

論文の内容の要旨

論文題目：マウス嗅覚系における嗅球前後軸に沿った神経地図形成の分子機構
(Topographic map formation along the anterior-posterior axis in the mouse olfactory bulb)

氏名： 山崎 崇裕

脊椎動物の神経系では、外界からの情報は末梢神経系細胞で受容された後、軸索を通して伝達され、その投射先において二次元の神経地図を形成する。この神経地図は、生物が外界の情報を受容し、情報処理を行い、行動を起こすための構造的基盤であることから、神経地図形成機構の解明は生物学的に重要な意味をもつ。

マウス嗅覚系において、嗅上皮に存在する嗅細胞は、約 1,000 種類ある嗅覚受容体の中から相互排他的に一種類のみを発現し、空気中の匂い分子を検出する。また、同じ種類の受容体を発現する嗅細胞の軸索は投射先である嗅球において収斂し、一対の糸球構造を形成する。その結果、嗅上皮で受容された匂い情報は、嗅球表面において糸球の発火パターンとして二次元の情報に変換される。嗅上皮において散在している嗅細胞は、発現する嗅覚受容体の種類によって固有の cAMP シグナル強度を持つと考えられ、cAMP シグナルの弱い軸索は嗅球の前方へと投射し、cAMP シグナルの強い軸索は嗅球の後方へと投射する。このように、嗅細胞は嗅上皮において散在しているが、細胞が生み出す固有の cAMP シグナル強度によって軸索投射位置が嗅球前後軸に沿って変化する。さらに、cAMP シグナルの強い嗅細胞ほど軸索ガイダンス分子である Neuropilin1 (Nrp1) の発現量が高いことから、cAMP シグナルの強度は、転写制御を介して、Nrp1 の発現量に変換されると考えられた。しかしながら、嗅球前後軸に沿った軸索投射位置決定に、Nrp1 自身が関与しているかどうかはわかっておらず、さらには、

どのような分子機構で嗅球の前後軸に沿った位置が決定されるかについては明らかとなっていなかった。本研究では、Nrp1 と、そのリガンドである Semaphorin3A (Sema3A) に着目し、嗅球前後軸に沿った軸索投射機構について解析を行った。

まず、嗅球前後軸に沿った軸索投射について、Nrp1 が機能しているかどうかを解析するために、Nrp1 の gain-of-function/loss-of-function の実験を行った。嗅覚受容体 I7 を発現する嗅細胞において、Nrp1 の発現量を変化させたマウスを作製し、それらの軸索の投射位置を解析したところ、Nrp1 の発現量を増やすと投射位置は嗅球の後方へシフトし、Nrp1 の発現量を減らすと糸球は嗅球の前方へシフトした。これらの結果から、嗅球の前後軸に沿った軸索投射位置決定において Nrp1 が機能していることを示すことができた。

ではどのような分子機構で嗅球前後軸に沿った軸索投射位置が決定されるのだろうか。これまで、視覚系における研究から、軸索が投射先における軸索ガイダンス分子を認識することで神経地図が形成されると考えられてきた。しかしながら驚くべきことに、投射先である嗅球のない変異マウスを解析したところ、嗅上皮から伸びてきた軸索は、本来嗅球があるべき場所において軸索の塊（軸索塊）を形成し、その中で嗅球前後軸に沿った投射位置を反映するように Nrp1 の発現量にしたがって軸索が選別されていた。さらには、WT マウスにおいて、嗅上皮から伸びてくる軸索は寄り集まって軸索束を形成し、嗅球へ到達する前の軸索束の段階で投射先を反映するように軸索が選別されていることが判明した。以上の結果は、投射先に依存しない神経地図形成機構があることを示唆するものである。

そこで、軸索が嗅球へ到達する前の軸索束における軸索の選別機構について解析を進めた。嗅球へ到達する前の軸索束においても、軸索は Nrp1 の発現量にしたがって選別され、Nrp1 の発現量の多い軸索は軸索束の外側 (outer-lateral) に選り分けられ、Nrp1 の発現量の低い軸索は内側に選り分けられていた。さらに、特定の嗅細胞において Nrp1 の発現量を変化させたときの軸索束内における選別の様子を観察したところ、通常外側 (outer-lateral) へ選り分けられる軸索が、Nrp1 の発現量がなくなると Nrp1 陰性の軸索領域である内側 (central) へと選り分けられた。逆に、通常内側 (central) へ選り分けられる軸索が、Nrp1 の発現量が増えると、外側 (outer-lateral) へと選り分けられた。以上の結果から、Nrp1 の発現量にしたがった軸索選別には Nrp1 自身が機能していることが明らかとなった。この Nrp1 発現量に依存した軸索の選別が、結果として嗅球の前後軸に沿った軸索投射位置に反映するものと考えられる。

次に、Nrp1 依存的な軸索選別・軸索投射において、Nrp1 のリガンドである分泌型タンパク質 Sema3A が関与しているかどうかについて解析を行った。Nrp1 を発現する神経細胞の軸索末端は、Sema3A に対して反発的に応答するということが、*in vitro* の実験から示されている。Sema3A KO マウ

スを解析したところ、**Nrp1** の発現量にしたがった軸索の選別がなくなり、**Nrp1** 陽性軸索が嗅球の前方へ投射するなどの異常が観察され、前後軸に沿った軸索投射パターンが乱れることがわかった。これらのことから、**Nrp1** 依存的な軸索選別と前後軸に沿った軸索投射機構には、**Sema3A** が必要であるということが判明した。さらに、嗅細胞における RT-PCR、定量的 PCR などによる詳細な発現解析から、**Sema3A** は **Nrp1** の発現量が低い（ない）嗅細胞において発現している傾向が観察された。**Sema3A** を発現する細胞の軸索を可視化するための BAC トランスジェニックマウスを作製し、その軸索束を観察すると、**Nrp1** 陽性軸索と **Sema3A** 陽性軸索とが選別されていた。これらの結果から、**Nrp1** と **Sema3A** は嗅細胞において相補的に発現しており、軸索の選り分けにおいて **Nrp1-Sema3A** を介した反発的な相互作用が働いている可能性が考えられた。

このモデルを検証するために、嗅細胞特異的に **Sema3A** をノックアウトしたマウスを作製し、軸索選別・軸索投射について、どのような異常が見られるかを解析した。すると、軸索の選別においては、依然 **Nrp1** の発現量にしたがった大まかな選別は維持されるものの、**Nrp1** を発現する軸索が軸索束の内側へと侵入してくるという異常が観察された。**Nrp1** 陽性軸索と **Nrp1** 陰性（**Sema3A** 陽性）軸索との間において働いていた **Nrp1-Sema3A** を介した反発的な相互作用がなくなることで、軸索束外側の **Nrp1** 陽性軸索が内側の領域へと進入したものと考えられた。さらに軸索の投射位置についても、嗅細胞特異的 **Sema3A** KO マウスでは、WT のマウスに比べて糸球の位置が前方へシフトするという結果が得られた。嗅細胞において発現する **Sema3A** が軸索間の相互作用以外においても機能している可能性はあるものの、軸索束内における変化と相関した変化が投射先において観察されたことから、軸索間の相互作用が軸索投射位置決定に影響を及ぼすものと考えられる。

Sema3A KO マウスにおいては、**Nrp1** 発現量にしたがった軸索の選別が完全に失われるが、嗅細胞特異的 **Sema3A** KO マウスにおいては、**Nrp1** の発現量にしたがった大まかな軸索の選別は維持されて、**Nrp1** 陽性軸索は軸索束の外側（outer-lateral）へと選り分けられる。これらの結果から、嗅細胞以外の **Sema3A** も **Nrp1** の軸索選別に寄与していると考えられる。さらには、嗅球のない変異マウスの軸索束においても、軸索は **Nrp1** の発現量にしたがって選別されており、**Nrp1** 陽性軸索は外側（outer-lateral）へと選り分けられていた。また、嗅球のない変異マウスの軸索塊の中において、軸索間の相互作用のみが働いているならば軸索は同心円状に選別されるが、実際は **Nrp1** 陽性軸索は軸索塊の後方へと選別されていた。これらの嗅球のない変異マウスにおける解析からも、軸索や投射先以外の細胞に由来する **Sema3A** が **Nrp1** 発現量に依存したトポグラフィーの形成に寄与しているものと考えられる。実際、軸索が嗅球へ到達する頃の軸索投射初期（胎児期 13-15 日目）において、軸索束外の内側において **Sema3A** mRNA の発現が検出された。この軸索投射の途中経路にある細胞に由来する **Sema3A** に

対して **Nrp1** 陽性軸索が反発的に応答することで、**Nrp1** 発現量にしたがったトポグラフィーが形成されると考えられる。さらには、投射先である嗅球の前方において **Sema3A mRNA** の発現が観察されたことから、この投射先における **Sema3A** が軸索を嗅球表面上に展開する際の絶対的なランドマークとして機能しているものと考えられる。

これまで視覚系などの研究から、軸索が投射先において濃度勾配をなして存在する軸索ガイダンス分子を認識することで神経地図が形成されると考えられてきた。しかしながら本研究によって、“神経地図形成における軸索間の相互作用の重要性”を示唆することができた。さらには、軸索を伸ばす神経細胞自身でもなく、投射先の細胞でもない第三の細胞に由来する軸索ガイダンス分子が、神経地図のトポグラフィーを形成するという重要な機能を果していることが示唆された。軸索ガイダンス受容体 **Nrp1** や、**Sema3A** を始めとする分泌型軸索ガイダンス分子は、嗅覚系のみならず脳・運動神経系・感覚神経系などにおいても発現・機能していることから、本研究によって示された分子機構は、神経系一般に敷衍することができると考えられる。