

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 5月28日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010年～2011年

課題番号：22790189

研究課題名（和文） 嗅覚系の発生過程におけるニューロナルロイシンリッチリピート4遺伝子の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of NLRR-4 gene in the mouse olfactory system during development.

研究代表者

板東 高功（BANDO TAKAYOSHI）

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教

研究者番号：00423963

研究成果の概要（和文）：成獣および発生過程の嗅覚関連組織において、NLRR-4 遺伝子の発現解析を行った。成獣において、NLRR-4 の発現は、嗅上皮では嗅細胞に、嗅球では mitral cell と tufted cell に、嗅皮質では piriform cortex で認められた。一方、鋤鼻器において NLRR-4 はフェロモン受容体 V2R を発現する上皮細胞に発現が認められた。さらに、社会性の行動解析から、NLRR-4 遺伝子欠損雄マウスは雄マウスに対して攻撃性の低下および雄マウスの尿から回避する行動をとることが明らかになった。したがって、NLRR-4 は嗅覚系の発生およびフェロモン受容においても重要な役割を担っている可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：In this study, I investigated the expression of NLRR-4 in the olfactory system during development. I found that NLRR-4 was expressed in the olfactory epithelium, olfactory bulb, and piriform cortex. In the vomeronasal organ, NLRR-4 was detected in pheromone receptor V2R-positive-epithelial cells but not in V1R-positive cells. In the behavioral analysis, NLRR-4-gene knockout male mice showed reduction of the aggressive responses for the other male mice and the avoidance behavior for male urine. These results suggested that NLRR-4 was involved in the development of the olfactory system and the function of vomeronasal system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・）

キーワード：NLRR-4、嗅覚、細胞接着分子

1. 研究開始当初の背景

マウス嗅覚系は、数十万もの匂い分子を識別する能力を備えており、匂い分子は嗅上皮で受容される。匂い分子の識別に関する研究は、Buckらが嗅覚受容体（odorant receptor、以下OR）を同定し、発展してきた。ORはマウスにおいて約1000種もの遺伝子群からな

っているが、1つの嗅上皮の嗅細胞は1000種のOR遺伝子からmono-allelicな1種のORを選択し発現することが明らかとなっている(one cell-one receptor)。また、同じORを発現した嗅細胞は、同一の糸球体にその軸索を集束させる。嗅球表面には約2000の糸球体が存在するが、嗅細胞はそのうちの特定の1

対(lateral 側、medial 側に1つずつ)に軸索を投射する。つまり、個々の糸球体は特定の OR からの情報を獲得し、二次ニューロン (mitral cell や tufted cell) へと情報を伝達する(図 1 B)。また、嗅上皮と嗅球はそれぞれ4つの zone に分類することができ、嗅上皮から嗅球へ Zone 特異的投射(zone-to-zone projection)のルールにしたがって嗅細胞は投射する。この様な嗅覚系の発生過程は非常に複雑であるにも関わらず、秩序だって形成され、その発生過程には様々なガイダンスシステムが存在すると考えられている。嗅上皮から嗅球への投射パターンの形成には、様々な動物種の研究から Cxcl12/Cxcr4、Robo/Slit、neuropilin/semaphorin、Eph/ ephrin、BIG-2 や Kirrel2/3 などの膜及び液性タンパク質が関与していることが明らかになっているが、1000種の異なる OR を発現するそれぞれの嗅細胞が正確に特定の糸球体にターゲットすることを説明するには十分とは言えず、未知の分子機構の存在が推測されている。

2. 研究の目的

Neuronal leucine-rich repeat 4 (NLRR-4) は、I 型の膜タンパク質で細胞外領域にタンパク質-タンパク質の相互作用に関わると考えられる Leucine-Rich Repeat (LRR)を持つことから Cell Adhesion Molecule (CAM)として働くことが想定した。また、NLRR-4 遺伝子の生体内での機能を明らかにするため、NLRR-4 遺伝子欠損マウスを作製し解析を進めてきた。NLRR-4 の脳内での発現は海馬、皮質などにみとめられ、NLRR-4 遺伝子欠損マウスは海馬依存的な学習課題において長期記憶形成後の記憶の維持に障害を示し、NLRR-4 が記憶のシステム内固定化に必須の分子であることを明らかにした。

また、NLRR-4 が脊髄神経節の1部の神経細胞に発現していることを明らかにし、詳細な発現解析を行っている。脊髄神経節において、NLRR-4 は胎生後期から生後1週の時に強く発現し、脊髄神経節の感覚神経細胞が脊髄において2次ニューロンとのシナプスを形成する時期に、NLRR-4 がシナプス形成のCAMとして機能していることが示唆した。

