

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19700311

研究課題名（和文）二次嗅覚神経回路形成における軸索性細胞認識分子 BIG-1 の機能解析

研究課題名（英文）Roles of axonal cell recognition molecule BIG-1 in the development of functional neuronal network of secondary olfactory pathway

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：嗅球僧帽細胞で領域特異的に発現する軸索性細胞認識分子 BIG-1 の機能を解明することを目的として、BIG-1 遺伝子座に膜移行型蛍光蛋白質遺伝子 gap-Venus を挿入した遺伝子ターゲティングマウスを作製した。このマウスを解析した結果、BIG-1 発現僧帽細胞の軸索は、lateral olfactory tract (LOT) の特定の領域を通過して、前嗅核、嗅結節、梨状葉皮質などの嗅皮質に投射することが明らかとなった。BIG-1 の欠失によって、この軸索投射に目立った異常は認められなかったことから、BIG-1 は二次嗅覚回路形成において単独では必須な役割を持たないことが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	0	2,400,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

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：二次嗅覚経路、細胞認識分子、BIG-1、僧帽細胞、lateral olfactory tract (LOT)

1. 研究開始当初の背景

嗅覚は生物の五感の中で最も原始的な感覚システムであり、摂食行動や生殖行動、危険回避、情動などの変化を引き起こすことにより生命活動に重要な役割を担っている。近年、分子生物学、発生工学、電気生理学などを用いた研究により、嗅上皮から一次中枢である嗅球への神経投射（一次嗅覚経路）に関しては、数多くの知見が得られてきた。しかし、嗅球から嗅皮質へと至る二次嗅覚経路に関しては、その回路形成の分子メカニズムを

め、まだ多くのことが未知のままである。

一方、BIG-1 (contactin-3) は、代表者らの研究チームによって発見された軸索性細胞認識分子で、小脳や海馬など神経系の限られた領域で特異的に発現している (Yoshihara, Y. et al. Neuron 1994)。BIG-1 は培養系で神経突起の伸長を促進する活性を持つことから、神経回路の形成や維持に何らかの役割を果たすことが示唆されていた。嗅覚系では、BIG-1 は二次嗅覚ニューロンである嗅球僧帽細胞に特異的に発現しており、

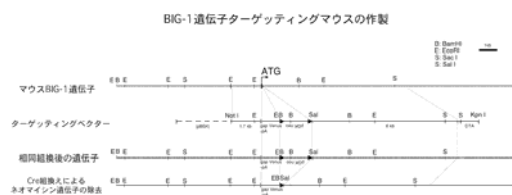
さらに嗅球の中でも腹外側に存在する僧帽細胞で高い発現を示す。またその軸索は lateral olfactory tract (LOT; 側嗅索) の特定の領域を通過して嗅皮質へと投射する (未発表データ)。このことから、BIG-1 は僧帽細胞の軸索投射の制御に関与している可能性が高いと考えられ、BIG-1 の解析を手がかりとして二次嗅覚経路の回路形成の分子メカニズムについて知見が得られることが期待された。

2. 研究の目的

本研究では、まず BIG-1 遺伝子座に膜移行型蛍光タンパク質 gap-Venus 遺伝子を挿入した遺伝子ターゲティングマウスを作製し、gap-Venus の発現を用いて BIG-1 発現僧帽細胞の軸索投射パターンを詳細に調べることがを試みた。またこの遺伝子ターゲティングマウスのホモ個体の表現型を解析することにより、嗅球僧帽細胞における BIG-1 の機能を明らかにすると共に、二次嗅覚経路の回路形成の分子メカニズムについて知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

BIG-1 遺伝子座にマーカーとして gap-Venus 遺伝子を挿入した遺伝子ターゲティングマウスを作製した (下図)。



Venus は GFP (green fluorescent protein) を改良した緑色蛍光タンパク質で、gap43 の N 末端配列を付加して細胞膜に局在化させることにより、発現細胞の細胞体のみならず軸索全体を可視化できると期待される。作製したマウスのヘテロ個体を用いて、蛍光観察および抗 GFP 抗体を用いた免疫組織化学により、BIG-1 発現僧帽細胞の軸索投射パターンを詳細に調べた。

