

# 論文の内容の要旨

論文題目	Functional analysis of Kruppel-like transcription factor 7 in terminal differentiation of mouse olfactory sensory neurons 嗅覚神経細胞最終分化における Kruppel-like transcription factor 7 の機能解析
氏名	梶村大介

Kruppel-like transcription factors (KLFs)は哺乳動物の転写因子で、ショウジョウバエのセグメント形成因子 Kruppel と相同性を有する。KLFs は C 末端に特徴的な保存された 3 つの zinc-finger ドメインを持ち、N 末端の違いにより多様性を示す。KLFs は zinc-finger 型の転写因子である Sp-1 転写因子と相関を持ち、GC リッチな DNA 配列に同様の親和性がある。今までに 16 種類の KLFs が報告されており、発生期に様々な機能を持つことが示されている。これまでに作成された *Klf* ノックアウトマウスは全て致死性であり、このグループの転写因子が哺乳類の発生において重要な役割を持つと考えられている。マウス *Klf7* は発生期に中枢神経系(CNS)および末梢神経系(PNS)の広範囲で発現し、成体での発現は嗅覚神経系や小脳などの限定された領域にのみ残る。*Klf7*−マウスも他の *Klf* ノックアウトマウス同様に致死性であり、CNS および PNS に発生異常が観察される。組織学的観察では *Klf7*−マウスは脳全体が野生型に比べ小さく、特に嗅球は著しく小さい。また脳梁をはじめとする脳構造が正常に発達しない。

じめ、大脳皮質、嗅覚、視覚などの様々な領域で軸索伸張異常が見られる。*Klf7*<sup>-/-</sup>マウスでは特に、嗅球の発生異常が著しく、嗅球に特徴的な層構造が形成されず、嗅上皮からの軸索投影がほとんど見られない。これらの組織学的観察から *Klf7* は軸索伸張および嗅球発生に重要な役割を果たしていることが示唆される。しかしながら、これらの過程における分子的なメカニズムについてはほとんどわかつていない。そこで、本研究では *Klf7* の下流遺伝子を探り、*Klf7* の発生における機能を追究することを目的とした。

嗅球の発生には嗅上皮からの軸索投影が必要であるという考えが提唱されており、このことから *Klf7*<sup>-/-</sup>マウスでは嗅球のみならず、嗅上皮にも発生異常がある可能性が考えられた。嗅覚神経細胞における発生マーカーの発現を *in situ* hybridization により調べたところ、前駆体マーカーである *Ngn1* には発現量の差が見られなかったものの、後期分化マーカーである *GAP43*, *OMP*, *SCG10* の発現が著しく低下していた。*OMP* は成熟嗅覚神経細胞のみで発現しており分化マーカーとして用いられている。*OMP* プロモーター依存的 EGFP 発現ベクターを持つトランスジェニックマウスでは *Klf7*<sup>+/+</sup>バックグラウンドに比べ *Klf7*<sup>-/-</sup>バックグラウンドでの EGFP 発現量が減少していた。これらの後期分化マーカー発現の減少から *Klf7*<sup>-/-</sup>マウスでは嗅覚神経細胞の最終分化が完了していないことがわかった。更に、クロマチン免疫沈降法、ルシフェラーゼレポーターアッセイ、ゲルシフト法を用いた *in vitro* 系の発現制御解析から、*OMP* は *Klf7* によって直接的に遺伝子発現調節が行われていることも明らかになった。

嗅覚神経細胞由来の mRNA を用いたマイクロアレイによる発現比較では *Klf7*<sup>+/+</sup> マウスと *Klf7*<sup>-/-</sup>マウス間で 29 遺伝子の発現に差が確認された。これらの遺伝子のうち *L1 cell adhesion molecule (L1)* は神経の軸索伸張に関わる因子として最もよく知られている。*L1* の発現は実際に *Klf7*<sup>-/-</sup>マウス嗅覚神経細胞で減少していることが免疫染色により確認され、さらに *in vitro* 系を用いた発現解析から *L1* も *Klf7* により直接的に遺伝子発現が制御されていることがわかった。これらの結果は *Klf7* の軸索伸張作用が *L1* 依存的に働いてい

る可能性を示唆している。マイクロアレイにより発現差異が確認された遺伝子のうち既知の遺伝子は 17 個あり、このうち 5 つの遺伝子は細胞骨格関連の遺伝子であった。細胞骨格は軸索の主要な構成因子であることから、細胞骨格遺伝子発現低下が *Klf7*−マウス軸索伸張異常の要因のひとつである可能性が考えられる。

本研究では *Klf7* が嗅覚神経細胞の最終分化に必須の因子であることを明らかにし、分子メカニズムの解明が進んでいない嗅覚神経細胞後期発生に新たな知見を与えるものであった。また *Klf7* は嗅覚神経細胞において軸索誘導因子 *L1* の発現を直接的に制御していることが分かり、*Klf7* の軸索伸張作用という特徴的な現象が *L1* 依存的である可能性を示すものであった。