

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21700387

研究課題名（和文） セマフォリンシグナルによる嗅球の軸索投射制御機構

研究課題名（英文） Semaphorin signaling in the central olfactory projections

研究代表者

川崎 能彦 (KAWASAKI TAKAHIKO)

国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・助教

研究者番号：00322751

研究成果の概要（和文）：セマフォリンシグナルに関与するさまざまな分子を欠失したマウスを用いて、嗅球の軸索投射におけるセマフォリンシグナルの機能について解析した。その結果、セマフォリンシグナルに関わる分子の中には、嗅球軸索投射を細胞自立的に制御するものと、細胞比自立的に制御するものが存在することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：From studies of central olfactory projections using mice deficient for several molecules of semaphorin signaling, I found that several semaphorin signaling guide the projections cell-autonomously and non-cell-autonomously.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学、神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経回路網・軸索ガイダンス

1. 研究開始当初の背景

(1) さまざまな神経活動を担う多種多様な神経回路も、基本的な構造は全て遺伝的なプログラムに従って形づくられる。近年、神経軸索の伸長をガイドする軸索ガイダンス分子が多数同定されてきたが、同定されたガイダンス分子の数は決して多いとは言えず、未同定の軸索ガイダンス分子や、既知の軸索ガイダンス分子間の未知の作用機構が多数存在すると考えられる。

(2) 私はこれまでの研究から、嗅球から終脳への軸索投射の制御には、軸索ガイダンス分子として知られるセマフォリンが複数関与しており、それぞれのセマフォリンが異なる役割を担うことや、異なるセマフォリンのシグナル経路がクロストークすることを示唆

する予備的な結果を得ていた。セマフォリンは sema ドメインを持った一群の分子ファミリーで、分泌型の class 3 セマフォリン (Sema3) や、膜貫通型の class 6 セマフォリン (Sema6) を含む 20 種類以上の遺伝子が存在する。これらセマフォリンは、受容体膜分子であるニューロピリン (Nrp) やプレキシシン (Pln) を介して細胞内にシグナルを伝える。マウスのゲノム中には、7 つの Sema3s (Sema3A-G)、4 つの Sema6s (Sema6A-D)、2 つの Nrps (Nrp1, 2) と、4 つの PlnAs (PlnA1-4) が存在する。各セマフォリンにはシグナルを伝えるための受容体に好みがあり、主に in vitro の研究から、その対応関係は単純な一対一ではないことが示されている (表 1)。

表 1

Sema3A	Nrp1, PlnA4, (PlnA3)
Sema3C	Nrp1, Nrp2
Sema3F	Nrp2, PlnA3, (PlnA4)
Sema6A	PlnA2, PlnA4
Sema6B	PlnA4
Sema6D	PlnA1

2. 研究の目的

セマフォリンとその受容体分子の複雑な対応関係から、シグナル伝達におけるこれらの分子間の複雑なクロストークが予想されるが、そのようなクロストークが実際に生体内で機能し、神経回路形成に関与しているのかについては、具体的には明らかになっていなかった。そこで、嗅球軸索投射をモデルとして、複数のセマフォリンシグナルが協調的に軸索投射を制御する仕組みについて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ネットワークとしてのセマフォリンシグナルの役割について、嗅球軸索の神経回路をモデルとして、遺伝子破壊マウスを用いながら *in vivo* と *in vitro* の両方の系を用いて解析した。

(1) 遺伝子発現パターンの解析：セマフォリンシグナルを構成する各種の遺伝子について、嗅球軸索やその投射経路における発現パターンを免疫染色や *in situ* ハイブリダイゼーションを用いて解析した。

(2) 遺伝子ノックアウトマウス胚の表現型解析：セマフォリンシグナルを構成する分子のうち、Sema3A, Sema3C, Sema3F, Sema6s, Nrp1, Nrp2, PlnA1, PlnA2, PlnA3, PlnA4 などの遺伝子に注目し、これらの遺伝子について入手可能な遺伝子破壊マウス系統や遺伝子機能改変マウス系統を用いて、嗅球軸索の投射パターンを解析した。表現型の解析は嗅球軸索をサブポピュレーションごとに区別しながら行った。解析にはそれぞれのサブポピュレーションを特異的に認識する抗体を用いた免疫染色の他、蛍光色素を用いた軸索ラベルなどの方法を用いた。

(3) 組み合わせ培養：嗅球の組織片と、各種のセマフォリンを発現する株細胞をコラーゲンゲルの中に包埋して共培養し、嗅球軸索の各セマフォリンに対する応答性を調べた。野生型マウス胚だけでなく、各種の受容体遺伝子を欠いたマウス胚から調整した嗅球組織片を用いることで、嗅球軸索上での各セマフォリンのシグナル伝達に必要な受容体をの同定を目指した。