また、二次嗅覚神経回路形成における BIG-1 の役割を明らかにするために、ヘテロおよびホモのマウスの脳で gap-Venus の発現パターンの比較を行い、BIG-1 遺伝子の欠失によって僧帽細胞の軸索投射に異常が見られるかどうかを調べた。また、蛍光トレーサーを用いて嗅球の腹側および背側に存在する僧帽細胞を標識し、BIG-1 の有無によって僧帽細胞の領域特異的な投射パターンに変化が生じるかを検討した。

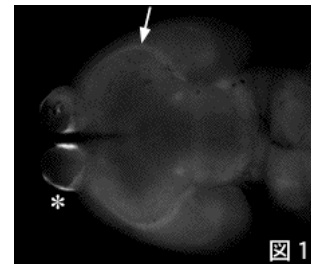
4. 研究成果

(1) BIG-1 遺伝子ターゲティングマウスにおける gap-Venus 発現細胞の同定

上記の方法により作製した遺伝子ターゲティングマウスの脳での gap-Venus の発現パターンを調べ、それが内在性 BIG-1 の発現を反映したものであるかどうかを検討した。また、gap-Venus の発現を用いて僧帽細胞の軸索投射について詳細な解析を行った。

まず、様々な発生段階 (胎生 14 日、胎生 17 日、生後 0 日、生後 7 日、成体) のヘテロマウスの脳を回収し、gap-Venus の蛍光を観察した。その結果、胎生 14 日において、僧帽細胞の軸索である LOT で gap-Venus の強い蛍光が認められ (図 1、矢印)、この蛍光は生後 0 日まで観察された。しかし、その後は (おそらく軸索の髄鞘化のために) LOT での蛍光強度は減衰し、成体ではほとんど認められなくなった。また、胎児期においては、嗅神経鞘細胞 (olfactory ensheathing glia; OEG) において非常に強い蛍光が観察された (図 1*)。

図 1 : gap-Venus による二次嗅覚神経回路の可視化。胎生 14 日のヘテロマウスの脳を摘出し、gap-Venus の蛍光を腹側より観察した。左が前側。LOT (矢印) で強い蛍光が認められる。* は OEG での蛍光を示す。



次に、LOT での gap-Venus の蛍光が最も強い胎生 14 日においてヘテロマウスの脳の切片を作製し、抗 GFP 抗体を用いた組織免疫化学により LOT 中の gap-Venus 発現細胞の位置を詳細に調べた。他のさまざまな細胞認識分子 (L1, NP1, NP2, TAG-1) を認識する抗体との二重染色により解析を行った結果、gap-Venus を発現する僧帽細胞の軸索は、LOT の腹内側の特定の領域を通過して投射していることが分かった (図 2)。この領域は、BIG-1 発現僧帽細胞が LOT 中で占める位置と一致し、このことから、gap-Venus の発現は内在性 BIG-1 の発現を反映したものであると考えられた。

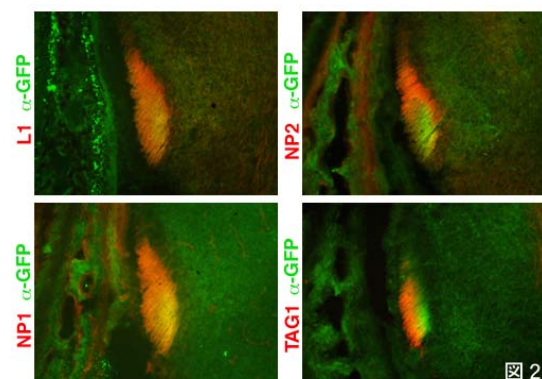


図 2

図2 : gap-Venus 発現軸索の LOT 中での領域特異的な局在。胎生 14 日のヘテロマウスの脳の冠状切片を作製し、LOT 中での gap-Venus の発現を他のさまざまなマーカー分子との二重免疫組織化学により調べた。上が背側、左が外側。抗 GFP 抗体で認識される gap-Venus 発現軸索は、LOT の腹内側の特定の領域を通して投射していることが分かる。

