

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19700292
 研究課題名（和文） 転写調節因子 Arx 及び Fez による一次嗅覚神経回路形成機構の解析
 研究課題名（英文） olfactory neural circuit formation by transcription factors: Arx and Fez.
 研究代表者
 吉原 誠一（YOSHIHARA SEIICHI）
 奈良県立医科大学 医学部 助教
 研究者番号：90360669

研究成果の概要：

転写調節因子である Arx 及び Fez 遺伝子の欠損マウスにおいて、嗅細胞の軸索が嗅球へと到達できない嗅覚神経回路形成の異常が見られる。Arx 及び Fez 遺伝子の下流に存在し嗅覚神経回路形成の制御をしている遺伝子を同定するために、Fez 遺伝子欠損マウスの嗅上皮及び Arx 遺伝子欠損マウスの嗅球において発現量の変化している遺伝子を DNA マイクロアレイによって探索した。これらの遺伝子群の中から、細胞接着分子・転写制御因子・シグナル伝達分子などの神経回路形成に関与すると予想される遺伝子について in situ hybridization を用いて野生型及び Fez 遺伝子欠損マウス、Arx 遺伝子欠損マウスの嗅覚系における発現パターンと発現量を調べた。その結果、Arx 遺伝子欠損マウスの嗅球においては細胞分裂を制御する分子である Prc1, 転写調節因子である EBF3, 細胞接着分子である Plexin C1 の 3 種類の遺伝子の発現が嗅球介在神経細胞において野生型に比べて減少していた。これらの遺伝子が嗅球介在神経細胞の分化・移動および嗅細胞の嗅球への軸索投射を制御している可能性があることが示された。

また嗅球介在神経細胞に遺伝子導入をする新たな系としてレンチウイルスの系の導入を試みた。GFP 遺伝子を搭載したレンチウイルスを新生仔マウスの脳室に注入して感染させ、2 週間後に解剖して解析したところ新生嗅球介在神経細胞に効率よく GFP 遺伝子が導入され、新生神経細胞の可視化が可能になった。今後このレンチウイルスの系を用いて新生嗅球介在神経細胞の分化・樹状突起の伸展などに関与する遺伝子の機能解析を行う予定である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：1. 脳・神経 2. 発生・分化 3. 嗅覚神経 4. 軸索投射

1. 研究開始当初の背景

一次嗅覚神経系は匂い分子を受容する嗅細胞とその情報伝達先である嗅球内の神経細胞が非常に精密な神経回路網を形成することで成立している (Cell 116:329-336, 2004.)。近年、主に遺伝子工学の手法を用いたマウスの解析から、この一次嗅覚神経回路形成過程において嗅覚受容体遺伝子自身及び **neuropilin-1** や **ephrin** といったいくつかの細胞認識分子が関与していることが明らかになっている。しかし、この精密な嗅覚神経回路の形成機構にはまだまだ不明な点が多い。

申請者らが最近報告したホメオボックス型転写調節因子である **Arx** 遺伝子とジンクフィンガー型転写調節因子である **Fez** 遺伝子のノックアウトマウスの解析から、嗅細胞の軸索投射と嗅球の形態形成が互いに密接に影響を及ぼしながら相互依存的に発達することが明らかになった (Development 132:751-762, 2005; Development 133:1433-1443, 2006)。さらに嗅細胞の軸索投射を制御する分子の発現は、嗅細胞においては **Fez** 遺伝子によって、嗅球の細胞 (嗅球の介在神経細胞もしくは **radial glia**) においては **Arx** 遺伝子によってそれぞれ制御されていることが示唆された。また、嗅細胞と嗅球の細胞で発現し、軸索投射を制御する分子同士は受容体とリガンドの関係になっていることが予想された。

本研究計画では **Fez** 遺伝子及び **Arx** 遺伝子が発現を制御している軸索ガイダンス分子もしくは細胞認識接着分子等を同定し、その機能を明らかにすることで嗅覚神経回路形成の分子機構を明らかにすることを目指す。さらにこの嗅覚神経回路形成を解析することで脳内の神経回路形成機構に関する重要な基盤的知見の発見へとつながることを期待する。

2. 研究の目的

これまでの申請者の **Arx** 遺伝子及び **Fez** 遺伝子欠損マウスに関する解析結果から、嗅細胞の軸索投射を制御する分子の発現が嗅細胞においては **Fez** 遺伝子によって、嗅球の細胞においては **Arx** 遺伝子によってそれぞれ制御されていると推測された。

