

学位論文

マウス嗅細胞の背腹軸に沿った投射に於ける  
Robo1 陽性グリア細胞の役割

(A novel role of Robo1<sup>+</sup> olfactory ensheathing cells  
in dorsoventral targeting of olfactory sensory neurons in mouse)

平成 24 年 12 月博士（理学）申請

東京大学理学系研究科

生物化学専攻

青木 真理

## Abstract

マウス嗅細胞(olfactory sensory neuron, OSN)の背腹軸に沿った軸索投射に関しては、嗅上皮における OSN の位置と嗅球における投射先との間に、空間的な対応関係が存在する。マウス胎児期 11 日目以降、OSN は背側から腹側へと時間を追って成熟し、成熟の順に嗅球へと軸索を伸長する。これに伴い、OSN で軸索誘導分子とその受容体が背腹軸に沿って相補的かつ濃度勾配を持って発現することで、嗅上皮と嗅球との間のトポグラフィーが維持されることが明らかになっている。しかしながら、最初に軸索を伸長する背側 OSN がどのように投射経路を見出し、背腹軸投射の基点となる嗅球上の位置を定めるのか、という問題は未解決のままであった。本研究では、OSN の軸索の初期投射に関与することが示唆されていた軸索ガイダンス受容体 *Robo1* がどのように機能するのかを解明した。

本研究ではまず、*Robo1* knockout (KO)マウスを解析した。その結果、背側 OSN の軸索が嗅球腹側にも誤って投射すること、またその結果異所的な糸球が形成されることが判明した。次に、*Robo1* がどこで発現しどのように機能するのかを解明した。当初 *Robo1* は軸索伸長時期に背側 OSN において発現すると想定されたが、予想に反し、*Robo1* の発現は、OSN ではなく、olfactory ensheathing cell (OEC)と呼ばれるグリア細胞で観察された。更に *Robo1* 陽性 OEC は、嗅上皮から嗅球に向かって伸長する OSN の軸索に付随して、嗅上皮から嗅球へ運ばれることが判明した。更に、*Robo1* の反発性リガンドとして知られる *Slit* 分子の発現を解析した結果、OSN の軸索投射経路の外側領域で発現することが観察された。これらの結果から、*Robo1* 産生グリア細胞が背側 OSN の軸索に付随して、*Robo1/Slit* の反発性相互作用により、軸索を嗅球背側へ誘

導することが示された。

これまでに知られていた神経軸索の誘導機構としては、軸索－投射先の相互作用および軸索－軸索の相互作用が主であった。本研究で明らかにされた、グリア細胞が OSN の軸索に付随することによって行なわれる投射誘導は、これまでに知られていない新しい神経投射メカニズムとして極めて重要であると言える。

## Abstract

In the mouse olfactory system, the anatomical locations of olfactory sensory neurons (OSNs) correlate with their axonal projection sites along the dorsoventral axis of the olfactory bulb (OB). We have previously reported that Neuropilin-2 expressed by ventral-zone OSNs contributes to the segregation of dorsal and ventral OSN axons. Here, we report that another guidance receptor, Robo1, plays an important role in guiding OSN axons to the OB and establishing the dorsoventral topography of the olfactory map. Knockout mice for Robo1 demonstrated defects in targeting of OSN axons. We found that Robo1 is detected on the dorsal-zone OSN axons. However, it is not produced by OSNs, but instead by olfactory ensheathing cells (OECs). These findings indicate a novel strategy of axon guidance in the mouse olfactory system: the guidance receptor, Robo1, is provided by associated OECs to the dorsal-zone OSN axons that repel with Slit ligands expressed in the ventral-OB.

## ◆◆◆ 目次 ◆◆◆

|  |    |
|--|----|
| Abstract (日本語) .....                                   | 1  |
| Abstract (英語) .....                                    | 3  |
| 目次 .....   | 4  |
| 略称一覧 .....   | 6  |
| 序論 .....   | 7  |
| マウス嗅覚系の概要 .....  | 7  |
| 嗅覚系の1次神経回路形成機構 .....                                   | 8  |
| マウス胎生期における嗅覚組織の発生 .....                                | 12 |
| グリア細胞 olfactory ensheathing cell と OSN の軸索との相互作用 ..... | 13 |
| 背側 OSN の軸索投射を制御する候補分子、軸索誘導受容体 Robo .....               | 14 |
| 本研究の目的 .....   | 17 |
| 結果 .....   | 18 |
| Robo2 KO マウスにおける OSN の背腹軸に沿った軸索投射異常 .....              | 18 |
| Robo1/2 double KO マウスにおける OSN の背腹軸に沿った軸索投射異常 .....     | 20 |
| Robo1 KO マウスにおける OSN の背腹軸に沿った軸索投射異常 .....              | 21 |
| 胎生期マウス嗅覚組織における Robo1 の発現 .....                         | 26 |
| OSN の軸索伸長に依存した Robo1 陽性 OEC の移動 .....                  | 29 |
| 胎生期マウス嗅覚組織における Robo1 のリガンド Slits の発現 .....             | 32 |
| 考察 .....   | 33 |
| 材料と方法 .....  | 40 |
| 図 .....  | 43 |

|            |    |
|------------|----|
| 引用文献 ..... | 77 |
| 謝辞 .....   | 87 |

## ◆◇◆ 略称一覧 ◇◇◆

### 遺伝子

NADPH: quinone oxidoreductase 1 (NQO1)

neural cell adhesion molecule (NCAM)

Neuropilin-2 (Nrp2)

roundabout (Robo)

### 組織および細胞

odorant receptor (OR)、嗅覚受容体

olfactory bulb (OB)、嗅球

olfactory ensheathing cell (OEC)、嗅組織に存在するグリア細胞

olfactory epithelia (OE)、嗅上皮

olfactory pit (OP)、嗅窩

olfactory sensory neuron (OSN)、嗅細胞

### その他

embryonic day (ED)、胎生期 日目

postnatal day (PD)、生後 日目

## ◆◆◆ 序論 ◆◆◆

マウスやヒトなど哺乳類は、外界の情報を五感を介して識別している。その中で嗅覚は、線虫から哺乳類に至るまで保存されて備わっており、餌となる物質への誘引、危害を及ぼす物質からの忌避、フェロモンを介した個体識別など、生き物の存在にとって極めて重要な役割を果たす。実際、哺乳類や魚類では、限られた数の遺伝子の数%を嗅覚受容体に割き、無数に存在する匂い物質を検出する巧妙な仕組みを発達させている。

### マウス嗅覚系の概要

マウスにおいて、匂い分子は嗅覚受容体 (odorant receptor, OR) で受容される。鼻腔奥に存在する嗅上皮において、約 1,000 万個存在する嗅神経細胞 (嗅細胞、olfactory sensory neuron, OSN) は、約 1,000 種類ある OR 遺伝子のうち、それぞれ 1 種類のみを相互排他的かつ mono-allelic に発現する (Buck and Axel, 1991; Malnic et al., 1999; Serizawa et al., 2000; Serizawa et al., 2003)。これは、1 神経・1 受容体ルールと呼ばれる。また、同種の OR 分子を発現する OSN の軸索は脳前方にある嗅球に投射し、特定の糸球体へと収斂する (Ressler et al., 1994; Vassar et al., 1994; Mombaerts et al., 1996)。これは、1 糸球・1 受容体ルールと呼ばれる。従って、投射先の嗅球において、OR 分子の種類に依存した数の糸球体が形成される (Figure 1)。匂い分子は、嗅上皮において複数種類の OR 分子と様々な強度で結合し、嗅球においてそれに対応した糸球体をそれぞれの強度で発火させる。従って嗅球表面では、約 1,000 個の糸



球体を素子とする電光掲示板のように、匂い分子に固有の発火パターンが形成され、匂い情報が2次元の神経マップに変換される (Figure 1)。嗅球においてどの糸球が発火したかという情報は、さらに2次神経細胞によって中枢へ伝達される。2次神経細胞である僧帽細胞は、糸球において OSN から匂い情報を受け取る。ひとつの糸球には、20~40 の僧帽細胞がそれぞれ1本ずつ主樹状突起を伸ばし、OSN の軸索と接続する (Figure 2A)。僧帽細胞は、枝分かれした軸索を、前嗅核、嗅結節、梨状皮質、扁桃体、内嗅領皮質へと投射することで、脳のさまざまな領野に匂い情報を伝達する (Figure 2B)。このように我々の脳は、嗅球における糸球の発火パターンを読み解くことで、数10万種類もの匂い分子をたった1,000種類のOR分子で認識することができる。

### **嗅覚系の1次神経回路形成機構**

糸球体を基盤とした嗅球における嗅覚神経マップの形成メカニズムは、嗅球の前後軸方向および背腹軸方向に沿った OSN の軸索のおおまかな投射位置決定、そして最終的な糸球体の選別、という過程に分けられる (Sakano, 2010)。

#### **・嗅球の前後軸に沿った OSN の軸索投射位置決定機構**

嗅球の前後軸方向に沿った軸索投射位置の決定機構においては、OR分子が指令的な役割を果たすことが明らかとなっている (Imai et al., 2006; Serizawa et al., 2006; Chesler et al., 2007)。OR分子はGタンパク質と共役してアデニル酸シクラーゼを活性化し、サイクリックAMP (cAMP)を産生する。個々のOSNにおいて、発現するORの種類ごとに異なる量のcAMPが産生される。cAMP量に対して軸索ガイダンス分子Neuropilin1 (Nrp1)の発現量が正に制御されて

おり、Nrp1 発現量の高い OSN の軸索は嗅球の後方へ、Nrp1 発現量の低い OSN の軸索は嗅球の前方へ投射する (Imai et al., 2006)。Nrp1 の反発性のリガンドである Semaphorin 3A (Sema3A)は、OSN においては Nrp1 と相補的に発現し、さらに OSN の軸索投射経路および嗅球前側でも発現が観察される。OSN の軸索は、Nrp1 と Sema3A との反発性相互作用により、軸索束内ですでに前方へ投射する軸索と後方へ投射する軸索が選り分けられ、さらに投射経路および嗅球前側で発現する Sema3A によって、Nrp1 陽性 OSN の軸索が嗅球後方へ誘導されることで、嗅球の前後軸方向の投射位置が規定される (Imai et al., 2009)。

#### ・ OSN 軸索の糸球体選別機構

同じ種類の OR 分子を発現する OSN の軸索は、投射先の嗅球において収斂し、糸球体を形成する。この OSN の軸索の選別機構においては、神経活動が指令的な役割を果たすことが明らかとなっている (Imai et al., 2006; Serizawa et al., 2006; Chesler et al., 2007)。OR を介した神経活動が高い OSN においては、軸索選別因子である Kirrel2、EphA5 などの発現量が高く、神経活動が低い OSN においては、軸索選別因子 Kirrel3、ephrin-A5 などの発現量が高い。Kirrel2 または Kirrel3 による homophilic 相互作用および EphA5 と ephrinA5 による反発性相互作用などを介して、同種の OR を発現する OSN の軸索が収斂して糸球体を形成する (Serizawa et al., 2006)。

#### ・ 嗅球の背腹軸に沿った OSN の軸索投射位置決定機構

嗅球の前後軸に沿った嗅細胞の軸索投射および軸索選別は OR 依存的に制御されるのに対し、背腹軸に沿った嗅細胞の軸索投射位置の決定は、OR 非依存的であり、OSN の嗅上皮における位置情報が重要な役割を果たすことが明らかに

なっている (Ressler et al., 1993; Vassar et al., 1993)。個々の OR 遺伝子は、嗅上皮の背腹軸方向にそってそれぞれに固有な限定された発現領域を持ち、それらは互いに重複して分布している (Miyamichi et al., 2005)。この厳密に定義された OR 遺伝子の発現領域が、嗅球の背腹軸方向の投射位置決定のパラメーターとなっている。即ち、嗅上皮の背側に存在する OSN は嗅球の背側に、嗅上皮の腹側に存在する OSN は嗅球の腹側に軸索を投射するという、位置対位置の対応関係が存在する (Figure 1)。このようなトポグラフィックオーダーを維持した軸索投射機構は、様々な神経系で観察され、特に視覚系の神経細胞の軸索投射研究においてよく研究されている (McLaughlin and O'Leary, 2005)。視覚系における網膜視蓋投射では、鼻側 (前側) 網膜神経節細胞が視蓋の後側に、耳側 (後側) 網膜神経節細胞が視蓋の前側に投射する。網膜神経節細胞の軸索において、受容体型の軸索ガイダンス分子 Eph が前後軸に沿って濃度勾配を示して発現する。Eph のリガンド ephrin は、軸索の投射先である視蓋で前後軸に沿って逆の濃度勾配を示して発現する。神経軸索で発現する軸索誘導受容体と投射先で発現するリガンドとの軸索-投射先間の相互作用によって、網膜視蓋投射の空間的な対応関係が保証されている。嗅覚系においても視覚系と同様に、OSN の位置情報が軸索ガイダンス分子の発現量に変換されるが、視覚系とは異なり、神経軸索で発現する軸索誘導受容体およびリガンドとの軸索-軸索間相互作用が OSN の軸索投射を制御することが示された (Takeuchi et al., 2010)。嗅上皮で位置特異的な発現を示す軸索ガイダンス分子 Neuropilin-2 (Nrp2) は、嗅上皮の腹側に位置する OSN で強く発現し、背側に向かうにつれて弱くなるという、位置に依存した発現パターンを示す (Figure 3A; Norlin et al., 2001)。Nrp2 の発現量の高い腹側 OSN の軸索は嗅球の腹側に、Nrp2 の発現量の低い背側 OSN の軸索は嗅球の背側に投射する (Figure 3B)。Nrp2 のノックアウトマ

ウスにおいて、腹側 OSN の軸索は嗅球の背側に異所的な糸球を形成する。また、特定の OR 遺伝子を発現する OSN の *Nrp2* の発現量を増やすと、その軸索はより腹側に糸球を形成する。これらの結果から、嗅上皮における OSN の位置情報が *Nrp2* の発現量に変換され、投射位置を決定することが示唆された。*Nrp2* の反発性の分泌型リガンドとして、Semaphorin 3F (Sema3F) が知られている (Chen et al., 1997; Chen et al., 1998; Giger et al., 1998; Walz et al., 2007)。Sema3F タンパク質は投射先の嗅球背側に局在するものの、驚くべきことに、*Sema3F* 遺伝子は嗅球では発現が見られず、嗅上皮において背側に位置する OSN で強く発現し、腹側に向かうにつれて弱くなるという、*Nrp2* と相補的な発現パターンを示した (Figures 4 and 5; Takeuchi et al., 2010)。さらに、嗅上皮において OSN は背側から腹側へ順を追って成熟し、成熟の順に軸索を嗅球へ伸長する。これらの結果から、先に嗅球へ到達する背側 OSN の軸索が分泌型の軸索ガイダンス分子 Sema3F を嗅球背側に持ち込み、後から到達する腹側 OSN が自身の Neuropln2 発現量の違いによって Sema3F と反発することで、背腹軸に沿った嗅上皮と嗅球の空間的な対応関係が形成されることが明らかとなった (Figure 6; Takeuchi et al., 2010)。このように、先に投射する神経細胞と後から投射する神経細胞との間の軸索-軸索間の相互作用は、視覚系の ephrin-Eph のような軸索-投射先間の相互作用とは異なる、新奇なメカニズムである。

OSN の軸索投射における背腹軸に沿ったトポグラフィーは、背側 OSN の軸索が持ち込む軸索誘導因子によって腹側 OSN の軸索が誘導されることから、背側 OSN の軸索が正確に嗅球まで到達するという軸索投射の最初の過程が、背腹軸に沿った OSN の軸索投射機構においてもっとも重要であると考えられる。しかしながら、背側 OSN がどのように軸索を嗅球へ投射し、背腹軸の起点を定め

るのかという問題は、ほぼ未解明のまま残されている。上に記したように、背側 OSN から腹側 OSN へ順を追って成熟し、成熟の順に嗅球へ軸索を伸長する。さらに、OSN の軸索伸長が開始する胎生期 11 日目から生後にかけて、嗅組織構造がダイナミックに変化する。よって、最初に投射する OSN の軸索がどのように投射先の嗅球まで辿り着くのかを理解するには、胎児期の発生段階を追って、詳細に OSN の軸索投射を解析する必要がある。

### **マウス胎生期における嗅覚組織の発生**

マウス胎生期 9.5 日目において、頭部外胚葉の間充織から嗅板(olfactory placode)が形成される。マウス胎生期 10.5 日目になると、嗅板が陥入し、嗅窩(olfactory pit, OP)が形成される。マウス胎生期 12 日目には、深く陥入した嗅窩の入り口が狭まり、鼻腔 (nasal cavity)が形成される。その後、鼻腔において鼻甲介 (turbinate)が発達するにつれて、嗅上皮が広がっていく。終脳の前腹部において、マウス胎生期 12 日目から突出し始め、将来嗅球となる組織が形成される (Figure 7; Miller et al., 2010)。

未成熟な OSN は、マウス胎生期 9.5 日目以降から観察される。マウス胎生期 10.5 日目から、鼻腔に向けて OSN が樹状突起を伸長し、繊毛を鼻腔に伸ばす。OSN の軸索は、マウス胎生期 11 日目以降において観察される。マウス胎生期 11.5 日目において、最初の OSN の軸索が終脳に到達する (Miller et al., 2010)。OSN の軸索は、さまざまな種類の細胞を伴って嗅球へ伸長することが知られている。嗅上皮から嗅球へ移動する細胞集団および伸長中の OSN の軸索を合わせて、migratory mass と呼ばれる (Valverde et al., 1992)。migratory mass は、嗅球表面に到達すると嗅神経層 (olfactory nerve layer)となり、生後以降はその

存在は観察されない。migratory mass を形成する細胞としては、性腺刺激ホルモン放出ホルモン(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)ニューロン、olfactory ensheathing cell (OEC)などがある。OSN と 2 次神経細胞とのシナプスは、マウス胎生期 14 日目以降に観察される (Hinds and Hinds, 1976)。

### **グリア細胞 olfactory ensheathing cell と OSN の軸索との相互作用**

嗅粘膜は、嗅上皮と粘膜固有層 (lamina propria)から形成される (Figure 8)。嗅上皮は、OSN、支持細胞、球形基底細胞、水平基底細胞からなる。粘膜固有層は、疎性結合組織、グリア細胞である olfactory ensheathing cell (OEC)からなる。球形基底細胞から OSN、指示細胞、水平基底細胞が分化する。嗅球へ伸長する OSN の軸索は、最初に粘膜固有層を通過し、その際に OEC を付随して、OEC と共に嗅球へ到達する (Barnett and Chang, 2004)。

OEC は、将来嗅上皮となる嗅板 (olfactory placode)において胎生期 10 日目付近から発生する (Chuah and West, 2002)。形態的にも遺伝子発現的にも不均一な細胞集団である (Chuah and West, 2002)。電子顕微鏡による観察から、細胞内の電子密度が異なる OEC が存在することが報告されている (Cuschieri and Bannister, 1975)。形状は、紡錘型や多極型、扁平型などが混在し、さまざまな分子に対する抗体を用いた免疫組織染色の結果から、抗体に対する反応性の違う OEC が存在することが示されている (Franceschini and Barnett, 1996; Astic et al., 1998; Wang and Huang, 2012)。また、OEC は自身で再生し続けるという特異な性質を持つ。OEC とアストロサイトの違いとしては、OEC は末梢である嗅板で産生されるのに対し、アストロサイトは中枢で産生される。電子顕微鏡を用いて観察すると、アストロサイトよりも OEC のほうが電子密度が

高いために、容易に見分けることができる (Ramon-Cueto and Avila, 1998)。

OEC は突起を伸ばして OSN の軸索束を取り囲み、伸長する OSN の軸索と共に嗅上皮から嗅球へと移動する。brain-derived neurotrophic factor や nerve growth factor などが OEC で発現し、OEC から分泌されることで、OSN の軸索の伸長を促進することが知られている (Gall et al., 1994; Kott et al., 1994; Liu et al., 1995; Key et al., 1996; Crandall et al., 2000; Schwarting et al., 2000; Woodhall et al., 2001)。OSN の軸索と OEC との接着に関わる分子は、いくつか候補が示されている。OSN で発現する galactose-binding receptor の galectin-1 が、OEC で発現する糖タンパク質 laminin に結合することで、OSN の軸索と OEC を接着させることが示唆されている (Puche and Key, 1995)。また、OSN で発現する細胞接着因子 neural cell adhesion molecule (NCAM) も、OEC との接着に関わることを示唆されている (Miragall et al., 1989)。

### **背側 OSN の軸索投射を制御する候補分子、軸索誘導受容体 Robo**

では、最初に投射する OSN の軸索を嗅球へ誘導する分子メカニズムはどうなっているのでしょうか。これまでに、先に軸索を嗅球へ投射する背側 OSN で発現する軸索誘導受容体 Robo2 とその反発性のリガンド Slit との軸索-投射先間相互作用が、背腹軸に沿った OSN の軸索投射に関わることが報告されている。

Robo/Slit は、ショウジョウバエ、カエル、ゼブラフィッシュ、マウス、ラットなどで発現が報告されており、さまざまな神経系で重要な役割を果たす軸索誘導分子の受容体/リガンドである (Ypsilanti et al., 2010)。最初にショウジョウバエにおいて、commissural axon の midline crossing 機構を制御する分子として、Robo/Slit が同定された (Rothberg et al., 1988; Kidd et al., 1998;

Rothberg et al., 1990)。

哺乳類においては Slit1、Slit2、Slit3 の3つが報告されており、3つとも神経系で発現が観察される。Slit は、N 末端シグナルペプチド、4つのロイシンリッチリピート(D1-D4)、epithelial growth factor (EGF)-like 配列、laminin-G ドメイン、C 末端システインリッチノットから構成され、分泌型として存在する (Figure 9)。Slit は、切断されて短い C 末端側と長い N 末端側に分かれるが、長い N 末端側が活性型として機能し、受容体である Robo に結合する (Wang et al., 1999)。Robo (roundabout) は、膜結合型の受容体であり、免疫グロブリンスーパーファミリーの1つのサブグループを形成する。哺乳類においては、Slit の受容体として Robo1、Robo2、Robo3 の3つが脳組織において発現することが報告されている。Robo は、5つの免疫グロブリンドメイン(Ig1-Ig5)、3つの fibronectin type III ドメイン、4つの conserved cytoplasmic ドメインから構成される (Figure 9)。Slit のロイシンリッチリピートの D2 と Robo の免疫グロブリンドメインの Ig1、Ig2 とが結合することが示されている (Liu et al., 2004)。Slit が Robo に結合すると、Robo の細胞内ドメインに結合する GAP (guanosine triphosphatase activating protein)が活性化し、Rho GTPase (guanosine triphosphatase)のひとつである Cdc42 (cell division control protein 42)を不活性化する。アクチンの重合は活性化型 Cdc42 によって誘導されるため、Slit と結合した Robo が存在する細胞膜の直下では、アクチンの重合が低下する。このような細胞骨格の変化により、Robo 陽性細胞は Slit を避ける方向へ移動し、Robo 陽性神経軸索の成長円錐は Slit を避ける方向へ走行する (Wong et al., 2001)。実際に、Robo を発現する運動ニューロン外植片、Robo2 を発現する嗅球外植片、Robo1/Robo2 を発現する歯状回外植片に対して、数 100  $\mu\text{m}$  離れた位置に Slit2 を発現する COS 細胞を置くと、外植片の神経軸索が反発すること



