

## 論文の内容の要旨

論文題目      ゼブラフィッシュ嗅細胞における  
匂い分子受容体発現と軸索投射に関する研究

氏名            佐藤 友紀

生物は嗅覚を用いることによって外的環境に存在する匂い分子を受容し、その情報を鼻から脳へと伝え、匂いの認識や識別さらには匂いに応答した行動や情動を惹起することができる。主に齧歯類やショウジョウバエを用いた分子生物学的、発生工学的研究から、嗅上皮から嗅球へと至る一次嗅覚神経系は非常に秩序立った神経回路網を備えていることが明らかになった。しかし、嗅覚系の精密な神経接続がどのような分子メカニズムによって形成されるのかについてはいまだ不明な点が多い。

小型魚類ゼブラフィッシュは、近年発生生物学および神経科学研究において広く利用されるようになった脊椎動物モデルである。ゼブラフィッシュは体外受精であることから発生学的手法を取り入れやすく、また発生が速く胚が透明であるため、特定の神経細胞に蛍光タンパク質を発現させることにより、生きたままの胚個体で軸索の伸長過程をリアルタイムに観察することができる。また嗅覚系に関してはゼブラフィッシュ匂い分子受容体遺伝子数および嗅球の糸球数がマウスに比べ 10 分の 1 程度であることから、複雑な嗅覚神経回路網をより単純化して解析できる。このような利点からゼブラフィッシュは嗅覚系神経回路網の形成メカニズムを探る上で非常に有用なモデル脊椎動物である。しかしこれまでのところ、魚類の嗅覚神経回路については一次嗅覚神経系を含めて未解明な部分が多く、本研究ではゼブラフィッシュ嗅細胞の軸索投射に焦点をあて 3

つのテーマについて解析を行った。

## 1. 魚類嗅覚系の2つの異なる神経経路

陸棲脊椎動物の多くは嗅覚器とは解剖学的に異なる鋤鼻器を持っているが、魚類には鋤鼻器がなく単一の嗅覚器に繊毛嗅細胞と微絨毛嗅細胞が存在しており、これらは同一の嗅球へと軸索を投射している。第1の研究テーマではこの2種類の嗅細胞の軸索投射様式を詳細に調べた。まずゼブラフィッシュの嗅細胞に発現している分子を探索したところ、繊毛嗅細胞では olfactory marker protein (OMP)、cyclic nucleotide-gated cation channel、OR タイプ匂い分子受容体が特異的に発現しているのに対し、微絨毛嗅細胞では transient receptor potential channel TRPC2 と V2R タイプ匂い分子受容体が発現していた。そこで2種類の嗅細胞を選択的に標識するため、それぞれ OMP、TRPC2 の遺伝子発現プロモーター制御下に蛍光タンパク質を発現するトランスジェニック系統を作製した。各系統における蛍光タンパク質の発現は内在性遺伝子の発現を厳密に再現しており、OMP 系統は繊毛嗅細胞を、TRPC2 系統は微絨毛嗅細胞を選択的に標識した。2種類の嗅細胞からの軸索投射様式を同時にかつ区別して可視化するために、異なる波長の蛍光タンパク質を発現する OMP 系統と TRPC2 系統と交配させたダブルトランスジェニック魚を獲得し、この成魚での嗅球表面の蛍光観察を行った。その結果、繊毛嗅細胞は主に嗅球の背側部や内側部に軸索を投射しているのに対し、微絨毛嗅細胞は嗅球の外側部に軸索を投射している様子が観察された。さらにその軸索投射様式を嗅球上の糸球レベルで解析するために、ダブルトランスジェニック成魚の嗅球切片の免疫染色を行った。その結果、2種類の嗅細胞からの軸索は相互排他的に全く別々の糸球に投射していることが明らかになった。またダブルトランスジェニック胚の経時的観察から2種類の嗅細胞による相互排他的な軸索投射は発生初期からおおよそ形成されていることが分かった。以上の結果から、齧歯類の嗅覚系と同様に魚類の嗅覚系においても繊毛嗅細胞と微絨毛嗅細胞はそれぞれ異なる種類の匂いを受容し、異なるシグナル伝達分子、異なる神経経路を介して、異なる機能発現に関与していることが示唆された。

## 2. 魚類嗅細胞における匂い分子受容体の選択的発現機構

上述の結果から2種類の嗅細胞による相互排他的軸索投射様式が明らかになったが、各嗅細胞群の中で個々の匂い分子受容体を発現している嗅細胞がどのような様式で各々の糸球に投射しているのかについては不明である。齧歯類では、1つの繊毛嗅細胞は1種類の匂い分子受容体(OR)を発現しており(1細胞-1受容体ルール)、同じORを発現する嗅細胞はその軸索を特定の糸球に集束させて投射している(特定糸球への軸索投射)。そこで第2の研究テーマではゼ

