

論文内容の要旨

論文題目

マウス嗅球における系球地図形成の分子的基盤

Molecular basis for the glomerular map formation in the mouse olfactory bulb

氏名 宮道 和成

我々ヒトの脳の複雑な機能は、多様に特殊化した神経細胞が自らの特異性を踏まえて互いに連結しあい、無数の神経回路を形成することによって支えられている。神経発生の研究では、神経軸索の個性 (“neuronal identity”) の獲得、およびそれに基づく特異的神経接続の機構解明が重要な課題となっている。本論文が扱うマウスの嗅覚系は、発現される嗅覚受容体によって与えられる嗅細胞の “neuronal identity” が、軸索投射先の混合/分離という形で明瞭に観察できるという点で、特異的な神経回路の構築原理を研究する優れたモデル系を提供している。

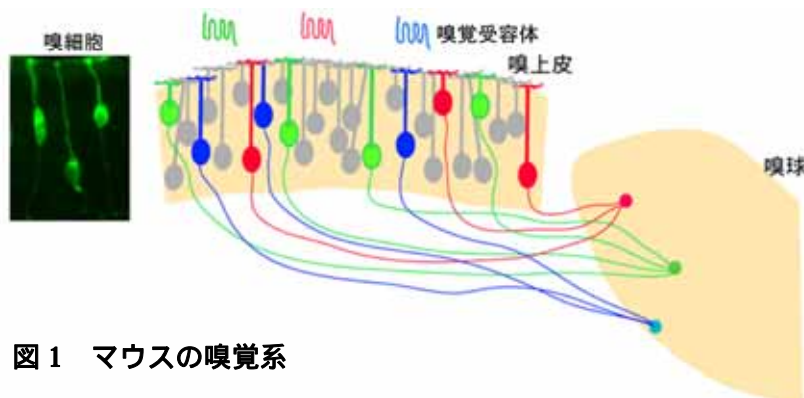


図1 マウスの嗅覚系

匂い受容を担う嗅覚受容体 (odorant receptor: OR) 遺伝子は、1000 種類以上にも及ぶ類似遺伝子からなる多重遺伝子系を構成し、ほぼ全ての

染色体にクラスターを成して存在する。個々の嗅細胞では、これら遺伝子群の中から一種類のみが相互排他的かつ mono-allelic に発現される。これを嗅覚系における「1 神経：1 受容体のルール」と呼び、動物の持つ高度な匂い識別能力の基盤であると考えられる。OR 遺伝子コーディング領域の欠損変異体や OR 偽遺伝子を用いた一連の研究によって、OR 分子を介する負のフィードバック制御が「1 神経：1 受容体のルール」を保証する分子機構として機能すると考えられている。

大脳前部に位置する嗅球上には、OR 分子の種類に対応した約 1000 対の糸球体と呼ばれる構造体が分布し、嗅細胞はそのうち特定の一对に対して軸索を投射する (図 1)。各 OR に対応する嗅球上の投射位置 (糸球地図) は、ほぼ個体差なく定まっており、嗅上皮でどの嗅細胞が活性化されたかという匂い分子の結合情報は、嗅球表面上ではどの糸球体が活性化されたかという 2 次元の位置情報 (匂い地図) へと変換される。この匂い地図は更に高次の嗅皮質へと伝えられ、最終的に匂いの認識、識別、あるいは匂いに惹起される情動や行動を引き起こすものと考えられている。

嗅細胞の軸索投射は、発現する OR の種類に直接依存せず大まかな投射位置が定められる初期投射と、OR 依存的に軸索を収斂させる後期投射の二段階からなると考えられている。前者に関して本研究では、嗅上皮の位置情報が嗅球での軸索投射位置の規定に果たす役割を検討した。従来、嗅上皮は 4 つの異なる zone に分けられ、各 OR 遺伝子を発現する嗅細胞は 1 つの zone に特異的に、かつ zone の中ではランダムに分布するものと考えられてきた。本研究では、80 種類の OR 遺伝子の発現領域を ISH 法によって解析し、嗅上皮における OR 遺伝子の発現領域は必ずしも古典的な 4 zone に当てはまらないことを明らかにした。発現領域は各 OR 遺伝子に特異的で、重なり合いながら連続的に配置されていた。更に、DiI の逆行輸送実験とトランスジェニックマウスにおける OR 遺伝子の発現系を用いた実験によって、嗅球における背腹軸上の軸索投射位置は、嗅上皮における背内側-腹外側軸に沿った個々の OR 遺伝子に固有な発現領域と強く相関することが明らかになった (図 2)。本論文ではこれらの観察に基づいて、糸球地図の背腹軸が嗅上皮の位置情報によって規定されることを提唱し、投射位置決定の機構について考察する。