(4) リガンド結合アッセイ；各セマフォリンが実際に嗅球軸索にどのように結合する

かを調べた。野生型マウス胚や、Nrp や PlnA を欠失したマウス胚の終脳に対して、アルカリフォスファターゼを融合した各種のセマフォリンを作用させて、各セマフォリンの結合パターンを解析した。

(5) 受容体間の直接的な相互作用の確認；クロストークの予想された受容体の組み合わせに対して、分子間の直接的な結合について免疫沈降法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子発現パターンの解析：Sema3A, Sema3C, Sema3F および Sema6s について、胚発生期に嗅球軸索の投射領域にそれぞれ異なるパターンで発現することを確認した。特に Sema3A は嗅球軸索のターゲットとなる一部の領域に強い発現が認められた。受容体に関しては、Nrp1, Nrp2, PlnA1, PlnA3 が嗅球軸索に発現することが確認できたが、PlnA2, PlnA4 は伸長中の嗅球軸索にはほとんど発現しないことが明らかとなった。

(2) 培養系を用いた Sema3A と Sema3F シグナルのクロストークの解明：野生型マウス胚ならびに、各種の受容体遺伝子破壊マウス胚から嗅球の一部を取り出し、コラーゲンゲルの中で各種のセマフォリンを発現する細胞塊と共培養して、嗅球軸索のセマフォリンに対する応答性を調べた。その結果、副嗅球と呼ばれる嗅球のサブ領域から生じる神経軸索は Nrp2 依存的に Sema3F に応答することを明らかにした。面白いことに、主嗅球と呼ばれる嗅球サブ領域から生じる軸索は Nrp2 を欠失すると Sema3A に対する応答性を新たに獲得することが明らかとなった。この結果は、Nrp2 は嗅球の軸索投射において Sema3A と Sema3F の2つのセマフォリンシグナルに関与するが、それぞれのシグナルで異なる機能を担っていることを示唆している。

(3) マウス胚を用いた Sema3A シグナルと Sema3F シグナルのクロストークの検証：培養系を用いることで明らかとなった Nrp2 を介した Sema3A と Sema3F のシグナル制御機構が、実際に生体内での嗅球の軸索投射に関与しているかどうかを検証するために、遺伝子欠失マウス胚における嗅球軸索投射の表現型についてラベル法を用いて解析した。その結果、培養系で確認された結果に沿うような軸索投射の異常を遺伝子破壊マウス胚でも確認することができた。①Nrp2 および Sema3F を欠失したマウス胚の副嗅球軸索は脱束化や異所的な投射を起こした。この表現型は Sema3F による投射抑制が欠失したことにより生じたと解釈すれば、培養系で得られた結果と一致する。②一方、Nrp2 を欠失したマウス胚の主嗅球軸索は、軸索の束が細くなったり、側枝形成が低下したりするなど、全体として軸索投射が減弱していた。ここに表現型は

新たに Sema3A の投射抑制のシグナルが主嗅球軸索に働いたと考えると培養系で得られた結果に矛盾しない。この新しく獲得されたと思われる Sema3A への応答性は、Nrp1 と PlnAs を同時に欠失することでレスキューされることも明らかとなり、主嗅球軸索では、何らかの形で Nrp2 が Sema3A シグナルを抑えていることが示唆された。

(4) リガンド結合アッセイ：各種セマフォリンを標識して、嗅球軸索への結合パターンを解析した。特に Nrp2 を欠失した際に、嗅球軸索に対する結合パターンに変化が見られるかなどに注目して解析を行ったが、セマフォリンの結合パターンに大きな変化は認められなかった。

(5) 免疫沈降：セマフォリンシグナルに関わる分子の直接的な結合の有無について、免疫沈降法を用いて解析した。当初はマウスの嗅球組織そのものをサンプルとして解析を進めたが、検出感度の問題などから、株細胞を用いてサンプルを抽出した。特に Nrp2 の有無によるその他の受容体の結合様式について注目して解析を行った。その結果、Nrp1 と Nrp2 は競合しながら PlnA に結合することなどが明らかとなった。そのことから、これらの競合的な結合が主嗅球軸索で認められた Sema3A シグナルと Nrp2 の相互作用の原因の一つであることが示唆された。

