

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430045

研究課題名(和文) 遺伝学的手法を用いた嗅球-嗅結節神経回路の解析

研究課題名(英文) Study of the central olfactory projection with genetic methods

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：目的とする軸索ガイダンスシグナルのConditional KOマウス系統を作製した。全身や終脳特異的にCreリコンビナーゼを発現するマウスと交配して得たマウス胚では、単純な遺伝子破壊マウスと同様の異常が嗅覚中枢神経回路に生じたが、嗅球の投射神経細胞特異的にCreリコンビナーゼを発現するマウス系統と交配して得たマウス胚では、嗅覚中枢神経回路に大きな異常が生じないことが明らかとなった。Creリコンビナーゼの活性を高めるために、テトラサイクリンを介した遺伝子発現誘導システムを導入したが、これらのシステムも嗅球の投射神経細胞では上手く機能しないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Conditional KO mice for target axon guidance signaling were made. With proper activity of the Cre recombinase, these mice showed abnormal phenotype in the axon guidance. However, two mice lines which express Cre recombinase in the olfactory bulb could not show enough activity to induce abnormal network formation in the central olfactory system. The tTA/tetO system also did not work well in the central olfactory projection.

研究分野：神経発生

キーワード：神経回路形成

1. 研究開始当初の背景

(1) 匂いの情報は、終脳先端に位置する「嗅球」に集められた後、嗅球の投射神経細胞である「僧帽細胞」と「房飾細胞」の軸索を介して、複数の嗅覚中枢領域へと伝達される。僧帽細胞と房飾細胞は匂い情報に対して異なるタイプの応答を示すことが知られており、僧帽細胞が嗅覚中枢全般を広くターゲットとするのに対して、房飾細胞は「嗅結節」などの一部の嗅覚中枢領域を主要なターゲットにしていることなどが明らかにされている(図1; 参考文献①~③)。このような解剖学的理解が進む一方で、嗅球と個々の嗅覚中枢をつなぐ神経回路については、その発生過程や機能局在についての理解が不足している。特に、それぞれの嗅覚中枢領域への軸索投射を制御する分子メカニズムや、個々の嗅覚中枢領域が担う生理的な役割については不明な点が多い。

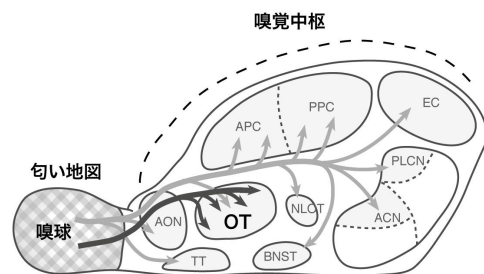


図1 嗅覚中枢神経回路の模式図：僧帽細胞の軸索(薄い矢印)が多くの中枢領域へ投射するのに対して、房飾細胞の軸索(濃い矢印)は嗅結節(OT)などの少数の中枢領域を主要なターゲットにする。

(2) さまざまな軸索ガイダンス分子を欠失させたマウス胚を用いたこれまでの研究から、Netrin-1/DCC シグナルを含む幾つかの軸索ガイダンスシグナルを欠失したマウス胚では、嗅覚中枢領域への軸索投射にさまざまな異常が生じることを予備的に見いだしてきた(参考文献)。これらのマウス胚の中には、嗅覚中枢領域への軸索投射が部分的に異常なものもある。これらの表現型異常を、これまでに報告されてきた解剖学的な知見と照らし合わせると、Netrin-1/DCC シグナルを含む幾つかの軸索ガイダンスシグナルを欠失したマウス胚では、僧帽細胞と房飾細胞の軸索投射に、それぞれ異なるタイプの異常が生じていることが示唆された。もしそうであるならば、僧帽細胞と房飾細胞の軸索投射は、これらの軸索ガイダンスシグナルに対して、異なる応答性や依存性を示す可能性が高い。

(3) Netrin-1/DCC を含む軸索ガイダンス分子シグナルの多くは、マウスの全身で遺伝子破壊してしまうと、胚胎生致を引き起こしたり、生後すぐに死亡したりしてしまう。そのため成体マウスを用いた表現型解析ができず、神経回路の異常が引き起こす行動異常

から、その神経回路の機能を探るといったような研究アプローチが困難であった。

2. 研究の目的

Netrin-1/DCC シグナルを含む幾つかの軸索ガイダンスシグナルに対する応答性や依存性の違いを利用することで、嗅覚中枢神経回路を僧帽細胞と房飾細胞の軸索投射経路として遺伝学的に分解し、解析することを計画した。特に、僧帽細胞と房飾細胞で軸索投射のパターンの違いが顕著な嗅結節への軸索投射に注目し、これらの神経回路の形成を制御する分子機構を明らかにするとともに、神経回路が担う生理的な機能についても手掛かりを得ることを目指した。