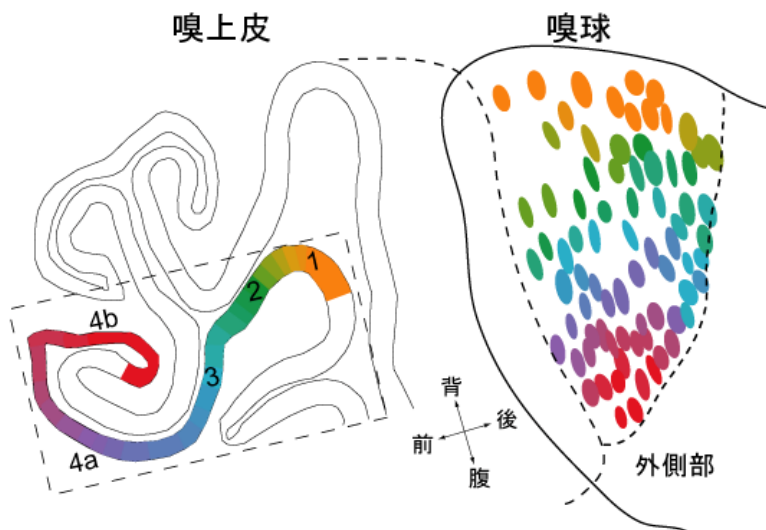


図 2 嗅上皮-嗅球の位置
対応マップ

嗅球外側部の 80 箇所
に DiI の微結晶を置き、嗅細胞の軸索末端から細胞体へと逆行輸送実験を行った。DiI で標識される嗅細胞の分布を color gradient によって示した。嗅上皮の位置と嗅球の背腹軸との間に明瞭な対応関係が見られる。

次に、同じ種類の OR を発現する嗅細胞軸索の収斂に関して、OR の種類に相関して発現制御される軸索ガイダンス分子の存在を想定した。このような分子をスクリーニングする為には、単一の OR 遺伝子をモノクローナルに発現する細胞株が必要であるが、残念ながら機能的な OR 遺伝子を発現する嗅細胞株は存在しない。その代替として本研究では、OR 遺伝子 *MOR28* の属するクラスターを正に制御するエンハンサー配列 H 領域を利用して、殆どの嗅細胞が *MOR28* を発現するようなトランスジェニックマウス (*H-MOR28* マウス) を作成し、その嗅上皮における細胞接着分子の発現プロファイルに偏りがないかを解析した (図 3)。 *H-MOR28* マウスでは、zone 4 の嗅細胞の 80-90% において *MOR28* トランスジーンが発現し、かつ「1 神経 : 1 受容体のルール」が守られていた。 *H-MOR28* マウスと野生型マウスの嗅上皮において発現量の異なる遺伝子を Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) 法と *in situ* hybridization (ISH) 法で探索した結果、軸索ガイダンス分子 *ephrin-A* とその受容体 *Eph-A*、細胞接着分子 *Kirrel* ファミリーを含む複数の遺伝子の発現量が *MOR28* の過剰な発現によって変化していた (図 3B)。個々の嗅細胞においてこれら遺伝子の発現量は発現される OR 分子の種類と相関していた。興味深いことに、*ephrin-A* と *Eph-A*、*Kirrel-2* と *Kirrel-3* の転写量はそれぞれ相補的な関係にあり、一方の発現量が高い細胞では他方の発現量は低く制御されていた。BAC トランスジェニックマウスの系において OR 遺伝子のコーディング領域を入れ換える swap 実験を行い、嗅細胞で発現される OR 分子の種類に応じて *ephrin-A/Eph-A*、*Kirrel* 遺伝子群の発現量が制御されることを明らかにした。次に、

