

平成 23 年 5 月 30 日現在

機関番号： 82401

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21700369

研究課題名（和文）

二次嗅覚ニューロン特異的転写因子 Tbx21 の機能および嗅細胞依存的動態の解析

研究課題名（英文） Roles of Tbx21 in mitral/tufted cells

研究代表者

水口 留美子 (MIZUGUCHI RUMIKO)

独立行政法人理化学研究所・シナプス分子機構研究チーム・研究員

研究者番号： 70450418

研究成果の概要（和文）：

マウス嗅球僧帽・房飾細胞における Tbx21、Tbr2 の役割を明らかにすることを目的とし、遺伝子ターゲティングマウスの解析を行った。Tbx21 は僧帽・房飾細胞の発生に必須な役割を持たないが、成体で再生した嗅細胞の嗅球への軸索投射に関与することが示唆された。一方、Tbr2 は僧帽・房飾細胞の分化過程において正常な遺伝子発現や樹状突起の投射、介在ニューロンとの相互作用などに必須であることが明らかとなった。このことから、Tbx21 と Tbr2 は嗅覚神経回路形成においてそれぞれ異なる機能を担うことが示された。

研究成果の概要（英文）：

To explore the functional roles of Tbx21 and Tbr2 in mitral/tufted cells in the mouse olfactory bulb, I analyzed their loss-of-function phenotypes using gene-targeting strategy. Tbx21 knockout mice showed a slight delay of regenerated olfactory sensory neurons to innervate the olfactory bulb, but the development of mitral/tufted cells was grossly normal. In contrast, loss of Tbr2 in mitral/tufted cells resulted in expressional changes of developmentally-regulated genes and abnormalities in dendritic morphology of mitral/tufted cells, which led to defects in interactions with inhibitory interneurons in the olfactory bulb. These results demonstrate that Tbr2 is required for proper differentiation of mitral/tufted cells as well as neuronal wiring in the olfactory bulb. It is also revealed that Tbx21 and Tbr21 have different functions in mitral/tufted cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：神経発生、嗅覚神経回路、僧帽・房飾細胞、T-box 転写因子、Tbx21 (Tbet)、Tbr2 (Eomes)、遺伝子ターゲティングマウス

## 1. 研究開始当初の背景

T-box 転写因子は、様々な細胞の分化や機能に関わることが知られている。その中で、Tbr1 遺伝子ファミリーに属する Tbr1、Tbr2 (Eomes)、Tbx21 (T-bet) は、発生期および成体マウス嗅球の投射ニューロン（僧帽・房飾細胞）で発現する。なかでも Tbx21 は、神経系の他の部位ではほとんど発現が認められず、僧帽・房飾細胞特異的に発現するが、Tbx21 の嗅覚神経系における機能は現在までほとんど明らかにされていない。代表者は、5%硫酸亜鉛または0.7% Triton X-100 を用いて成体マウスの嗅上皮を人為的に除去すると、僧帽・房飾細胞の核で Tbx21 の蛋白質量が顕著に上昇することを見いだした。Tbx21 量は嗅上皮除去後 7～10 日前後でピークを示し、3 週間程度で再び通常レベルに低下する。Tbx21 が高発現する時期は、嗅細胞が再生し嗅球へ再投射を行う時期と一致することから、Tbx21 は嗅細胞の嗅球への軸索投射に何らかの役割を担う可能性が示唆された。

一方、Tbr2 は嗅球僧帽・房飾細胞で Tbx21 とよく似た発現パターンを示し、嗅上皮の除去によっても Tbx21 と同様に僧帽・房飾細胞の核で発現誘導される。Tbr2 は造血細胞で Tbx21 と重複した機能を持つことが知られており、嗅覚神経系でも両者は近い機能を持つのではないかと推察された。

そこで本研究では、嗅覚神経系における Tbx21、Tbr2 の機能について、僧帽・房飾細胞の発生・分化、および成体での機能の両面から解析を行うことにした。

## 2. 研究の目的

本研究では、発生期および成体マウス嗅覚

神経系における Tbx21、Tbr2 の機能を解明することを目的とし、主に以下の3つの項目について解析を行った。

(1) 成体マウスでの、嗅細胞依存的な Tbx21 の発現制御のメカニズムを調べる。また、嗅細胞の再生および軸索投射における Tbx21 の役割を明らかにする。

(2) 僧帽・房飾細胞の発生・分化における Tbx21 の機能を解明する。

(3) 僧帽・房飾細胞における Tbx21、Tbr2 の機能的重複性および差異を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 嗅細胞依存的な Tbx21 の発現制御のメカニズムの解析