3. 研究の方法

(1) Netrin-1/DCC シグナルを全身で欠失したマウスは、何らかの理由で生後数日以内に死亡してしまうことから、これまでは成体マウスを用いた表現型解析や行動解析ができなかった。そこで、DCC を conditional にノックアウトするために、DCC 遺伝子を flox したマウス[DCC (loxP) マウス]を作製する。その後、このマウスを嗅球の投射神経細胞で特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウスと掛け合わせることで、嗅球の投射神経細胞特異的に Netrin-1/DCC シグナルが欠失したマウスを作製する。Cre リコンビナーゼを嗅球の投射神経細胞で発現するマウスには、すでに報告されている Pcdh21-Cre マウス(文献)と AP-2ε-Cre マウス(文献)の2系統のマウスを使用する。

(2) 嗅球の投射神経細胞で特異的に Netrin-1/DCC シグナルを欠失させたマウスを得たら、これらのマウスに対して、抗体染色や軸索トレーサーを用いたラベルなどの手法を用いて、嗅覚中枢神経回路の表現型異常について解剖学的に解析する。全身で DCC を欠失させたマウス胚の表現型と比較するとともに、これまでは解析できなかった成体マウスにおける表現型異常について詳しく解析する。

(3) 嗅球の投射神経細胞で特異的に Netrin-1/DCC シグナルを欠失させたマウス胚では、全身で Netrin-1/DCC シグナルを欠失させたマウス胚と同様に、嗅覚中枢領域への軸索投射に異常が生じることを確認する。その後、それら軸索投射異常の生じたマウスを成体まで飼育し、嗅覚に関わる行動を解析して、投射異常が生じた神経回路の本来の生理的な機能について明らかにすることに挑戦する。

4. 研究成果

(1) 作製した遺伝子改変マウスの評価：DCC を conditional にノックアウトするために、DCC 遺伝子を flox した DCC (loxP) マウス系統を作製した。次に、DCC (loxP) マウスを Cre リコンビナーゼを全身 (ROSA-Cre

マウス)や、終脳特異的(Emx1-Cre マウス)に発現するマウスと交配し、得られたマウス胚の表現型を解析した。その結果、これらのマウス胚では、DCC が全身で欠失したマウス胚とほぼ同様の軸索投射異常が嗅覚中枢神経回路に生じていることが確認できた。掛け合わせたCreリコンビナーゼ発現マウス系統ごとに、新皮質や小脳皮質における異常の有無、目的遺伝子の発現パターンの変化などを大まかに解析し、作製したConditional ノックアウトマウスがデザインした通りにCreリコンビナーゼ活性依存的に遺伝子が破壊されていることを確認した。

(2) 嗅球特異的な遺伝子破壊: 作製したDCC (loxP) マウス系統を、嗅球の投射神経細胞特異的にCreリコンビナーゼを発現する2系統のマウス(Pcdh21-Cre マウスとAP-2 $\epsilon$ -Cre マウス)と交配し、それぞれ得られたマウス胚の表現型を解析した。その結果、これらのマウス胚では全身でDCCを欠失させたマウス胚と比較して、嗅覚中枢神経回路に生じる異常がマイルドな胚が多く含まれることを確認した。これらの結果は、Pcdh21-Cre マウスやAP-2 $\epsilon$ -Cre マウスではマウス胚の嗅球投射神経細胞におけるCreリコンビナーゼの活性が十分ではない可能性を示唆している。レポーターマウスを用いてCreリコンビナーゼ活性をモニターした解析も、その可能性を支持する結果を示した。そこで計画を変更し、嗅球投射神経細胞におけるCreリコンビナーゼの活性を増強するために、テトラサイクリンを介した遺伝子発現誘導システム(Pcad21-tTA マウスおよびTg-tetO-Cre マウスの併用)の導入を試みた。この発現誘導システムは、嗅球の投射神経細胞特異的に発現したtTAが、tetOプロモーターに作用してCreリコンビナーゼの発現を引き起こす。しかしながら、このシステムも上手く機能しなかった。Pcad21-tTA マウスが嗅球の投射神経細胞で十分な量のtTAを発現することについては確認できたが、tTAを受けたTg-tet-Cre マウスが何らかの理由で嗅球の投射神経細胞で十分なCreリコンビナーゼ活性を発揮できないことが明らかとなった。活性が不十分な原因を探ったところ、Tg-tetO-Cre マウスにおけるテトラサイクリン応答配列(tetO)が、嗅球の投射神経細胞の多くでエピジェネティックに抑制されていることを強く示唆する結果を得た。一方、これらのエピジェネティックな抑制は、興味深いことに一部の嗅球投射神経細胞では起きないことから、そのことを逆に利用することで、嗅球の投射神経細胞のサブグループについて解析することが可能であることが明らかとなった。