(6) PlnA2 と PlnA4 の機能：PlnA2 と PlnA4 は、伸長時の嗅球軸索には発現していないにも関わらず、これらの遺伝子破壊マウス胚では、嗅球軸索投射に異常が生じることを明らかにした。このことはこれらの PlnAs が細胞非自律的に嗅球軸索投射を制御していることを示している。PlnA2、PlnA4 の遺伝子破壊マウスで見られる表現型は、Sema3A シグナルや Sema3F シグナルを欠失したマウス胚の表現型とは異なることから、嗅球軸索投射において PlnA2 と PlnA4 は Sema3A、Sema3F 以外のリガンドと相互作用している可能性が考えられた。そこでその他のリガンド候補である Sema6s に注目して、遺伝子破壊マウス胚における表現型を観察したところ、PlnA2 と PlnA4 の遺伝子破壊マウスで観察された異常に類似した表現型を見いだすことができた。このことは PlnA2 と PlnA4 は嗅球軸索投射において Sema6s と相互作用しながら軸索投射を細胞非自律的にガイドしていることを示している。

(7) 以上の結果から、セマフォリンシグナルに関わる分子の中には、嗅球軸索投射を細胞自律的に制御するものと、細胞比自律的に制御するものが存在すると結論づけることができる。また実際に生体内で、複数の複数のセマフォリン受容体がダイナミックに相互作用していることが明らかとなった。これらの相互作用は、限られた遺伝子で複雑な軸

索ガイダンスを行うことを可能にしていると考えられる。

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 4 件)

① Yamatani, H., Kawasaki, T., Mita, S., Inagaki, N. and Hirata, T. (2010) Proteomics Analysis of the Temporal Changes in Axonal Proteins during Maturation.

Dev. Neurobiol. 70 523-537. 査読有り

DOI:10.1002/dneu.20794

② Sato, Y., Iketani, M., Kurihara, Y., Yamaguchi, M., Yamashita, N., Nakamura, F., Arie, Y., Kawasaki, T., Hirata, T., Abe, T., Kiyonari, H., Strittmatter, S. M., Goshima, Y. and Takei, K. (2011) Cartilage acidic protein-1B (LOTUS), an endogenous Nogo receptor antagonist for axon tract formation.

Science Vol. 333 769-773. 査読有り

DOI:10.1126/science.1204144

③ Suzuki, I. K., Kawasaki, T., Gojobori, T. and Hirata, T. (2012) The temporal sequence of the mammalian neocortical neurogenetic program drives mediolateral pattern in the chick pallium.

Dev. Cell Vol. 22 863-870. 査読有り

DOI:10.1016/j.devcel.2012.01.004

④ Hirata, T., Kumada, T., Kawasaki, T., Furukawa, T., Aiba, A., Conquet, F., Saga, Y. and Fukuda, A. (2012) Guidepost neurons for the lateral olfactory tract: expression of metabotropic glutamate receptor 1 and linnervation by glutamatergic olfactory bulb axons.

Dev. Neurobiol. (in press) 査読有り

DOI:10.1002/dneu.22030

[学会発表] (計 8 件)

① 川崎能彦、平田たつみ

Novel function of Nrp2 as an inhibitor of Sema3A signaling in the projection of olfactory bulb axons 第 42 回日本発生生物学学会年会 新潟 2009 年 5 月 28-31 日

② 佐藤泰史 他

新規な軸索ガイダンス分子 LOTUS LOTUS, a novel axon guidance molecule 第 32 回日本神経科学大会 名古屋 2009 年 9 月 16-18 日

③川崎能彦、平田たつみ
嗅球軸索投射における Nrp2 の Sema3A シグナル阻害作 Construction and reconstruction of the brain 淡路 2009 年 10 月 8-10 日

④川崎能彦、平田たつみ
Interaction of semaphorin signaling in the central olfactory projection 第 43 回日本発生生物学会年会 京都 2010 年 6 月 20-23 日

⑤川口将史 他
Development of the nervous system in the turtle trunk region 第 43 回日本発生生物学会年会 京都 2010 年 6 月 20-23 日

⑥川口将史 他
カメ体幹部における末梢神経系の発生機構:脊椎動物の神経系の進化 Development of the peripheral nervous system in turtles; with reference to the evolution of the vertebrate trunk region 第 33 回日本神経科学大会 神戸 2010 年 9 月 2-4 日

⑦川崎能彦、平田たつみ
Distinct functions of PlnA family proteins in the central olfactory projection 嗅覚中枢軸索投射における PlnA ファミリー分子の機能 第 44 回日本発生生物学会年会 沖縄 2011 年 5 月 18-21 日

⑧川口将史 他
羊膜類の体幹部末梢神経系の進化 Evolution of developmental plan for peripheral nervous system in amniote trunk region 第 34 回日本神経科学大会 横浜 2011 年 9 月 14-17 日

[その他]

ホームページ

<http://www.nig.ac.jp/section/hirata/hirata-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川崎 能彦 (KAWASAKI TAKAHIKO)

国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・助教
研究者番号: 00322751