嗅上皮の除去による Tbx21 の発現誘導は、(1) 嗅細胞からの匂い刺激の入力、または(2) 嗅細胞の嗅球への軸索投射、のいずれかの消失が引き金となって起こると考えられる。この2つの可能性について検証するために、まずマウスの片鼻鼻腔を閉鎖し匂い刺激を除去した際に、Tbx21 の発現がどのように変化するかを免疫組織化学によって調べる。一方、CNGA2 (cyclic nucleotide-gated ion channel A2) は嗅細胞の活性化に必須な分子で、この遺伝子のヘテロノックアウトマウスでは、モザイク状に一部の糸球体で匂い刺激の伝達が阻害されることが知られている。そこで次に、このマウスの不活性化した糸球体近傍の僧帽・房飾細胞での Tbx21 発現を調べる。これらの実験により、匂い刺激の入力の有無によって Tbx21 の発現が変化するか検証を行う。

### Tbx21 ノックアウトマウスの解析① (嗅細胞の再生・軸索投射)

僧帽・房飾細胞での Tbx21 の発現誘導が、嗅細胞の再生・軸索投射に果たす役割を明らかにするために、野生型および Tbx21 ノックアウトマウス

の嗅上皮を 0.7% Triton X-100 処理によって除去し、その後の嗅細胞の再生過程を、嗅細胞のマーカーである OMP の免疫組織化学を用いて観察する。Tbx21 が欠失することによって、嗅覚細胞の再生や嗅球への軸索投射に遅れや変化が見られるか、また嗅球への投射のパターンに異常が生じるかなどを調べる。

#### Tbx21 ノックアウトマウスの解析② (僧帽・房飾細胞の発生・分化)

Tbx21 ノックアウトマウスを用いて、僧帽・房飾細胞の発生・分化における Tbx21 の役割を解明する。免疫組織化学や *in situ* hybridization により、僧帽・房飾細胞の分化に関わる遺伝子や神経伝達物質などの発現を野生型マウスと比較する。蛍光色素の細胞内注入、Golgi 染色等により、僧帽・房飾細胞の形態や投射パターンに異常が起こるか調べる。BrdU ラベルや TUNEL 染色により、僧帽・房飾細胞の増殖やアポトーシスについて調べる。嗅細胞の嗅球への軸索投射や介在ニューロンの数や形態など、細胞非自律的な変化や他のニューロンとの相互作用についても、各種マーカーに対する免疫組織化学などを用いて解析を行う。

#### 僧帽・房飾細胞における Tbr1 ファミリー遺伝子の機能解析

まず、発生期および成体マウス僧帽・房飾細胞での Tbr1 ファミリー (Tbr1、Tbr2、Tbx21) の発現を、免疫組織化学によって細胞レベルで詳細に調べる。

次に遺伝子ターゲティングマウスを用いて、僧帽・房飾細胞における Tbr2 の機能を解析する。Tbr2 ノックアウトマウスは致死であるため、Cre-loxP システムを用いて僧帽・房飾細胞特異的に Tbr2 遺伝子を不活化したマウスを作製する。僧帽・房飾細胞で Cre 組換え酵素を発現するマウス (Pcdh21-Cre マウス ; Y. Nagai et al. 2005) と、Tbr2 遺伝子座に flox 配列を組込んだマ

ウス (Eomes<sup>flox/flox</sup> マウス ; C. Mao et al. 2008) を交配し、僧帽・房飾細胞特異的 Tbr2 コンディショナルノックアウトマウスを得る。このマウスを用いて、僧帽・房飾細胞の発生・分化、および成体での機能について Tbx21 ノックアウトマウスと同様の解析を行い、両者の表現型の違いを比較する。

さらに Tbx21/Tbr2 二重ノックアウトマウスを作製し、それぞれ単独遺伝子のノックアウトマウスと表現型の違いを調べ、両者の協調的作用について考察を行う。

#### Tbx21 の下流遺伝子の探索

Tbx21 は転写因子であるため、その作用を知るためには標的遺伝子の同定が重要である。そこで GeneChip を用いた発現解析により、僧帽・房飾細胞における Tbx21 の下流遺伝子の探索を行う。野生型および Tbx21 ノックアウトマウス嗅球の新鮮凍結切片よりレーザーマイクロダイセクション法にて僧帽細胞層近傍のみを単離し、cDNA を作製する。これをプローブとしてマウスゲノムアレイに対するハイブリダイゼーションを行い、Tbx21 の有無により発現が変化する遺伝子を探索する。得られた候補遺伝子の僧帽・房飾細胞での発現を *in situ* hybridization により調べる。これら分子の嗅覚神経系における機能を Tbx21 と関連づけながら解析を行う。