さらに、NLRR-4 遺伝子欠損マウスは作製過程において NLRR-4 遺伝子座に LacZ 遺伝子をノックインしているため、NLRR-4 ヘテロマウス由来の組織にβ-gal 染色を行うことで NLRR-4 遺伝子の発現をモニターすることができる。β-gal 染色法により NLRR-4 遺伝子は、海馬、皮質のみならず嗅上皮、嗅球に発現していることを明らかにした。成獣の嗅球においては mitral cell layer の一部の細胞に、

嗅上皮では嗅細胞の一部に発現していることを見出した。本研究は、嗅覚系の発生過程での NLRR-4 が担う未知のガイダンス機能の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) NLRR-4 ヘテロマウスの組織におけるβ-gal 染色法を用いた NLRR-4 遺伝子の発現解析

(2) NLRR-4 ヘテロマウスの組織におけるβ-gal 抗体と各種細胞マーカーの二重免疫染色を用いた NLRR-4 発現細胞の同定

(3) NLRR-4 遺伝子欠損マウスの行動解析

①resident-intruder 試験

②尿に対する反応

4. 研究成果

(1) 嗅上皮における NLRR-4 の発現

嗅上皮組織における NLRR-4 の発現を解析するため、NLRR-4 ヘテロマウスの嗅上皮においてβ-gal 染色を行なった。成獣において LacZ 陽性の細胞は Zone 1 から Zone IV すべてで認められた(図1)。つまり、NLRR-4 は Zone 1 から Zone IV すべてで発現していることが明らかとなった。

同様に発生過程の嗅上皮組織において解析を行なったところ、E13.5 から発現し始め段階的に増強していくことが明らかとなった。

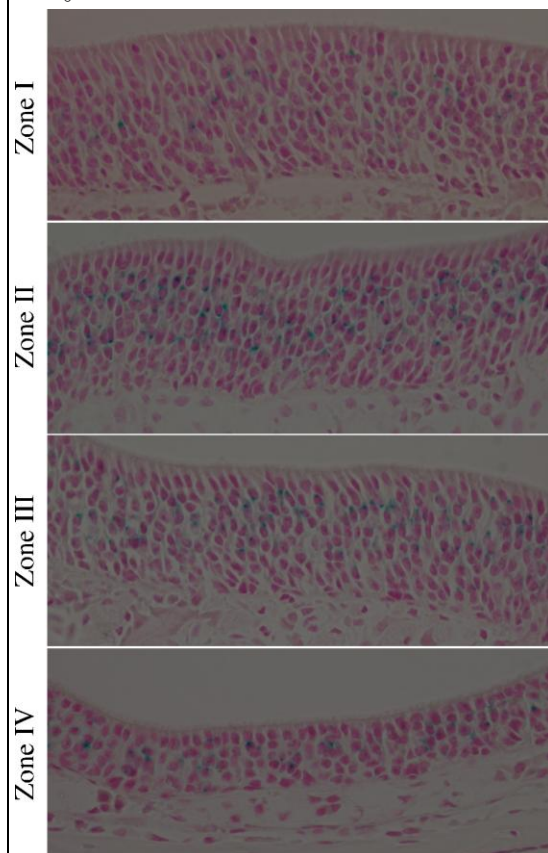


図1、成獣の嗅上皮における NLRR-4 の発現。Zone I から IV すべてで発現が認められる。

(2) 嗅球における NLRR-4 の発現

嗅球組織における NLRR-4 の発現を解析するため、NLRR-4 ヘテロマウスの嗅球においてβ-gal 染色を行なった。NLRR-4 の発現は E14.5 から発現し始め、P0 付近でピークとなり、その後、減少することが明らかとなった (図 2)。また、その発現は mitral cell layer に認められた。さらに、二重免疫染色を行なったところ、NLRR-4 発現細胞は、Reelin 陽性で NeuN 陰性であることが明らかとなり、mitral cell に発現していることが明らかとなった。

