

論文内容の要旨

論文題目 Molecular Mechanisms of Neural Map Formation in the Mouse Olfactory System

マウス嗅覚系における神経地図形成の分子機構

氏名 竹内 春樹

我々の脳は、視覚、嗅覚、聴覚、味覚、体性感覚といった様々な感覚器官から入力される情報を、神経地図として脳内における二次元上の位置情報へと変換する。この神経地図形成のために、個々の神経細胞は発生の過程で自らのアイデンティティを獲得し、決められた投射先へと軸索を伸長させる。嗅覚系は、神経細胞における投射のアイデンティティが“発現する嗅覚受容体(olfactory receptor: OR)”という明確な形で定義され、その軸索の投射先が糸球体と呼ばれる明瞭な構造体として観察できることから、神経回路形成の分子メカニズムを研究する上で他に類をみない有用な系であると考えられる。

マウスの嗅覚系では、匂い分子を検知するための OR は約 1000 種類存在する。個々の嗅神経細胞は、多数ある OR 遺伝子の中からたった一種類のみをランダムに選択し、相互排他的かつ mono-allelic に発現する(1 神経-1 受容体ルール)。また同一の OR を発現している嗅神経細胞の細胞体は、鼻腔の奥に存在する嗅上皮上においてモザイク状に分布しているものの、その軸索は脳前部に位置する嗅球に存在する特定の箇所に糸球構造を形成して投射する(1 受容体-1 糸球ルール)。従って、嗅球上では、OR の数に相当する 1000 個の素子からなる神経地図が形成される。個々の匂い分子は、複数の種類の OR 分子と異なる親和性をもって認識されるため、匂いの情報は嗅球上において約一千個ある糸球を素子とした二次元上の発火パターンとして展開される。

この嗅覚の神経地図の形成は、発現する OR に依存的な軸索投射と非依存的な軸索投射の二つのメカニズムによって形成される。嗅球の前後軸方向の軸索投射及び軸索の収斂に関しては、発現する OR 分子が複数の軸索投射及び選別分子の種類と発現量を制御することによって達成されるが明らかとなっている。一方、背腹軸方向の投射に関しては、嗅上

皮と投射先である嗅球との間に空間的な対応関係が存在し、嗅神経細胞の嗅上皮における細胞体の位置が重要なパラメーターになっている。嗅上皮の背内側に位置する嗅神経細胞は嗅球の背側方向に、腹外側に位置する嗅神経細胞は嗅球の腹側方向に軸索を伸長させる。個々の *OR* 遺伝子は、嗅上皮上の限られた領域で発現し、その発現領域は *OR* ごとに固有であり、かつ互いに重なり合って連続的に分布している。これまで嗅球の背腹軸方向の軸策投射に関しては、嗅上皮と嗅球間の膨大な組織学的な知見は蓄積されてきたものの、それを保障する分子メカニズムについてはほとんど明らかとされてこなかった。そこで本研究では、この嗅上皮と嗅球との間に存在する空間的な対応関係を保障する分子メカニズムを解明することを目的として、**Neuropilin-2 (Nrp2)** という軸索ガイダンス分子に着目して解析を行った。**Nrp2** は嗅上皮上において腹外側に位置する嗅神経細胞において強く、背内側に向かうにつれて弱くなるという位置特異的な発現パターンを示す。**Nrp2** の抗体を用いて、**Nrp2** の発現量と軸索の投射位置との関係を詳細に調べた結果、**Nrp2** を強く発現する嗅神経細胞の軸索は、嗅球の腹側に、**Nrp2** を弱く発現する嗅神経細胞の軸索は、背側に投射することがわかった。実際に **Nrp2** が軸策投射に影響を与えるかどうかを検証するために、遺伝学的手法を用いて一部の嗅神経細胞において **Nrp2** の発現量を変化させる実験を行った。その結果、**Nrp2** の発現量を低くするとより背側に、逆に発現量を高くするとより腹側に糸球が観察されるようになり、実際に **Nrp2** の発現量によって背腹軸方向における糸球の位置が決定されるということが明らかとなった。

軸索ガイダンス分子が神経地図の形成にどのように作用するのかということを理解するためには、そのリガンドの発現部位とそのタンパク質の分布を明らかにすることが必要となる。**Nrp2** は、分泌型のリガンドである **Semaphorin-3F (Sema3F)** と相互作用することで反発性の活性を示すことが明らかとなっている。そこで、マーカー遺伝子である *LacZ* を *Sema3F* の遺伝子座にノックインしたマウスを用いて *Sema3F* の発現解析を行った。その結果、*Sema3F* はターゲットである嗅球の細胞での発現は検出されず、嗅上皮上に存在する嗅神経細胞において発現するということが判明した。しかもその発現パターンは、背内側で強く、腹外側に弱いという *Nrp2* とは概ね相補的であることがわかった。

