

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

マウス嗅球における匂い分子構造認識領域の空間分布の解析

氏名 稲木 公一郎

哺乳類嗅覚系において、匂い分子は、嗅上皮に存在する嗅細胞で発現している匂い分子レセプターによって受容される。嗅細胞は匂い分子を受容すると興奮し、その情報は軸索を通して嗅球に送られる。嗅細胞の軸索は、嗅球表面にある糸球において嗅球のニューロンとシナプスを形成している。特定の匂い分子レセプターを発現している嗅細胞の軸索は、収束して、通常2個、外側、内側半球にそれぞれ1個ずつ、の糸球にのみ投射している。また、1つの糸球は、通常特定の1種類の匂い分子レセプターを発現している嗅細胞の軸索のみで占められている。よって、嗅球上で、個々の糸球はそれぞれ特定の種類の匂い分子レセプターに対応していると考えられる。従って、嗅球糸球層を2次元展開したシートは、嗅球表面上での匂い分子レセプター地図、感覚地図を表している。

本研究は、匂い分子刺激によって嗅球糸球層において誘導される神経活動をマップすることにより、このような匂い分子レセプター地図の構成の基本的な法則を解明することを目的としている。嗅球糸球層での匂い応答のマッピングの方法として、種々の神経刺激に応答して発現が誘導されることが知られてい

る zif268 遺伝子の発現誘導を神経活動のマーカーとして使用した。すなわち、匂い刺激により特定の糸球が活性化し、その糸球の周りに存在して、その糸球を通して嗅細胞からの入力を直接受け取っている juxtaglomerular cell (JG 細胞) 内で、Zif268 の発現が誘導されると考えた。

実際には、匂いを嗅がせたマウスの嗅球切片において、Zif268 遺伝子産物の発現を免疫組織化学法により検知した。一定の区分内の Zif268 陽性 JG 細胞数を数えて色で表現し、その情報を嗅球糸球層の 2 次元展開図上にプロットした。嗅球糸球層では、2 種類の細胞接着分子 (CAM)、OCAM と Neuropilin-1 の発現パターンが個体間でよく保存されているので、それらの情報を 2 次元展開図上に重ねあわせ、嗅球上の定点座標として利用した。

匂い刺激した個体の嗅球の切片で Zif268 の発現を調べたところ、特定の領域でのみ高密度の Zif268 陽性 JG 細胞が観察された。その他の領域や、脱臭した空気のみを嗅がせたネガティブコントロールマウスの切片では、少数の Zif268 陽性 JG 細胞が散在しているだけであった。展開図上では、このような高密度の Zif268 陽性 JG 細胞が存在する場所は、それぞれの匂い分子に特異的ないくつかの領域に集中していた。よって、匂い刺激によって、それぞれに特有の空間パターンで糸球が活性化し、その周りの JG 細胞で Zif268 の発現が誘導されると想定された。

そこで、この仮説を検証するため、嗅球背側面において、内在性信号の光学的計測法 (optical imaging 法) によって測定される匂い応答の空間分布と、免疫組織化学法によって検知される、JG 細胞での Zif268 の発現誘導の空間分布を比較した。まず、optical imaging 法により、嗅球背側面において propionic acid に応答する糸球の部位を記録し、その内の 2 ケ所にマーカー色素を注入して、活性化部位をマークした。1 週間後に、同じ匂い分子、propionic acid を使用して Zif268 マッピング法を行った。その結果、マーカー色素が注入された部位付近に、Zif268 陽性 JG 細胞が集中して存在しているのが観察された。さらに、展開図上での解析により、Zif268 シグナルのクラスターの空間分布と、optical imaging 法で測定された匂い応答の空間分布がよく一致することがわかった。よって、Zif268 シグナルが、実際に匂い刺激で誘導される嗅球糸球層での神経活動を反映していることが証明された。

次に、匂い分子により誘導される Zif268 シグナルの空間分布が、どの嗅球においても保存されているかどうかについて検証した。propionic acid で刺激した