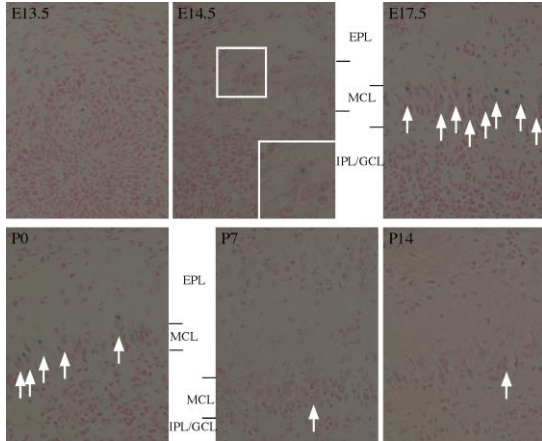


図 2、発生過程の嗅球では、NLRR-4 の発現は E14.5 から MCL において認められ、P0 付近でピークとなり、その後、減少することが明らかとなった

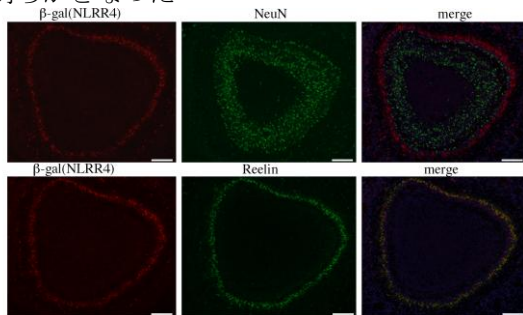


図 3、P0 の嗅球では、NLRR-4 発現細胞は Reelin を発現していたが、NeuN は発現していない。

(3) 鋤鼻器における NLRR-4 の発現

鋤鼻器における NLRR-4 の発現を解析するため、NLRR-4 ヘテロマウスの嗅球においてβ-gal 染色を行なった。NLRR-4 発現細胞は Gαo を発現していることから、フェロモン受容体 V2R 陽性の神経細胞に発現していることが明らかとなった。

(4) NLRR-4 遺伝子欠損マウスにおける resident-intruder 試験

NLRR-4 発現細胞はフェロモン受容体 V2R 陽性の神経細胞であった。V2R は、攻撃性ホルモンである MUP の受容体として働いてい

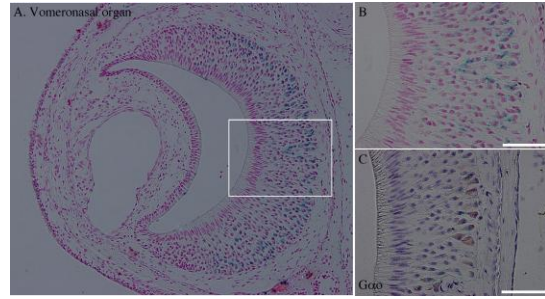
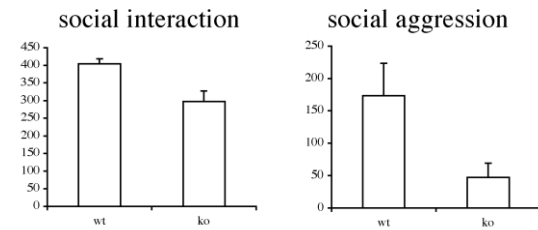


図 4、成獣の鋤鼻器における NLRR-4 の発現。NLRR-4 発現細胞は Gαo を発現している。

ることが明らかとなっている。そこで、NLRR-4 遺伝子欠損雄マウスの雄マウスに対する攻撃性を検討した。NLRR-4 遺伝子欠損雄マウス野生型マウスに比べ顕著な相互作用



用及び攻撃性の低下が認められた。図 5、NLRR-4 遺伝子欠損雄マウスの攻撃性の低下

(5) NLRR-4 遺伝子欠損マウスの尿に対する異常な反応

NLRR-4 遺伝子欠損雄マウス野生型マウスに比べ顕著な攻撃性の低下が、尿に含まれる攻撃性フェロモンの影響が否かを検討するため、尿を含ませた綿棒と水を含ませた綿棒に対する反応性を検討した。NLRR-4 遺伝子欠損雄マウスの雄マウスは、尿を含ませた綿棒に対して顕著な接触の低下が認められた。

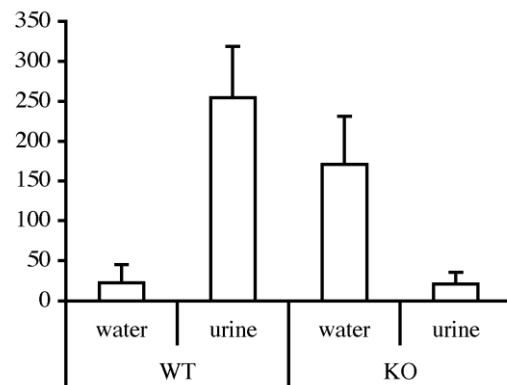


図 6、NLRR-4 遺伝子欠損雄マウスの雄マウスの尿に対する反応異常

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0件）

〔学会発表〕（計2件）

①板東高功、森川吉博、宮島篤、仙波恵美子
発生過程の小脳における Neuronal leucine-rich
repeat 4 の機能解析、P2-e16、2011 日本神経
科学大会

②板東高功、森川吉博、宮島篤、仙波恵美子
成獣及び発生過程の脳における Neuronal
leucine-rich repeat 4 の発現解析、P1-f04、2010
日本神経科学大会

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

板東 高功 (BANDO TAKAYOSHI)

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教

研究者番号：00423963

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：