また、gap-Venus の発現は、前嗅核 (anterior olfactory nucleus)、嗅結節 (olfactory tubercle)、梨状葉皮質 (piriform cortex) など嗅皮質のさまざまな場所にも観察され、BIG-1 発現僧帽細胞の軸索が LOT を通ってこれらの領域に投射していることが示された。前述したように、この遺伝子ターゲティングマウスでは、生後は軸索の髄鞘化のために LOT での gap-Venus の発現は顕著に低下する。しかしこれら嗅皮質での gap-Venus の発現は、成体でも胎児期と同様に認められた。このことから、このマウスのヘテロ個体を用いることにより、BIG-1 発現僧帽細胞の軸索終末を成体においても可視化できることが示された。

最近、僧帽細胞の軸索が同側の前嗅核外節 (AONpE) と呼ばれる領域に topographic に投射し、左右の嗅球間の情報交換に重要な役割を果たすことが報告された (Yan, A. et al. Neuron 2008)。そこで成体マウスの AONpE における gap-Venus の発現を調べたところ、AONpE の腹側と背側で高く、中心部に向かって濃度勾配を示すことが明らかとなった (図 3)。BIG-1 は僧帽細胞でも嗅球の背腹軸に沿って濃度勾配を示すことから、BIG-1 の発現がこの topographic な軸索投射の制御に関与している可能性が示唆された。

図 3 : gap-Venus 発現軸索の前嗅核外節 (AONpE) への投射。成体ヘテロマウスの脳の冠状切片を用いて抗 GFP 抗体による免疫組織化学を行った。上が背側、右が外側。AONpE (矢尻部分) での gap-Venus の発現は背側と腹側で高く、中心部に向かって低くなっていることが分かる。

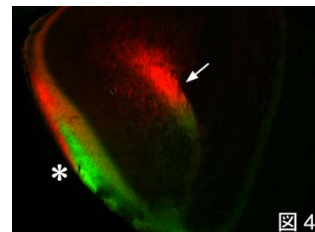


(2) 二次嗅覚神経回路形成における BIG-1 の機能についての解析

上記の解析により、BIG-1 発現僧帽細胞の軸索は LOT の特定の領域を通して嗅皮質へ特異的な投射パターンを示すことが分かった。そ

こで次に、僧帽細胞の軸索投射における BIG-1 の役割を明らかにするために、BIG-1 遺伝子ターゲティングマウスのホモ個体の表現型の解析を行った。BIG-1 は僧帽細胞以外にも (海馬、小脳など) 脳のいくつかの領域で発現するが、BIG-1 を欠失するホモのマウスは生存・生殖可能で、脳全体の構造にも目立った異常は認められなかった。そこで、さまざまな発生段階 (胎生 14 日、胎生 17 日、成体) のヘテロおよびホモの個体を用いて、二次嗅覚経路における gap-Venus の発現パターンの比較を行った。前嗅核、嗅結節、梨状葉皮質などの嗅皮質における gap-Venus の発現パターンを、抗 GFP 抗体を用いた免疫組織化学により詳細に比較したが、ヘテロとホモの個体で有為な差は見いだせなかった。BIG-1 はその分子構造より、軸索表面に存在し、他の神経細胞との相互作用に関与していると考えられる。そのため、BIG-1 の欠失は BIG-1 発現細胞だけでなく周囲の神経細胞の軸索投射に細胞非自律的に作用する可能性が高いと考えられた。そこで、僧帽細胞の軸索に発現するさまざまなマーカー (L1、NP1、NP2、TAG-1) の LOT 内での位置関係を調べたが、BIG-1 の有無によって LOT の領域性に有為な変化は生じていなかった。さらに、僧帽細胞の嗅球での背腹軸に沿った領域特異的な投射について調べるために、二種の蛍光レーザー (NeuroVue Jade : 緑色、NeuroVue Red : 赤色) を用いて、嗅球の背側と腹側の僧帽細胞をラベルし、その軸索の位置関係について調べた (図 4)。