ブラフィッシュの繊毛嗅細胞における OR 遺伝子の選択的発現とその嗅細胞軸索の糸球投射様式について解析を行った。ある特定の機能的嗅細胞サブセットを選択的に標識するために、2 つの OR 遺伝子 *OR111-7* と *OR103-1* のコーディング領域をそれぞれ YFP と CFP に置換した OR 遺伝子クラスターを持つ BAC トランスジェニック系統 BAC-YC を作製した。BAC-YC 胚の嗅細胞を発達段階を追って観察したところ、YFP、CFP 蛍光は置換された OR 遺伝子の発現開始時期とほぼ同じく受精後 1.5 日目から少数の嗅細胞で観察され、受精後 5 日目までには YFP または CFP で標識された嗅細胞軸索は予定嗅球領域の内側部に位置する同じ特定の糸球群に投射していた。BAC-YC 成魚での軸索投射様式を調べるため、ホールマウント嗅球に対し抗 GFP 抗体を用いた免疫染色を行うことによって YFP と CFP の発現を検出した。その結果、対照の OMP 系統では繊毛嗅細胞から投射を受ける嗅球の背側部や内側部の数多くの糸球が染色されていたのに対し、BAC-YC 系統では YFP/CFP 発現嗅細胞が嗅球前方内側部に位置する少数の糸球にのみ軸索を投射している様子が観察された。このように発生初期から成魚に至るまで BAC-YC 系統の YFP/CFP 発現嗅細胞は特定糸球への軸索を投射していることが明らかになった。

また BAC-YC 成魚の嗅上皮切片の解析から、YFP/CFP は繊毛嗅細胞で特異的に発現しており、微繊毛嗅細胞では全く発現していないことが示された。これは BAC-YC トランスジーンにおいて YFP、CFP 遺伝子が内在性 OR 遺伝子と同様の遺伝子発現制御を受けている結果と考えられる。しかしこれまでのトランスジェニックマウスを用いた研究によると、OR コーディング領域を欠失させたトランスジーンを発現する嗅細胞では別の OR 遺伝子が発現することが報告されており、BAC-YC トランスジーンでもコーディング領域を置換していることから、YFP/CFP 発現嗅細胞がどの OR 遺伝子が発現しているかは不明であった。この問題を明確にするために、OR 遺伝子の ISH と抗 GFP 抗体染色を組み合わせ解析したところ、YFP/CFP 発現嗅細胞で発現される OR 遺伝子は様々な染色体座から無作為に選択されるのではなく、主に *OR111* サブファミリーと *OR103* サブファミリーに属する OR 遺伝子から選択されていることが判明した。この結果から私は、ゼブラフィッシュの個々の嗅細胞では以下に示す 2 段階からなる階層的制御によって、発現される OR 遺伝子が選択されているというモデルを提唱する: (1) 個々の嗅細胞はまず OR 遺伝子サブファミリーを 1 つ選択する; (2) 続いて嗅細胞は選択されたサブファミリーに属する限られたメンバーの中から 1 つの OR 遺伝子を選択し発現する。また以上の結果をまとめると、BAC-YC 系統の YFP/CFP 発現嗅細胞では特定のサブファミリーに属する OR 遺伝子が発現しており、それらの軸索は特定の糸球へ投射していることから、魚類においても類似した OR を発現する嗅細胞は

特定糸球へ軸索を集束させていることが示唆された。さらに二重 ISH 法により各々の OR 遺伝子の発現について解析したところ、*OR111* サブファミリーに属する OR 遺伝子は互いに異なる嗅細胞群に発現していたが、*OR103* サブファミリーの *OR103-1* は野生型成魚においても *OR103-2* または *OR103-5* と共発現していることが判明した。このことから魚類では“1 細胞-1 受容体ルール”がすべての嗅細胞に当てはまるわけではなく、複数の OR を発現する嗅細胞も存在することが示された。

### 3. 魚類一次嗅覚神経回路形成における Slit/Robo シグナルの役割

一次嗅覚経路の精密な神経回路網の形成には多種多様な軸索ガイダンス分子が関与していることが予想される。軸索反発性因子 Slit とその受容体 Robo は様々な神経システムで軸索ガイダンスに関わっていることから、第 3 の研究テーマでは一次嗅覚経路における Slit/Robo シグナルの役割について検討した。嗅上皮での *robo2* mRNA の発現は嗅細胞軸索が予定嗅球領域へ伸長する時期に限られていた。*robo2* 機能欠損変異体を上述の OMP 系統と交配して嗅細胞軸索の伸長過程を観察したところ、*robo2* 変異体では一部の軸索が予定嗅球領域に到達できず本来の道筋から逸れて脳の他の部位へ侵入していた。ISH 解析から Slit 遺伝子は嗅上皮から予定嗅球領域への軸索の道筋を取り囲むように発現していることが判明し、熱ショックプロモーターを用いて全身で均一に Slit 遺伝子を発現させると嗅細胞軸索は *robo2* 機能欠損変異体と同様の表現型を示した。このことから、Slit の濃度勾配がその反発性作用により Robo2 を発現する嗅細胞軸索を本来の道筋から逸脱しないようにガイドしていることが示唆された。*robo2* の発現は発生初期に限られているが、*robo2* 変異体の糸球配置異常は成魚においても観察されることから、発生初期に形成された神経接続がその後生まれてくる新しい嗅細胞の足場となって正しい神経回路が構築されるという仮説を提唱する。