OR 分子の種類を細胞接着分子の発現量に変換する機構を探る目的で、神経活動の発生が抑制された変異体マウスの解析を行った。その結果、OR 分子を介する神経活動が、細胞接着分子の転写量を制御する上で重要な役割を果たすことが明らかとなった。先行研究により ephrin-A は嗅細胞の軸索投射に関与するガイダンス分子の一つであることが知られており、*Eph-A* と *ephrin-A* との間に働く反発性の相互作用は OR 分子の種類によって嗅細胞の軸索を仕分けるのに貢献すると考えられる。本論文では、発現される OR の種類によって規定される neuronal identity が、神経活動のレベルを介して細胞接着分子の発現量という形で軸索末端に表現され、軸索の選別に関与しているという新しいモデルを提唱し、その神経系全般における意義について考察する。

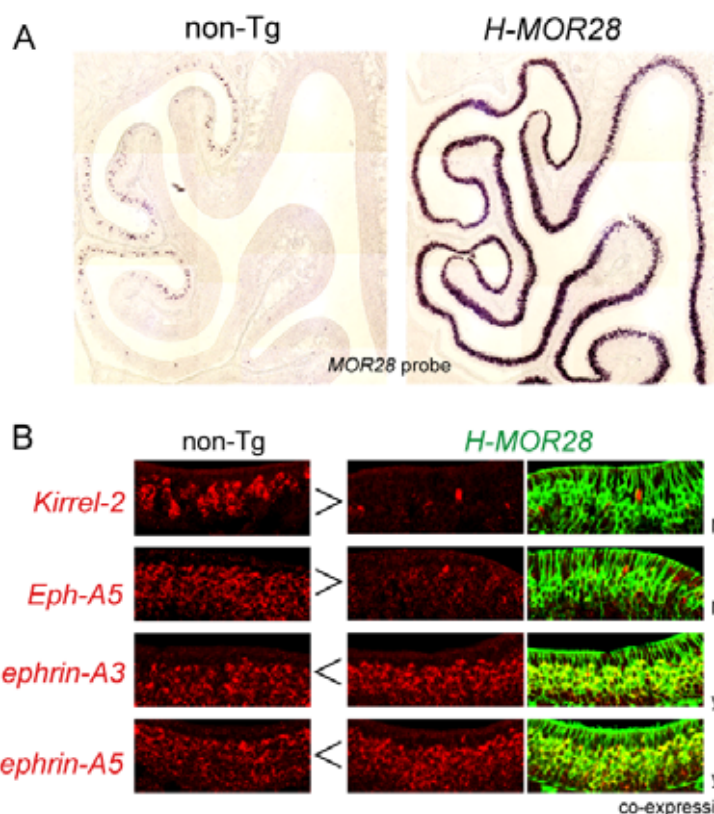


図3 ORの種類と相関して発現する細胞接着分子の探索

野生型マウスと *H-MOR28* マウスの嗅上皮切片において ISH 法により *MOR28* の発現を観察した (A)。 *H-MOR28* マウスでは、 *MOR28* 遺伝子が極めて高頻度に発現する。 *H-MOR28* マウスと野生型マウスの嗅上皮において発現量に差のある遺伝子を探索したところ、 *Kirrel* ファミリー、 *Eph-A/ephrin-A* ファミリーの複数のメンバーが得られた。野生型マウス (non-Tg) と *H-MOR28* マウスの嗅上皮においてこれらの発現を ISH 法により赤色に検出し、同時に抗

GFP 抗体染色により、 *H-MOR28* の発現を緑色に検出した。 *MOR28* トランスジーンを発現する細胞 (緑色) で、 *Eph-A5* と *Kirrel-2* の発現は検出されず、これら遺伝子が発現する細胞数は野生型の相同領域に比較して顕著に減少した。一方、 *MOR28* トランスジーンと *ephrin-A3*, *-A5* は共発現し、これら遺伝子の発現細胞数は減少せず、むしろ *H-MOR28* マウスにおいて若干増加する傾向にあった。この結果は、 *MOR28* の発現に相関して発現制御される一群の軸索ガイダンス/細胞接着分子が存在することを示した。