同じマウスの左右の嗅球、及び異なる2個体の嗅球での、Zif268 シグナルの空間分布を展開図上で比較した。各嗅球の地図上では、前述のように、CAM の発現パターンを基にして座標を設定した。これらの座標を参考にすると、多少の差はあるものの、調べた全ての嗅球において、Zif268 シグナルの空間分布が概ね保存されていることがわかった。よって、Zif268 マッピング法によって、別種類の匂い分子に対する応答の空間分布を、異なる個体を使用して比較検討することが可能である。

これらの結果をふまえて、炭素鎖長を体系的に変化させた3種類の脂肪酸、及び3種類の直鎖アルコールを匂い刺激として使用し、嗅球全体において、Zif268 シグナルをマップした。それぞれの匂い分子は、Zif268 シグナルのクラスターを概ね2対誘起した。2対のクラスターは、嗅球外側、内側地図間で鏡像対称的に配置されていた。optical imaging 法により、嗅球背側面において、脂肪酸は前内側ドメインに局在する糸球を活性化し、直鎖アルコールは前外側ドメインに局在する糸球を活性化することが知られている。また、各ドメイン内では、匂い分子の炭素鎖が長くなるに従って、応答する糸球の場所が前方へシフトする。すなわち、optical imaging 法により、匂い分子構造認識領域(molecular feature domain) および、その極性(匂い分子の炭素鎖長の変化に従って、応答する糸球の場所がシフトする)が決定できる。本研究では、optical imaging 法で定義される molecular feature domain 及びその極性が、Zif268 マッピング法でも検知されるかどうかについて検証した。3種類の脂肪酸、または3種類直鎖アルコールによって誘導されるそれぞれの Zif268 シグナルのクラスターの位置情報を、標準の展開図(複数の嗅球の展開図を重ねあわせて、平均化した展開図)上に重ね合わせた。そうすると、これらのクラスターは、各領域で互いに重なりあって、大きなドメイン(脂肪酸応答ドメイン、及び直鎖アルコール応答ドメイン)を形成していた。嗅球背側面では、optical imaging 法で観察される決まった場所、すなわち背側面前内側部と前外側部、にそれぞれ Zif268 マッピング法で検知される脂肪酸応答ドメイン、及び直鎖アルコール応答ドメインが存在した。さらにドメインの極性の方向も、optical imaging 法で観察された方向と同じ、前腹側方向であった。よって、Zif268 マッピング法でも、得られたデータを標準の展開図上で重ねあわせることにより、molecular feature domain 及びその極性が検知可能である事がわかった。

次に、嗅球背側面以外(つまり optical imaging 法では観察できない領域)も

含む嗅球の全領域で、脂肪酸応答ドメイン、及び直鎖アルコール応答ドメインの空間分布とその極性について検証した。その結果、(1) molecular feature domains は、嗅球上の決まった位置に存在すること、(2) molecular feature domains は、嗅球の外側、内側感覚地図間で鏡像対照的に配置されること、及び(3) 調べた全ての domains の極性の方向が概ね前腹側方向であることがわかった。

このような、脂肪酸応答ドメインの相対的位置や、極性の方向、対称的な空間配置は、以前に報告された、興奮した細胞への 2-deoxyglucose (2-DG) の取り込みを神経活動のマーカーとしたマッピング方法 (2-DG uptake 法) を用いた研究の結果とよく一致していた。molecular feature domain 及びその一定の極性が、別個の方法によっても、決まった場所で一貫して観察されることは、molecular feature domain が嗅球上の匂い分子レセプター地図の構成における基本的な構造上の単位であることを示唆している。

また、全ての脂肪酸応答ドメイン、及び直鎖アルコール応答ドメインの極性の方向は、概ね嗅球の後背側-前腹側軸に平行であり、この軸は OCAM(+)/(-)ゾーン間の境界線の後部分に概ね平行であると推定された。さらに、全てのドメインは、後背側-前腹側軸上の特定の範囲内に局在していた。これらのことは、後背側-前腹側軸に沿った糸球の配置が、感覚地図を形作る上で重要な鍵の1つである可能性を示唆する。