Arx 遺伝子及び **Fez** 遺伝子ノックアウトマ

ウスは嗅細胞の軸索投射異常と嗅球の層形成の異常を共に起こしているという嗅覚神経回路形成の研究の観点から見て極めて興味深い表現系を持つ変異マウスである。この嗅細胞の軸索投射異常の原因遺伝子を DNA マイクロアレイによって探索することで、嗅覚神経回路形成の分子機構の解析が大きく進むことを期待する。これまでの解析から嗅細胞の軸索投射と嗅球の形態形成は互いに影響を及ぼしながら発達していると推測された。このことから **Arx** 遺伝子及び **Fez** 遺伝子ノックアウトマウスノックアウトマウスを解析することによって嗅細胞の軸索投射だけでなく嗅球の形態形成の機構についても新たな知見が得られるであろう。

これらの嗅覚神経回路形成機構について今後解析を進めることで、脳内の複雑な神経回路の形成の基本原理となるものが見つかることが大いに期待できると考えられる。

3. 研究の方法

これまでの申請者による **Arx** 及び **Fez** の遺伝子欠損マウスに関する解析結果から、嗅細胞の軸索投射を制御する分子の発現が嗅細胞においては **Fez** 遺伝子によって、嗅球の細胞においては **Arx** 遺伝子によってそれぞれ制御されていると推測された。その存在が推測された嗅細胞の軸索投射を制御する分子を同定するために、以下のようにマイクロアレイ実験を行う。

まず、正常な野生型マウスの嗅上皮 (嗅細胞の存在する組織) と **Fez** 遺伝子ノックアウトマウスのそれから **total RNA** を抽出し DNA マイクロアレイによって発現量の変化した遺伝子を比較する実験と野生型マウスの嗅球と **Arx** 遺伝子ノックアウトマウスのそれを DNA マイクロアレイによって比較する実験の2つの実験を行う。この2種類の DNA マイクロアレイ実験によって得られた発現量の変化した遺伝子の中から細胞接着もしくは軸索伸長に関与すると思われる膜タンパク及び分泌タンパク質の遺伝子を選び出しさらに解析を行う。現在までに野生型マウスの嗅球と **Arx** 遺伝子ノックアウトマウスのそれを DNA マイクロアレイによって比較する実験は既に終了しており発現量の変化した遺伝子の中から細胞接着もしくは軸索伸長に関与する可能性のある膜タンパク及び

分泌タンパク質遺伝子が 20 種類程度見つかった。

DNA マイクロアレイによって得られた嗅細胞の軸索投射に関与する可能性のある遺伝子群については、*in situ hybridization* もしくは免疫組織染色によって野生型及び *Fez* 遺伝子、*Arx* 遺伝子ノックアウトマウスでの発現細胞の同定と発現量の変化を明らかにする。もし嗅細胞の軸索投射に関与する遺伝子であるならば、*Fez* と *Arx* 遺伝子はそれらの遺伝子の発現をそれぞれ cell-autonomous に制御すると考えられるので、*Fez* ノックアウトマウスで発現量の変化している遺伝子は嗅細胞で発現し、*Arx* ノックアウトマウスで発現量の変化している遺伝子は嗅球の介在神経細胞もしくは radial glia で発現していると考えられる。(Arx 遺伝子は一次嗅覚神経系では嗅球の介在神経細胞と radial glia で発現している。) *in situ hybridization* 及び免疫組織染色によって、その発現パターンから嗅細胞の軸索投射に関与する可能性が高い遺伝子を見つけ出す。

見つけた *Fez* もしくは *Arx* 遺伝子によって発現制御される嗅細胞の軸索投射に関与する可能性が高い遺伝子に関して、以下の実験を行うことで嗅覚神経回路形成におけるそれらの遺伝子の機能解析を行う。その実験とは、トランスジェニックマウスのシステムを用いることで *Fez* 遺伝子もしくは *Arx* 遺伝子ノックアウトマウスでの嗅細胞の軸索投射のレスキューを試みる実験である。具体的には、*Fez* 遺伝子によって発現制御される遺伝子は、嗅細胞特異的な OMP プロモーターの制御下に置いて、その遺伝子の嗅細胞特異的な強制発現を試みる。また、*Arx* 遺伝子によって発現制御される遺伝子は、嗅覚系では嗅球の介在神経細胞特異的な発現を示す *Dlx5* プロモーターもしくは radial glia 特異的な発現を示す *blbp* プロモーターの制御下に置いて、嗅球の特定の細胞種特異的な発現を試みる。これらのトランスジェニックマウスと *Fez* 遺伝子もしくは *Arx* 遺伝子ノックアウトマウスを掛け合わせたマウスにおいて嗅細胞の軸索投射がレスキューされるのかを調べることで、その遺伝子の嗅細胞の軸索投射における機能を明らかにする。

また、*Arx* 遺伝子ノックアウトマウスにおいては嗅細胞の軸索投射だけではなく嗅球の介在神経細胞において脳室周辺から嗅球への移動にも異常が見られた。野生型マウスの嗅球と *Arx* 遺伝子ノックアウトマウスのそれを DNA マイクロアレイによって比較する実験において、発現量の差のある遺伝子の中には嗅球の介在神経細胞の移動に関与する遺伝子も含まれていると考えられる。マイクロアレイの解析で得られた遺伝子の中で神経細胞の移動に関与する遺伝子が見つかった