図 4 : 蛍光レーザーを用いた僧帽細胞の軸索ラベル。野生型マウス (成体) 嗅球の背側 (赤)



および腹側 (緑) の僧帽細胞を蛍光レーザーにより 2 ヶ月間標識し、冠状切片を作製して LOT (*) の観察を行った。上が背側、左が外側。僧帽細胞の軸索は、嗅球での細胞体の位置に対応して LOT でも背腹軸に沿った領域特異性を保っていることが分かる。矢印は前交連を示す。

この方法により、野生型と BIG-1 欠失マウスの LOT の比較を行ったが、背腹軸に沿った軸索の投射パターンに目立った違いは見つけられなかった。これらの結果より、BIG-1 は僧帽細胞の軸索投射において単独では必要な役割を果たさないことが示された。

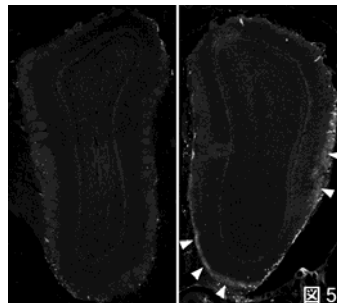
BIG-1 は細胞表面上に存在し、他の細胞が発現する細胞認識分子とホモあるいはヘテロフィリックに相互作用することにより、その

機能を発現すると考えられる。僧帽細胞には BIG-1 以外にも他のさまざまな細胞認識分子が存在することから、BIG-1 単独が欠失しても他の細胞認識分子同士の相互作用により、軸索投射の領域特異性が保たれるのではないかと推察される。このように、二次嗅覚神経回路形成においては、複数の細胞認識分子の機能的重複により神経系全体の正常性が保たれるようなメカニズムが存在しているのかもしれない。

(3) BIG-1 の OEG における機能についての解析

前述したように、BIG-1 は胎生期において嗅神経鞘細胞 (OEG) で強い発現を示す。また成体でも、5% 硫酸亜鉛を用いてマウスの嗅上皮を人工的に除去すると、約 2 週間後から OEG で BIG-1 の発現が誘導されることが明らかとなった (図 5)。

図 5 : 嗅上皮の除去による OEG での BIG-1 の発現誘導。野生型マウス (成体) の鼻腔に 5%硫酸亜鉛を注入し、嗅上皮を除去した。3 週間



後、嗅球における BIG-1 の発現を抗 BIG-1 抗体を用いた免疫組織化学により調べた。右図が硫酸亜鉛処理したマウス、左図はコントロール (PBS 処理) マウス。上が背側 (冠状切片)。嗅球の周囲の OEG で BIG-1 の発現が誘導されていることが分かる (矢尻)。

OEG は神経細胞の軸索伸長や再生を促進する活性を持つことから、BIG-1 が嗅細胞の発生および再生過程において、嗅球への軸索投射を制御している可能性が示唆された。そこで、BIG-1 遺伝子ターゲティングマウスのヘテロおよびホモのマウスの嗅上皮を人工的に除去し、その後の嗅細胞の再生および嗅球への軸索投射の過程を比較したが、BIG-1 欠失による明らかな異常は見つからなかった。また発生期においても、ホモの個体で嗅細胞の軸索投射や糸球体形成に異常や遅延は認められなかった。これらの結果より、BIG-1 は OEG において嗅細胞の正常な発生や再生、軸索投射の制御に必須な役割を担わないことが示された。

ここまでの結果を総合して考えると、BIG-1 は嗅覚神経回路形成において単独では必須な役割を持たず、他の細胞認識分子などとの相互作用によりその機能が発現していると

考えられる。今後は BIG-1 と他の分子との機能的重複性について、ダブルノックアウトマウスの解析などを通じて明らかにしていくことが課題であると考えられる。

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

研究者番号 : 70450418