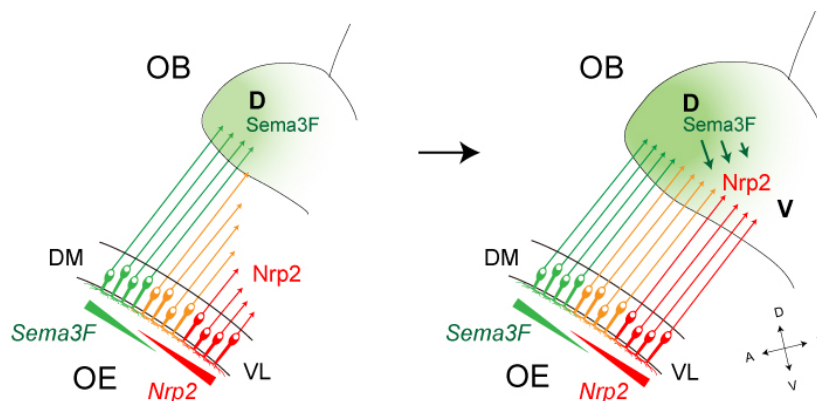
この発現パターンに促され、嗅神経細胞由来の **Sema3F** の軸索投射における役割を検証するために、嗅神経細胞特異的に **Sema3F** をノックアウトしたマウスを作製した。このマウスにおいては、通常に腹側に投射する嗅神経細胞の軸索投射に異常が見られ、誤ってより背側方向に投射する軸索が観察された。このことから、嗅神経細胞由来の **Sema3F** が **Nrp2** を発現する嗅神経細胞の軸索に cell non-autonomous に作用して背腹軸方向の軸策投射に関わると考えられた。しかしながら、**Sema3F** は分泌タンパク質であり、実際の作用機序を理解するためには **Sema3F** タンパク質の局在を明らかにすることが重要であると考えられる。しかしながら、*Sema3F* の発現レベルは低く、また現時点で組織染色可能なよい **Sema3F** の抗体は存在しないことから、これまで生体内における **Sema3F** タンパク質の局在は明らかとされてこなかった。この問題に対し、我々はテトラサイクリンシステムを

用いて **Sema3F** の発現量を上昇させた BAC トランスジェニックマウスを作製して、嗅覚組織における **Sema3F** タンパク質の可視化を試みた。その結果、**Sema3F** は嗅上皮において背内側に位置する嗅神経細胞によって産生されるにも関わらず、ターゲットである嗅球の背側領域にそのタンパク質が局在することがわかった。この領域は、嗅神経細胞特異的な **Sema3F** ノックアウトマウスにおいて **Nrp2** を発現する嗅神経細胞の軸索が誤って投射する領域と一致することから、**Sema3F** の **Nrp2** の反発作用は嗅球上において生じるものと考えられた。

げっ歯類の嗅覚系において、嗅球の背側方向に投射する嗅神経細胞の成熟が嗅球の腹側方向に投射する嗅神経細胞より早いということが複数の遺伝子マーカーの発現解析から示唆されている。その知見に促され、我々は発生段階を追って嗅上皮から嗅球への軸索伸長の様子を観察した。その結果、発生段階初期においては背側方向に投射する軸索のみが嗅球に到達しており、嗅球の腹側方向に投射する軸索はそれよりも遅れて嗅球に到達することがわかった。このように嗅神経細胞の間に、時間的な成熟の違いがあるということが、**Sema3F** と **Nrp2** の作用機序において、背腹軸に沿った神経地図を作るのに重要であると考えられる。これによって、発生段階初期に先に背側領域に到達した軸索が、**Sema3F** をターゲット領域に分泌することで後から到達する **Nrp2** を発現する軸索を腹側方向へと押しやることで、**Nrp2** の発現量に従ったトポグラフィックなオーダーを作り出すというモデルが考えられた。

これまで神経地図の形成メカニズムに関しては、主に視覚系において解析が進められてきた。視覚系では、網膜と視蓋との間に存在する空間的な対応関係を保障するために、軸索側で発現される軸索ガイダンス分子とターゲット側の細胞によって提示されるガイダンスキューとの相互作用 (**axon-target interaction**) が重要な役割を果たすことが明らかとなっている。この知見を基に、神経地図の形成メカニズムに関しては、**axon-target interaction** を中心に語られることが多かった。それに対し、本研究において得られた知見は、投射する軸索自身がガイダンスキューをターゲット領域に持ち込むことでトポグラフィックマップを作り出すという

新しいモデルを提唱するものであり、他の中枢神経系においてこれに類似する機構が存在するかどうかを明らかにすることが今後の神経回路形成の分野における大きな課題になるものと思われる。



背腹軸方向の軸索投射のモデル

OE, 嗅上皮; OB, 嗅球; DM, 背内側; VL, 腹外側; A, 前; P, 後; D, 背; V, 腹;