#### 4. 研究成果

鼻腔閉鎖により片側の嗅球への匂い入力を除去したマウスの僧帽・房飾細胞では、Tbx21 の発現変化は認められなかった。また CNGA2 ヘテロノックアウトマウスにおいて不活性化した糸球体近傍の僧帽・房飾細胞でも、Tbx21 の発現は亢進していなかった。このことより、嗅細胞の除去による Tbx21 の発現誘導は、匂い刺激の入力に依存せず、嗅細胞からの軸索投射によって制御されている可能性が高いと考えられた。

Tbx21 ノックアウトマウスの僧帽・房飾細胞は正常に発生し、細胞形態や遺伝子発現などに目立

った異常は認められなかった。このことから、Tbx21 は単独では僧帽・房飾細胞の発生・分化に必須な役割を持たないことが示された。野生型および Tbx21 ノックアウトマウスの嗅上皮を除去し、その後時系列を追って再生した嗅細胞が嗅球へ投射する過程を観察したところ、Tbx21 ノックアウトマウスは嗅細胞の再生は正常に起こるが、嗅細胞の嗅球への軸索投射が野生型に比べて若干（数日程度）遅れることが明らかとなった（図1）。

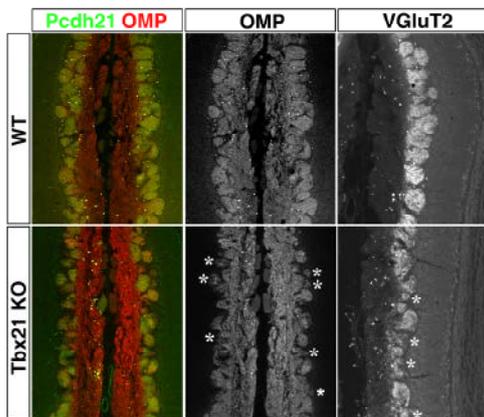


図1 Tbx21 欠失による、嗅細胞の軸索投射の遅れ

野生型（上段）および Tbx21 ノックアウトマウス（下段）の嗅上皮を 0.7% TritonX-100 で除去し、4週間後再生した嗅細胞の嗅球への投射の様子を、抗 OMP 抗体および抗 VGluT2 抗体を用いた免疫組織化学により観察した。Tbx21 ノックアウトマウスでは、嗅細胞の軸索投射が遅れることにより、糸球体（緑）での OMP および VGluT2 の染色性が悪く、糸球体の大きさも小さくなっていることがわかる（星印）。

鼻腔閉鎖や CNGA2 ノックアウトマウスの結果と考え合わせると、Tbx21 は嗅細胞からの軸索投射が消失することにより僧帽・房飾細胞核で発現誘導され、その下流で何らかのシグナルを介して細胞非自律的に再生した嗅細胞の再投射を促進しているのではないかと考えられた。しかし、Tbx21 ノックアウトマウスでは、嗅細胞の軸索投射に遅れは見られるものの最終的には正常な投射が起こる。また発生段階における嗅細胞の嗅球への軸索投射には目立った異常は認められなかった。これらのことから、Tbx21 は嗅細胞の軸索投射に必須な分子ではなく、補助的な役割を担うか、あるいは他に機能を補完する遺伝

子が存在することが示唆された。興味深いことに、Tbx21 ノックアウトマウスでは、嗅上皮の除去による Tbr2 の発現誘導が野生型の約2倍に亢進していた。このことから、嗅細胞の軸索投射の制御において Tbr2 が Tbx21 の機能を代償する可能性が示唆された。

