

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究 B
研究期間：平成 20～21 年度
課題番号：20700294
研究課題名（和文） 一次嗅覚神経回路における領域特異性決定の分子機構
研究課題名（英文） Molecular mechanisms based on the regional specificity of olfactory sensory neurons.
研究代表者
 高橋 弘雄 (TAKAHASHI HIROO)
 奈良県立医科大学・医学部・助教
 研究者番号：20390685

研究成果の概要（和文）：発生期の特異的な神経回路網の形成は、脳の複雑な機能を支える基盤である。本研究は、特異的神経投射のモデル系である一次嗅覚神経回路において、領域に応じた嗅細胞の分化機構を明らかにすることを目的とした。本研究により、形態形成因子である BMP ファミリーの複数の分子が匂いの感知を行う嗅上皮において、特徴的な発現パターンを示すことが明らかとなった。特に、BMP7 は転写因子 Pax6 と共に、大気中の CO₂ を感知する特殊な嗅細胞サブタイプ Car2 細胞において特異的発現を示した。レンチウイルスを用いた機能解析により、Pax6 は Car2 細胞のシグナル経路の確立に寄与することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Olfactory sensory neurons (OSNs) expressing a given odorant receptor project axons to a pair of fixed glomeruli on the olfactory bulb to form a topographic map. In this study, we revealed that some BMP family members are variously expressed in olfactory epithelium (OE) during development. BMP7 and Pax6 are specifically expressed in a unique subset of OSNs, termed Car2 OSNs, which exists in the ventro-lateral region of the OE and is known to respond to CO₂. We found that Pax6 regulates the establishment of the signaling cascade of Car2 OSNs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：嗅細胞・分化・領域特異性

1. 研究開始当初の背景

嗅覚を介した匂い情報の識別は、摂食行動

や、フェロモンを介した性行動など、生物の生存に欠かせない重要な役割を持つ。一次嗅覚神経回路は特異的神経投射のモデル系と

して知られ、これまでに多くの研究者によりその神経回路の実体が詳細に研究されてきた。

嗅細胞は 1,000 種類にも及ぶ嗅覚受容体の中から 1 種類のみを選択して発現し、同じ種類の受容体を選択した嗅細胞は、嗅球上に約 1,000 対存在する糸球の内、特定の一对に対して特異的に軸索投射する。特にその背腹軸方向においては、嗅上皮における嗅細胞の位置と嗅球における標的糸球の位置が対応する。しかしながら、嗅上皮の位置情報がどのように決定され、部位に応じた嗅細胞サブタイプの分化や、領域特異的な神経回路の形成がどのような分子機構により制御されるのか？その実体は明らかとなっていない。

このような特異的な神経回路網形成の基本原則を研究することは、“機能的な神経回路をいかに再生させるか？”という再生医療の基礎となる知見を得る意味でも極めて重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、特異的な神経投射のモデル系である一次嗅覚神経回路において、位置情報の決定や、領域に応じた嗅細胞分化機構を明らかにすることを目的とした。

1,000 種類にもおよぶ嗅覚受容体の発現は、従来、嗅上皮の背腹軸に沿って存在する 4 つの同心円状ゾーン構造の 1 つに対応すると考えられてきたが、近年、細分化された受容体固有の発現ゾーンが存在し、それが嗅球上の投射位置に反映されることが明らかとされている (*J. Neurosci.* 25, 3586, 2005; *Eur. J. Neurosci.* 23, 1436, 2006)。さらに嗅細胞の軸索投射には、嗅覚受容体自身や *Neuropilin(Nrp)*、*ephrin*、*Kirrel* 等の分子の関与が報告されており、嗅細胞が選択した嗅覚受容体の種類に応じてその発現が制御されることが知られている (*Cell* 127,1057, 2006)。つまり、嗅上皮の背腹軸方向における領域特異的な神経回路の形成過程は、まず、位置に応じた嗅覚受容体の選択がなされ、次に選択した嗅覚受容体の種類に応じた軸索ガイダンス分子の発現制御の過程を経て、極めて精緻な神経回路が形成される。

