が c-fos 陽性であった。c-fos 陽性嗅細胞には繊毛嗅細胞に特徴的な長い dendrite がないことから、微繊毛嗅細胞だと考えられる。

3. 4 「塩」応答嗅細胞における受容体の探索

現在、塩刺激 30 分後のゼブラフィッシュ嗅上皮切片を用いて、c-fos と嗅覚受容体プローブのダブル in situ hybridization 実験を進めている。まだ、c-fos と共発現する受容体遺伝子、すなわち塩受容体遺伝子を同定することはできていない。引き続きスクリーニングを継続する予定でいる。

4. 考 察

本研究によって、ゼブラフィッシュは「塩」を匂い物質として受容することが分かった。この受容細胞は嗅上皮の中央に位置する比較的少数の微繊毛嗅細胞であること、嗅球において mdG3 糸球体を活性化することが分かった。この mdG 糸球体クラスターは二酸化炭素、アンモニアといったガスや、酸、そして塩に応答することから、糸球体クラスターの中でもユニークな糸球体であり、何らかの本能的行動に関与することが推察される。実際、我々はゼブラフィッシュ稚魚を用いた行動アッセイにおいて、二酸化炭素が稚魚に回避行動を引き起こすことを見出している。今後、「塩」によって引き起こされる行動を明らかにしていく予定である。また、鼻に発現する「塩」受容体を同定し、近年確

立されたゲノム編集技術 CRISPR を用いて塩受容体遺伝子欠損トランスジェニックゼブラフィッシュを作成することにより、その機能的意義に迫りたいと考えている。

5. 引用文献

- 1) Koide T, Miyasaka N, Morimoto K, Asakawa K, Urasaki A, Kawakami K, Yoshihara Y. (2009) Olfactory Neural Circuitry for Attraction to Amino Acids Revealed by Transposon-Mediated Gene Trap Approach in Zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 9884-9889
- 2) Ohkura M, Sasaki T, Sadakari J, Gengyo-Ando K, Kagawa-Nagamura Y, Kobayashi C, Ikegaya Y, Nakai J. (2012) Genetically encoded green fluorescent Ca²⁺ indicators with improved detectability for neuronal Ca²⁺ signals. *PLoS One*. 7(12):e51286.
- 3) Saraiva LR, Ahuja G, Ivandic I, Syed AS, Marioni JC, Korsching SI, Logan DW. (2015) Molecular and neuronal homology between the olfactory systems of zebrafish and mouse. *Sci Rep*. 5:11487.
- 4) Friedrich RW, Korsching SI. (1997) Combinatorial and chemotopic odorant coding in the zebrafish olfactory bulb visualized by optical imaging. *Neuron*. 18(5):737-52.
- 5) Filosa A, Barker AJ, Dal Maschio M, Baier H. (2016) Feeding State Modulates Behavioral Choice and Processing of Prey Stimuli in the Zebrafish Tectum. *Neuron*. 90(3):596-608.

The Cells and Logic for Salt Detection in the Zebrafish Olfactory System

Tetsuya Koide

RIKEN Brain Science Institute

Summary

Salt is an essential part of the diet for human and animals. Although in aquatic vertebrate such as fish, their osmotic circumstances are entirely different from the terrestrial vertebrate. Freshwater fish use the gill, which is primary salt detectors, to actively uptake salt from the environment because water diffuses into their body. However, it is not well understood whether other sensory organs involve in monitoring external salt concentrations. Because the olfactory system can detect a variety of chemicals, which evoke fundamental behaviors essential for their survival, we reasoned that fish nose could detect NaCl. In this study, we used genetically encoded calcium indicator GCaMP7, an improved version of GCaMP, and measured salt-evoked neural activity in the olfactory bulb (OB). In transgenic lines with GCaMP expression in the olfactory sensory neurons, we could detect a significant increase of calcium signals in distinct glomeruli of the OB upon application of NaCl or defined odorants such as amino acids (feeding cue), and bile acids (social cue). In situ hybridization analysis with cRNA probes for c-fos, a marker of neuronal activation also revealed that NaCl activates a small population of olfactory sensory neurons located in the apical portion of the olfactory epithelium. These results show that zebrafish can detect NaCl through a small population of olfactory sensory neurons, and the information of NaCl is transferred to the distinct glomeruli in the OB and suggest that olfaction may play a fundamental role in the salt sensory circuit and behavior.