

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19500284

研究課題名（和文） 嗅神経投射により誘導される終脳形態形成の分子メカニズムの解析

研究課題名（英文） Analysis of molecular mechanisms underlying the telencephalic morphogenesis induced by olfactory sensory axon projection.

研究代表者

宮坂 信彦 (MIYASAKA NOBUHIKO)

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・副チームリーダー

研究者番号：70332335

研究成果の概要：

脳の形成・発達には、末梢感覚器から脳への神経投射が重要な役割を果たすと考えられている。本研究では、嗅神経投射に異常を示すゼブラフィッシュ変異体を利用して、匂い情報の一次中枢である嗅球の発達における嗅神経投射の役割を解析した。その結果、嗅神経投射の欠損によって、嗅球の大きさの減少、シナプス部位である糸球構造の形成不全、嗅球内の種々のニューロンの細胞数の減少などが観察された。このことから、嗅神経投射が嗅球の発達に必須であることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：嗅覚、嗅上皮、嗅球、ゼブラフィッシュ、ケモカイン、神経回路、ニューロン、軸索投射

## 1. 研究開始当初の背景

脳形成には、神経細胞自身の内因的な遺伝子プログラム(転写因子カスケード等)だけでなく、脳内あるいは脳-末梢組織間の異なる神経細胞種の相互作用が重要な役割を果たしていると考えられている。特に嗅覚器原器である嗅プラコード由来の神経線維(軸索)は、末梢神経系の中で最も早く脳へと到達することから、「嗅神経投射による終脳形態形成の誘導」という概念が提唱されていた。

この概念は、アフリカツメガエルを用いた実験で、嗅プラコードを外科的に切除すると一次嗅覚中枢である嗅球(終脳の一部)の形成不全が起きるといった結果により支持されていた。しかしながら、このような嗅プラコードの外科的切除は、少なくとも2つの不確実な要素を含んでいる。すなわち、「終脳に対する外科的なダメージを排除できないこと」および「嗅プラコード自体からの分泌シグナルと区別できないこと」である。

研究代表者らは、嗅神経の特異的投射の分

子機構を解析する過程で、あるゼブラフィッシュ変異体(ケモカイン受容体機能欠損)のユニークな表現型を発見した。この変異体は以下の3パターンの表現型を示す。クラス1: 嗅神経は正常に脳の嗅球へと投射する, クラス2: 片側の鼻からは嗅球へと嗅神経が正常に投射するものの、もう一方の鼻からは嗅球への投射が全くみられない, クラス3: 嗅球への投射が両側とも全く見られない。このように同じ遺伝学的背景にもかかわらず異なる表現型を示すことは、比較解析する上で非常に有効である。特にクラス2では同一個体の左右で正常と異常の両方の表現型を解析することができる。研究代表者はこの「片鼻の魚」を用いることで、嗅神経投射による終脳形態形成の誘導について、より詳細に解析することができるのではないかという着想に至った。

## 2. 研究の目的

### (1) 嗅神経投射欠損が種々の嗅球ニューロンの発達に与える影響の解析

匂い情報の一次中枢である嗅球には様々なタイプのニューロンが存在し、複雑な神経回路網を形成している。これらのニューロンの発達が嗅神経投射の欠損によってどのような影響を受けるのかについて、他の終脳領域と比較しながら明らかにする。

### (2) 嗅球内興奮性投射ニューロンの遺伝子工学的可視化による軸索伸長パターンの解析

嗅球内で匂いの情報を受け取り、高次中枢へと伝える興奮性投射ニューロンを遺伝子工学的に可視化し、正常時の軸索伸長パターンを明らかにする。また、嗅神経投射の欠損によってこの軸索伸長パターンがどのような影響を受けるのかについて明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 免疫組織化学的手法

嗅神経投射に異常を示す *odysseus* 変異体(ケモカイン受容体 *Cxcr4b* 機能欠損, 図1)において、嗅球ニューロンタイプ特異的なマーカー抗体を用いた免疫組織化学により、嗅神経投射の有無とニューロンの発達の関係を解析する。