しかしながら、すべての基盤となる嗅上皮の初期発生過程についてはこれまであまり研究されておらず、領域特異的な神経投射に先立ち、嗅上皮内の位置情報がどのように決定されるのか、その分子機構の詳細は明らかにされていない。また、嗅細胞の中には、通常の嗅覚受容体を持たないサブタイプも存在し、それぞれのサブタイプは嗅上皮の特定の

部位に限局して存在することが報告されているが、領域特異的に嗅細胞サブタイプの分化を制御する分子機構も全く分かっていない。このような位置情報の決定に関わる分子は、嗅上皮において特定の領域に限局した発現パターンを示すことが予想される。また、嗅細胞は成体においても常時新生し、新たに新生した嗅細胞の発生・分化過程が生涯継続することから、嗅細胞の分化制御に関わる遺伝子の発現は、成体の嗅上皮においてもその一部で見られるものと考えられる。そこで本研究は、発生期および成体嗅上皮において領域特異的に発現する分子を探索し、その機能解析を行った。

3. 研究の方法

まず、(1) 嗅原基から成体の嗅上皮に至るまで、その発生過程に関与することが予想される複数の分泌性シグナル分子や、転写因子等について、発現パターンの詳細を *in situ hybridization* により解析した。さらに、(2) 得られた候補分子について、レンチウイルスを用いた遺伝子導入系を行い、嗅細胞で異所発現させた場合の影響について検討を行った。

4. 研究成果

(1) 嗅上皮における領域特異的な発現遺伝子の探索

本研究により、マウス鼻窩から成体の嗅上皮に至るまで、分泌性のシグナル分子である BMP ファミリーに属する複数の遺伝子が、嗅細胞で多様な発現パターンを示すことが明らかとなった。

BMP4 が背内側 (弱) から腹外側 (強) に勾配を持って発現した (図 1)。一方、BMP6 は嗅上皮全体でモザイク状の発現を示し (図 1)、

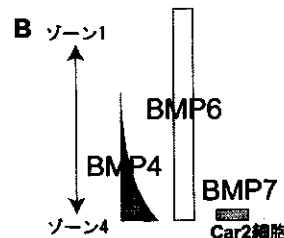


図1
(A) BMP4は嗅上皮背側で弱く、腹側で強い濃度勾配を持って発現する。一方、BMP6はモザイク状の発現パターンを示す。
(B) 嗅上皮でのBMPファミリー分子の発現パターン

BMP7 は最も腹外側の一部の嗅細胞サブタイプにおいてのみ特異的に発現することを見出した。さらに興味深いことに、転写因子 Pax6 も BMP7 とまったく同じ細胞で発現を示すことを見出した。

さらなる解析により、BMP7 および Pax6 を発現する嗅細胞は、炭酸脱水酵素 Car2 をセンサーとして持ち、大気中の CO2 を感知する特殊な嗅細胞サブタイプであることが明らかとなった(図2)。Car2 細胞は嗅上皮の腹側に限局して存在し、通常の嗅細胞が持つ cAMP 経路とは異なる、独自の cGMP を介したシグナル経路を持つことが知られる。

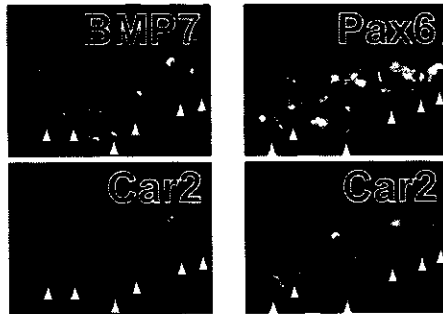


図2 嗅細胞の中で、Car2細胞のみが特異的にBMP7,Pax6を発現する。

嗅上皮の発生過程における発現パターンの変化を詳細に検討したところ、BMP7 が嗅細胞の分化以前の嗅原基において、既に一部の細胞で発現し、成体の Car2 細胞に至るまでその発現が維持されるのに対して、Pax6 は、嗅原器のすべての細胞で発現し、発生の後期になると Car2 細胞へと発現が限局することが明らかとなった。