Tbx21 が僧帽・房飾細胞の発生や機能に必須な役割を持たなかったため、Tbx21 の関連遺伝子の機能解析を行うことにした。免疫組織化学により、僧帽・房飾細胞での Tbr1 ファミリー分子 (Tbr1、Tbr2、Tbx21) の発現パターンを詳細に調べた結果、成体マウスの房飾細胞は Tbx21 と Tbr2 を共発現する細胞群と、Tbr1 のみを発現する細胞群の、少なくとも2つのサブタイプが存在することが明らかとなった。一方、僧帽細胞では、Tbx21、Tbr1、Tbr2 が細胞ごとに異なるレベルで共発現していた。これらの発現パターンから、Tbr1 ファミリーは僧帽・房飾細胞においてそれぞれ異なる機能を持つことが示唆された。

Tbr2 は房飾細胞で Tbx21 と発現パターンが一致し、嗅上皮の除去によっても Tbx21 と同様に僧帽・房飾細胞で発現誘導されることから、Tbx21 と類似した機能を持つのではないかと考えられた。そこで、僧帽・房飾細胞特異的 Tbr2 コンディショナルノックアウトマウスを作製し解析を行った。このマウスの僧帽・房飾細胞では Tbr1 の発現が顕著に上昇していたが、Tbx21 に関しては目立った変化は認められなかった。また、Tbr2 から Tbr1 への変化に伴って、小胞グルタミン酸トランスポーターのサブタイプの一つである VGluT1 の発現が低下し、代わりに VGluT2 が増加していた。房飾細胞では通常 Tbr2/VGluT1<sup>+</sup> 細胞と Tbr1/VGluT1<sup>+</sup>VGluT2<sup>+</sup>細胞の2種類が存在するが、Tbr2 の欠失により前者が後者へと変化することから、Tbr2 は通常 Tbr1 の発現を抑制することによって房飾細胞のサブタイプの決定に関与しているのではないかと考えられた。僧帽細胞は房飾細胞のようにはっきりとしたサブタイプには分類

できないが、細胞ごとに異なるレベルの Tbr1、Tbr2 が発現し、VGlutTs を含めた細胞の特性を決定していると考えられた。

また、これら遺伝子発現の変化と同時に、Tbr2 コンディショナルノックアウトマウスでは、僧帽・房飾細胞の一次樹状突起が野生型よりも細く、糸球体への投射パターンも乱れていることが分かった (図2)。さらに、僧帽・房飾細胞の樹状突起へ投射する抑制性介在ニューロンの数が顕著に減少していた。Tbr2 の欠失により僧帽・房飾細胞の形態に異常が生じ、その結果、樹状突起の投射や介在ニューロンとの相互作用が正常に行われなくなったと考えられる。

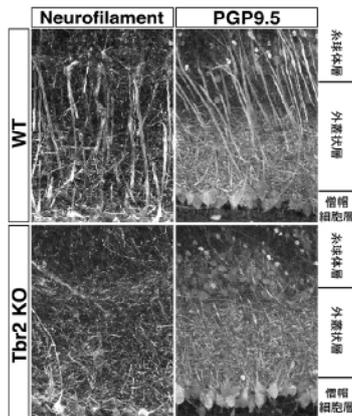


図2 Tbr2 欠失による僧帽・房飾細胞の樹状突起の構造変化

野生型 (上) および Tbr2 コンディショナルノックアウトマウス (下) 成体嗅球の冠状切片に対して、抗 Neurofilament 抗体 (左) および抗 PGP9.5 抗体 (右) を用いた免疫組織化学を行った。Tbr2 コンディショナルノックアウトマウスでは、僧帽・房飾細胞の一次樹状突起が細くなり、投射パターンも乱れていることが分かる。

NFκB のリン酸化を指標として僧帽・房飾細胞の神経活性をモニターしたところ、Tbr2 コンディショナルノックアウトマウスは野生型マウスに比べて、同じ匂い刺激に対してより多くの僧帽・房飾細胞が活性化することが明らかとなった (図3)。Tbr2 コンディショナルノックアウトマウスでは、抑制性介在ニューロンからの入力を正しく受けられないために、僧帽・房飾細胞間の側方抑制が起りにくくなっているのではないかと考え

