

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830015

研究課題名(和文) Nogo受容体アンタゴニストLOTUSによる嗅索形成機構

研究課題名(英文) The mechanism of LOT formation by LOTUS as an endogenous Nogo receptor-1 antagonist

## 研究代表者

池谷 真澄 (Iketani, Masumi)

横浜市立大学・生命医科学研究科・共同研究員

研究者番号：60644359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：嗅覚情報を伝える嗅索(LOT)の形成過程において、LOTUSがNogo受容体(NgR1)の拮抗物質として働き、軸索の束化に寄与することが知られている。NgR1とNogoは成体における神経再生阻害因子として知られているが、発生期における存在意義は不明な点が多い。胎生期のLOTUS遺伝子欠損マウスにおいてLOTの軸索側枝の増加が観察され、NgR1遺伝子欠損マウスとLOTUSとNgR1の両方を欠損させたマウスにおいては減少が観察された。これらのことからLOTUSがNgR1を拮抗的に制御することによって、軸索側枝形成に寄与することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Previously, we identified LOT usher substance (LOTUS) as an endogenous Nogo receptor-1 (NgR1) antagonist and found that LOTUS contributes to formation of LOT axonal bundle through its antagonistic action towards NgR1 function. The NgR1 is a receptor of axonal outgrowth inhibitors such as Nogo. We examined in vivo phenotypes in the axonal branching in LOT of LOTUS-KO and/or NgR1-KO mice. The collateral branches of LOT were increased in LOTUS-KO mice, whereas the collateral branches were decreased in NgR1-KO mice. Moreover, the abnormal increase of axonal branching seen in LOTUS-KO mice was rescued in double mutant of LOTUS- and NgR1-KO mice. These findings suggest that Nogo-A and NgR1 interaction may contribute to axonal branching in LOT development. Thus, it is considered that LOT formation is developmentally controlled by Nogo-A induction and down-regulation of the antagonistic action towards Nogo-NgR1 signaling by LOTUS.

研究分野：神経生物学

キーワード：軸索側枝 神経回路形成 Nogo NgR1 LOTUS

1. 研究開始当初の背景

嗅覚情報の伝導路である嗅索 (LOT) の形成過程において、LOTUS が Nogo 受容体 (NgR1) の拮抗物質として働き、神経軸索退縮からの保護や軸索の束化に寄与することが知られている。NgR1 とそのリガンドである Nogo は成体における神経再生阻害因子として知られているが、発生期における存在意義は不明な点が多い。LOTUS を欠損したマウスにおいて軸索側枝に異常が見いだされたことから、LOTUS が発生期の軸索側枝形成に寄与している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では LOT の形成過程において軸索束形成の後に起こる軸索側枝形成に注目し、LOTUS, NgR1, Nogo の相互作用が軸索側枝形成にどのように関わるかを明らかにすることを目的とした。LOTUS と NgR1 の相互作用が嗅索側枝形成に関与することが明らかになれば、NgR1 の生物学的な存在意義の理解につながり、NgR1 が関与する神経変性疾患や脳損傷との関連性が明らかになる可能性がある。障害を受けた時に消失した神経機能の再建のための治療法の分子基盤を考える上でも有用である。

3. 研究の方法

(1) 免疫組織染色

胎生 14,16,18 日目のマウス終脳半球を取り出し、4%パラホルムアルデヒド (PFA) で固定した後に LOTUS, NgR1, Nogo に対する抗体を用いて免疫染色を行った。

(2) shRNA 実験

胎生 14.5 日目のマウスから嗅球を取り出しトリプシン処理によって細胞を分散し、ポリ-L-リジンでコートしたガラスベースディッシュ上で1日培養 (37°C)、レンチウイルスを用いて Nogo の shRNA を細胞に導入し Nogo、その後6日間培養を行い、4%PFA で固定した後に Nogo に対する抗体を使った免疫染色によって Nogo のノックダウンを確認した。

(3) DiI トレーシング

胎生 18 日目のマウス終脳半球を取り出し、4%PFA で固定後に DiI を嗅球に埋め込み、そのまま PFA 内で 37°C、3 週間静置した後に、蛍光顕微鏡にて LOT の軸索側枝を観察した。

4. 研究成果

LOTUS, Nogo, NgR1 は LOT の束が形成される胎生 12 日目と 13 日目に存在することが我々の先行研究によって明らかとなっている (Sato et al. 2011)。束化が完了した胎生 14 日目以降に軸索側枝が形成されることが知られており、LOT マーカーである Nrp1 抗体を用いた免疫染色法によって軸索を可視化し、胎生 16 日目において軸

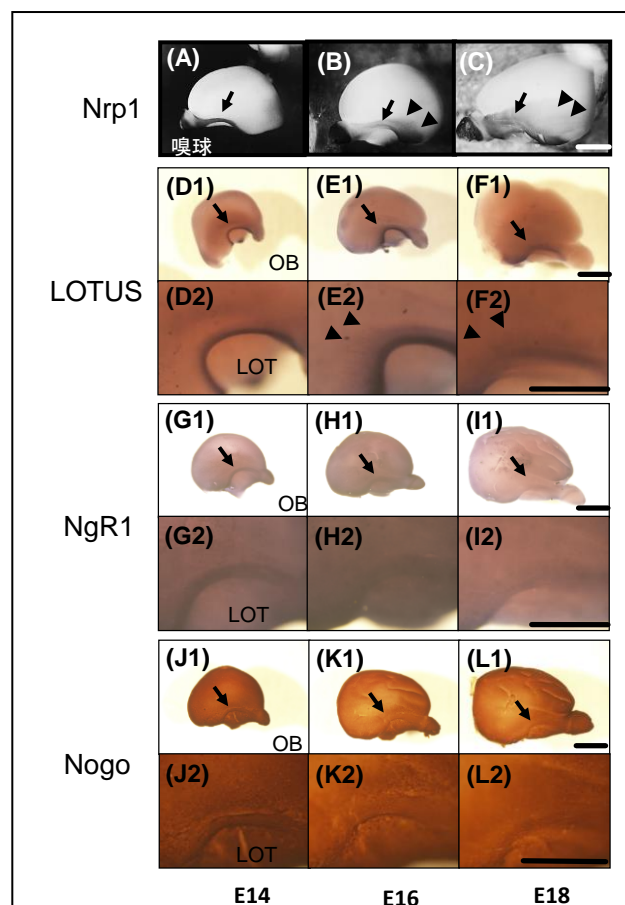


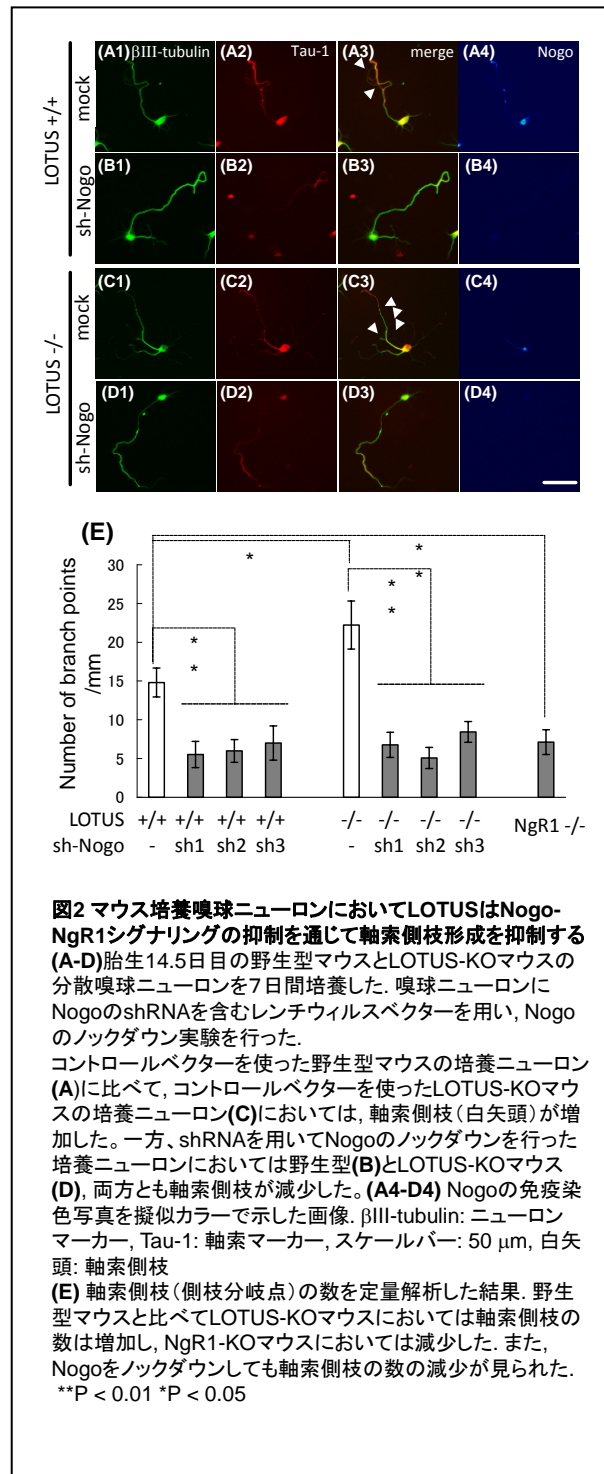
図1 LOT における LOTUS, NgR1, Nogo の発現パターン。(A-L) 発生期のマウス終脳側面。(A-C) 胎生 14-18 日目の LOT を Nrp1 (LOT マーカー) で染色した写真。軸索側枝 (黒矢印) が胎生 16 日目から出現する。胎生 14-18 日目におけるマウス終脳 LOTUS (F-H), NgR1 (I-K), Nogo (L-N) の分布。(F2-N2) は (F1-N1) の拡大図。スケールバー: 1 mm, 黒矢印: LOT, 黒矢頭: 軸索側枝。

索側枝を確認した(図 1A-E)。今回、胎生 14 日、16 日、18 日目のマウス終脳の染色を行ったところ、LOT の東化が完了した胎生 14 日目以降にも発現していることが明らかになった(図 1F-N)。また、LOTUS においては軸索側枝にも発現が認められ、軸索側枝形成に関係していると予測された(図 1G2,H2)。

先行研究において LOTUS が NgR1 シグナリングを抑制することが知られている(Sato et al. 2011)。そこで、LOTUS による NgR1 シグナリングの抑制が軸索側枝形成に関与しているかどうか培養嗅覚ニューロンの初代培養を用いて検討した。野生型マウスと比べて LOTUS ノックアウト(KO)マウスの培養嗅球ニューロンにおいては軸索側枝の数が増加し、NgR1-KO マウスにおいては軸索側枝の数が減少した(図 2A-E)。また、shRNA を用いた Nogo のノックダウン実験においても軸索側枝の減少が観察された(図 2A-E)。このことより LOTUS が、Nogo-NgR1 シグナリングによって起こる軸索側枝の発生を LOTUS が抑制していることが明らかとなった。

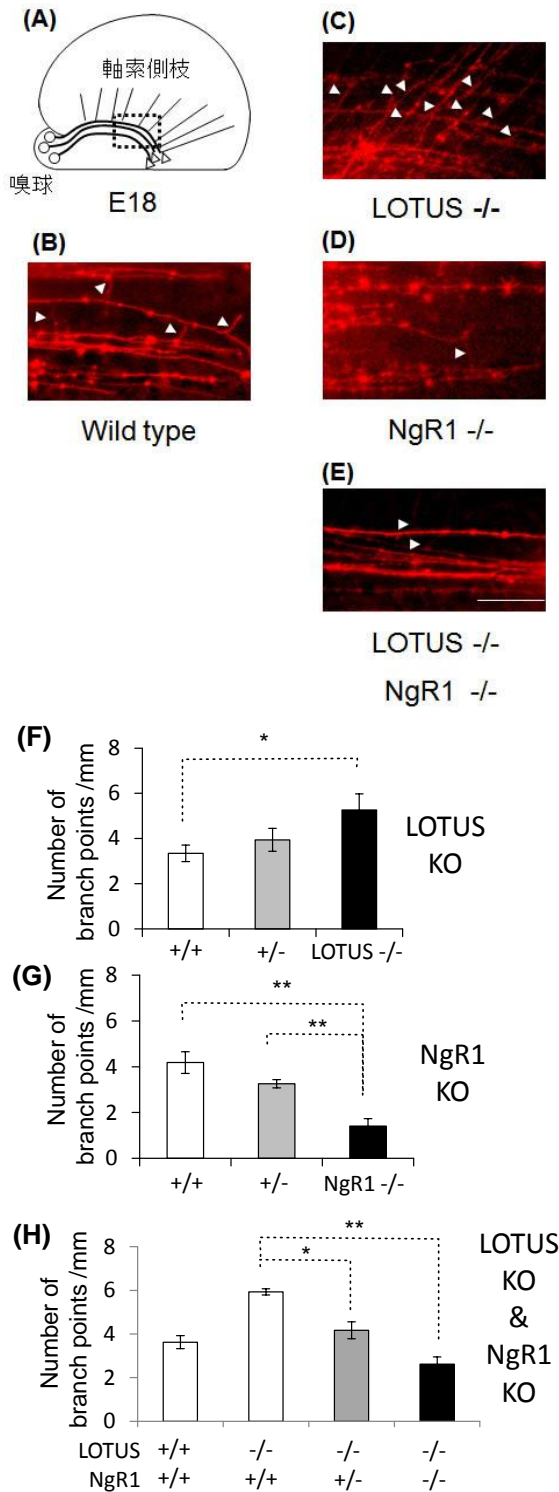
最後に、胎生 18 日目の LOTUS-KO マウスの LOT の軸索側枝を蛍光色素 DiI によって可視化した所、生体内においても野生型と比べて軸索側枝の数の増加が観察され(図 3 C,F)、NgR1-KO マウスと LOTUS/NgR1-ダブル KO マウスにおいては減少が観察された(図 3 D,E,G,H)。これらのことより LOTUS が Nogo-NgR1 シグナリングを通じた軸索側枝形成を制御することによって、LOT の軸索側枝形成に寄与していることが明らかとなった。

今回、LOTUS が Nogo-NgR1 シグナリングの制御を通じて LOT の軸索側枝形成に寄与していることが明らかとなった。LOTUS は唯一の内在性の NgR1 拮抗物質として見出されたものであり(Sato, et al.



**図2** マウス培養嗅球ニューロンにおいてLOTUSはNogo-NgR1シグナリングの抑制を通じて軸索側枝形成を抑制する(A-D)胎生14.5日目の野生型マウスとLOTUS-KOマウスの分散嗅球ニューロンを7日間培養した。嗅球ニューロンにNogoのshRNAを含むレンチウイルスベクターを用い、Nogoのノックダウン実験を行った。コントロールベクターを使った野生型マウスの培養ニューロン(A)に比べて、コントロールベクターを使ったLOTUS-KOマウスの培養ニューロン(C)においては、軸索側枝(白矢頭)が増加した。一方、shRNAを用いてNogoのノックダウンを行った培養ニューロンにおいては野生型(B)とLOTUS-KOマウス(D)、両方とも軸索側枝が減少した。(A4-D4) Nogoの免疫染色写真を擬似カラーで示した画像。βIII-tubulin: ニューロンマーカー, Tau-1: 軸索マーカー, スケールバー: 50 μm, 白矢頭: 軸索側枝  
(E) 軸索側枝(側枝分岐点)の数を定量解析した結果。野生型マウスと比べてLOTUS-KOマウスにおいては軸索側枝の数は増加し、NgR1-KOマウスにおいては減少した。また、Nogoをノックダウンしても軸索側枝の数の減少が見られた。  
\*\*P < 0.01 \*P < 0.05

2011)、未解明の部分が多い。LOTUS の結合相手である NgR1 は Nogo などの神経再生阻害因子の受容体として有名な分子だが(GrandPre, et al. 2002)、その生理機能はあまり知られていない。LOTUS は内在性の NgR1 アンタゴニストであるので、LOTUS と NgR1 の結合が NgR1 機能の ON/OFF を決める制御要因となる。このような観点から NgR1 の機能を推察する先行



**図3** LOTUSとNgR1はLOTの軸索側枝形成に寄与する。**(A)**胎生18日目マウス終脳側面の模式図。点線で囲んだ枠内を解析した。**(B-E)**胎生18日目の野生型マウス、LOTUS-KOマウス、NgR1-KOマウス、LOTUS/NgR1ダブル-KOマウスの終脳側面。野生型マウス**(B)**に比べLOTUS-KOマウス**(C)**では軸索側枝(白矢頭)が増加し、NgR1-KOマウス**(D)**、LOTUS/NgR1ダブル-KOマウス**(E)**においては減少していた。スケールバー: 50  $\mu$ m, 白矢頭: 軸索側枝**(F-H)** 軸索側枝の数の定量解析結果。**(F)** 野生型, LOTUSヘテロ(+/-), LOTUS-KO(-/-)マウスの比較。**(G)** は野生型, NgR1ヘテロ(+/-), NgR1-KO(-/-)マウスの比較..**(H)** はLOTUS-KO(-/-)マウスを遺伝的背景としたNgR1野生型(+/+), NgR1ヘテロ(+/-), NgR1-KO(-/-)マウスの比較. \*\* $P < 0.01$  \* $P < 0.05$ .

にLOTUSとNgR1の相互作用が関与することが明らかとなり、NgR1の生物学的な存在意義の理解につながった。また、LOTの軸索側枝形成に関してはカルマン症候群関連分子であるAnosmin-1が存在し、軸索側枝形成と病態との関連性が報告されており(Soussi-Yanicostas et al. 2002)、同様にLOTUSとNgR1の関係も関わる可能性がある。また、NogoとNgR1は中枢神経に広く局在している為、LOT以外でのLOTUSとの相互作用も予想され、NogoとNgR1が関与する神経変性疾患や脳損傷との関連性が明らかになる可能性がある。最近、我々はNogo以外のNgR1と結合する神経再生阻害因子も同様にLOTUSが抑制することを発見しており(Kurihara et al. 2014)、これらを含めて、障害を受け消失した神経機能再建のための治療法を考える上で重要であると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Kurihara Y, Iketani M, Ito H, Nishiyama K, Sakakibara Y, Goshima Y, Takei K. LOTUS suppresses axon growth inhibition by blocking interaction between Nogo receptor-1 and all four types of its ligand. Mol Cell Neurosci. 61 巻, 211-218 頁, 2014 年, 査読有

[学会発表] (計 1 件)

① 廣川智子, 榊原裕介, 栗原裕司, 池谷真澄, 五嶋良郎, 竹居光太郎 (2014) 脊髄損傷後の神経再生における内在性 Nogo 受容体アンタゴニスト LOTUS の役割. 第 37 回日本神経科学会, 2014 年 9 月 13 日, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市.

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

池谷 真澄 (IKETANI, Masumi)

横浜市立大学・生命医科学研究科・共同研究員

研究者番号: 60644359