BMP7 および Pax6 の両者の発現が互いに重なりはじめる出産前後のステージは、Car2 細胞が分化・成熟して、神経回路を形成する以前の時期であり、BMP7 および Pax6 の領域特異的発現こそが、領域特異的に出現する Car2 細胞の発生過程を制御する可能性が強く示唆された。

(2) 領域特異的な発現を示す BMP7 および Pax6 の機能解析

BMP7 および Pax6 の Car2 細胞特異的な発現の意味を明らかとするため、レンチウイルスを用いて、これら遺伝子を新生仔のマウス嗅上皮で異所発現させ、影響を検討した。残念ながら、BMP7 の異所発現による顕著な変化は見られなかった。一方、レンチウイルスにより Pax6 を異所発現させると、通常の嗅細胞には存在し、Car2 細胞には存在しない cAMP シグナル関連分子の発現が抑制された

(図3)。この結果から、Car2 細胞は Pax6 の発現を維持することにより、cAMP シグナル関連分子の発現を抑制しているものと予想され、Pax6 は Car2 細胞が通常の嗅細胞へ分化するのを妨げる負の制御因子として働く可能性が示唆された。一方、Pax6 の異所発現により Car2 の発現は誘導されず、Pax6 以外に Car2 細胞への分化を正に制御する因子の存在が予想された。

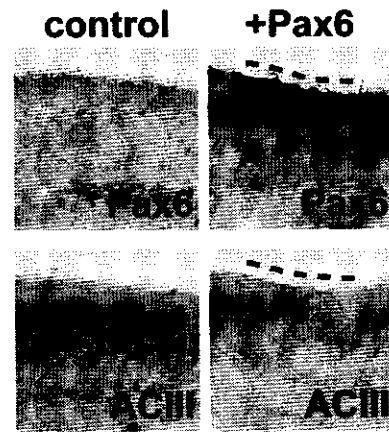


図3

マウス新生仔の嗅上皮では、レンチウイルスによるPax6の導入部位(破線)において、アデニル酸シクラーゼACIIIの発現が抑制される(下段右)。

今後、BMP7 と Pax6 が共同して働く可能性も踏まえ、Pax6 以外の制御因子の探索を行うことにより、Car2 細胞の分化過程の詳細が明らかになるものと考えられる。また、BMP7 とは異なる発現パターンを示す BMP4 や BMP6 についても、レンチウイルスを用いた機能解析を行っていく予定である。

様々な匂い分子を明確に識別するため、極めて多様に進化した嗅細胞が、その発生過程においてどのような分子機構によりその多様性を確立し、領域特異的な神経回路を形成しているのか? その分子機構の一端が本研究により明らかとなった。

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 1 件)

- ① Takahashi H., Yoshihara S., Nishizumi H., and Tsuboi A. : Neuropilin-2 is required for the proper targeting of ventral glomeruli in the mouse olfactory bulb. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 査読有、Vol.44, pp.233-245, 2010.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 高橋弘雄、マウス嗅覚系における CO₂ センサー細胞の解析、第 32 回日本分子生物学会会、2009 年 12 月 10 日、パンフィコ横浜
- ② 高橋弘雄、Molecular basis of CO₂ sensing in the mouse olfactory system, *Neuroscience* 2009、2009 年 9 月 18 日、名古屋国際会議場
- ③ 高橋弘雄、Molecular mechanisms underlying formation of the Odor map in the mouse brain KEYSTONE SYMPOSIA、2009 年 2 月 20 日、Keystone, Colorado
- ④ 高橋弘雄、マウス匂い地図形成の分子機構、第 31 回日本分子生物学会年会、2008 年 12 月 10 日、神戸ポートアイランド

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 弘雄 (TAKAHASHI HIROO)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：20390685

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし