

平成 21 年 5 月 30 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19700325

研究課題名 (和文) 主嗅球と副嗅球の軸索投射を制御する分子機構

研究課題名 (英文) Guidance mechanism of main and accessory olfactory bulb axons

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：本研究では主嗅球と副嗅球という嗅球の違いに注目しながら、嗅球から終脳中枢への軸索投射が胚発生期にどのように制御されているのかを明らかにしようと解析を進めた。in vitro や in vivo の解析によって、主嗅球の軸索投射は主に Slit/Robo シグナリングが制御し、副嗅球の軸索投射は主に Nrp2 を介した Sema3/Nrp/Pln シグナリングが制御していることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	0	2,200,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

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

1. 研究開始当初の背景

嗅覚受容体の発見を契機として、臭いの情報を伝達する神経回路の構造が急速に明らかになりつつある。ただし、その主な研究対象は、臭い物質を感知する嗅覚1次ニューロンから、次の中継核である嗅球への軸索投射までを解析したものであり、それ以降の嗅球から中枢への軸索投射機構については不明な点が多く残されている。嗅球に伝達された臭い情報は、嗅球に存在する僧帽細胞などの嗅覚2次ニューロンによって中継されて、より中枢の終脳領域へと伝達される。

申請者は、この嗅覚2次神経回路の形成を制御する機構について解析を進めてきた。特に、胚発生期に、これら嗅球軸索の投射をガイドするガイドポスト細胞の機能や、これらのガイドポスト細胞が予定軸索投射領域へ配置するメカニズムについて、マウス胚を用いて解析を行っている。

嗅球には、異なるタイプの臭い情報の伝達を担う主嗅球や副嗅球などの幾つかのサブ領域が存在することが知られている。それぞれのサブ領域から中枢へと投射する軸索は、一時的には同じ外側嗅索と呼ばれる左右一対

の軸索の束を形成するものの、最終的には各サブ領域の軸索ごとに異なる終脳領域へと投射することが知られている。このことは、主嗅球や副嗅球の軸索投射の制御には、異なるメカニズムが関与することを示唆している。

主嗅球軸索の投射には、これまでに反発性因子として知られる Slit1、Slit2 が関与することが報告されている。しかし、これら Slit1/Slit2 のシグナルが、嗅球軸索のガイドポスト細胞の配置に影響を及ぼすのかと言った点や、同時に腹嗅球軸索の投射に関与するのかなどについてはまだ明らかになっていなかった。また、主嗅球とは異なる副嗅球の軸索投射パターンを規定するガイダンス分子機構の実体については、全く明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では主嗅球や副嗅球という嗅球のサブ領域の違いに注目しながら、嗅球から終脳中枢への軸索投射が胚発生期にどのようなメカニズムによって制御されているのかを明らかにすることを目的とした。

まず、それぞれの嗅球のサブ領域ごとの神経回路形成過程をモニターする良い解析系を構築した後、各種ガイダンス分子のシグナルを欠失した遺伝子破壊マウス胚を用いて、嗅球軸索のガイダンス機構を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1)、嗅球のサブ領域ごとの軸索投射パターンを効率よく可視化するための軸索ラベル法を開発するために、各種のトレーサーなどを用いて、軸索ラベル法の検討を行う。

(2)、(in vivo) 嗅球軸索や、そのガイドポスト細胞について、既存の軸索ガイダンス分子の発現の有無を抗体染色や、in situ ハイブリダイゼーションを用いて確認する。

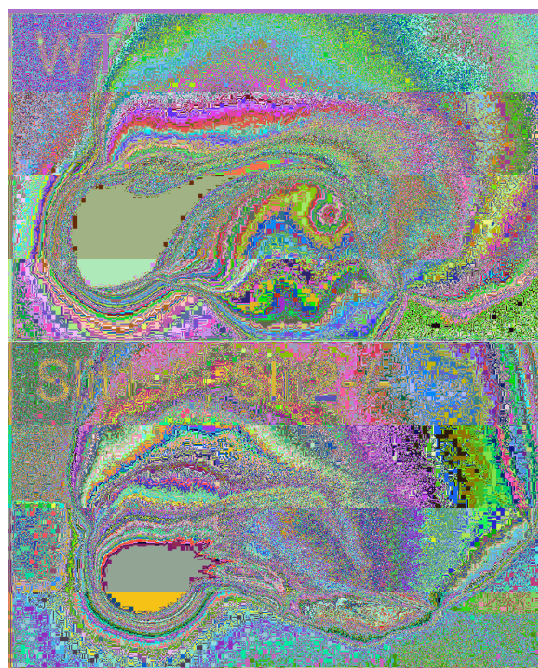
(3)、(in vivo) Slit1/Slit2 や、Nrp などの軸索ガイダンスに関わることが知られている遺伝子を欠失したノックアウトマウス胚を用いて、嗅球のサブ領域ごとに軸索をラベルして、軸索投射パターンを解析して、投射異常の有無を明らかにする。同様に、ガイドポスト細胞の移動や、配置についても観察する。

(4)、(in vitro) 嗅球のサブ領域ごとに神経組織を切り出した後、各種の軸索ガイド分子を発現する株細胞とカラーゲンゲルのなかで共培養して、軸索の応答性を確認する。

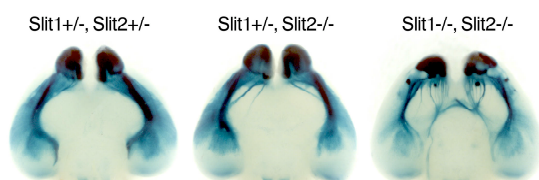
4. 研究成果

(1)、各種のトレーサーを用いた条件検討を行い、脂溶性の蛍光色素である DiI による軸索ラベル法と、全胚培養法を組み合わせることで、嗅球の軸索を効率よくラベルする方法を構築した。

(2)、新しく構築したラベル法を用いて、嗅球軸索投射に異常が生じることが報告されている Slit1^{-/-};Slit2^{-/-}マウスの軸索投射の異常を詳細に解析した。また、嗅球軸索に特異的に LacZ を発現するマウス胚を用いた解析も平行して行い、Slit1^{-/-};Slit2^{-/-}マウス胚の軸索投射パターンをさらに詳しく解析した。



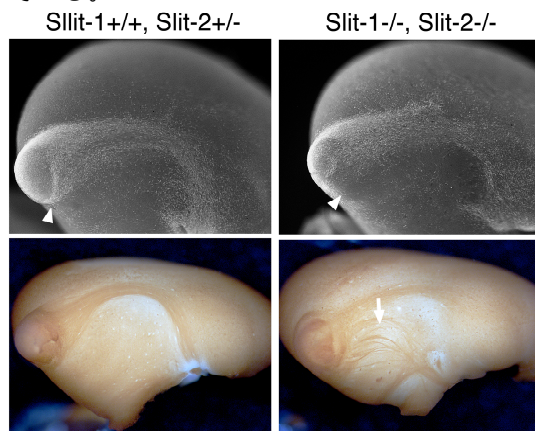
(図1) 野生型および、Slit1^{-/-};Slit2^{-/-}マウス胚の主嗅球軸索の投射パターンを蛍光色素 DiI を用いて可視化した。従来、Slit1 よ Slit2 の両方を欠いたマウス胚では、嗅球軸索の投射は本来の経路を全く通らず、軸索側枝も形成されないと考えられてきたが、Slit1^{-/-}; Slit2^{-/-}胚においても、一部の軸索は正常な領域を伸長して、軸索側枝を伸長するなどの表現型を明らかにすることが出来た。これらの結果は Fouquet et al., 2007 で報告した。



(図2) 嗅球軸索を特異的に可視化できるマウスを用いて、Slit1^{-/-}; Slit2^{-/-}胚の嗅球軸索投射のパターンを解析した。Slit1^{-/-}; Slit2^{-/-}胚に加えて、Slit1^{+/-}; Slit2^{-/-}胚に

においても、弱い軸索投射異常が観察された。これらの結果は Fouquet et al., 2007 で報告した。

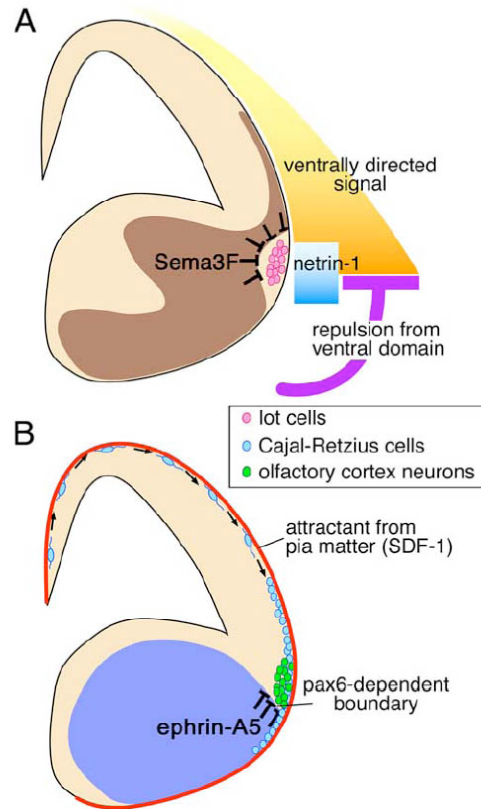
(3), 軸索ラベル法によって、主嗅球の軸索投射は主に Slit1, 2 によって活性化される Slit/Robo シグナリングが制御していることを再度確認した後、これらの異常には嗅球軸索のガイドポスト細胞の分布パターンが関与するのかどうかを、ガイドポスト細胞に対する抗体を用いて免疫染色によって解析した。その結果、Slit1^{-/-};Slit2^{-/-}マウス胚においては、ガイドポスト細胞の分布に大きな異常は認められないことを明らかにした。このことは、Slit1^{-/-};Slit2^{-/-}マウス胚の嗅球軸索投射異常には、これらガイドポスト細胞は大きくは関与をしていないことを示唆している。



(図 3) Slit1/Slit2 遺伝子破壊マウス胚における、嗅球軸索ガイドポスト細胞の分布パターンと、主嗅球軸索の投射パターンを免疫染色によって可視化した。嗅球の膨らみと終脳の接合部で、ガイドポスト細胞の分布に若干の異常が生じているもの(矢頭)、終脳側面の予定嗅球軸索投射領域でのガイドポスト細胞の分布に関しては、ほぼ正常であることが分かる。軸索は前述の通り、大きく終脳腹側へと異所的に伸長する。これらの結果を Fouquet et al., 2007 で報告した。

(3), 主嗅球の軸索伸長が主に Slit/Robo シグナルで制御されているのに対して、副嗅球の軸索投射を制御するガイダンスシグナルの探索を行い、Nrp2 を介した Sema3/Nrp2 シグナリングが、副嗅球の軸索投射に関与することをしめす手がかりを得た。ただし同時に、Sema3 のうちの1つで反発因子として知られる Sema3F が、Nrp2 を介して嗅球軸索のガイドポスト細胞の移動と分布を制御していることも見いだした。具体的には、これらガイドポスト細胞の移動時に、終脳深層に発現する Sema3F が、受容体の Nrp2 を発現するガイドポスト細胞が、脳の内部へと侵入することを阻害し、ガイドポスト細胞が、

終脳表層へと留まるよう働いていることが明らかとなった。これらの相互作用は、培養系を用いた in vitro の系と、Sema3F や Nrp2 の遺伝子破壊マウスを用いた in vivo の系の両方で確認することが出来た。これらの解析結果の一部は。Ito et al., 2008 で報告した。



(図 4) 嗅球軸索のガイドポスト細胞の移動制御機構に関する模式図。ガイドポスト細胞の移動は終脳の腹側表層に発現する netrin-1 によって誘引されると同時に、終脳深層に発現する Sema3F によって反発される。Ito et al., 2008 より。

本研究の一連の研究結果によって、主嗅球の軸索投射は Slit/Robo シグナルによって主に制御されており、一方副嗅球の軸索投射は Sema3/Nrp シグナルで主に制御されていることを示すことが出来た。このことから、主嗅球と副嗅球の軸索は、一時的には同じ経路を通る軸索であるが、そのガイダンスは、軸索のサブタイプごとに異なるメカニズムによって制御されていることを明らかとした。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計2件)

①Keisuke Ito, Takahiko Kawasaki, Seiji Takashima, Ikuo Matsuda, Atsu Aiba, and Tatsumi Hirata; Semaphorin 3F confines ventral tangential migration of lateral

olfactory tract neurons onto the telencephalon surface; J. Neurosci., vol. 28, 4414-4422, (2008), 査読有り

②Coralie Fouquet, Thomas Di Meglio, Le Ma, Takahiko Kawasaki, Hua Long, Tatsumi Hirata, Marc Tessier-Lavigne, Alain Chédotal, and Kim T. Nguyen-Ba-Charvet; Robo1 and Robo2 control the development of the lateral olfactory tract; J. Neurosci., vol. 27, 3037-3045, (2007), 査読有り

〔学会発表〕(計4件)

①2009年5月 The 32st Annual meeting of the Japan neuroscience society (新潟) Takahiko Kawasaki and Tatsumi Hirata; Novel function of Nrp2 as an inhibitor of Sem3A signaling in the projection of olfactory bulb axons

②2008年7月 The 31st Annual meeting of the Japan neuroscience society (東京) Takahiko Kawasaki and Tatsumi Hirata; The role of semaphorin signaling in the olfactory bulb projections

③2008年5月 41st Annual meeting for the Japanese society of developmental biology (徳島) Takahiko Kawasaki and Tatsumi Hirata; The role of semaphorin signaling in the projections of olfactory bulb axons

④2007年5月 40st Annual meeting for the Japanese society of developmental biology (福岡) Takahiko Kawasaki and Tatsumi Hirata; Guidance of main and accessory olfactory bulb axons

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