から、Slit2 が Robo1/Robo2 に対して分泌型の反発性因子として機能することが示されている (Brose et al., 1999; Nguyen Ba-Charvet et al., 1999)。

マウス嗅覚系においては、軸索誘導受容体 Robo2 が背側 OSN で発現し、リガンドである Slit1 および Slit3 が嗅球腹側で胎生期 16 日目から発現する (Cho et al., 2007)。Robo2 ノックアウト(knockout, KO)マウスおよび Slit1/3 KO マウスにおいて、背側 OSN の軸索が嗅球腹側に誤って投射することが報告されている (Cho et al., 2007)。また、OSN 特異的 Robo2 KO マウスの嗅球において、背側 OSN および腹側 OSN 両方の軸索投射に異常が観察され、糸球体の個数の増加や糸球体位置の背腹軸に沿った移動が見られることが報告されている (Cho et al., 2011; Cho et al., 2012)。これらの結果から、Robo2/Slit1,3 を介した反発性相互作用によって OSN の背腹軸に沿ったトポグラフィーが維持されると考えられている (Cho et al., 2011; Cho et al., 2012)。

残りの Robo ファミリーのうち、Robo3 は嗅組織において発現が観察されない (Cho et al., 2007)。Robo1 は、OSN および嗅球では発現が観察されないにもかかわらず、Robo1/2 double KO マウスにおいて、一部の OSN の軸索は嗅球を外れて投射することが報告されている (Nguyen-Ba-Charvet et al., 2008)。嗅球の背腹軸に沿った OSN の軸索投射異常のみが報告されている Robo2 KO マウスに比べて、Robo1/2 double KO マウスではほぼすべての OSN の軸索が嗅球へ投射できない表現型を示すことから、Robo1、あるいは、Robo1 および Robo2 が OSN の軸索を嗅球へ到達させる過程において重要な役割を果たす可能性が考えられる。しかしながら OSN の軸索投射において、Robo1 単独でどのような機能を持つのかは明らかとなっていない。

## **本研究の目的**

近年の研究により、背腹軸に沿った OSN の軸索投射に関して、Nrp2/Sema3F シグナルや Robo2/Slits シグナルを介したトポグラフィックオーダーの形成メカニズムが解明されてきた。しかしながら、最初に投射する背側 OSN の軸索がどのように投射先の嗅球へ伸長し、背腹軸の起点を形成するのかに関して、ほとんど明らかとなっていない。本研究では、OSN の軸索投射の初期段階に関与することが予想された Robo1 に関して、いつ、どこで、どのように機能するのかを詳細に解析することで、発生段階における OSN の軸索投射機構を解明することを試みた。

## ◆◆◆ 結果 ◆◆◆

### Robo2 KO マウスにおける OSN の背腹軸に沿った軸索投射異常

まず始めに、最初に投射を開始する OSN の軸索を嗅球へ誘導する役割が予想される軸索誘導受容体 Robo1、Robo2 のうち、背側 OSN で発現することが知られている Robo2 について解析を行った。OSN 軸索の投射初期において Robo2 がどのような機能を持つのかを、Robo2 欠損マウス(knockout, KO)マウスを解析することで明らかにしようと試みた。Robo2 KO マウスでは、*Robo2* 遺伝子の開始コドンの下流に *ires-taulacZ* が挿入されており、*Robo2* が null mutation となっている(Grieshammer et al., 2004)。

OSN の軸索を検出するために、すべての OSN で発現する神経細胞接着因子 neural cell adhesion molecule (NCAM)を全 OSN のマーカー分子として、背側の OSN で特異的に発現する酸化還元酵素 NADPH:quinone oxidoreductase 1 (NQO1)を背側 OSN のマーカー分子として、腹側の OSN で特異的に発現する軸索ガイダンス分子 Neuropilin-2 (Nrp2)を腹側 OSN のマーカー分子として用いた。OSN の軸索が嗅球に到達する時期である生後 1 日目 (postnatal day, PD1)のマウス sagittal 切片において、NCAM (全 OSN マーカー)、NQO1 (背側 OSN マーカー)、Nrp2 (腹側 OSN マーカー) に対する抗体を用いて免疫組織染色を行い、OSN の軸索投射の様子を観察した (Figure 10)。全 OSN の軸索を示す NCAM のシグナルは、野生型 (wild type)マウスにおいては嗅球の背側から腹側まで嗅神経層全域に観察された。それに対して Robo2 KO マウスの嗅球では、NCAM (OSN マーカー) のシグナルは、嗅神経層に加えて嗅球外側に

凝集して観察された（点線内）。また、wild type マウスにおいては、NQO1 陽性 OSN は嗅球背側へ、Nrp2 陽性 OSN は嗅球腹側へ、それぞれ軸索を投射するため、嗅球の免疫組織染色における NQO1 のシグナルは背側嗅神経層で、Nrp2 のシグナルは腹側嗅神経層でそれぞれ観察された。Robo2 KO マウスの嗅球では、NQO1 (背側 OSN マーカー) のシグナルは嗅神経層の背側のみならず、野生型では認められなかった腹側でも観察された。嗅球外側に形成された凝集塊の中には、NQO1 のシグナルも Nrp2 (腹側 OSN マーカー) のシグナルも観察された。これらの結果から、Robo2 KO マウスにおいて、嗅球腹側の嗅神経層の外側で、一部の正常に投射できない OSN の軸索が軸索凝集塊を形成することが明らかとなった。また、残りの軸索は嗅神経層に投射するものの、嗅球の背腹軸に沿ったトポグラフィが乱れていることが判明した。これらの結果から、Robo2 は、OSN の軸索が嗅神経層に正常に到達する過程に関与することが示唆された。

## Robo1/2 double KO マウスにおける OSN の背腹軸に沿った軸索投射異常

次に、最初に投射する OSN の軸索を嗅球へ誘導する役割が予想されるもう一方の軸索誘導受容体 Robo1 と Robo2 を二重に欠損させた Robo1/2 double KO マウスを解析し、OSN の軸索投射がさらに影響を受けるかどうか調べた。Robo1/2 double KO マウスにおいて、*Robo1* 遺伝子は、exon3 の下流に膜貫通ドメイン融合 *lacZ* ( $\beta$ -galactosidase) が挿入されており、Robo1 も、Robo2 と同様 null mutation となっている (Long et al., 2004; Grieshammer et al., 2004)。

Robo1/2 double KO マウスは、生後すぐ死亡する。そこで、生まれる直前の胎生期 17.5 日目のマウス sagittal 切片において、NCAM (全 OSN マーカー)、NQO1 (背側 OSN マーカー)、Nrp2 (腹側 OSN マーカー) に対する抗体を用いて免疫組織染色を行い、OSN の軸索を検出した (Figure 11)。全 OSN の軸索を示す NCAM のシグナルは、wild type マウスにおいては嗅球の背側から腹側まで嗅神経層全域に観察された。それに対し、Robo1/2 double KO マウスにおける NCAM のシグナルは、嗅球背側および腹側の嗅神経層でほとんど観察されず、嗅球腹側の嗅神経層の外側に凝集して観察された (Figure 11、点線内)。また、wild type マウスにおいて、嗅球の免疫組織染色における NQO1 のシグナルは背側嗅神経層で、Nrp2 のシグナルは腹側嗅神経層でそれぞれ観察される。しかし Robo1/2 double KO マウスにおいては NQO1 のシグナルも Nrp2 のシグナルも嗅神経層ではなく、嗅球腹側に形成される軸索凝集塊の中に分離して観察された (Figure 11)。これらの結果から、Robo1/2 double KO マウスにおいて、背側 OSN の軸索も腹側 OSN の軸索も嗅神経層に投射できず、嗅球腹側で凝集塊を形成することが明らかとなった。これらの結果から、OSN の軸索を嗅球背側へ誘導するのに Robo2 だけでなく、Robo1 も必要であることが示唆された。

## **Robo1 KO マウスにおける OSN の背腹軸に沿った軸索投射異常**

Robo2 KO マウスおよび Robo1/2 double KO マウスの解析結果から、OSN の軸索投射において Robo2 とは異なる機能を持つことが推測された Robo1 について、詳細な解析を試みた。まず、Robo1 単独 KO マウスを解析し、背腹軸に沿った OSN の軸索投射がどのように影響を受けるか解析を行った。NCAM (全 OSN マーカー)、NQO1 (背側 OSN マーカー)、Nrp2 (腹側 OSN マーカー) に対する抗体を用いて、生後 1 日目(PD1)のマウス sagittal 切片において免疫組織染色を行い、OSN の軸索を検出した (Figure 12A)。Robo1 KO マウスにおける NCAM の免疫組織染色のシグナルは嗅神経層に観察されるものの、wild type マウスと比較すると背側嗅神経層が薄く、逆に腹側嗅神経層が厚く形成されており、嗅球腹側に偏っていた。この結果から、Robo1 KO マウスでは嗅球腹側で OSN の軸索投射が停滞し、その影響で腹側の嗅神経層が厚くなっていると考えられる。wild type マウスにおいて NQO1 陽性 OSN は嗅球背側へ軸索を投射するため、免疫組織染色の NQO1 のシグナルは嗅球背側に限局して検出された。しかし Robo1 KO マウスの嗅球では、NQO1 のシグナルが wild type マウスでは見られない腹側にまで広がって検出された。これら NQO1 陽性の背側 OSN の軸索が嗅球上で背側と腹側の境界を越えて腹側へ投射しているのかを検証するために、別のマーカー分子 OCAM (olfactory cell adhesion molecule)を用いて解析を行った。OCAM は、腹側 OSN および、胎生期にのみ嗅球背側に存在する 2 次神経細胞 (僧帽細胞) で発現するため、嗅球において背側領域と腹側領域の明確な境界を検出するマーカー分子として用いることができる (Takeuchi et al., 2010)。しかし本研究で用いた生後の Robo1 KO マウスでは、僧帽細胞側での OCAM の発現はすでに消失した後であるため、検出できなかった。生後マウスの 2 次神経細胞において背腹軸に沿って位置特異的に発現することが知ら

れている遺伝子は他に存在しないため、Robo1 KO マウスにおいて背側 OSN の軸索が、腹側 2 次神経細胞が存在する領域にまで広がっているのかを詳細に調べるためには、今後胎生期の Robo1 KO マウスを用いて解析する必要がある。一方 OSN 側においては、OCAM に対する抗体を用いた免疫組織染色により、背側と腹側の境界が検出された (Figure 12B)。wild type マウスの嗅球では、背側 OSN (NQO1 陽性) と腹側 OSN (OCAM 陽性) の軸索が嗅球上で明確に境界 (点線) を形成するのに対し、Robo1 KO マウスの嗅球では、OCAM 陽性の腹側 OSN の軸索が投射する領域にまで広がって NQO1 陽性の背側 OSN の軸索が検出された (Figure 12B)。これらの結果から、Robo1 KO マウスでは NQO1 陽性背側 OSN の軸索が嗅球腹側へも誤って投射していると考えられた。

また、この異常はトポグラフィックオーダーの形成が遅れているわけではなく、糸球マップ形成が完了した後の成体マウスにおいても継続して観察された。成体マウスの嗅球 horizontal 切片に対して、抗 NQO1 抗体を用いて免疫組織染色を行った (Figure 13)。その結果、成体 Robo1 KO マウスの嗅球においても、NQO1 陽性の糸球が wild type マウスと比較してより腹側にまで観察された。一方、Nrp2 陽性の腹側 OSN の軸索は嗅球腹側へと投射するため、wild type マウスにおいて Nrp2 の免疫組織染色のシグナルは、嗅球腹側で強く、背側に行くにつれて弱く観察された。Robo1 KO マウスにおいて、Nrp2 陽性の腹側 OSN の軸索の一部が嗅球背側へも誤って入り込んでいるものが観察された (Figure 12)。もっとも、NQO1 陽性の背側 OSN の投射異常よりは、軽度の異常であった。

Robo1 KO マウスにおいて、OSN の軸索投射がどこでどのように影響を受け

るのかを詳細に調べるためには、特定の OR を発現する OSN の軸索投射経路および糸球体位置を解析する必要がある。しかしながら、今までに用いられてきた、特定の OR を発現する OSN が蛍光タンパク質で標識されたトランスジェニックマウスでは、蛍光が弱い、または糸球体の個数や位置が一定でなく、正確な解析には向かないという問題があった。そこで、嗅覚受容体のひとつである MOR23 のプロモーター制御下で  $\beta 2$  adrenergic receptor ( $\beta 2AR$ ) と gapCFP を共発現するトランスジェニックマウス ( $\beta 2AR$ -gapCFP) を用いて解析を行った (Figure 14A)。 $\beta 2AR$  は、OR や他の 7 回膜貫通型受容体タンパク質の間で保存された細胞内ドメインを 3 つ持ち、OSN 特異的な G タンパク質  $G_{olf}$  とカップルすることが示されている (Jones and Reed, 1989; Liu et al., 2001)。さらに OR プロモーターの制御下で  $\beta 2AR$  を発現させた OSN は、他の OR を共発現せず、その軸索は、内在性の OR を発現する他の OSN の軸索と同様に収斂して独立した糸球体を形成し、2 次神経細胞と正常に接続することから、 $\beta 2AR$  は OR の代わりとして振舞うことが示されている (Feinstein et al., 2004)。このトランスジェニックマウスでは、 $\beta 2AR$  陽性 OSN は嗅上皮の背側に位置し、その軸索は嗅球背側で収斂し、lateral 側、medial 側に各 1 つずつ糸球体を形成する。また、 $\beta 2AR$  陽性 OSN は gapCFP で標識されているため、その軸索および糸球体を、蛍光または GFP に対する抗体を用いた免疫組織染色によって可視化することができる (Moriyoshi et al., 1996)。

まず、Robo1 KO マウスとトランスジェニックマウス  $\beta 2AR$ -gapCFP を交配して得たマウスおよびコントロールのマウスの嗅球を蛍光顕微鏡下で観察し、 $\beta 2AR$  の糸球体の位置を検出した。medial 側および lateral 側の wholemount view を Figure 14B, 14C に示した。OSN の糸球は、各嗅球に対して medial 側および lateral 側に鏡像対称で形成される。wild type マウス嗅球において、 $\beta 2AR$



陽性 OSN の軸索は medial 側および lateral 側でそれぞれ 1 ヶ所に収斂し、ひとつの糸球体を形成した。しかし Robo1 KO マウスの嗅球においてβ2AR 陽性 OSN の軸索は 1 ヶ所に収斂せず、複数の糸球体を形成するものが多く観察された (Figure 14B and 14C)。β2AR 陽性 OSN は背側 OSN であるため、その軸索は嗅球背側に糸球を形成するが、嗅球における medial 側と lateral 側の鏡像対称面が傾いているため、medial 側の糸球位置が嗅球中央よりに形成される。しかし、medial 側のほうが嗅球の曲率が小さいため、嗅球 medial 側に形成された糸球をプロットに用いた。wholemount view を示した 2 例 (#1、#2) に加えて、さらに 7 例(#3-#9)ずつの糸球体位置をプロットしたものを、Figure 14B 下に模式図で示した。1 嗅球ごとに、糸球が 1 つのみ観察されたものは黒で、糸球が複数観察されたものは、背側に観察された糸球から腹側に観察された糸球へ順に黒、赤、ピンクでプロットした。Robo1 KO マウスでは、複数の糸球が観察され、さらに糸球が形成される範囲が腹側に広がっている傾向にあった (Figure 14B)。

次に、Robo1 KO マウスにおけるβ2AR 陽性 OSN の軸索投射経路において、どこから異常が観察され始めるのかを解析した。まず、軸索投射の出発点である、嗅上皮における OSN の細胞体位置を、Robo1KO マウスと wild type マウスとで比較した。嗅上皮切片において *in situ* hybridization 法により、*NCAM* (全 OSN マーカー)、*NQO1* (背側 OSN マーカー)、*Nrp2* (腹側 OSN マーカー) の mRNA を検出した (Figure 15A)。その結果、wild type マウス、Robo1 KO マウスどちらの嗅上皮においても *NQO1* のシグナルは背側 OSN で検出され、*Nrp2* のシグナルは腹側 OSN で検出された。さらに、トランスジェニックマウスβ2AR-gapCFP と交配した wild type マウスおよび Robo1 KO マウス由来の嗅

上皮切片において、抗 GFP 抗体を用いた免疫組織染色を行い $\beta$ 2AR 陽性 OSN の細胞体を検出した。その結果、wild type マウス、Robo1 KO マウスどちらの嗅上皮においても NQO1 陽性 OSN が存在する領域内に、GFP のシグナルが観察された (Figure 15B)。これらの結果より、嗅上皮における OSN の細胞体の配置は、Robo1 KO マウスと wild type マウスの間で差異がなく、Robo1 KO マウスの嗅球において観察される背側 OSN の軸索投射異常は、軸索伸長の過程における異常であることが示唆された。

そこで、Robo1KO マウスにおける OSN の軸索投射異常が、嗅上皮から嗅球までの間のどこから現れるかを明らかにするために、 $\beta$ 2AR 陽性 OSN の軸索投射経路に着目して解析した。 $\beta$ 2AR 陽性 OSN が標識されたトランスジェニックマウス $\beta$ 2AR-gapCFP と交配した Robo1 KO マウスまたは wild type マウスから得られた嗅組織より嗅上皮から嗅球までの連続 coronal 切片を作成し、抗 GFP 抗体を用いて免疫組織染色を行い $\beta$ 2AR 陽性 OSN の軸索を検出した (Figure 16)。medial 側の $\beta$ 2AR 陽性 OSN の軸索投射経路を、Figure 16 に示した。wild type マウスと Robo1 KO マウスの $\beta$ 2AR 陽性 OSN の軸索の投射経路は、嗅上皮を出発して嗅球表面に到達するまで差が見られなかった。しかし、嗅球表面上において、Robo1 KO マウスの $\beta$ 2AR 陽性 OSN の軸索は背側に向かわずに腹側で停滞するものが観察された (Figure 16, 矢頭)。

以上の結果は Robo1 が、OSN の軸索投射において、背側 OSN の軸索を嗅球背側に誘導する機能を持つことを示唆している。

## 胎生期マウス嗅覚組織における Robo1 の発現

OSN の軸索投射において、Robo1 がいつ、どこで機能するのかを調べるために、発生段階を追って Robo1 の発現を解析した。まず、OSN の軸索が伸長し始める胎生期 11.5 日目(ED11.5)のマウスの sagittal section において、*Robo1* のアンチセンス鎖のプローブを用いて *in situ* hybridization を行い、*Robo1* の mRNA を検出した (Figure 17A)。Robo1 KO マウスにおいて OSN の軸索投射異常が観察されたことから、当初 Robo1 は OSN で発現することが予想された。しかしながら、驚くべきことに *Robo1* は OSN の細胞体が存在する OSN 層ではなく、グリア細胞が存在する lamina propria で発現することが判明した (Figure 17A)。また、連続した切片を Robo1 に対する抗体で免疫組織染色をしたところ、*in situ* hybridization のシグナルと同じ領域でシグナルが検出された (Figure 17A)。この結果から、Robo1 は OSN ではなく、グリア細胞で発現することが示唆された。嗅覚系に存在するグリア細胞は、olfactory ensheathing cell (OEC) と呼ばれ、形態的にも遺伝子発現的にも不均一な細胞集団であることが知られている。OEC のマーカー分子として、カルシウム結合タンパク質 s100 $\beta$  とニューロトロフィン受容体 p75 がよく用いられている (Ramon-Cueto et al., 1993; Gong et al., 1994; Franceschini and Barnett, 1996; Astic et al., 1998; Au et al., 2002; Honore et al)。そこで、Robo1 がどのような細胞種で発現するかを明らかにするために、嗅上皮に存在する各細胞種のマーカー分子に対する抗体および Robo1 に対する抗体を用いて、マウス胎児切片に対して二重免疫組織染色を行った (Figure 17B)。OSN 層における OSN の細胞体と OSN の軸索において観察される NCAM (OSN マーカー) のシグナルと、Robo1 のシグナルは重ならなかった。この結果は、Robo1 は OSN ではなくグリア細胞で発現するという *in situ* hybridization の結果と一致した。グリア細胞が存在する

lamina propria における Robo1 のシグナルは、OEC マーカーのひとつである s100 $\beta$  のシグナルとは重ならなかったが、別の OEC マーカーである p75 のシグナルとは重なった (Figure 17B)。以上の結果は、Robo1 が OSN ではなく、p75 陽性 OEC で発現することを示している。

Robo1 陽性 OEC の局在をさらに詳細に調べるために、Figure 17B で使用した切片を共焦点顕微鏡を用いてより高倍率で観察したものを Figure 17C に示した。NCAM のシグナル (緑) で表わされる伸長中の OSN 軸索末端(1)から細胞体のそば(2)にかけて、近傍で Robo1 陽性 OEC (赤) の細胞体が検出された。Robo1 陽性 OEC の突起が実際に OSN 軸索を取り囲んでいる様子は、現在入手可能な抗 Robo1 抗体を用いた免疫組織染色では検出できなかった。その理由としては、抗 Robo1 抗体の感度が低い、Robo1 タンパク質が細胞体周辺の膜のみ存在する、組織切片の固定条件により突起でのシグナルが観察されない、などの可能性が考えられる。今後、固定条件の検討や、電子顕微鏡を用いた観察の検討などが必要である。

嗅覚系組織において Robo1 の発現が時間的空間的にどのように推移するのかを調べるために、胎生期 11.5 日目、13.5 日目、15.5 日目 (ED11.5、ED13.5、ED15.5) のマウスより作製した sagittal 切片を、NCAM (OSN マーカー)、p75 (OEC マーカー)、Robo1 に対する抗体で、免疫組織染色した (Figure 18)。胎生期 11.5 日目~15.5 日目において、Robo1 のシグナルは嗅上皮では lamina propria で、嗅球では外側嗅神経層で観察され、いずれの時期においても NCAM (OSN マーカー) とは重ならなかった。胎生期 13.5 日目、15.5 日目と発生が進むにつれて、NCAM のシグナルで示される OSN の軸索が嗅球に到達するよ

うになり、Robo1 および p75 のシグナルも NCAM のシグナルに沿って嗅上皮から嗅球表面にかけて検出された (Figure 18)。この結果から、Robo1 陽性 OEC は、OSN の軸索とともに OSN から嗅球へと移動することが示唆された。Robo1 のシグナルは胎生期 13.5 日目付近でもっとも強く観察され、その後減少し、生後消滅した(Figure 18)。胎生期 13.5 日目は、OSN の軸索が嗅球に到達する時期であることから、Robo1 は、OSN の軸索を嗅球へ誘導する過程で機能する可能性が考えられる。

### **OSNの軸索伸長に依存した Robo1 陽性 OECの移動**

OECは、OSNの軸索伸長に適した微小環境を形成することで、OSNの軸索投射を補助する機能があることが知られている。OECは嗅球に存在する細胞が分泌する栄養因子などによって嗅上皮から嗅球へ移動し、移動中にOECが分泌するbrain-derived neurotrophic factorやnerve growth factorなどが、OSNの軸索伸長を促進することが示されている(Gall et al., 1994; Kott et al., 1994; Liu et al., 1995; Key et al., 1996; Woodhall et al., 2001)。また、ラットとオポッサムのOSNの軸索末端を電子顕微鏡で観察した結果、OECの突起が伸長するOSNの軸索末端より常に先に観察されることから、OECが先に嗅球に移動してOSNの軸索を誘導すると考えられている(Tennent and Chuah, 1996)。さらに、OECを嗅球に移植したマウスにおいて、OSNの軸索伸長が促進されることも示されている(Chehrehasa et al., 2010)。一方、OECで発現する糖タンパク質 laminin と OSN で発現するその受容体との相互作用や、両者で発現する細胞接着因子を介して、OECが突起を伸ばしてOSNの軸索束を取り囲み、OSNの軸索が伸長すると共にOECが嗅上皮から嗅球へ移動することも報告されている(Miragall et al., 1989; Puche and Key, 1995)。そこで、Robo1陽性OECが、OSNの軸索に依存せずに単独で嗅上皮から嗅球まで移動するのか、あるいはOSNの軸索に付随して移動するのかを検証した。当研究室に存在する複数のトランスジェニックマウスを交配してOSNが遺伝的に除去されたマウス(OSN depleted)を作成し、OSNの軸索非存在下でRobo1陽性OECが嗅上皮から嗅球まで移動するのかを調べた。OSN depletedマウスは、NSE-DTA、OMACS-Cre、#123-Creの3つの遺伝子改変マウスを交配して得た個体である(Figure 19A)。NSE-DTAマウスは、神経特異的エノラーゼ(neuron specific enorase, NSE)プロモーターの下流に、標的配列loxPに挟まれた転写stop配列

およびジフテリア毒素 (diphtheria toxin A)が組み込まれたノックインマウスであり、DNA 組み換え酵素 Cre 存在下でのみジフテリア毒素を発現する。OMACS-Cre マウスは、背側 OSN 特異的に発現する中鎖アシル CoA 合成酵素 (olfactory specific medium-chain acyl CoA synthetase, OMACS)のプロモーター制御下で、DNA 組み換え酵素 Cre を発現するノックインマウスである (Kobayakawa et al., 2007)。#123-Cre マウスは、OSN 特異的に発現する遺伝子#123 のプロモーター制御下で、DNA 組み換え酵素 Cre を発現するノックインマウスである (Hirata et al., 2006)。OMACS-Cre、#123-Cre の2つの遺伝子改変マウスを交配させると、ほぼすべての OSN で DNA 組み換え酵素 Cre が発現する個体が得られる。その個体を、さらに NSE-DTA マウスと交配させると、Cre 陽性 OSN において、Cre の DNA 組み換え活性によって神経特異的プロモーターの下流の転写 stop 配列が切り出されてジフテリア毒素が発現し、細胞死が誘導されることによりほぼすべての OSN が遺伝的に除去され、total OSN depleted マウスとなる (Figure 19B)。また、OMACS-Cre マウスと NSE-DTA マウスを交配させると、背側 OSN のみで細胞死が引き起こされることにより、背側 OSN のみが除去された dorsal OSN depleted マウスとなる (Figure 19B)。これらの OSN-depleted マウスを用いて、ほぼすべての OSN が除去されたとき、または腹側 OSN のみが存在するときに、Robo1 陽性 OEC の局在がどのように影響を受けるのかを調べた。OSN は、嗅上皮において背側から腹側へ順を追って成熟し、成熟の順に軸索を嗅球へ伸長する。そこで、背側 OSN と腹側 OSN の両方の軸索が嗅球に到達する時期の生後 1 日目 (PD1)のマウスを用いた。しかし生後 1 日目において、Robo1 の発現はほとんど検出されないため、Robo1 を発現していた OEC の一部と考えられる p75 陽性 OEC の局在を代わりに調べることにより、Robo1 陽性 OEC の局在を推測した。OSN depleted マウスおよ

び wild type マウスの sagittal 切片において、NCAM (OSN マーカー)および p75 (OEC マーカー)に対する抗体を用いて免疫組織染色を行い、OSN の軸索と p75 陽性 OEC の局在を検出した (Figure 20)。wild type マウスでは、NCAM および p75 のシグナルは、嗅上皮と、背側から腹側にかけて嗅球全体に観察された。一方、腹側の OSN のみが存在する dorsal OSN depleted マウスでは、嗅球背側では NCAM のシグナルも p75 のシグナルも観察されず、嗅球腹側にのみ両方のシグナルが観察された (Figure 20、矢頭)。ほぼすべての OSN が除去された total OSN depleted マウスでは、嗅上皮でも嗅球でも OSN マーカーである NCAM のシグナルがほとんど観察されず、p75 のシグナルは、嗅上皮で観察されるのみであった。ただし、DNA 組み換え酵素 Cre の組み換え効率により、除去されずに残ったわずかな OSN の軸索が total OSN depleted マウスでも嗅球に投射し、その周囲に P75 のシグナルもわずかに検出された (Figure 20、矢頭)。これらの結果は、p75 陽性 OEC が OSN の軸索に付随して OSN の軸索伸長に伴って嗅上皮から嗅球へ移動することを示している。以上の結果およびこれまでの知見から、Robo2 陽性 OSN の軸索と、それに付着する Robo1 陽性 OEC の両方が、投射経路において発現するリガンドからの反発作用を受けることにより、最初に投射する背側 OSN の軸索が正しく嗅球背側に誘導される可能性が考えられた。



## 胎生期マウス嗅覚組織における Robo1 のリガンド Slits の発現

Robo1 が軸索誘導受容体としてどのように機能するのかを明らかにするためには、そのリガンドの局在を調べる必要がある。Robo1 の反発性のリガンドとして、分泌型の Slit1、Slit2、Slit3 の3つが知られている (Brose et al.,1999; Nguyen Ba-Charvet et al., 1999; Yuan et al., 1999)。そこで、OSN の軸索伸長期において Robo1 のリガンドがいつどこで発現するのかを調べるために、マウス胎生期 11.5 日目、13.5 日目、15.5 日目の sagittal 切片において *Slit1*、*Slit2*、*Slit3* のアンチセンス鎖のプロープを用いて *in situ* hybridizaion を行い、*Slit1*、*Slit2*、*Slit3* の mRNA の局在を検出した (Figure 21)。

まず OSN の軸索が伸長し始める胎生期 11.5 日目のマウス嗅覚組織においては、*Slit2* が olfactory pit (OP) の腹側で発現するのが観察された。背側 OSN の軸索が嗅球に到達する胎生期 13.5 日目のマウス嗅覚組織においては、*Slit1* が嗅球の腹側方向に位置する前脳基底部分 (basal telencephalon) の一部である中隔 (septum) で発現するのが観察された。腹側 OSN の軸索が嗅球に投射し始める胎生期 15.5 日目のマウス嗅覚組織においては、*Slit1* が嗅球腹側で、*Slit3* が嗅球全域で発現するのが観察された (Figure 21)。この結果から、Robo1 陽性 OEC および Robo2 陽性 OSN は、胎生期 11.5 日目では olfactory pit の腹側から分泌された Slit2、胎生期 13.5 日目では septum から分泌された Slit1、胎生期 15.5 日目では嗅球腹側から分泌された Slit1 および Slit3 により、それぞれ反発作用を受ける可能性が示唆された。

## ◆◆◆ 考察 ◆◆◆

### **Robo1、Robo2 KO マウスにおける OSN 軸索の投射異常**

OSN の軸索は、さまざまな種類の細胞を伴って嗅球へ伸長することが知られている。嗅上皮から嗅球へ移動する細胞集団および伸長中の OSN の軸索を合わせて、migratory mass と呼ばれる (Valverde et al., 1992)。migratory mass は、嗅球表面に到達すると嗅神経層 (olfactory nerve layer) となり、生後以降はその存在は観察されない。マウス胎生期 17 日目(ED17)において、wild type マウスでは OSN の軸索が glomerular layer に観察されるのに対し、Robo1/2 double KO マウスおよび Robo2 KO マウスでは OSN の軸索が嗅球腹側で凝集塊を形成するのが観察された。この結果から、通常 migratory mass が嗅球に到達して嗅神経層に広がる段階において、Robo1/2 double KO マウスおよび Robo2 KO マウスでは OSN の軸索が migratory mass の状態のまま留まっている可能性が考えられる。また、背側 OSN の軸索は、Figure 7 および Figure 18 で示したように、一旦嗅球の腹側を通過して嗅球背側まで投射する。Robo1 KO マウスでは、嗅球腹側の嗅神経層が wild type マウスと比較して厚くなり、背側 OSN の軸索が嗅球腹側に誤って投射することが観察された。これは、Robo1 KO マウスにおいて背側 OSN の軸索が正常に嗅球腹側を通過できず、嗅球腹側で停滞した影響によると考えられる。Robo1/2 double KO マウスおよび Robo2 KO マウスで OSN の軸索が凝集塊を形成し、Robo1 KO マウスで嗅神経層が厚くなる嗅球腹側において Robo1/Robo2 のリガンドである Slit1 および Slit3 が発現していた (Figure 21)。よって、嗅球腹側で、Robo1/2 double KO マウスおよび Robo2 KO マウスにおいて OSN の軸索が凝集塊を形成し、Robo1 KO マウスにおいて嗅神

経層が厚くなるのは、Robo2 を欠損した OSN の軸索および Robo1 を欠損した OEC が嗅球腹側で発現する Slit からの反発作用を受けることができなかった結果であると考えられる。もっとも Slit の関与については、今後 Slit KO マウスの解析が必要である。

OSN の軸索を嗅球へ到達させる機構における Robo1 と Robo2 の機能差について、OSN の軸索が嗅球に到達する時期において、OSN で発現する Robo2 は OSN の軸索を migratory mass の状態から嗅神経層に広げるのに必要であり、OEC で発現する Robo1 は嗅神経層において背側 OSN を嗅球背側まで誘導するのに必要であると考えられる。

### **Robo1 陽性 OEC による OSN 軸索誘導の予想モデル**

本研究において、Robo1 KO マウスで、OSN の軸索が嗅球背側に正しく誘導されないことが明らかとなった (Figure 12, 13, 14 and 16)。興味深いことに Robo1 は、OSN の軸索ではなく OSN に付随する OEC において発現することが判明した (Figure 17)。OEC で発現する Robo1 が、OSN の軸索投射をどのように制御するのだろうか？

Robo1 陽性 OEC は、OSN 軸索の根元から伸長中の末端に渡って付随するのが観察された (Figure 17C)。OSN 軸索に付随する Robo1 陽性 OEC が軸索にどのように作用するのかに関して、(1) Robo1 陽性 OEC が、Slit からの反発作用を受けて Slit から遠ざかるほうへ移動するのに伴い、突起で取り囲まれた軸索が引きずられる、または、(2) Robo1 陽性 OEC が、軸索の成長円錐の走行性を制御する、の2つの可能性が考えられる。これまでに、(1)のようにグリア細胞が軸索を引っ張るという誘導機構は報告されていない。しかし、*in vitro* の実験

系において、OEC がアクチンの脱重合を介して Slit2 から遠ざかる方向へ移動することが報告されている (Huang et al., 2011; Wang and Huang, 2012)。また、OEC は突起を伸ばして OSN の軸索束を取り囲むことが電子顕微鏡を用いた観察により示されているが、この OEC と OSN 軸索との接着には、糖タンパク質や細胞接着因子などが関わりと考えられている (Miragall et al., 1989; Puche and Key, 1995)。その内の一例として、胎児期の OEC でポリシアル化された NCAM が、OSN で修飾を受けない NCAM がそれぞれ発現し、これらが OEC と OSN 軸索の接着に関わる可能性が報告されている (Miragall et al., 1989; Franceschini and Barnett, 1996)。これらの知見を総合すると(1)のモデルのように、Robo1 陽性 OEC が NCAM などの接着因子を介して背側 OSN 軸索と接着して存在し、Slit からの反発作用を受けて Robo1 陽性 OEC が Slit を避ける方へ移動するのに伴い、取り囲んだ OSN 軸索を Slit を避ける方へ誘導する可能性は十分に考えられる (Figure 22)。

Robo1 陽性 OEC が OSN 軸索に付随できなくなっていると考えられる NCAM KO マウスにおいては、嗅球腹側の嗅神経層が野生型よりも厚く形成され、OSN の軸索投射に異常があることが報告されている (Treloar et al., 1997)。この表現型は、Robo1 KO マウスで、背側 OSN の軸索が嗅球腹側で停滞し、嗅球腹側の嗅神経層が厚く形成されるという表現型と酷似している。これは、NCAM KO マウスにおいて Robo1 陽性 OEC が OSN の軸索に接着できないため、OSN の軸索が嗅球背側まで正しく誘導されない結果であると考え、Robo1 陽性 OEC が OSN の軸索に接着して OSN の軸索を誘導する可能性と矛盾しない。しかしながら、OEC による軸索誘導機構を詳細に記載するには、今後 *in vitro* の系で、Robo ファミリーを発現しない神経細胞と Robo1 陽性 OEC とを共に培養し、それに対して Slit を与えた場合に、軸索およびその成長円錐がどのような

挙動を示すのかを調べる必要がある。

### **Robos/Slits による背腹軸に沿った OSN 軸索投射の起点の形成**

OSN の背腹軸方向の軸索投射に関して、先に嗅球に到達する背側 OSN の軸索が嗅球背側に Sema3F を持ち込み、後から投射する腹側 OSN の軸索が自身の Nrp2 発現量に応じて嗅球の Sema3F と反発することで、背腹軸に沿ったトポグラフィックオーダーが形成されることが明らかになっている (Figure 6)。よって、軸索投射の初期段階において背側 OSN の軸索が正しく嗅球へ投射し、背腹軸方向の軸索投射における起点を形成する過程が OSN 全体の軸索投射においてもっとも重要である。

マウス胎生期 12 日目前後において、嗅上皮の背側方向に嗅球が位置すること、さらに Robo1/2 double KO マウスにおいて背側 OSN の軸索が嗅球の腹側で異常に凝集することから、背側 OSN の軸索はまず、背側方向に向かって伸長し、嗅球の腹側で一旦嗅球と接触するがそのまま通過し、嗅球背側へ押し上げられると考えられる (Figures 7 and 18)。このように複雑な軸索投射経路は、どのように形成されるのであろうか？

本研究において、OSN の軸索が伸長し始める胎生期 11.5 日目において、Robo1 陽性 OEC が存在する位置より腹側に Slit2 が発現することを明らかにした (Figure 21)。この時期においては、嗅球で Slits の発現は検出できない。さらに、OSN の軸索が嗅球に到達する胎生期 13.5 日目においては、嗅球の外側の前脳基底部分で Slit1 が発現し、OSN の軸索が嗅球上で背腹軸に沿ったトポグラフィックオーダーを形成する時期において、嗅球腹側で Slit1 および Slit3 が発現する (Figure 21)。また、*in vitro* において、OEC が Slit2 に対して反発することも

報告されている (Huang et al., 2011)。これらの実験結果および知見から、以下のモデルが考えられる (Figure 22)。胎生期 11.5 日目において、OSN の軸索は、Slit2 からの反発作用を受けて嗅上皮から嗅球へ向かって伸長を始め、付随してくる Robo1 陽性 OEC と共に、OSN 軸索の伸長する方向を調節する。胎生期 13.5 日目になると、Robo1 陽性 OEC を付随した Robo2 陽性 OSN の軸索は、嗅球外側の前脳基底部の中隔(septum)において発現する Slit1 による反発作用によって、投射先を嗅球に誘導される。胎生期 15.5 日目は、OSN 軸索が嗅球上で背腹軸に沿ってトポグラフィが形成する時期に当たるが、嗅球腹側で発現する Slit1 および Slit3 によって、Robo1 陽性 OEC を付随した Robo2 陽性 OSN の軸索は嗅球背側へ誘導され、Robo1 陽性 OEC を付随しない Robo2 陰性 OSN の軸索は嗅球腹側にそのまま投射すると考えられる (Figure 22)。実際にどの Slit からの反発作用が必須であるのかを確認するためには、分泌された Slit タンパク質の局在、そして Slit KO マウスにおける OSN の軸索投射の解析が必要である。

Robo1 陽性 OEC は、どのように背側 OSN の軸索に選択的に付随するのだろうか? lamina propria に存在する OEC における Robo1 の発現は、背側 OSN の軸索が lamina propria を通過して嗅球へ伸長する時期(胎生期 13.5 日目付近)でもっとも高く、その後腹側 OSN の軸索が lamina propria を通過する時期には発現が減少あるいは消失している。よって、先に伸長する背側 OSN の軸索が Robo1 陽性 OEC を付随して嗅球へ持ち去り、その後伸長する腹側 OSN の軸索は、Robo1 の発現が減少した OEC を付随することで、Robo1 陽性 OEC が、背側 OSN の軸索に偏って付随すると考えられる。以上のようなモデルで、背腹軸方向の OSN 軸索投射における起点が形成される可能性が示唆された。

背側 OSN の軸索が嗅球背側へ誘導される過程における Robo1/Slits シグナルの関与について、上記で述べたような Robo1/Slits による反発性相互作用によって背側 OSN の軸索が嗅球背側へ積極的に誘導される、というモデルには別に、Robo1/Slits による反発性相互作用によって、嗅球背側に投射した背側 OSN の軸索投射位置を維持する、という可能性も考えられる。確かに、胎生期の嗅球は、将来背側領域となる部分が最初に形成され、徐々に腹側領域が付加していくため、先に投射する背側 OSN の軸索が到達した地点はすでに嗅球背側であるとも考えられる (Takeuchi et al., 2010)。しかし実際には、胎生期 13 日目付近の wild type マウスでは背側 OSN の軸索は嗅球の腹側を通過して背側へ投射する、という経路を辿っており、この時期では 2 次神経細胞とはまだ接続していないと考えられている。また、軸索伸長期の Robo1/2 double KO マウスおよび Robo2 KO マウスでは、一旦嗅球背側に投射した背側 OSN の軸索が、投射位置を維持できずに嗅球腹側に移動した、という結果は観察されていない。考察の冒頭で述べたようにいずれの Robo ファミリー欠損マウスにおいても、OSN 軸索が嗅球と最初に接する嗅球腹側で OSN の軸索投射が停滞していたことから、Robo1/Slits シグナルは、背側嗅細胞の軸索投射位置の維持ではなく、積極的に正確な投射位置への誘導に機能すると考えられる。

### **OSN 軸索投射における、軸索ーグリア細胞間の相互作用の役割**

これまで OEC について、laminin や collagen などを分泌し、OSN の軸索伸長を許容する微小環境を形成する機能が報告されている。また、OEC で発現する反発性リガンドが OSN の軸索投射に関わることが示唆されている (Crandall et al., 2000; Schwarting et al., 2000; Imai et al., 2009)。しかしながら、OEC

で発現する軸索誘導受容体が間接的に OSN の軸索投射に関与するという報告は、これまでに存在しない。背腹軸に沿った OSN 軸索投射に関しては、Nrp2/Sema3F を介した軸索-軸索間の相互作用、および Robo2/Slit1,3 を介した軸索-投射先間の相互作用がトポグラフィックオーダーの形成を制御することが示されてきた。しかし本研究によって、Robo1 陽性グリア細胞(OEC)が許容的というよりもむしろ指令的に、最初に投射する背側 OSN の軸索を嗅球背側へ誘導することが明らかになった。グリア細胞が OSN の軸索に付随することによって行う軸索投射誘導は、まったく新奇の神経投射メカニズムとして極めて重要であると言える。



## ◆◆◆ 材料と方法 ◆◆◆

### 実験動物

野生型(wild type)マウスは、C57BL/6J を日本 SLC から購入した。Robo1/Robo2 KO マウスは、Mutant Mouse Regional Resource Centers (MMRRC)から購入した。OMACS-Cre マウスおよび $\beta$ 2AR-gapCFP マウスは、当研究室で作製されたものを用いた (Kobayakawa et al., 2007; Nakashima et al., 投稿中)。#123-Cre マウス、NSE-DTA マウスは、理化学研究所脳科学総合研究センターの吉原良浩先生、糸原重美先生からそれぞれ提供頂いた。

### マウス嗅覚組織凍結切片の作成

成体マウスは、氷冷した 4%パラホルムアルデヒド/PBS で還流固定した後、嗅覚組織を摘出し、O.C.T. compound (Sakura Finetek Tissue-Tek)に包埋して液体窒素で凍結させた。

胎生期マウスは、妊娠メスマウスから摘出し、4%パラホルムアルデヒド/PBS で 1 晩 4°C で固定した後、30%スクロース/PBS で 1 晩 4°C で置換し、O.C.T. compound に包埋して液体窒素で凍結させた。

O.C.T. compound に包埋したサンプルから Cryostat (Leica)を用いて切片を作成し、APS コートしたスライドガラス(MATSUNAMI)に貼り付けた。

### *in situ* hybridization 法

発現解析を行う遺伝子は、遺伝子野生型マウスC57BL/6Jの嗅上皮組織から得られたcDNAを鋳型に、500bp~1000bpのDNA断片としてPCRによって増幅し、

クローニングした。このDNA断片をpGEM-T (Promega)に入れてサブクローニングしたものを、プローブ転写時の鋳型として使用し、DIG RNA labeling kit (Roche)を用いてDigoxigenin (DIG)で標識されたアンチセンス鎖のRNAプローブを作成した。

*in situ* hybridization法は、坪井、宮道らの方法に従って行ったが、簡潔に以下に記す (Tsuboi et al., 1999; Miyamichi et al., 2005)。マウス嗅覚組織凍結切片をスライドガラスに貼り付けたものをサンプルとして用いた。まず、サンプルを4°Cの4%パラホルムアルデヒド/PBSで15分間固定した。PBSで洗浄したのち、37°Cの7µg/ml Proteinase K, 10mM Tris-HCl, pH 7.4, 1mM EDTAで10分間処理した。4°Cの4%パラホルムアルデヒド/PBSで10分間固定したのち、0.25%無水酢酸、0.1Mトリエタノールアミン、pH 8.0で10分間処理した。その後PBSで洗浄し、風乾させた。サンプルに、DIG標識RNAプローブをのせ、51°Cで16時間反応させた。その後、サンプルを2×SSC (0.3M NaCl, 0.03M クエン酸ナトリウム)、50%ホルムアミド、次に2×SSC、さらに0.2×SSCでそれぞれ20分間洗浄した。1.5% blocking reagent (Roche)で1時間ブロッキングした後、1000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合抗DIG抗体(Roche)と1時間反応させた。そして nitroblue tetrazolium salt (NBT) および 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate toluidinium salt (BCIP)、または HNPP/FastRed (Roche)を用いて、発色反応を行なった。十分な染色シグナルが得られた後、TEバッファーで洗浄して発色を停止し、光学顕微鏡または蛍光顕微鏡を用いて観察した。

## **1 次抗体**

抗 Neuropilin2 抗体 (goat, 1:500)、抗 Robo1 抗体 (goat, 1:30) および抗 Robo2 抗体 (goat, 1:100) は R&D Systems から購入した。抗 GFP 抗体 (rabbit, 1:1000)、抗 NCAM 抗体 (mouse, 1:500)、抗 NQO1 抗体 (goat, 1:700)、抗 S100 $\beta$  抗体 (rabbit, 1:5000)、抗 p75 抗体 (rabbit, 1:500) は、それぞれ Invitrogen、Sigma、Abcam、DAKO、Promega から購入した。

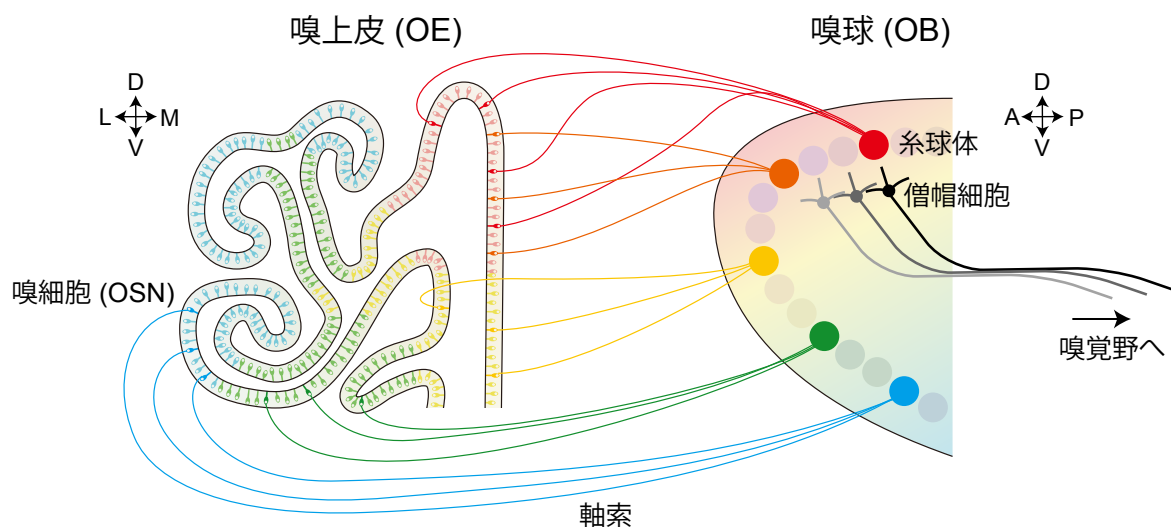
## **免疫組織染色**

免疫組織染色は、芹沢らによる方法に従って行ったが、以下に簡潔に記す (Serizawa et al., 2006)。マウス嗅覚組織凍結切片を貼り付けたスライドガラスを、4°C の 4% パラホルムアルデヒド/PBS で 15 分間固定した。PBS で 3 回洗浄したのち、5% スキムミルク、PBST (0.2% Triton-X100, PBS) で 15 分間ブロッキングを行った。1 次抗体をのせて 1 晩反応させた後、PBST で 3 回洗浄した。200 倍に希釈した 2 次抗体 (Invitrogen) と 1 時間反応させた後、PBS で洗浄し、蛍光顕微鏡 (Model IX70, Olympus) を用いて観察した。画像は CCD camera (C4742-95-12ERG, Hamamatsu Photonics) で撮影し、コンピューター上で Adobe Photoshop、Illustrator を使って加工した。



- Figure 1. マウス嗅細胞軸索投射における嗅上皮と嗅球の空間的な対応関係
- Figure 2. 嗅覚2次神経細胞、僧帽細胞による匂い情報の伝達経路
- Figure 3. Nrp2 の発現量の低い背側嗅細胞は嗅球背側に、Nrp2 の発現量の高い腹側嗅細胞は嗅球腹側に、それぞれ軸索を投射する
- Figure 4. 嗅上皮の嗅細胞において、*Nrp2* と *Sema3F* は相補的に発現する
- Figure 5. 嗅細胞で産生された *Sema3F* は、嗅球背側に局在する
- Figure 6. 先に投射する背側嗅細胞の軸索が持ち込む *Sema3F* が、遅れて投射してくる *Nrp2* 陽性腹側嗅細胞の軸索を嗅球の腹側に誘導する
- Figure 7. マウス胎生期における嗅覚組織の発生
- Figure 8. マウス嗅粘膜の構造
- Figure 9. Robo の反発性のリガンド Slit
- Figure 10. Robo2 KO マウスにおいて、一部の OSN の軸索は嗅球の嗅神経層に到達するが、残りの OSN の軸索は嗅球外側に軸索凝集塊を形成する
- Figure 11. Robo1/2 double KO マウスにおいて、OSN 軸索のほとんどが嗅球の嗅神経層に到達できず、嗅球外側に軸索凝集塊を形成する
- Figure 12. Robo1 KO マウスにおいて、OSN の軸索は嗅球の嗅神経層に到達するものの、背側 OSN の軸索の一部が腹側の嗅神経層で停滞する
- Figure 13. 成体 Robo1 KO マウスにおいて、背側 OSN の軸索が嗅球背側に加えて嗅球腹側にも投射する
- Figure 14. Robo1 KO により、 $\beta 2$  adrenergic receptor 陽性 OSN の軸索は通常投射する嗅球背側の糸球体に加えてより腹側に異所的な糸球体を形成する

- Figure 15. 嗅上皮における OSN の配置は、Robo1 KO の影響を受けない
- Figure 16. Robo1 KO による $\beta$ 2AR 陽性 OSN の軸索投射異常は、軸索が嗅球に到達した後に観察される
- Figure 17. Robo1 は、OSN ではなく、グリア細胞である olfactory ensheathing cell (OEC) で発現する
- Figure 18. 発生段階を追った Robo1 の発現の推移
- Figure 19. 遺伝的に OSN が除去された OSN depleted マウスの作製
- Figure 20. OSN の軸索伸長に依存した OEC の嗅上皮から嗅球への移動
- Figure 21. OSN の軸索投射経路における Robo1 の反発性リガンド *Slit1*、*Slit2*、*Slit3* の発現
- Figure 22. Robo1 陽性 OEC による OSN の軸索誘導機構のモデル

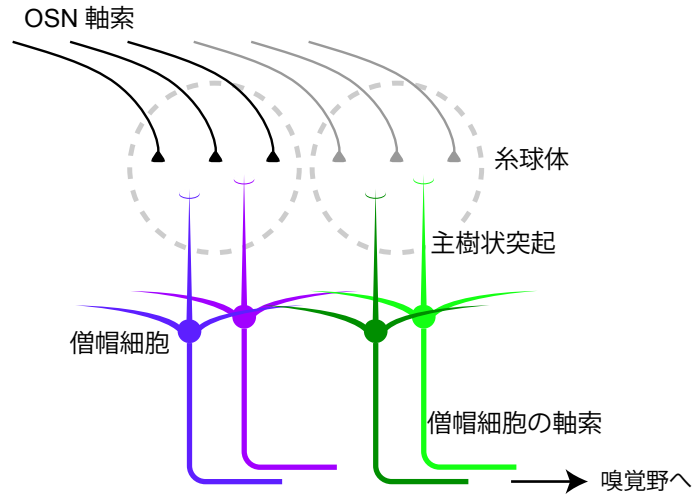
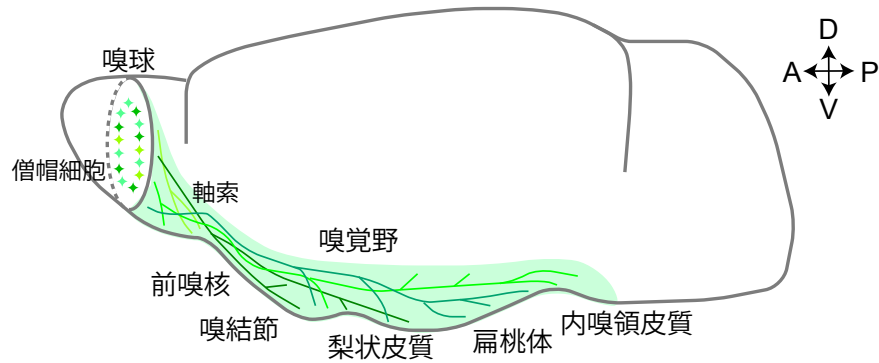


**Figure 1. マウス嗅細胞軸索投射における嗅上皮と嗅球の空間的な対応関係**

鼻腔奥に存在する嗅上皮において、約 1,000 万個存在する嗅細胞 (OSN) は、約 1,000 種類ある OR 遺伝子のうち、それぞれ 1 種類のみを相互排他的かつ mono-allelic に発現する。また、同種の OR 分子を発現する OSN の軸索は脳前方にある嗅球に投射し、特定の糸球体へと収斂する。従って、投射先の嗅球において、OR 分子の種類に依存した数の糸球体が形成される。匂い分子は、嗅上皮において複数種類の OR 分子と様々な強度で結合し、嗅球において対応した糸球体をそれぞれの強度で発火させる。従って嗅球表面では、約 1,000 個の糸球体を素子とする電光掲示板のように、匂い分子に固有の発火パターンが形成され、匂い情報が 2 次元の神経マップに変換される。

個々の OR 分子は、嗅上皮の背腹軸方向に沿ってそれぞれに固有な限定された発現領域を持ち、それらは互いに重複して分布している (赤～黄～緑～青)。嗅上皮の背側に存在する OSN は嗅球の背側に、腹側に存在する OSN は嗅球の腹側に軸索を投射する。

OR, odorant receptor; OSN, olfactory sensory neuron; OE, olfactory epithelium; OB, olfactory bulb; D, dorsal; V, ventral; A, anterior; P, posterior; L, lateral; M, medial

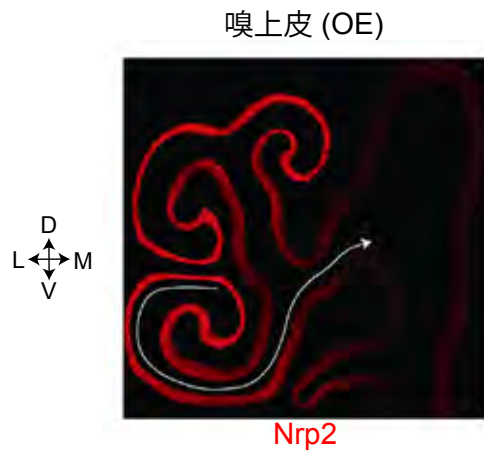
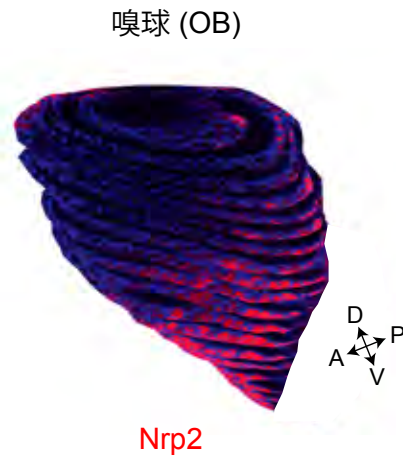
**A****B**

**Figure 2. 嗅覚 2 次神経細胞、僧帽細胞による匂い情報の伝達経路**

(A) 匂い情報によって嗅球においてどの系球が発火したかという情報は、さらに 2 次神経細胞である僧帽細胞によって中枢（嗅覚野）へ伝達される。僧帽細胞は、系球体において OSN から匂い情報を受け取る。ひとつの系球体には、20 ~ 40 の僧帽細胞がそれぞれ 1 本ずつ主樹状突起を伸ばし、OSN の軸索と接続する。

(B) 僧帽細胞は、枝分かれした軸索を、前嗅核、嗅結節、梨状皮質、扁桃体、内嗅領皮質へと投射することで、脳のさまざまな領野に匂い情報を伝達する。

OR, odorant receptor; OSN, olfactory sensory neuron; OE, olfactory epithelium; OB, olfactory bulb; D, dorsal; V, ventral; A, anterior; P, posterior; L, lateral; M, medial

**A****B**

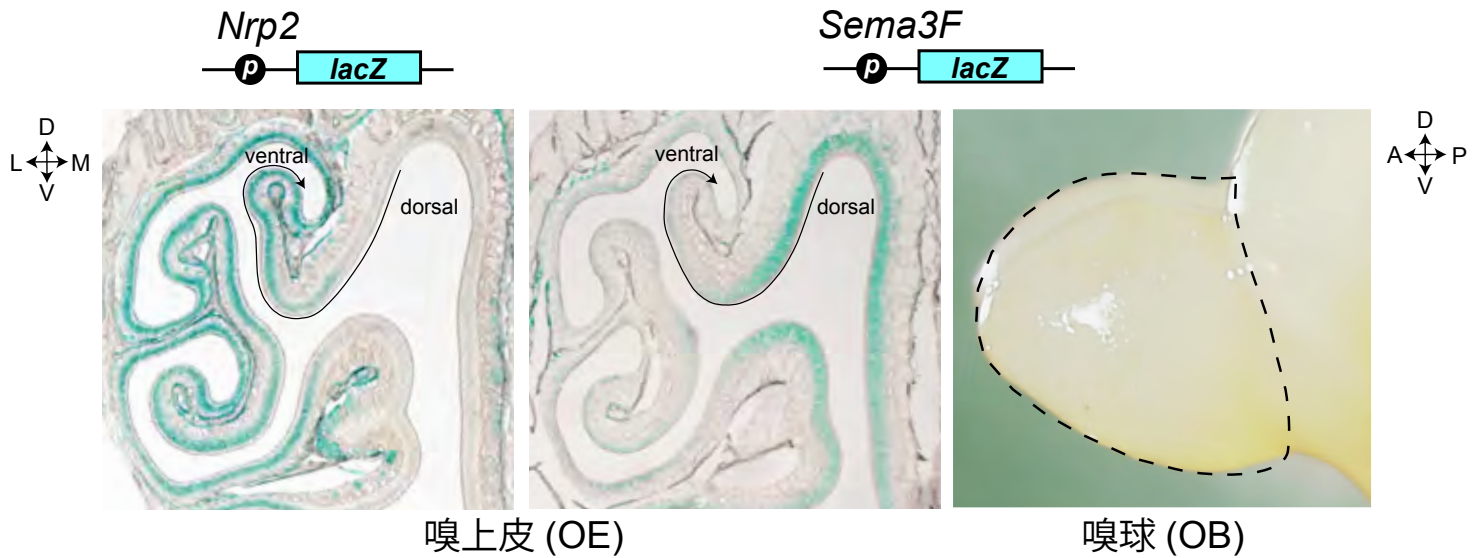
**Figure 3. Nrp2 の発現量の低い背側嗅細胞は嗅球背側に、Nrp2 の発現量の高い腹側嗅細胞は嗅球腹側に、それぞれ軸索を投射する**

(A) 嗅上皮における領域特異的な Nrp2 の発現。Nrp2 は、嗅上皮の腹側に位置する嗅細胞で強く発現し、背側に向かうにつれて弱くなるという、位置に依存した発現パターンを示す。

(B) 抗 Nrp2 抗体による抗体染色を行なったマウス嗅球切片を重ねた図。嗅細胞の軸索末端の投射先を示す。嗅上皮の背側に存在する Nrp2 の発現量の低い嗅細胞は嗅球の背側に、腹側に存在する Nrp2 の発現量の高い嗅細胞は嗅球の腹側に軸索を投射する。

Nrp2, Neuropilin-2; D, dorsal; V, ventral; L, lateral; M, medial; A, anterior; P, posterior.

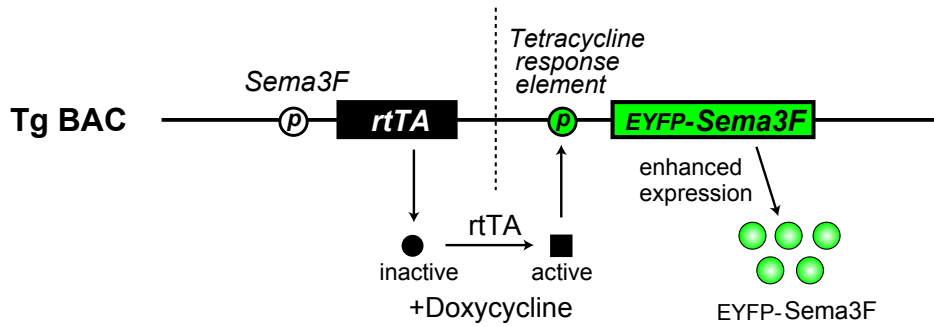
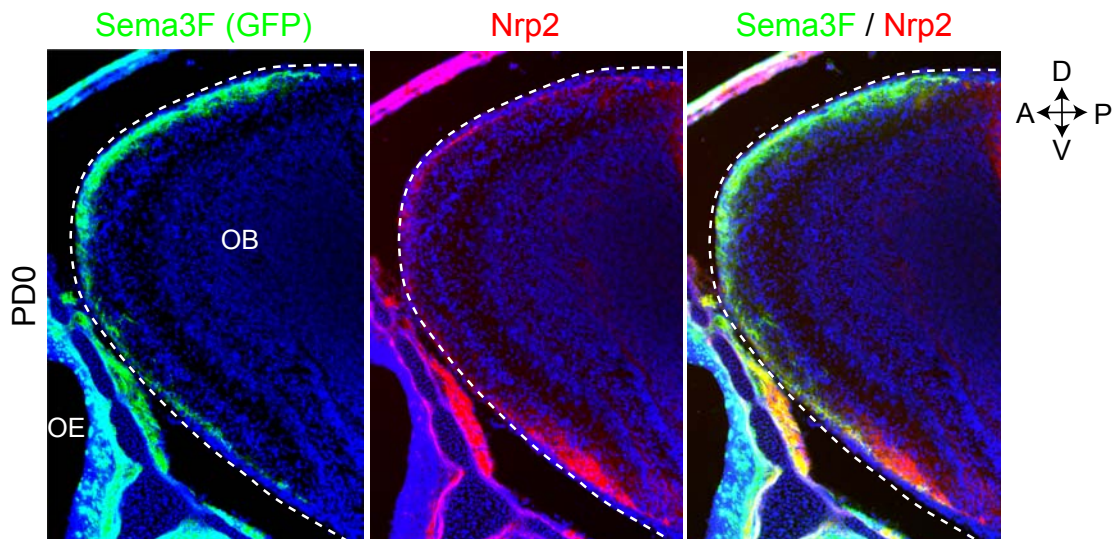




**Figure 4. 嗅上皮の嗅細胞において、*Nrp2* と *Sema3F* は相補的に発現する**

*Nrp2* プロモーター、*Sema3F* プロモーターの下流に *lacZ* 遺伝子のコーディング配列をそれぞれ挿入したノックインマウスの嗅上皮切片または嗅球 wholemount における X-gal 染色。*Sema3F* プロモーターの活性は、嗅上皮の嗅細胞において観察され、さらにその発現強度は *Nrp2* とは相補的になっている。投射先の嗅球 (OB) においては、*Sema3F* プロモーターの活性は観察されない。

p, promoter, *Nrp2*, Neuropilin-2; D, dorsal; V, ventral; L, lateral; M, medial; A, anterior; P, posterior.

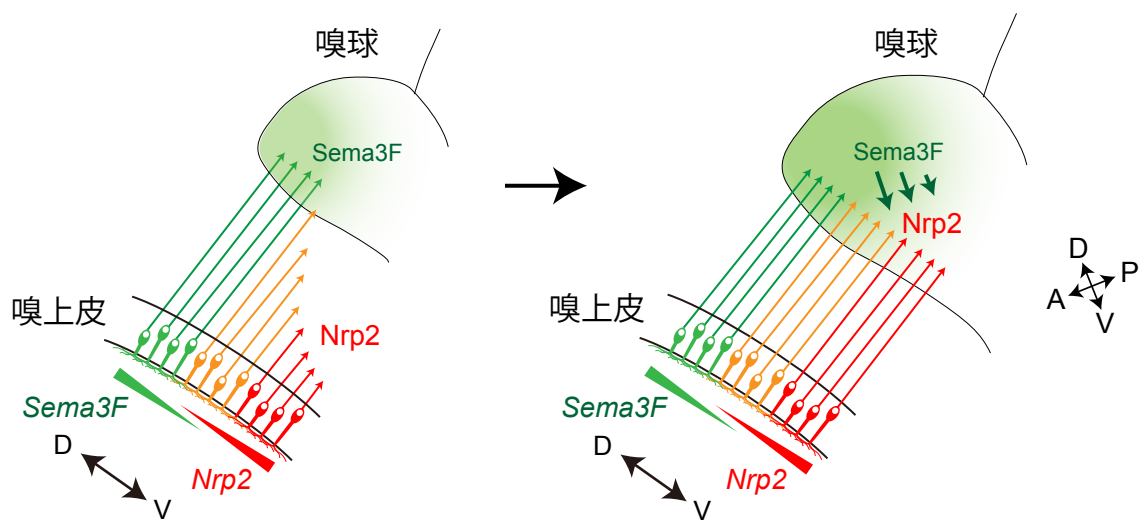
**A****B**

**Figure 5. 嗅細胞で産生された Sema3F は、嗅球背側に局在する**

(A) BAC-Tg EYFP-Sema3F のコンストラクト。Doxycycline をトランスジェニックマウスに経口投与することで、EYFP-Sema3F 融合タンパク質が高発現するようになる。

(B) BAC-Tg EYFP-Sema3F マウスにおける嗅球の parasagittal 切片における抗体染色。抗 GFP 抗体によって EYFP (緑) を、抗 Nrp2 抗体によって Nrp2 (赤) を検出した。DAPI による核染色を青で示した。嗅細胞で産生された Sema3F は、投射先である嗅球背側の神経軸索層に検出され、嗅球上において Nrp2 とは概ね相補的な局在パターンを示す。

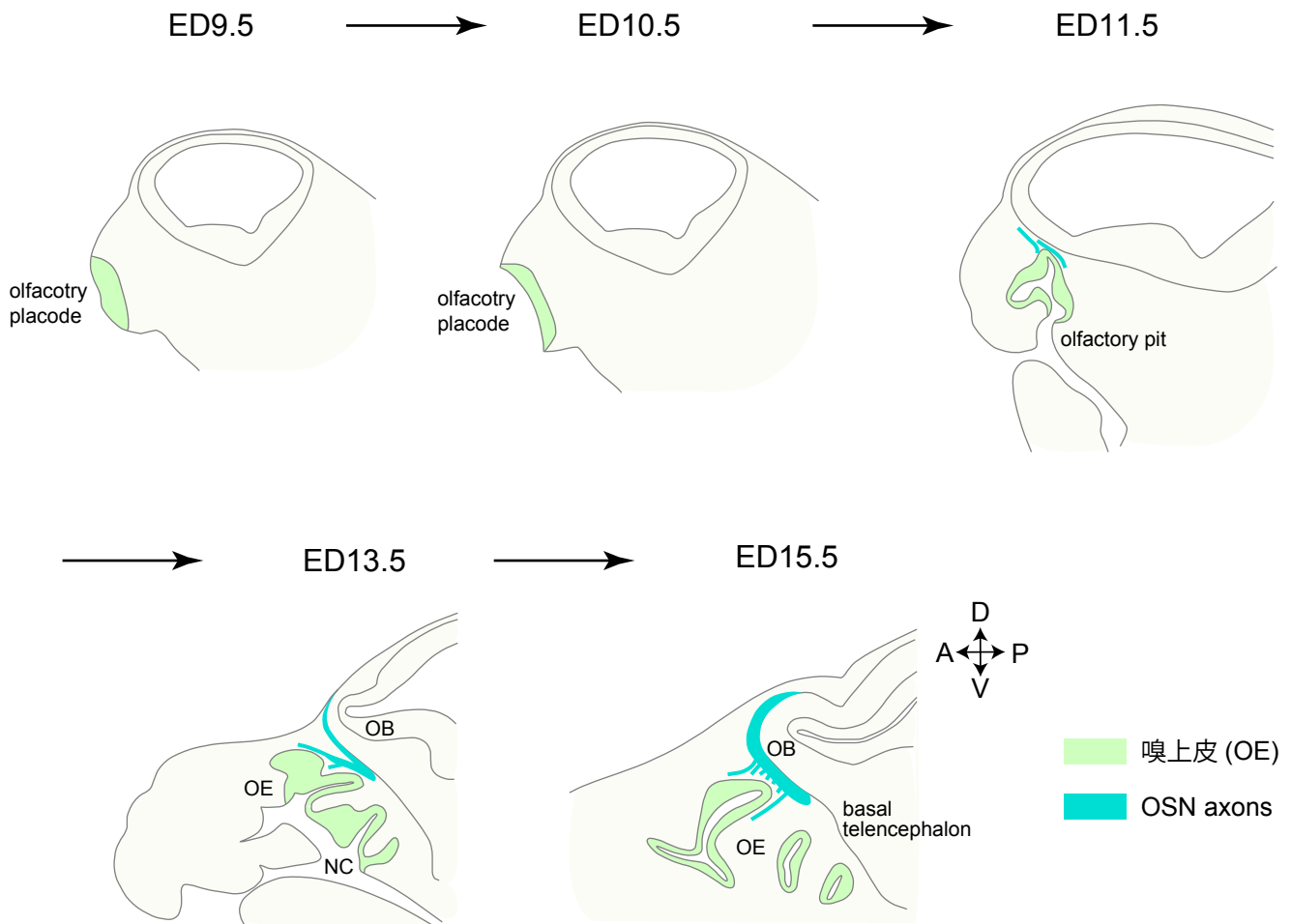
Tg, transgenic; BAC, bacterial artificial chromosome; p, promoter; rtTA, reverse tetracycline-controlled transactivator; TRE, tetracycline response element; EYFP, enhanced yellow fluorescent protein; PD, postnatal day; OE, olfactory epithelium; OB, olfactory bulb; D, dorsal; V, ventral; A, anterior; P, posterior



**Figure 6. 先に投射する背側嗅細胞の軸索が持ち込む Sema3F が、遅れて投射してくる Nrp2 陽性腹側嗅細胞の軸索を嗅球の腹側に誘導する**

嗅細胞の背腹軸方向に沿った軸索投射のモデル。まず、Sema3F を発現する背側嗅細胞の軸索が先に嗅球に到達する。背側嗅細胞の軸索によって嗅球に持ち込まれた Sema3F が嗅球背側に広がり、反発作用によって遅れて投射してくる Nrp2 を発現する腹側嗅細胞の軸索を嗅球の腹側に誘導する。

Nrp2, Neuropilin-2; D, dorsal; V, ventral; A, anterior; P, posterior

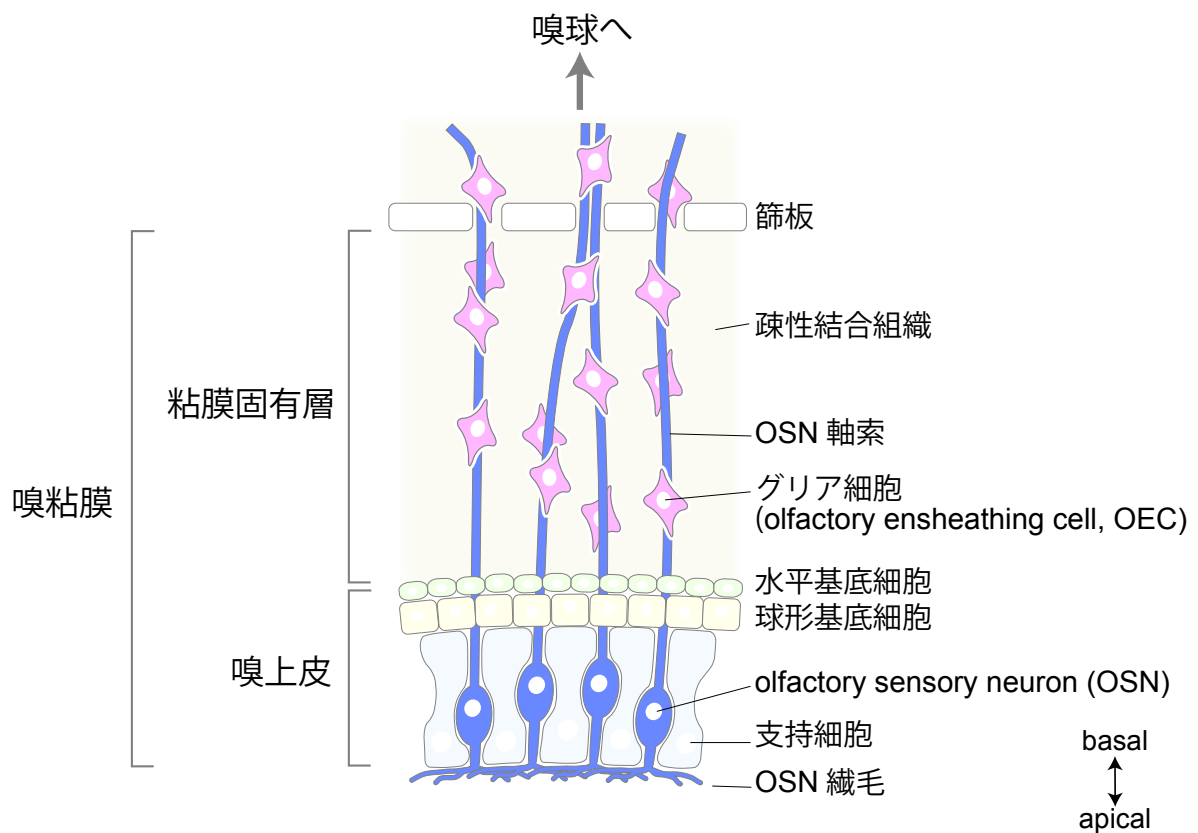


**Figure 7. マウス胎生期における嗅覚組織の発生**

マウス胎生期 10.5 日目から、嗅板 (olfactory placode) が陥入し、嗅窩 (olfactory pit) が形成される。マウス胎生期 12 日目には、深く陥入した嗅窩の入り口が狭まり、鼻腔 (nasal cavity, NC) が形成される。その後、鼻腔において鼻甲介 (turbinate) が発達するにつれて、嗅上皮が広がっていく。一方、同胎生期 12 日目には終脳の前腹部が突出し始め、将来嗅球となる組織が形成される。

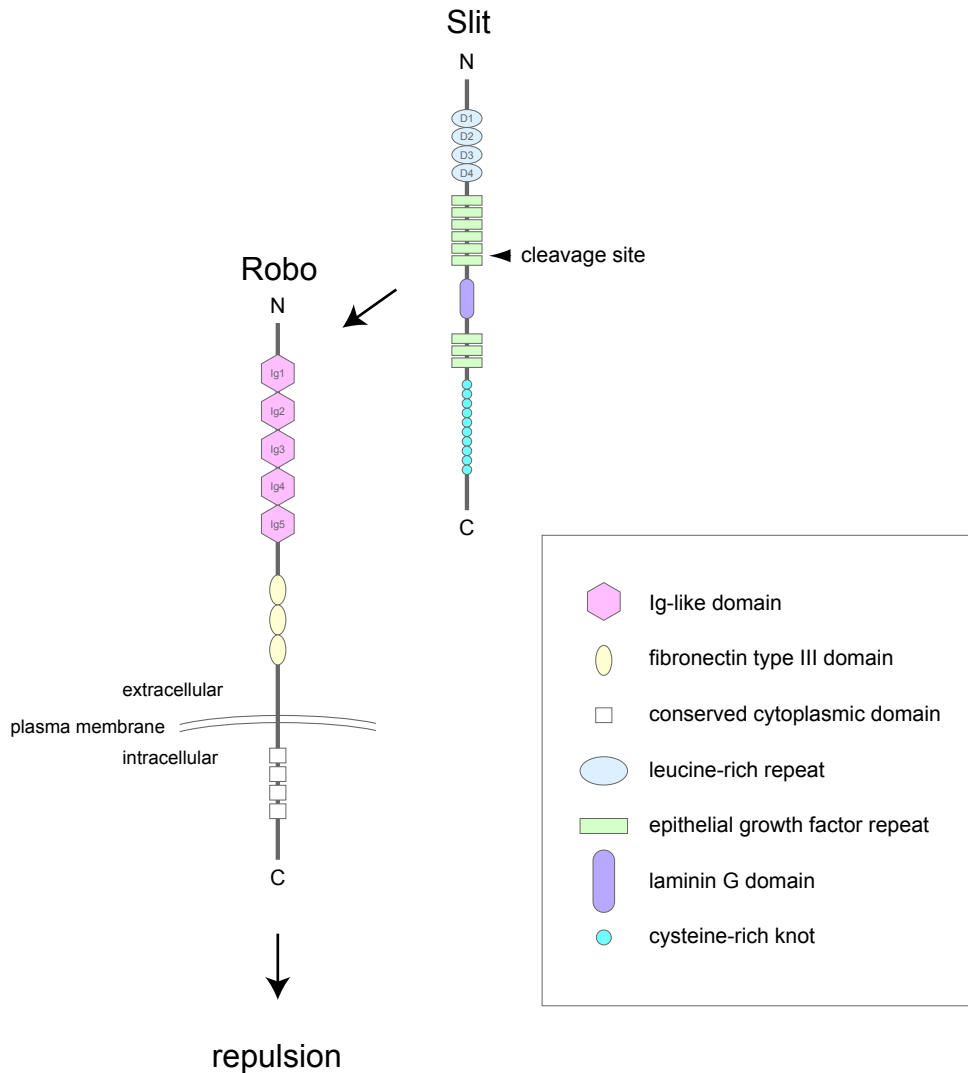
未成熟な嗅細胞 (OSN) は、マウス胎生期 9.5 日目以降から観察され、OSN の軸索はマウス胎生期 11 日目以降において観察される。マウス胎生期 11.5 日目に、最初に投射する OSN の軸索が嗅球へ向かって伸長を始め、マウス胎生期 13.5 日目には背側 OSN が嗅球へ到達する。マウス胎生期 15.5 日目以降、腹側 OSN の軸索が伸長を開始し、嗅球において背腹軸に沿ったトポグラフィーが形成される。

OE, olfactory epithelium; OB, olfactory bulb; OSN, olfactory sensory neuron; D, dorsal; V, ventral; A, anterior; P, posterior



**Figure 8. マウス嗅粘膜の構造**

嗅粘膜は、嗅上皮と粘膜固有層 (lamina propria) から形成される。嗅上皮は、OSN、支持細胞、球形基底細胞、水平基底細胞により形成される。粘膜固有層は、疎性結合組織、グリア細胞である olfactory ensheathing cell (OEC) により形成される。球形基底細胞から OSN、支持細胞、水平基底細胞が分化する。嗅球へ伸長する OSN の軸索は、最初に粘膜固有層を通過し、その際に OEC を付随して篩板の穴を通過し、OEC と共に嗅球へ投射する。



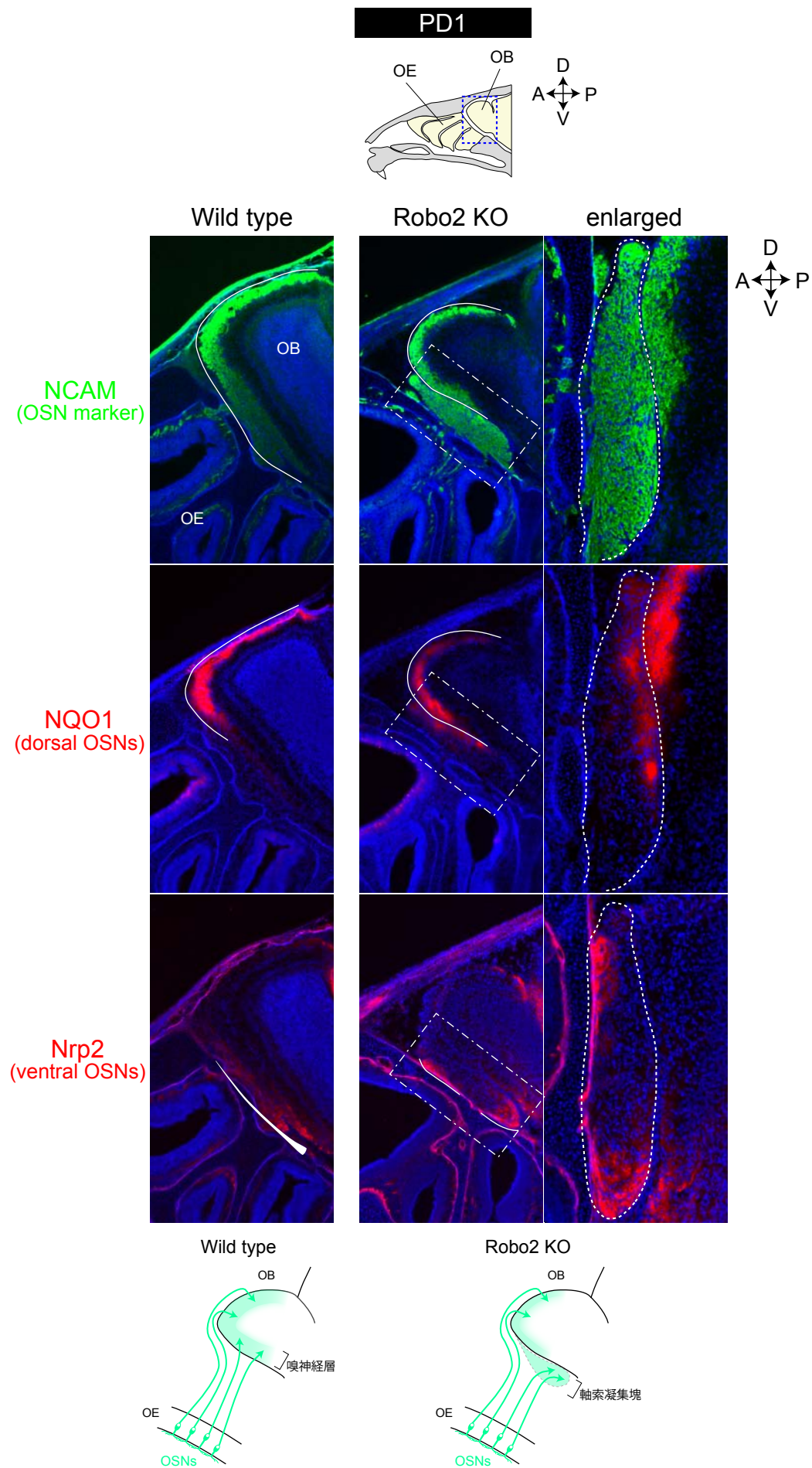
**Figure 9. Robo の反発性のリガンド Slit**

Robo/Slit は、ショウジョウバエ、カエル、ゼブラフィッシュ、マウス、ラットなどで発現が報告されており、さまざまな神経系で重要な役割を果たす軸索誘導分子の受容体/リガンドである。

哺乳類においては Slit1、Slit2、Slit3 の3つが報告されており、3つとも神経系で発現が観察される。Slit は、N 末端シグナルペプチド、4つのロイシンリッチリピート (D1-D4)、epithelial growth factor (EGF)-like 配列、laminin-G ドメイン、C 末端システインリッチノットから構成され、分泌型として存在する。Slit は、切断されて C 末端側と N 末端側に分かれるが、N 末端側が活性型として機能し、受容体である Robo に結合する。

Robo (roundabout) は、膜結合型の受容体であり、免疫グロブリンスーパーファミリーの1つのサブグループを形成する。哺乳類においては、Slit の受容体として Robo1、Robo2、Robo3 の3つが脳組織において発現することが報告されている。Robo は、5つの免疫グロブリンドメイン (Ig1-Ig5)、3つの fibronectin type III ドメイン、4つの conserved cytoplasmic ドメインから構成される。Slit のロイシンリッチリピートの D2 と Robo の免疫グロブリンドメインの Ig1、Ig2 とが結合する。

Slit は、Robo に対して反発性の分泌型リガンドとして機能する。Slit が Robo に結合すると、Robo の下流のシグナルによってアクチンや微小管などの細胞骨格の変化が誘導され、Robo 陽性細胞は Slit を避ける方向へ移動し、Robo 陽性神経軸索の成長円錐は Slit を避ける方向へ走行する。



**Figure 10. Robo2 KO マウスにおいて、一部の OSN の軸索は嗅球の嗅神経層に到達するが、残りの OSN の軸索は嗅球外側に軸索凝集塊を形成する**

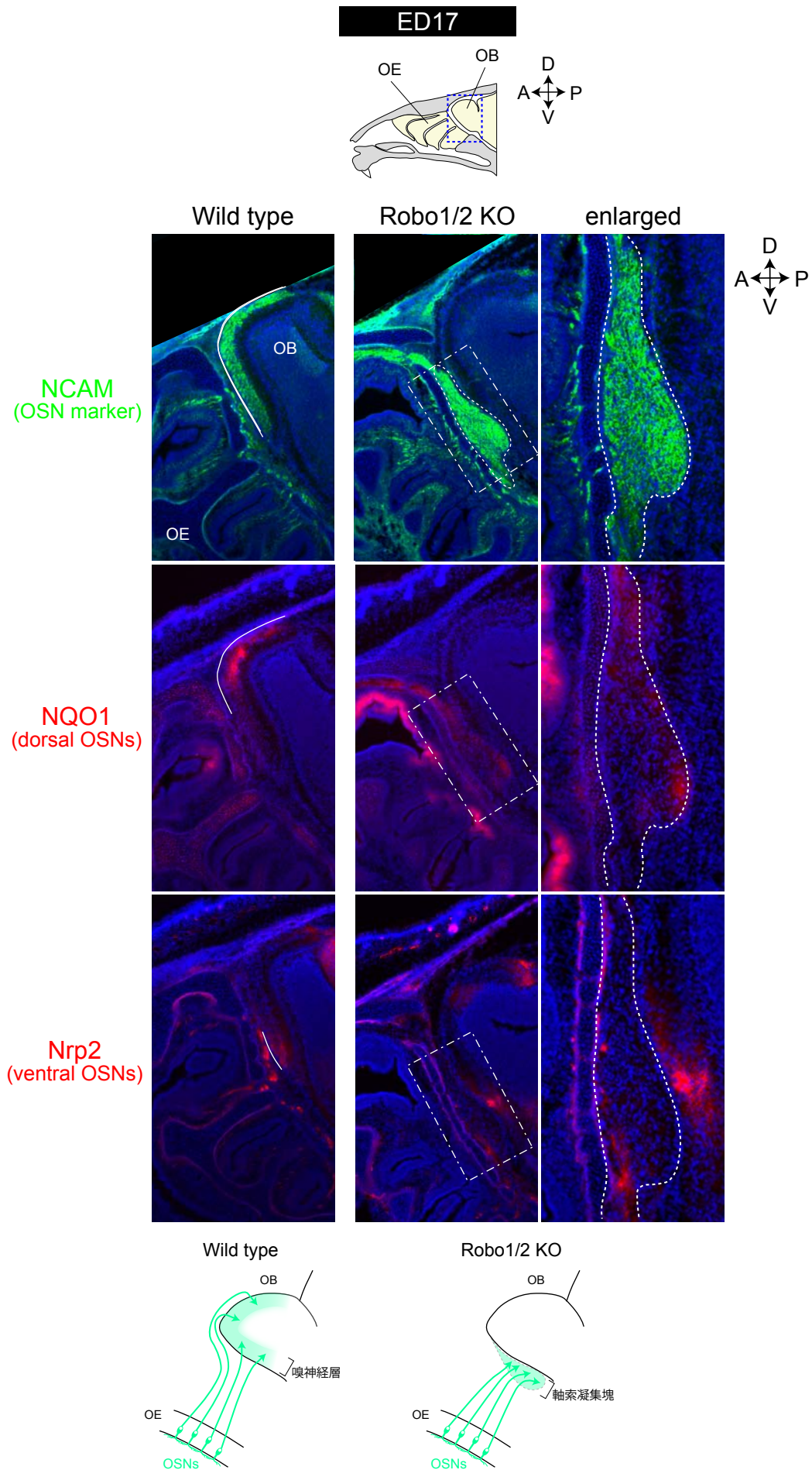
## Figure 10. Robo2 KO マウスにおいて、一部の OSN の軸索は嗅球の嗅神経層に到達するが、残りの OSN の軸索は嗅球外側に軸索凝集塊を形成する

マウス生後 1 日目 (PD1) の wild type マウス (左) および Robo2 KO マウス (右、破線四角を拡大したものを右隣りに示す) の sagittal 切片において、NCAM (全 OSN マーカー)、NQO1 (背側 OSN マーカー)、および Nrp2 (腹側 OSN マーカー) に対する抗体を用いた免疫組織染色を行った。

全 OSN の軸索を示す NCAM のシグナルは、wild type マウスにおいては嗅球の背側から腹側まで嗅神経層全域に観察された。それに対して Robo2 KO マウスの嗅球では、NCAM (OSN マーカー) のシグナルは、嗅神経層に加えて嗅球外側に凝集して観察された (点線内)。また、wild type マウスの嗅球では NQO1 のシグナルは背側嗅神経層で、Nrp2 のシグナルは腹側嗅神経層でそれぞれ観察された。一方 Robo2 KO マウスの嗅球では、NQO1 (背側 OSN マーカー) のシグナルは、嗅神経層の背側のみならず、野生型では認められなかった腹側でも観察された。嗅球外側に形成された凝集塊の中には、NQO1 のシグナルも Nrp2 (腹側 OSN マーカー) のシグナルも観察された。

PD, postnatal day; OSN, olfactory sensory neuron; OE, olfactory epithelium; OB, olfactory bulb; Nrp2, Neuropilin-2; D, dorsal; V, ventral; A, anterior; P, posterior





**Figure 11. Robo1/2 double KO マウスにおいて、OSN 軸索のほとんどが嗅球の嗅神経層に到達できず、嗅球外側に軸索凝集塊を形成する**

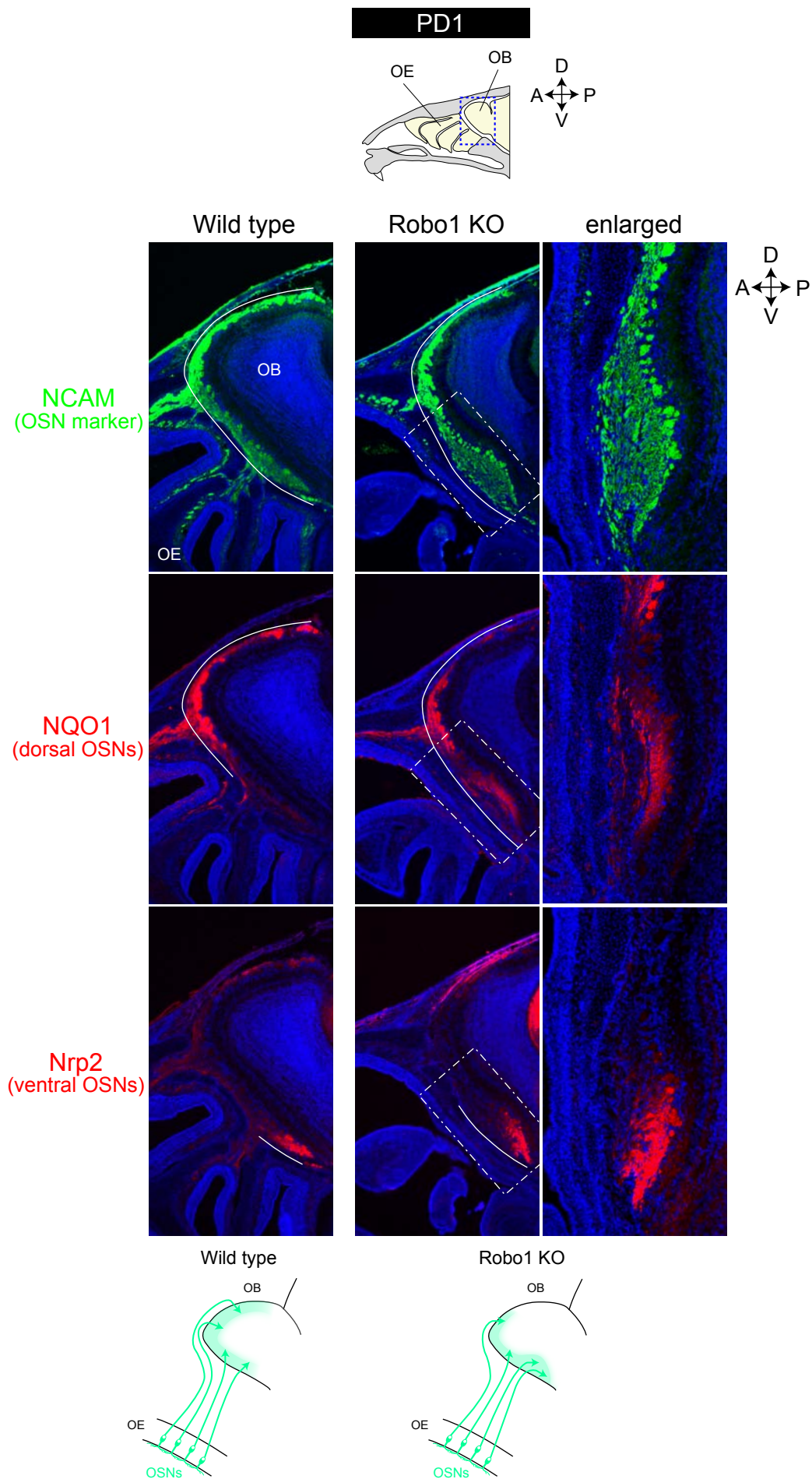
(説明は次のページに記載)

## Figure 11. Robo1/2 double KO マウスにおいて、OSN 軸索のほとんどが嗅球の嗅神経層に到達できず、嗅球外側に軸索凝集塊を形成する

マウス胎生期 17 日目 (ED17) の wild type マウス (左) および Robo1/2 double KO マウス (右、破線四角を拡大したものを右隣りに示す) の sagittal 切片において、NCAM (OSN マーカー)、NQO1 (背側 OSN マーカー)、および Nrp2 (腹側 OSN マーカー) に対する抗体を用いた免疫組織染色を行った。

OSN の軸索を示す NCAM のシグナルは、wild type においては嗅球の背側から腹側まで嗅神経層全域に観察された。それに対し、Robo1/2 double KO における NCAM のシグナルは、嗅球背側および腹側の嗅神経層でほとんど観察されず、嗅球腹側の嗅神経層の外側に凝集して観察された (点線内)。また、wild type マウスにおいて、NQO1 陽性 OSN は嗅球背側へ、Nrp2 陽性 OSN は嗅球腹側へ、それぞれ軸索を投射するため、嗅球の免疫組織染色における NQO1 のシグナルは背側嗅神経層で、Nrp2 のシグナルは腹側嗅神経層でそれぞれ観察される。しかし Robo1/2 double KO においては、NQO1 のシグナルも Nrp2 のシグナルも嗅神経層ではなく、嗅球腹側に形成される軸索凝集塊 (点線内) の中に観察された。

ED, embryonic day; OSN, olfactory sensory neuron; OE, olfactory epithelium; OB, olfactory bulb; Nrp2, Neuropilin-2; D, dorsal; V, ventral; A, anterior; P, posterior

**A**

**Figure 12. Robo1 KO マウスにおいて、OSN の軸索は嗅球の嗅神経層に到達するものの、背側 OSN の軸索の一部が腹側の嗅神経層で停滞する**

(説明は次の次のページに記載)

B

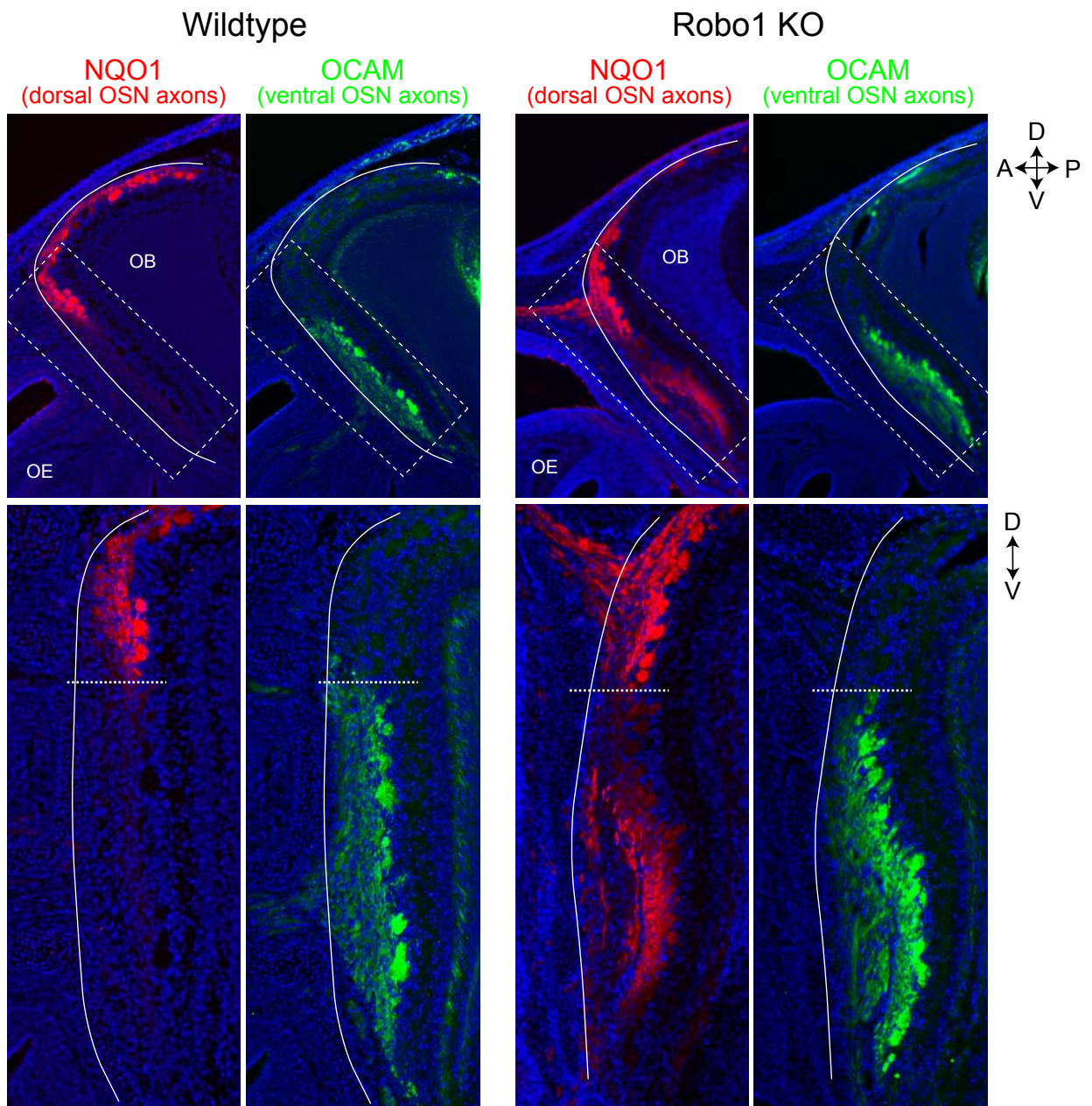


Figure 12. Robo1 KO マウスにおいて、OSN の軸索は嗅球の嗅神経層に到達するものの、背側 OSN の軸索の一部が腹側の嗅神経層で停滞する

(説明は次のページに記載)

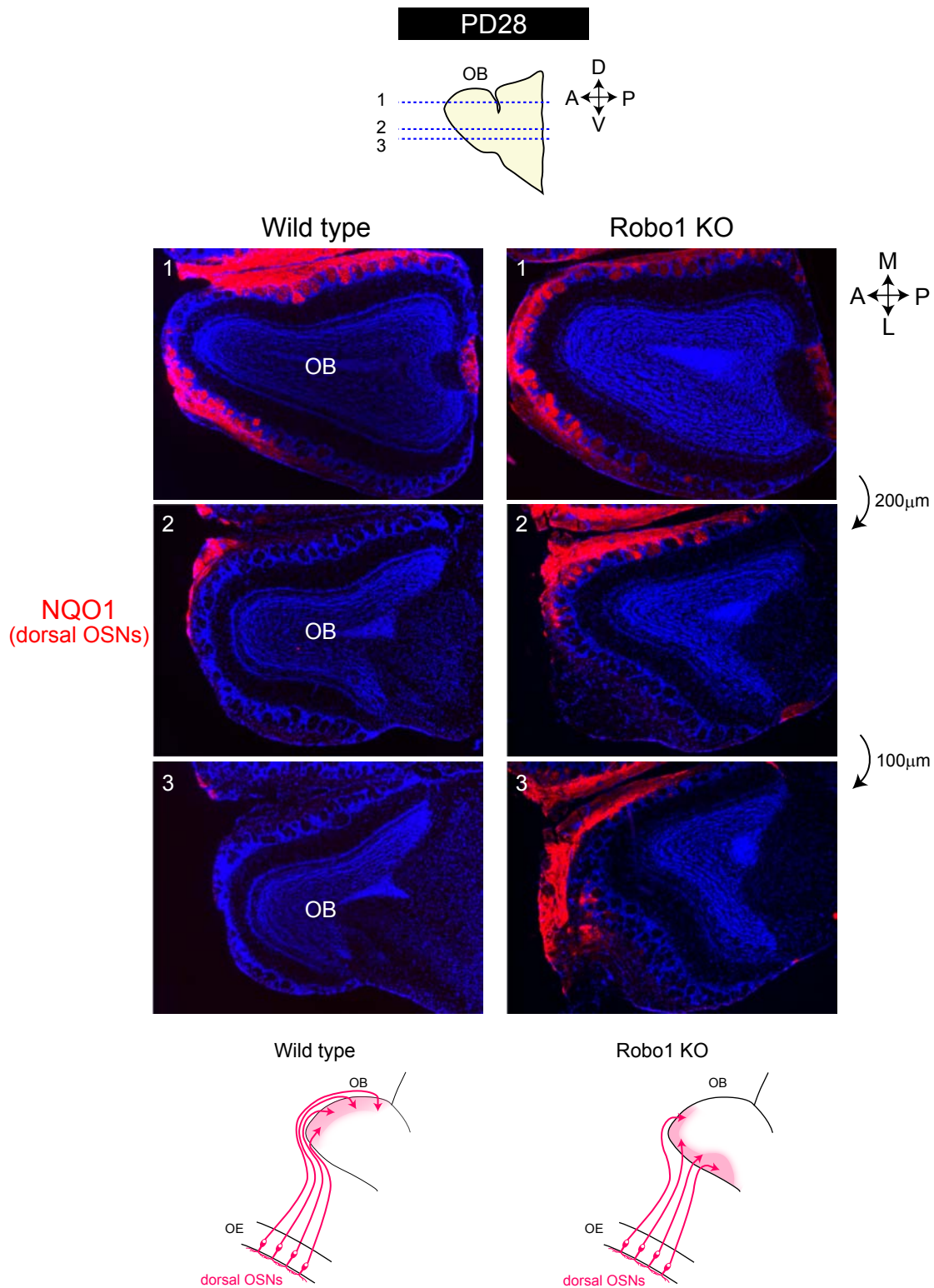
**Figure 12. Robo1 KO マウスにおいて、OSN の軸索は嗅球の嗅神経層に到達するものの、背側 OSN の軸索の一部が腹側の嗅神経層で停滞する**

(A) マウス生後 1 日目 (PD1) の wild type マウス (左) および Robo1 KO マウス (右、破線四角を拡大したものを右隣りに示す) の sagittal 切片において、NCAM (OSN マーカー)、NQO1 (背側 OSN マーカー)、および Nrp2 (腹側 OSN マーカー) に対する抗体を用いた免疫組織染色を行った。

Robo1 KO マウスにおける NCAM の免疫組織染色のシグナルは嗅神経層に観察されるものの wild type マウスと比較すると背側嗅神経層が薄く、腹側嗅神経層が厚く形成されており、嗅球腹側に偏っていた。wild type マウスでは免疫組織染色の NQO1 のシグナルは、嗅球背側に限局して検出されたが、Robo1 KO マウスの嗅球では、NQO1 のシグナルが wild type マウスでは見られない腹側にまで広がって検出された。一方、wild type マウスにおいて、嗅球腹側で強く、背側に行くにつれて弱く観察される Nrp2 の免疫組織染色のシグナルは、Robo1 KO においても同様の傾向を示したが、Nrp2 陽性の腹側 OSN の軸索の一部が背側 OB にも誤って入り込んでいるものが観察された。もっとも、NQO1 陽性の背側 OSN の投射異常よりは、軽度の異常であった。

(B) マウス生後 1 日目 (PD1) の wild type マウス (左) および Robo1 KO マウス (右) の sagittal 切片において、NQO1 (背側 OSN マーカー) および OCAM (腹側 OSN マーカー) に対する抗体を用いた免疫組織染色を行った。野生型マウスでは、背側 OSN (NQO1 陽性) と腹側 OSN (OCAM 陽性) の軸索が嗅球上で明確に境界 (点線) を形成するのに対し、Robo1 KO マウスの嗅球では、OCAM 陽性の腹側領域にまで NQO1 陽性の OSN の軸索が投射していた。

PD, postnatal day; OSN, olfactory sensory neuron; OE, olfactory epithelium; OB, olfactory bulb; Nrp2, Neuropilin-2; D, dorsal; V, ventral; A, anterior; P, posterior

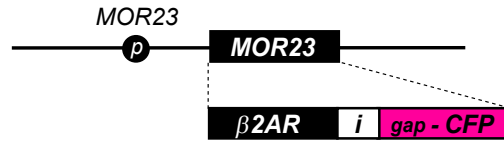


**Figure 13. 成体 Robo1 KO マウスにおいて、背側 OSN の軸索が嗅球背側に加えて嗅球腹側にも投射する**

マウス生後 28 日目 (PD28) の wild type マウス (左) および Robo1 KO マウス (右) 嗅球より horizontal 切片を作成し、NQO1 (背側 OSN マーカー) に対する抗体を用いた免疫組織染色を行った。200µm および 100µm 離れた切片における免疫組織染色の結果を示した。糸球体のマップ形成が終了した後の成体 (PD28) Robo1 KO マウス 嗅球 において、NQO1 陽性の糸球体が wild type マウスと比較してより腹側でも観察された。

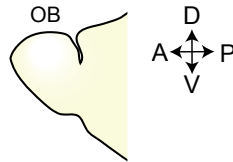
PD, postnatal day; OSN, olfactory sensory neuron; OE, olfactory epithelium; OB, olfactory bulb; Nrp2, Neuropilin2; D, dorsal; V, ventral; A, anterior; P, posterior; L, lateral; M, medial

A



B

PD14



wholemout medial view

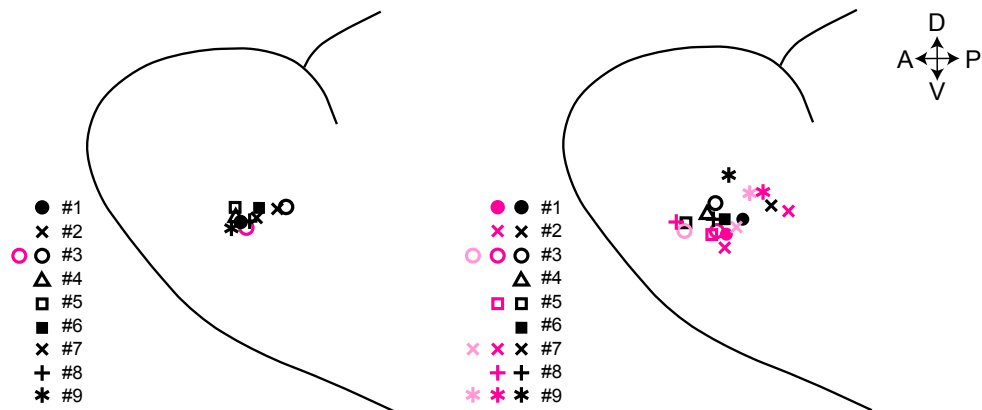
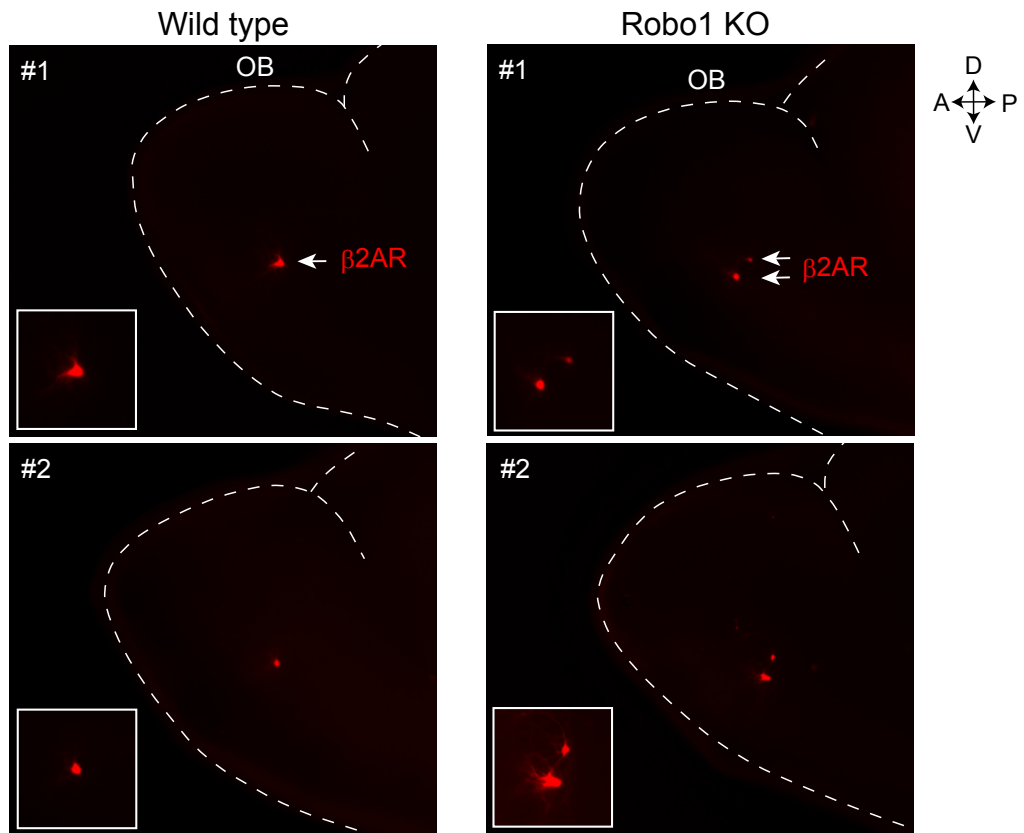
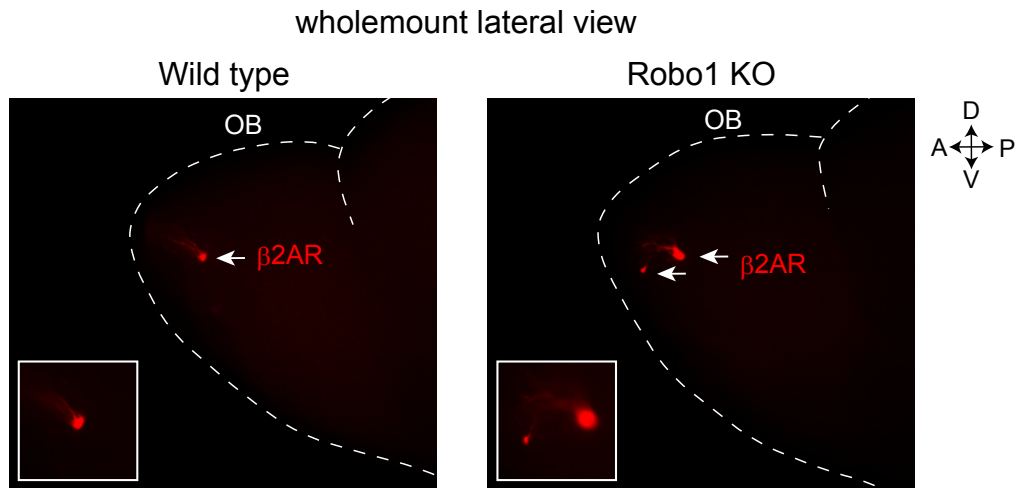


Figure 14. Robo1 KO により、 $\beta 2$  adrenergic receptor 陽性 OSN の軸索は通常投射する嗅球背側の糸球体に加えてより腹側に異所的な糸球体を形成する

(説明は次のページに記載)

**C**

**Figure 14. Robo1 KO により、 $\beta 2$  adrenergic receptor 陽性 OSN の軸索は通常投射する嗅球背側の糸球体に加えてより腹側に異所的な糸球体を形成する**

(A) 嗅覚受容体のひとつである MOR23 の promoter 制御下で  $\beta 2$  adrenergic receptor ( $\beta 2AR$ ) と gap-CFP を共発現するトランスジェニックマウス ( $\beta 2AR$ -gapCFP) のコンストラクト。p, promoter; i, internal ribosome entry site; CFP, cyan fluorescent protein

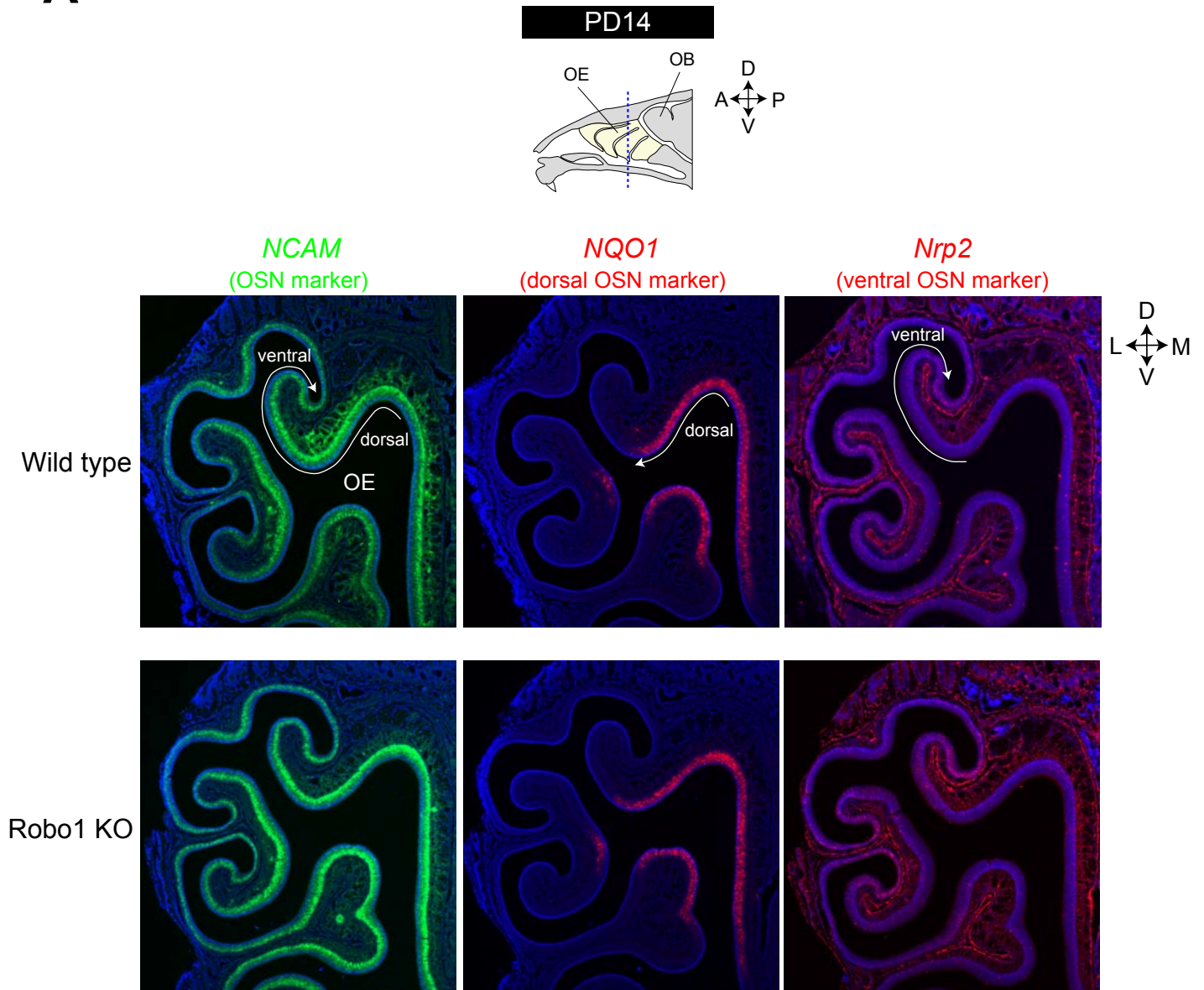
(B) Robo1 KO マウスとトランスジェニックマウス  $\beta 2AR$  -gapCFP を交配して得たマウスおよびコントロールのマウスの嗅球を蛍光顕微鏡下で観察し、 $\beta 2AR$  の糸球体の位置を検出した。嗅球 medial 側の wholemount view を 2 例 (#1、#2) ずつ示した。四角内に、拡大した図を挿入した。wild type マウスの嗅球において、 $\beta 2AR$  陽性 OSN の軸索は 1 ヶ所に収斂し、ひとつの糸球体を形成した。しかし Robo1 KO マウスの嗅球において、 $\beta 2AR$  陽性 OSN の軸索は 1 ヶ所に収斂せず、複数の糸球体を形成するものが多く観察された。Robo1 KO の嗅球において、より腹側に異所的な糸球が形成される傾向にあった。wholemount view を示した 2 例 (#1、#2) に加えて、さらに 7 例 (#3-#9) ずつの糸球体位置をプロットしたものを、下に模式図で示した。1 嗅球ごとに、糸球が 1 つのみ観察されたものは黒で、糸球が複数観察されたものは、背側に観察された糸球から腹側に観察された糸球へ順に黒、赤、ピンクでプロットした。

(C) (B) と同様に、wild type マウスおよび Robo1 KO マウスの嗅球 lateral 側での  $\beta 2AR$  の糸球体の位置を、蛍光顕微鏡下で観察した。ここでは嗅球 lateral 側の wholemount view を 1 例ずつ示した。Robo1 KO マウスにおける lateral 側の  $\beta 2AR$  の糸球も、複数形成される傾向にあった。

PD, postnatal day; OSN, olfactory sensory neuron; OB, olfactory bulb; AR, adrenergic receptor; CFP, Cyan Fluorescent Protein; D, dorsal; V, ventral; A, anterior; P, posterior



A



**Figure 15. 嗅上皮における OSN の配置は、Robo1 KO の影響を受けない**

(A) 嗅上皮切片において、NCAM (全 OSN マーカー)、NQO1 (背側 OSN マーカー)、Nrp2 (腹側 OSN マーカー) のアンチセンス鎖のプロープを用いて *in situ* hybridization を行い、NCAM、NQO1、Nrp2 の mRNA を検出した。その結果、wild type マウス、Robo1 KO マウスどちらの嗅上皮においても NQO1 のシグナルは背側 OSN で、Nrp2 のシグナルは腹側 OSN で、それぞれ検出された。

(B) 嗅上皮切片において、NQO1 および GFP に対する抗体を用いて免疫組織染色を行い、背側 OSN および  $\beta$ 2AR 陽性 OSN のそれぞれの細胞体を検出した。背側 (dorsal) の NQO1 陽性領域および腹側 (ventral) の NQO1 陰性領域をそれぞれ拡大して下に掲載した (点線四角)。wild type マウス、Robo1 KO マウスどちらの嗅上皮においても  $\beta$ 2AR 陽性 OSN の細胞体 (矢頭) は、嗅上皮で NQO1 陽性 OSN が存在する領域内でのみ存在が確認された。

PD, postnatal day; OSN, olfactory sensory neuron; OE, olfactory epithelium; OB, olfactory bulb; Nrp2, Neuropilin-2; D, dorsal; V, ventral; A, anterior; P, posterior; L, lateral; M, medial

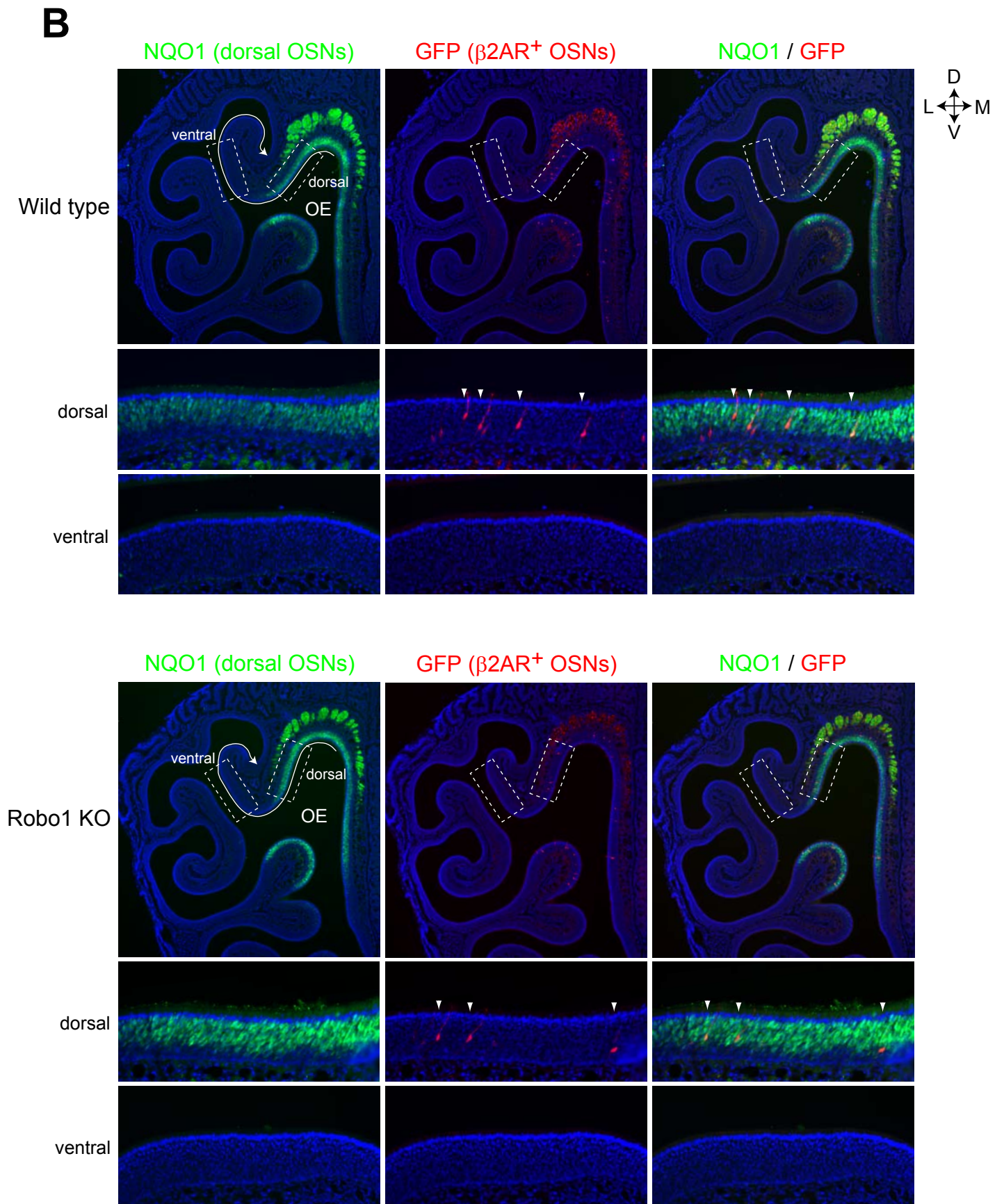
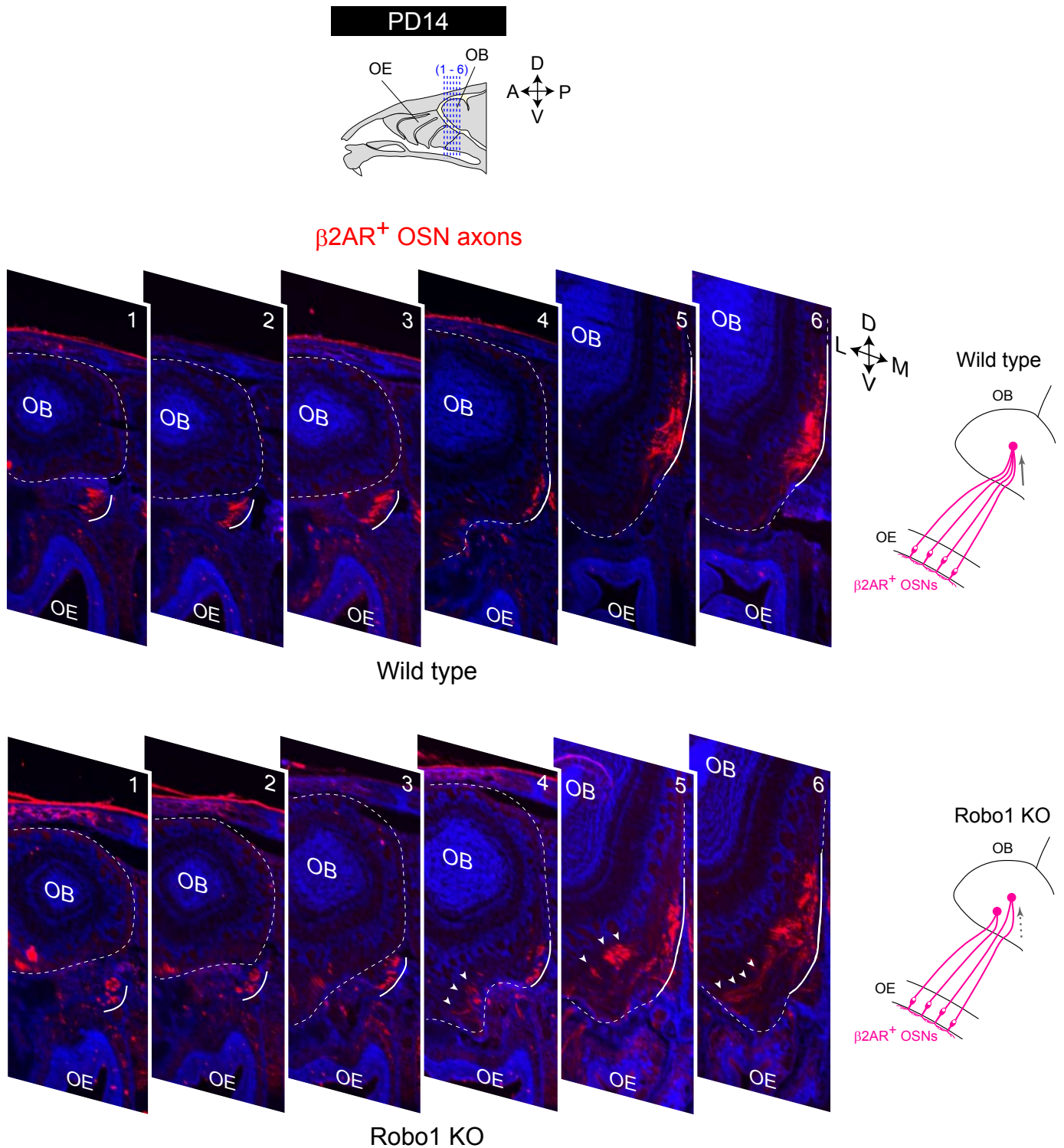


Figure 15. 嗅上皮における OSN の配置は、Robo1 KO の影響を受けない

(説明は前のページに記載)



**Figure 16. Robo1 KO による β2AR 陽性 OSN の軸索投射異常は、軸索が嗅球に到達した後に観察される**

嗅上皮から嗅球にかけて coronal 切片を作製し、それに対して抗 GFP 抗体を用いた免疫組織染色を行い、β2AR 陽性 OSN の軸索（実線）を検出した。50μm 間隔の切片における、medial 側の β2AR 陽性 OSN の軸索投射経路を示した。wild type マウスと Robo1 KO マウスの β2AR 陽性嗅細胞の軸索の投射経路は、嗅上皮を出発して嗅球表面（点線）に到達するまで差が見られなかった（1-3）。しかし、嗅球表面上において、Robo1 KO マウスの β2AR 陽性 OSN の軸索は背側に向かわずに腹側で停滞するものが観察された（4-6、矢頭）。

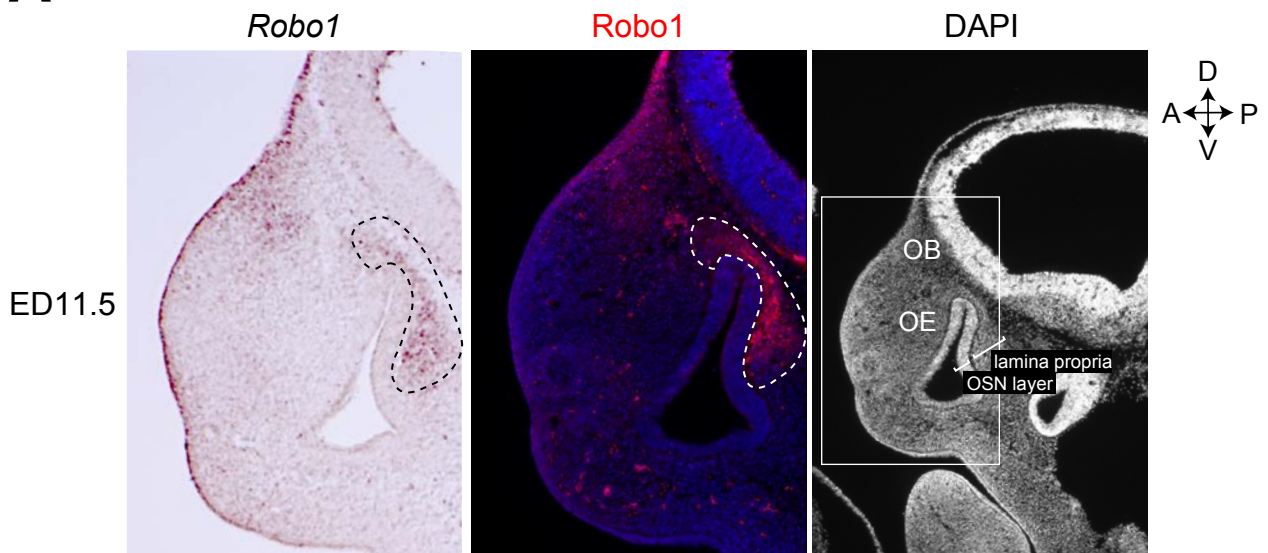
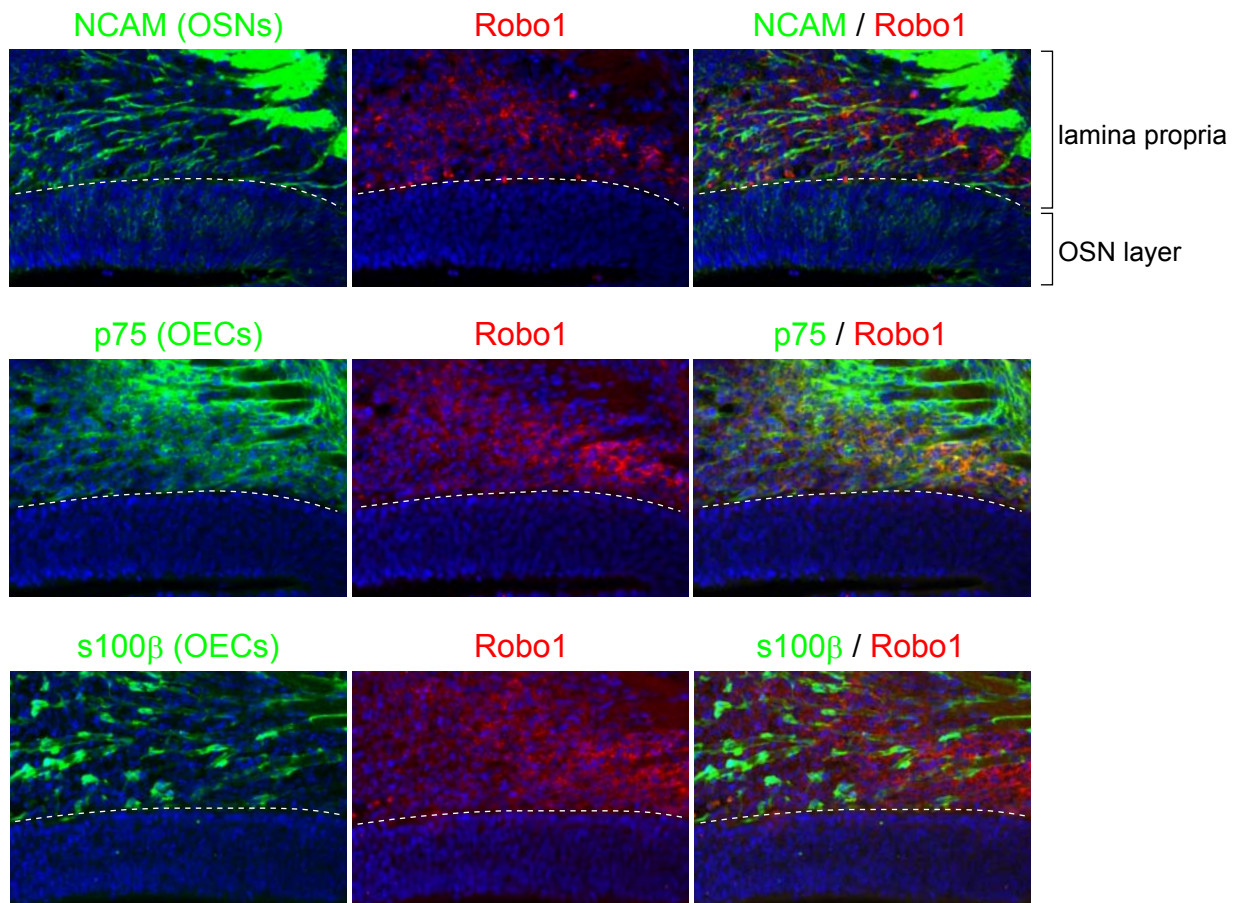
**A****B**

Figure 17. Robo1 は、OSN ではなく、グリア細胞である olfactory ensheathing cell (OEC) で発現する

(説明は次の次のページに記載)

C

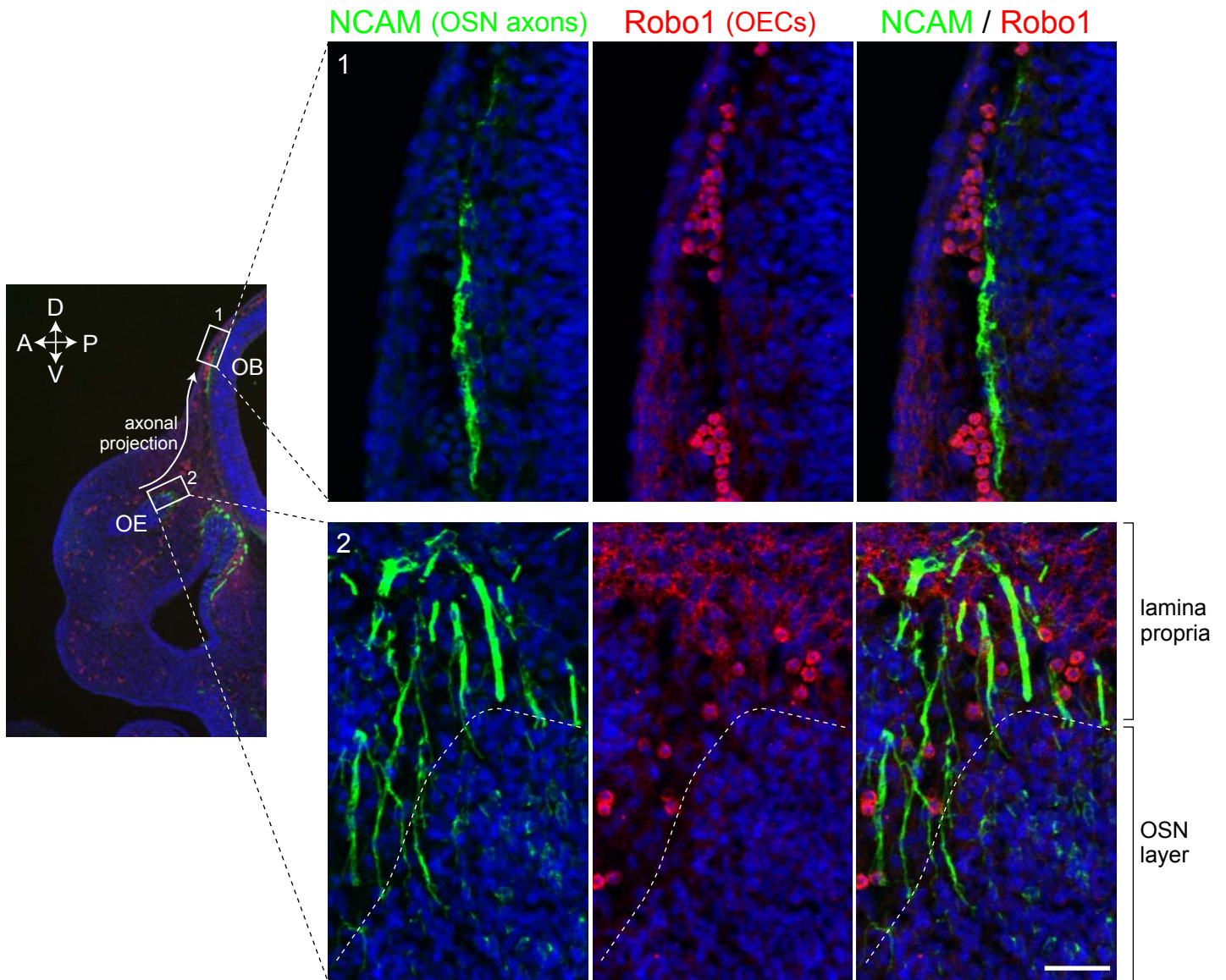


Figure 17. Robo1 は、OSN ではなく、グリア細胞である olfactory ensheathing cell (OEC) で発現する

(説明は次のページに記載)