### (2) 遺伝子工学的的手法による嗅球ニューロンの特異的可視化

嗅球ニューロンタイプ特異的な遺伝子制御領域に蛍光タンパク質遺伝子(GFP等)を連結した導入遺伝子を作製し、トランスジェニックゼブラフィッシュを作製する。このトランスジェニック系統と *odysseus* 変異体を交配して、嗅神経投射欠損時のニューロンの形態、特に軸索の伸長パターンを詳細に解析する。

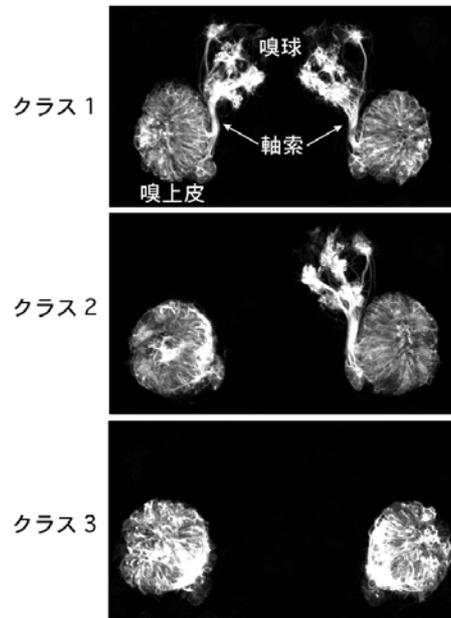


図1 *odysseus* 変異体における嗅神経投射の異なる表現型(正面より観察)

## 4. 研究成果

### (1) 嗅神経投射の欠損に伴う嗅球の発達異常

*odysseus* 変異体における免疫組織化学的解析により、嗅神経投射欠損時における嗅球の異常について以下の知見を得た。

全ての嗅球ニューロンの樹状突起に存在する MAP-2 および抑制性介在ニューロンに発現する GABA 合成酵素(GAD)に対する抗体によって染色される糸球構造(嗅神経と嗅球ニューロンがシナプスを形成する機能的ユニット)が形成されず、嗅神経投射が正常な場合と比べて嗅球の大きさが減少する。

介在ニューロンのマーカーである Arx の免疫活性がわずかに減少し、介在ニューロンサブセットで発現するチロシン水酸化酵素(TH)の免疫活性が顕著に減少する(図2)。一方、嗅球以外の他の終脳領域では TH の免疫染色性に変化は見られない。

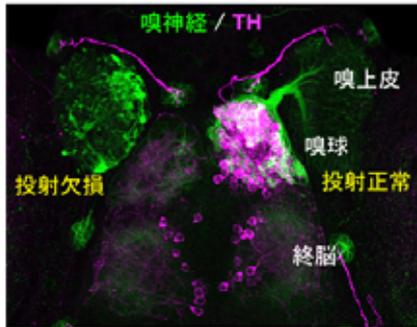


図2 嗅神経投射欠損による嗅球でのTH免疫活性の減少（背側より観察）

興奮性投射ニューロンのマーカーである Tbr2 の陽性細胞数が減少する。一方、嗅球以外の他の終脳領域では Tbr2 の陽性細胞数に顕著な変化は見られない。

嗅球の嗅神経層付近に存在する性腺刺激ホルモン放出ホルモン産生細胞(GnRH ニューロン)の数が顕著に減少し、GnRH ニューロンの一部の軸索が脳内に進入できずに迷走する(図3)。