ならば嗅細胞の軸索投射の場合と同様に以下の実験を行う。まず *in situ hybridization* 及び免疫組織染色によって、その遺伝子の発現が *Arx* 遺伝子ノックアウトマウスの嗅球の介在神経細胞において変化しているのかを確かめる。確かに嗅球の介在神経細胞において発現が変化していたならば *Dlx5* プロモーターを用いて嗅球の介在神経細胞特異的にその遺伝子を強制的に発現させるトランスジェニックマウスを作製する。そのマウスと *Arx* 遺伝子ノックアウトマウスを掛け合わせることで嗅球の介在神経細胞の移動がレスキューされるかを調べる。嗅球の介在神経細胞はその産生と嗅球への移動が胎生期のみならず成体時においても常時起きているという特徴をもっている。*Arx* 遺伝子によって発現が制御されている嗅球の介在神経細胞の移動に関与する遺伝子が成体時の嗅球への移動にも関与しているかは非常に興味深い点である。成体時の嗅球への移動については *Arx* 遺伝子欠損のヘテロの雌マウスを解析することで明らかになるであろう。(Arx 遺伝子は X 染色体上に存在するため、*Arx* 遺伝子欠損のヘテロの雌マウスでは正常な *Arx* 遺伝子を持った細胞と *Arx* 遺伝子欠損の細胞のモザイクになっている。) また、嗅球の介在神経細胞の移動がレスキューされた場合、*Arx* 遺伝子ノックアウトマウスの他の表現型である嗅細胞の軸索投射異常及び嗅球の層形成の異常がどう変化するのかを解析することで、介在神経細胞の移動と関連性があるのかを調べる。

4. 研究成果

転写調節因子である *Arx* 及び *Fez* 遺伝子の欠損マウスにおいて、嗅細胞の軸索が嗅球へと到達できない嗅覚神経回路形成の異常が見られる。*Arx* 及び *Fez* 遺伝子の下流に存在し嗅覚神経回路形成の制御をしている遺伝子を同定するために、*Fez* 遺伝子欠損マウスの嗅上皮及び *Arx* 遺伝子欠損マウスの嗅球において発現量の変化している遺伝子を DNA マイクロアレイによって探索した。これらの遺伝子群の中から、細胞接着分子・転写制御因子・シグナル伝達分子などの神経回路形成に関与すると予想される遺伝子について *in situ hybridization* を用いて野生型及び *Fez* 遺伝子欠損マウス、*Arx* 遺伝子欠損マウスの嗅覚系における発現パターンと発現量を調べた。その結果、*Arx* 遺伝子欠損マウスの嗅球においては細胞分裂を制御する分子である *Prc1*、転写調節因子である *EBF3*、細胞接着分子である *Plexin C1* の 3 種類の遺伝子の発現が嗅球介在神経細胞において野生型に比べて減少していた。これらの遺伝子が嗅球介在神経細胞の分化・移動を制御している可

能性があることが示された。

また嗅球介在神経細胞に遺伝子導入をする新たな系としてレンチウイルスの系の導入を試みた。GFP 遺伝子を搭載したレンチウイルスを新生仔マウスの脳室に注入して感染させ、2 週間後に解剖して解析したところ新生嗅球介在神経細胞に効率よく GFP 遺伝子が導入され、新生神経細胞の可視化が可能になった。今後このレンチウイルスの系を用いて新生嗅球介在神経細胞の分化・樹状突起の伸展などに関与する遺伝子の機能解析を行う予定である。

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. Kaneko-Goto T, Yoshihara S, Miyazaki H, Yoshihara Y.

BIG-2 mediates olfactory axon convergence to target glomeruli.

Neuron 57: 834-846 (2008)

[学会発表] (計 3 件)

1. Yoshihara S, Takahashi H, Sawamura M and Tsuboi A.

Developmental analysis of olfactory bulb interneurons upon neural circuit formation with the lentiviral system

Keystone Symposia: Chemical Senses, Granlibakken, USA (2009)

2. 吉原誠一、高橋弘雄、坪井昭夫

エレクトロポレーションおよびレンチウイルスベクターを用いたマウス嗅覚神経回路形成機構の解析

第 31 回日本神経科学学会大会、東京 (2008) .

3. 吉原誠一、日比正彦、北村邦夫、吉原良浩、坪井昭夫

嗅覚系の発達過程における転写因子 Arx 及び Fez の下流因子の解析

第 30 回日本神経科学学会大会、横浜 (2007) .

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉原 誠一 (YOSHIHARA SEIICHI)

奈良県立医科大学 医学部 助教

研究者番号：90360669