(3) 嗅覚中枢神経回路以外での解析: 上述したように、嗅球の投射神経細胞で特異的に遺伝子破壊することが困難となってしまったため、研究の計画を変更する必要がある。幸いにも、DCCを含む幾つかの軸索ガイダ

ンス分子をConditionalにノックアウトするために作製を進めて来たマウス系統は、デザインした通りにCreリコンビナーゼ活性依存的に遺伝子を破壊することができる。そこで計画を変更して、Creリコンビナーゼの活性が確実なEmx1-Creマウスとの交配を行って、これらの軸索ガイダンス分子を欠失したマウスの終脳皮質における表現型異常を解析した。その結果、終脳皮質の層構造形成を制御する新しい分子メカニズムについて明らかにすることができた。

<参考文献> Mori K. and Sakano H. *Annu. Rev. Neurosci.* **34** 467(2011), Nagayama S. *et al. J. Neurophysiol.* **91** 2532(2004), Nagayama S. *et al. Frontiers in Neural Circuits* **4** 120(2010), Fouquet C. *et al. J. Neurosci.* **27** 3037(2007), Kawasaki T. *et al. Development* **133** 845(2005), Nagai Y. *et al. genesis* **43** 12(2005), Feng W. *et al. Mol. Cell. Neurosci.* **42** 161(2009).

#### 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)

Kanatani S., Honda T., Aramaki M., Hayashi K., Kubo K., Ishida M., Tanaka DH., Kawachi T., Sekine K., Kusuzawa S., Kawasaki T., Hirata T., Tabata H., Uhlén P. and Nakajima K. (2015) The COUP-TFII/Neuropilin-2 is a molecular switch steering diencephalon-derived GABAergic neurons in the developing mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol.112 E4985-4994 査読あり DOI: 10.1073/pnas.1420701112

Ito T., Bai T., Tanaka T., Yoshida K., Ueyama T., Miyajima M., Negishi T., Kawasaki T., Takamatsu H., Kikutani H., Kumanogoh A and Yukawa K. (2015) Semaphorin 4D induces vaginal epithelial cell apoptosis to control mouse postnatal vaginal tissue remodeling. *Mol Med Rep*. Vol.11 829-836 査読あり DOI: 10.3892/mmr.2014.2773

Mita S., de Monasterio-Schrader P., Fünfschilling U., Kawasaki T., Mizuno H., Iwasato T., Nave KA., Werner HB. and Hirata T. (2015) Transcallosal Projections Require Glycoprotein M6-Dependent Neurite Growth and Guidance. *Cereb Cortex*. Vol.25 4111-4125 査読あり DOI: 10.1093/cercor/bhu129

Ito T., Bai T., Tanaka T., Yoshida K., Ueyama T., Miyajima M., Negishi T., Kawasaki T., Takamatsu H., Kikutani H., Kumanogoh A. and Yukawa K. (2014) Estrogen-dependent proteolytic cleavage of semaphorin 4D and plexin-B1 enhances semaphorin 4D-induced apoptosis during postnatal vaginal remodeling in pubescent mice. PLoS One. Vol.9 e97909 査読あり DOI: 10.1371/journal.pone.0097909

〔学会発表〕(計 2件)

Yumiko Hatanaka, Takahiko Kawasaki, Tatsumi Hitrata, Yasuo Kawaguchi PlexinA2/A4-Semaphorin 6A signaling is involved in termination of migration for uppermost layer neurons in the mouse cerebral cortex. International Symposium on Adaptive Circuit Shift 2016 (ACS2016) (国際学会) 2016年3月3~4日 京都府上京区 同志社大学寒梅館

Yumiko Hatanaka, Takahiko Kawasaki, Tatsumi Hitrata, Yasuo Kawaguchi PlexinA2/A4 signaling is necessary for proper termination of migration for uppermost part of layers 2/3 neurons in the mouse cerebral cortex. 新学術領域「大脳皮質構築」終了公開国際シンポジウム(国際学会) 2016年2月11~12日 東京都文京区 東京大学小柴ホール

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
<https://www.nig.ac.jp/labs/Brain/new/j/>

## 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