られた。

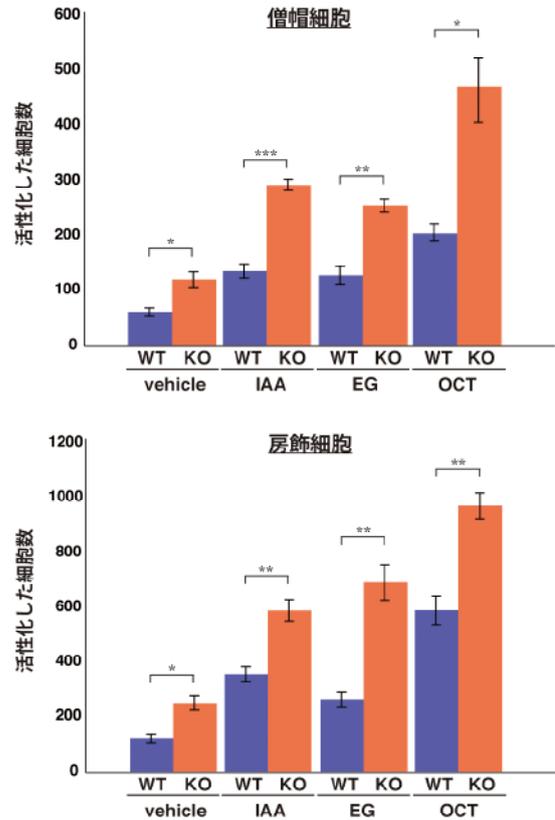


図3 匂い刺激による僧帽・房飾細胞の過剰な活性化

野生型 (WT) および Tbr2 コンディショナルノックアウトマウス (KO) に、様々な匂い物質 (IAA: イソアミル酢酸、EG: オイゲノール、OCT: オクタナール) および溶媒 (vehicle) を嗅がせ、10 分後に活性化した僧房細胞 (上) および房飾細胞 (下) の数を比較した。Tbr2 コンディショナルノックアウトマウスでは、どの匂い物質に対しても野生型より多くの僧帽・房飾細胞が活性化することが示された。

以上の結果より、Tbr2 は僧帽・房飾細胞の正常な発生と機能に重要な役割を果たすことが示された。また、機能的にも正しい匂い識別などに関与している可能性が示唆された。Tbr2 コンディショナルノックアウトマウスは Tbx21 ノックアウトマウスと異なる表現型を示したことから、Tbx21 と Tbr2 は僧帽・房飾細胞で少なくとも一部は異なる機能を果たすと考えられた。

次に、Tbr2 コンディショナルノックアウトマウスを Tbx21 ノックアウトマウスと交配することにより、Tbx21/Tbr2 二重ノックアウトマウスを作製した。現在までの解析では、このマウスは Tbr2 コンディショナルノックアウトマウスと非常に良く似た表現型を示し、二重ノックアウトにすることによって生じた新しい表現型は見つかつ

ていない。このことから、僧帽・房飾細胞の発生・分化において *Tbr2* は *Tbx21* と独立して働く可能性が高いと考えられた。成体マウスでの嗅細胞の再生・軸索投射における *Tbr2* の役割および *Tbx21* との関連については現在解析中である。

GeneChip 解析により、野生型と *Tbx21* ノックアウトマウスで発現量が異なる遺伝子の探索を行った。得られた候補遺伝子のうち、データベース (Allen Brain Atlas) で僧帽・房飾細胞に発現が見られるものについて、cDNA をクローニングし *in situ* hybridization を行った。その結果、神経ペプチドであるニューロメジン B、構造蛋白質として知られるクリスタリン $\mu$  やケラチン 12、Wnt 阻害因子である *Wif1*、など複数の遺伝子が僧帽・房飾細胞で *Tbx21* によって発現制御されていることが明らかとなった。現在、これら遺伝子の嗅覚神経系における機能について解析を行っている。

## 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)

[学会発表] (計 3 件)

①Rumiko Mizuguchi, Yoshihiro Yoshihara  
*Tbr2* is required for proper differentiation of mitral/tufted cells in the mouse olfactory bulb.  
The 40<sup>th</sup> annual meeting of the Society for Neuroscience  
平成 22 年 11 月 16 日 San Diego Convention Center (San Diego)

②水口 留美子、吉原 良浩  
Roles of T-box transcription factors in mitral/tufted cells  
第 8 回国際シンポジウム “味覚嗅覚の分子神経機構”  
平成 22 年 11 月 7 日 九州大学医学部 (福岡市)

③水口 留美子、吉原 良浩  
マウス嗅球僧帽・房飾細胞の分化における *Tbr2* の機能  
Neuro2010 (第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経科学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会)  
平成 22 年 9 月 4 日 神戸コンベンションセンター (神戸市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水口 留美子 (MIZUGUCHI RUMIKO)  
独立行政法人理化学研究所・シナプス分子機構研究チーム・研究員  
70450418

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者