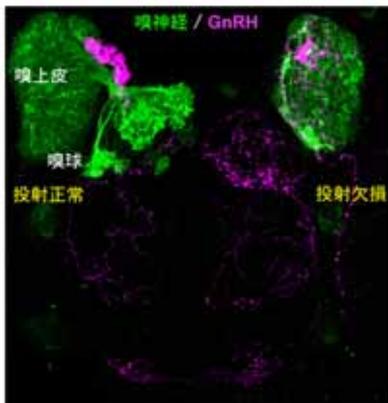


図3 嗅神経投射欠損によるGnRHニューロンの細胞数減少と軸索の迷走（背側より観察）

(2) 嗅球内興奮性投射ニューロンの軸索伸長パターンに対する嗅神経投射欠損の影響

匂い情報を鼻から受け取り、高次中枢へと伝える嗅球投射ニューロンの特異的サブセットを遺伝子工学的手法により可視化した(図4)。LIM-homeobox型転写因子である Ihx2a 遺伝子プロモーターの制御下に、膜移行型あるいはシナプス小胞移行型 GFP を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを樹立し、正常個体における高次中枢への投射パターンを解析した。この嗅球投射ニューロンサブセットは終脳領域と共に、間脳の神経核である手綱核に投射することが明らかとなった。また、終脳への投射は左右対称であるのに対して、手綱核への投射は右半球の手綱核に特異的で、左右非対称な神経接続を形成することが明らかとなった。このトランスジェ

ニック系統を odysseus 変異体と交配し、軸索伸長パターンを解析したところ、GFP 陽性細胞数の減少が見られたものの、軸索伸長パターンに顕著な変化は認められなかった。このことから、嗅球投射ニューロンの軸索伸長は嗅神経投射に依存せず、内因的なプログラムによって制御されている可能性が示唆された。

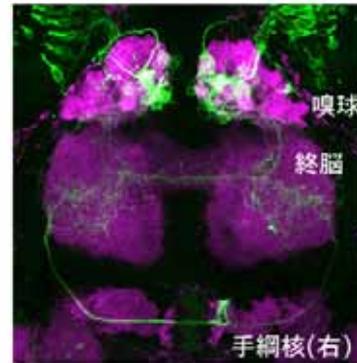


図4 嗅球投射ニューロンサブセットの高次中枢への軸索伸長パターン(緑, 背側から観察)

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7件)

Miyasaka N, Morimoto K, Tsubokawa T, Higashijima S, Okamoto H, Yoshihara Y. From the olfactory bulb to higher brain centers: genetic visualization of secondary olfactory pathways in zebrafish. *J. Neurosci.* 29: 4756-4767 (2009) 査読有り

宮坂信彦 嗅覚系の発達過程におけるケモカインシグナルの役割 *生化学* 80: 1115-1119 (2008) 査読無し

宮坂信彦, 吉原良浩 神経回路形成におけるケモカインの役割 *BRAIN MEDICAL* 20: 127-133 (2008) 査読無し

Miyasaka N, Knaut H, Yoshihara Y. Cxcl12/Cxcr4 chemokine signaling is required for placode assembly and sensory axon pathfinding in the zebrafish olfactory system. *Development* 134: 2459-2468. (2007) 査読有り

宮坂信彦, 吉原良浩 嗅覚神経系の形成過程におけるCxcl12/Cxcr4 ケモカインシグナルの二元的役割 *Aroma Research* 32:

370-373 (2007) 査読無し

宮坂信彦, 吉原良浩 嗅覚神経回路形成の分子機構 生体の科学 58: 285-292 (2007) 査読無し

宮坂信彦, 吉原良浩 嗅神経投射の分子メカニズム Journal of Otolaryngology, Head and Neck Surgery (JOHNS) 23(5): 719-724 (2007) 査読無し

〔学会発表〕(計3件)

Miyasaka N, Morimoto K, Tsubokawa T, Higashijima S, Okamoto H, Yoshihara Y. Visualizing mitral cell axon projection in transgenic zebrafish. 15<sup>th</sup> International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT), July 23, 2008, San Francisco

宮坂信彦, 森本耕造, 坪川達也, 東島眞一, 岡本仁, 吉原良浩 ゼブラフィッシュ二次嗅覚神経系の可視化と軸索投射パターンの解析 日本味と匂学会第42回大会 2008年9月17-19日、富山

Miyasaka N, Knaut H, Yoshihara Y. Cxcl12/Cxcr4 chemokine signaling is required for placode assembly and sensory axon pathfinding in the zebrafish olfactory system. Neuro2007, Sept. 12, 2007, Yokohama

〔その他〕

プレス発表

2009年4月15日

「左右非対称な神経回路の存在を嗅覚系で発見」

<http://www.riken.jp/r-world/info/release/press/2009/090415/index.html>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

宮坂 信彦 (MIYASAKA NOBUHIKO)

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・副チームリーダー

研究者番号：70332335