

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 佐藤 友紀

嗅覚系は匂い情報を鼻から脳へと伝え、匂いの認識や識別を行う神経システムである。主に齧歯類を用いた研究により嗅上皮から嗅球へと至る一次嗅覚神経系の秩序立った神経接続様式についてはかなりの部分が解明されてきた。しかし、そ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。本論文では小型魚類ゼブラフィッシュをモデル脊椎動物として用い、魚類一次嗅覚神経系における軸索投射様式およびその神経回路網形成に關与する軸索ガイダンス分子について解析を行っている。

第一章の序論、第二章の方法に続き、第三章では魚類の嗅上皮に存在する二種類の嗅細胞の軸索投射様式について詳細な解析を行っている。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いる。ゼブラフィッシュの嗅細胞に発現している分子を調べたところ、繊毛嗅細胞と微絨毛嗅細胞ではそれぞれ異なる嗅覚受容体やシグナル伝達分子が発現していることが明らかになった。そこで、それぞれの嗅細胞に選択的な遺伝子発現プロモーターを用い、繊毛嗅細胞と微絨毛嗅細胞を異なる蛍光タンパク質で標識したダブルトランスジェニック魚を作製している。蛍光標識された嗅細胞軸索の投射様式を観察した結果、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おり、その軸索投射様式は相互排他的であることが判明した。また生きたままのダブルトランスジェニック胚の経時的観察では二種類の嗅細胞による相互排他的な軸索投射様式は発生初期からおおよそ形成されていることが明らかにされている。以上の結果は、魚類嗅覚系において繊毛嗅細胞と微絨毛嗅細胞がそれぞれ異なる種類の匂い情報の処理に關与していることを示唆するものである。

第四章では魚類嗅細胞における匂い分子受容体(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の解析を行っている。ゼブラフィッシュのOR遺伝子クラスターを含む大腸菌人工染色体(BAC)において、二つのOR遺伝子のコーディング領域をそれぞれ異なる蛍光タンパク質遺伝子に置換したコンストラクトを作製し、それを用いて特定の機能的嗅細胞サブセットを蛍光標識したBACトランスジェニック系統を作製した。蛍光標識された嗅細胞軸索は嗅球上の特定糸球に集束している様子が観察されたことから、魚類でも齧歯類と同様に類似の機能を持つ嗅細胞はその軸索を特定糸球へ集束させることが示唆された。またBACトランスジェニック系統の嗅上皮切片の解析から、蛍光タンパク質は繊毛嗅細胞選択的に発現しており、その蛍光標識された嗅細胞で発現するOR遺伝子は特定のサブファミリーに属するOR遺伝子にほぼ限定されていることが判明した。このような結果から、個々の嗅細胞では発現されるOR遺伝子が階層的制御によって選択されているというモデルを提唱している。さらに、魚類の一部の嗅細胞では二種類

の OR 遺伝子が発現していることを新たに見出している。

第五章では魚類一次嗅覚神経回路形成過程における軸索ガイダンス分子 Slit/Robo の役割について検討を行っている。ゼブラフィッシュの嗅上皮では嗅細胞軸索が予定嗅球領域へ伸長する時期に合わせて *robo2* 遺伝子が一過性に発現していることが明らかになり、*robo2* 機能欠損変異体では一部の嗅細胞軸索が本来の道筋から逸れて予定嗅球領域とは異なる部位に投射している様子が観察された。Robo2 のリガンドである Slit 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 Slit 遺伝子を過剰発現させたところ *robo2* 変異体と同様の嗅細胞軸索投射異常を示した。これらの結果から、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。また *robo2* 遺伝子の発現は発生初期に限られているが、*robo2* 変異体では成魚においても糸球配置異常が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している。

本論文は、魚類一次嗅覚神経回路における匂い情報のコーディング様式を解明し、その神経回路網形成に関わる分子メカニズムの一部を明らかにしたものである。これらの知見は魚類のみならず脊椎動物全般の嗅覚神経回路網の形成メカニズムや嗅覚機能の解明に貢献するものと期待される。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。