## Figure 17. Robo1 は、OSN ではなく、グリア細胞である olfactory ensheathing cell (OEC) で発現する

(A) OSN の軸索が伸長し始める胎生期 11.5 日目 (ED11.5) のマウス sagittal 切片において、Robo1 のアンチセンス鎖のプロープを用いて *in situ* hybridization を行い、Robo1 の mRNA を検出した。その結果、Robo1 は OSN の細胞体が存在する OSN layer ではなく、グリア細胞が存在する粘膜固有層 (lamina propria) で発現することが判明した (点線)。また、連続した切片を Robo1 に対する抗体で免疫組織染色をしたところ、*in situ* hybridization のシグナルと同じ領域でシグナルが検出された (点線)。

(B) マウス胎生期 11.5 日目の嗅覚組織切片に対して、NCAM (OSN マーカー)、p75 (OEC マーカー) または s100 $\beta$  (OEC マーカー) に対する抗体と Robo1 に対する抗体を用いて、二重免疫組織染色を行った。OSN layer における OSN の細胞体 (OSN layer、点線下部) および OSN の軸索において観察される NCAM (嗅細胞マーカー) のシグナルと、Robo1 のシグナルは重ならなかった。それに対してグリア細胞が存在する粘膜固有層 (lamina propria、点線上部) における Robo1 のシグナルは、OEC マーカーのひとつである s100 $\beta$  のシグナルとは重ならなかったが、別の OEC マーカーである p75 のシグナルとは重なった。

(C) 共焦点顕微鏡を用いて、(B) の免疫組織染色を行った切片をさらに拡大して観察した。NCAM のシグナル (緑) で表わされる OSN の伸長中の軸索末端 (1) から細胞体のそば (2) にかけて、近傍で Robo1 陽性の OEC (赤) が存在する。scale bar=20 $\mu$ m

ED, embryonic day; OE, olfactory epithelium; OB, olfactory bulb; OSN, olfactory sensory neuron; OEC, olfactory ensheathing cell; D, dorsal; V, ventral; A, anterior; P, posterior

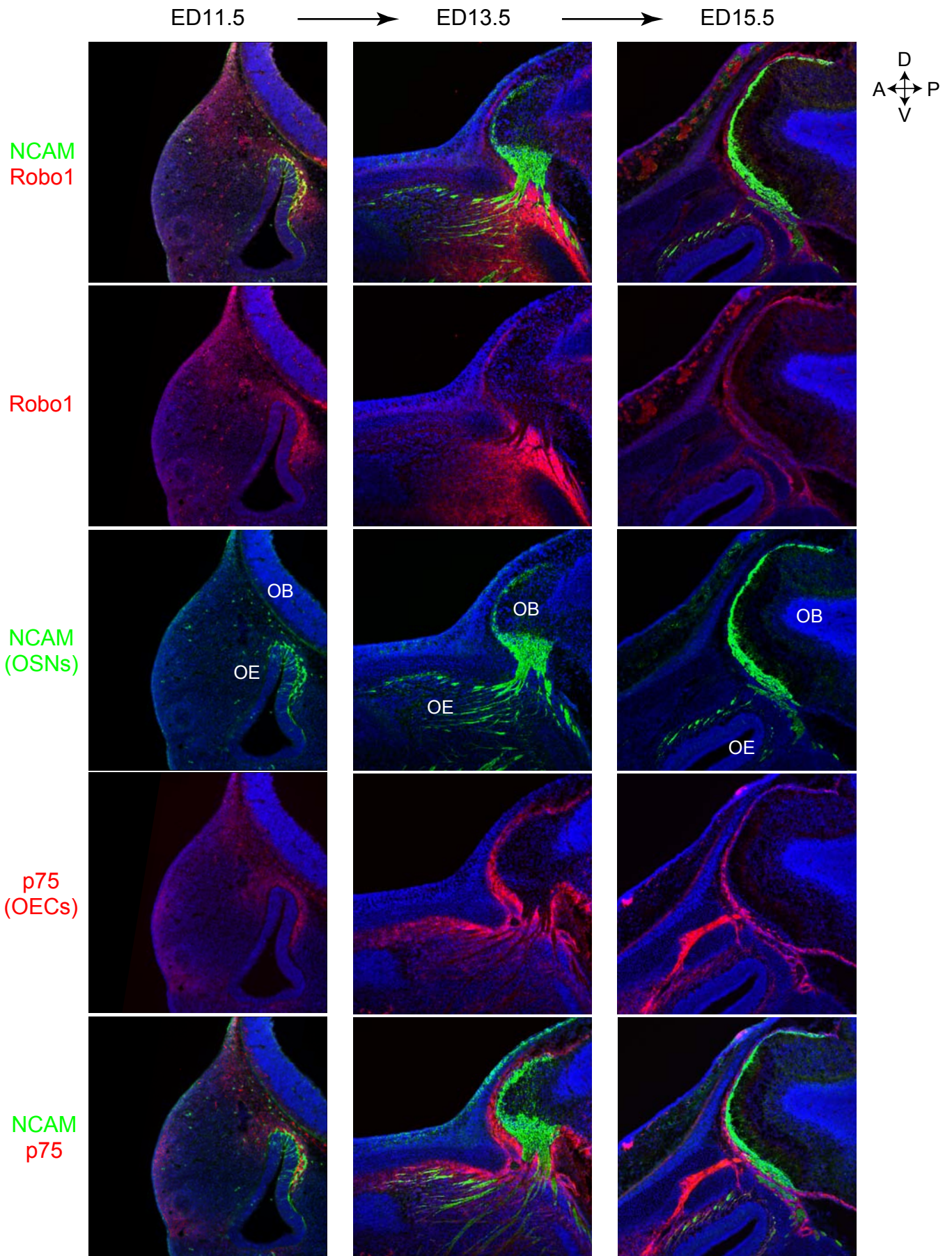


Figure 18. 発生段階を追った Robo1 の発現の推移

(説明は次のページに記載)

## Figure 18. 発生段階を追った Robo1 の発現の推移

胎生期 11.5 日目、13.5 日目、15.5 日目 (ED11.5、ED13.5、ED15.5) のマウスより作成した sagittal 切片を、NCAM (OSN マーカー)、p75 (OEC マーカー)、Robo1 に対する抗体で、免疫組織染色をした。ED11.5 ~ ED15.5 において、Robo1 のシグナルは嗅上皮では lamina propria で、嗅球では外側嗅神経層で観察され、いずれの時期においても NCAM (OSN マーカー) とは重ならなかった。ED13.5、ED15.5 と発生が進むにつれて、NCAM のシグナルで示される OSN の軸索が嗅球に到達するようになり、Robo1 および p75 のシグナルも NCAM のシグナルに沿って嗅上皮から嗅球表面にかけて検出された。また、Robo1 のシグナルは ED13.5 付近でもっとも強く観察され、その後減少した。

ED, embryonic day; OE, olfactory epithelium; OB, olfactory bulb; OSN, olfactory sensory neuron; OEC, olfactory ensheathing cell; D, dorsal; V, ventral; A, anterior; P, posterior



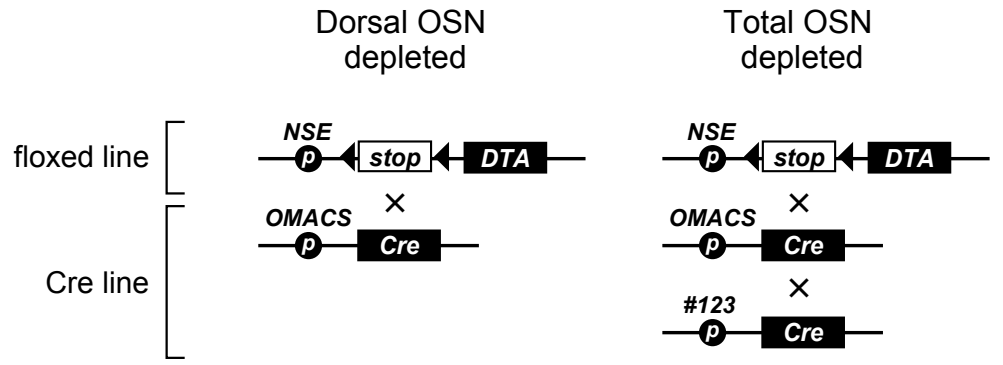
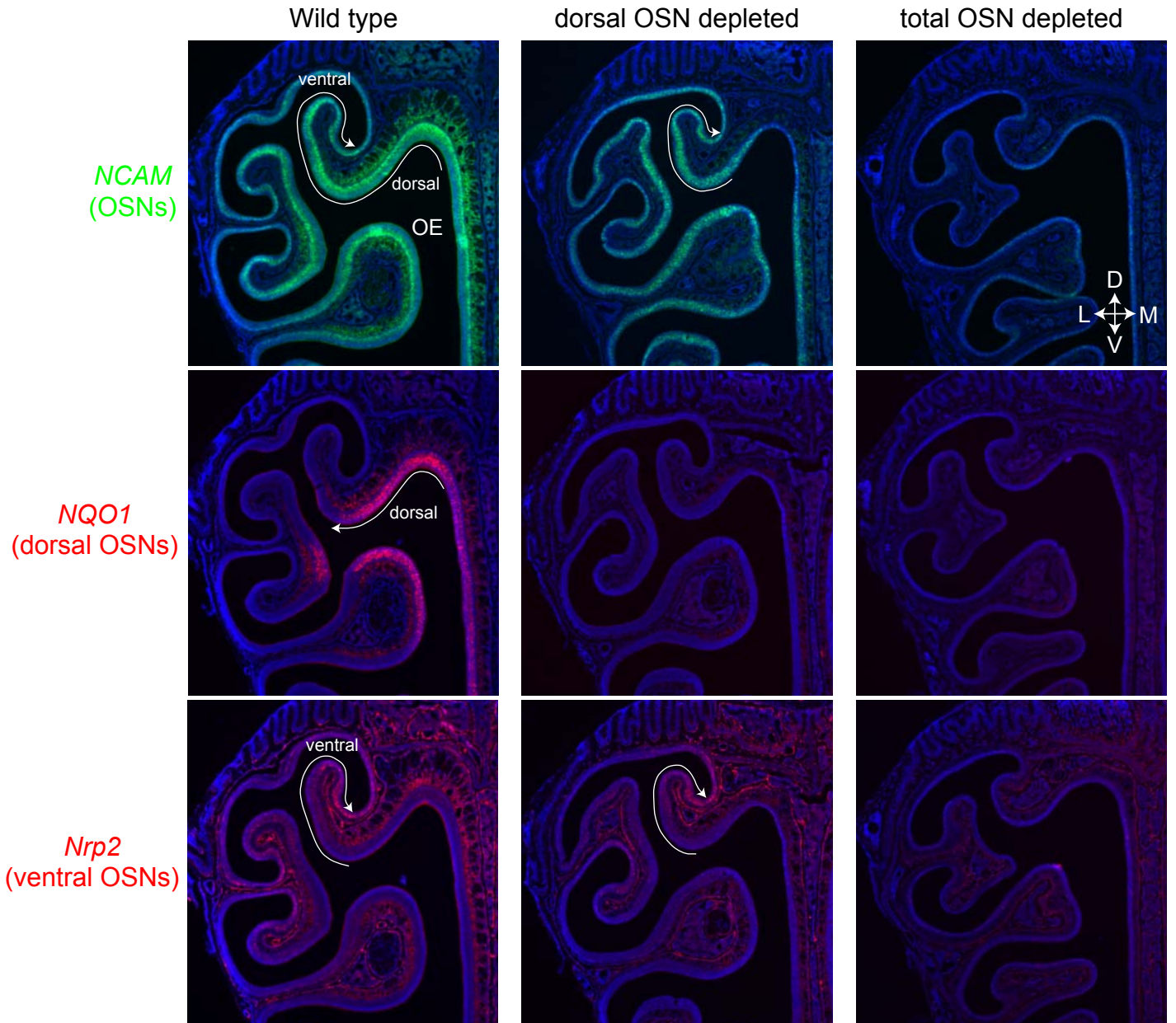
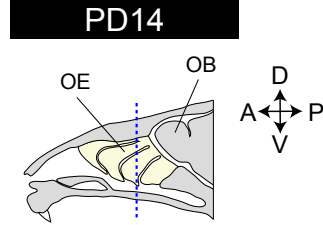
**A****B**

Figure 19. 遺伝的に OSN が除去された OSN depleted マウスの作製

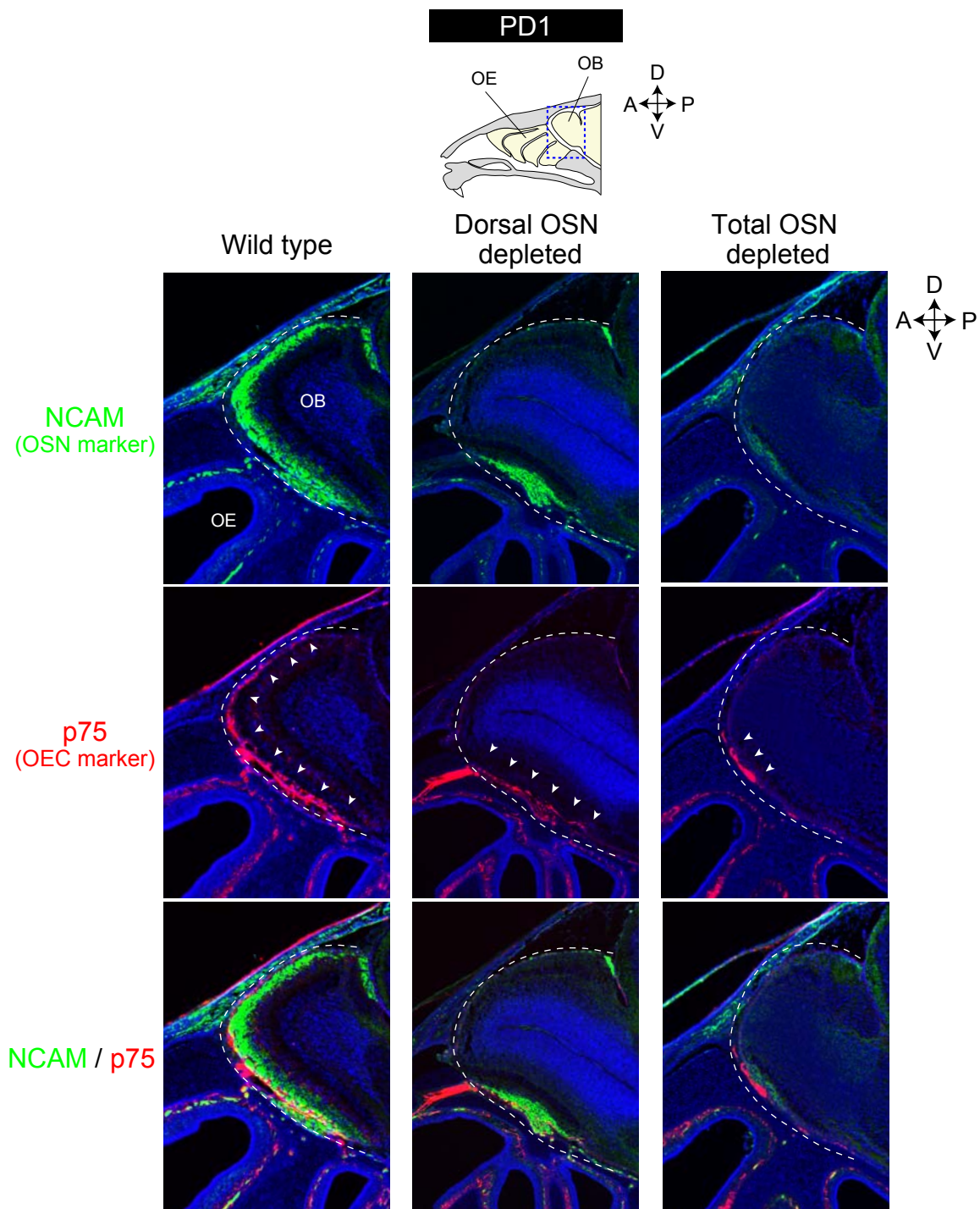
(説明は次のページに記載)

## Figure 19. 遺伝的に OSN が除去された OSN depleted マウスの作製

(A) ノックインマウス NSE-DTA、OMACS-Cre、#123-Cre のコンストラクト。NSE-DTA マウスは、神経特異的エノラーゼ (neuron specific enorase, NSE) プロモーター (promoter, p) の下流に、標的配列 loxP (黒三角) に挟まれた転写 stop 配列およびジフテリア毒素 (diphtheria toxin A, DTA) が組み込まれたノックインマウスであり、DNA 組み換え酵素 Cre 存在下でのみジフテリア毒素を発現する。OMACS-Cre マウスは、背側 OSN 特異的に発現する中鎖アシル CoA 合成酵素 (olfactory specific medium-chain acyl CoA synthetase, OMACS) のプロモーター (p) の制御下で、DNA 組み換え酵素 Cre を発現するノックインマウスである。#123-Cre マウスは、嗅細胞特異的に発現する遺伝子 #123 プロモーター (p) 制御下で、DNA 組み換え酵素 Cre を発現するノックインマウスである。背側 OSN が除去された dorsal OSN depleted マウスは、NSE-DTA マウスと OMACS-Cre マウスの 2 ラインを交配して得た。ほぼすべての OSN が除去された total OSN depleted マウスは、NSE-DTA マウス、OMACS-Cre、#123-Cre の 3 ラインを交配して得た。

(B) wild type マウス、dorsal OSN depleted マウス、total OSN depleted マウスの嗅上皮切片において、NCAM (全 OSN マーカー)、NQO1 (背側 OSN マーカー)、Nrp2 (腹側 OSN マーカー) のアンチセンス鎖のプローブを用いて *in situ* hybridization を行い、NCAM、NQO1、Nrp2 の mRNA を検出した。wild type マウスでは、OSN の細胞体を表す NCAM のシグナルは嗅上皮の背側から腹側まで全域で、背側 OSN の細胞体を表す NQO1 のシグナルは嗅上皮の背側 OSN で、腹側 OSN の細胞体を表す Nrp2 のシグナルは嗅上皮の腹側 OSN でそれぞれ検出された。背側 OSN が除去された dorsal OSN depleted マウスでは、嗅上皮の背側における NCAM のシグナルが wild type マウスよりも減少しており、NQO1 のシグナルはまったく検出されなかった。それに対し、Nrp2 のシグナルは嗅上皮の腹側 OSN で wild type マウスと同様に検出された。ほぼすべての OSN が除去された total OSN depleted マウスでは、NCAM のシグナルが嗅上皮の背側から腹側にかけてほとんど検出できず、NQO1 のシグナルも Nrp2 のシグナルもほとんど観察されなかった。

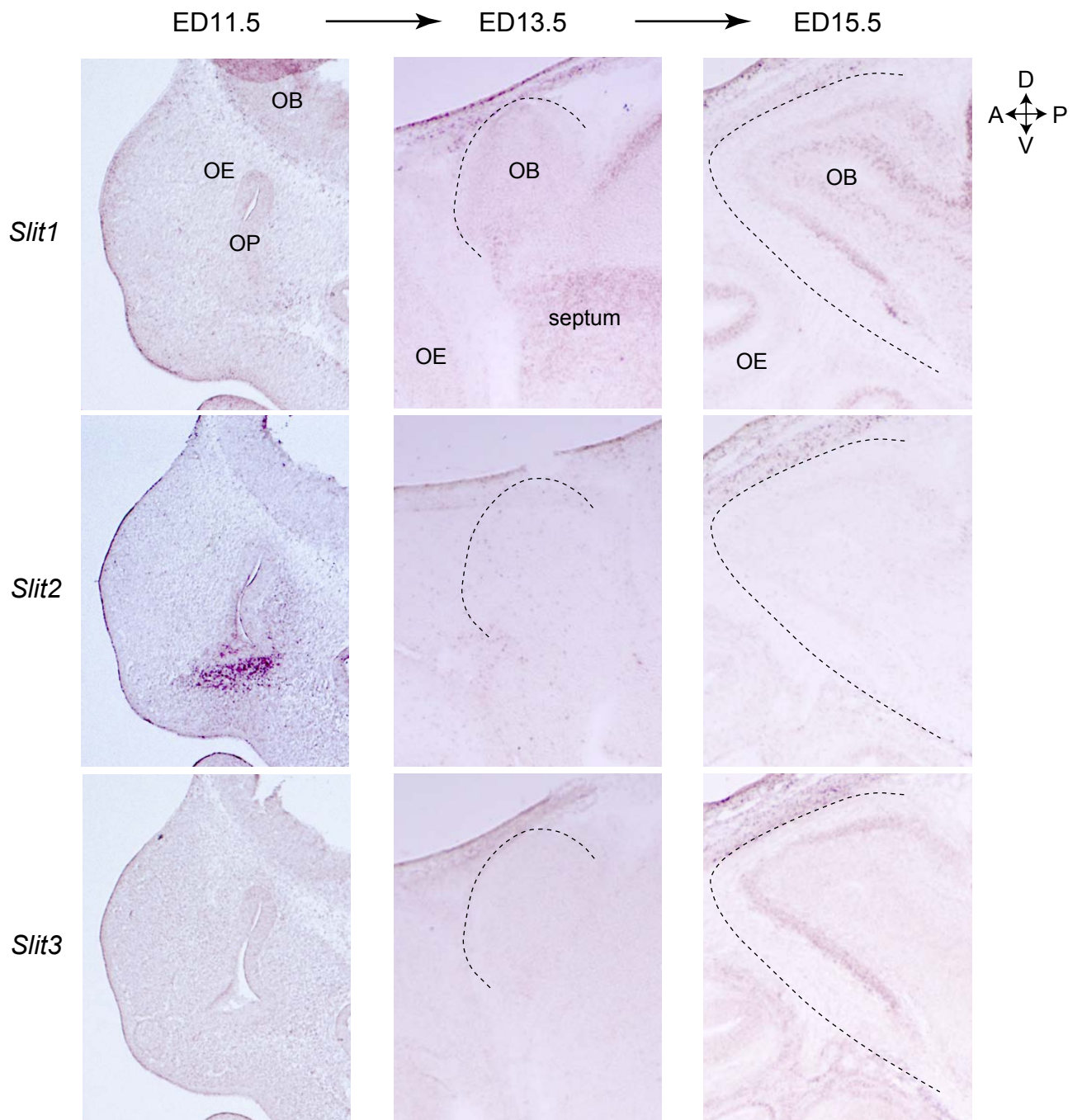
PD, postnatal day; OSN, olfactory sensory neuron; OE, olfactory epithelium; OB, olfactory bulb; Nrp2, Neuropilin-2; D, dorsal; V, ventral; A, anterior; P, posterior; L, lateral; M, medial



**Figure 20. OSN の軸索伸長に依存した OEC の嗅上皮から嗅球への移動**

OSN depleted マウスおよび wild type マウスの sagittal 切片において、NCAM (OSN マーカー) および p75 (OEC マーカー) に対する抗体を用いて免疫組織染色を行い、OSN の軸索と p75 陽性 OEC の局在を検出した。wild type マウスでは、NCAM および p75 のシグナルは、嗅上皮と、背側から腹側にかけて嗅球全体に観察された (矢頭)。一方、腹側の OSN のみが存在する dorsal OSN depleted マウスでは、嗅球背側に NCAM のシグナルも p75 のシグナルも観察されず、嗅球腹側にのみ両方のシグナルが観察された (矢頭)。ほぼすべての OSN が除去された total OSN depleted マウスでは、嗅上皮でも嗅球でも OSN マーカーである NCAM のシグナルがほとんど観察されず、p75 のシグナルは、嗅上皮で観察されるのみであった。ただし、DNA 組み換え酵素 Cre の組み換え効率により、除去されずに残ったわずかな OSN の軸索が total OSN depleted マウスでも嗅球に投射し、その周囲に P75 のシグナルもわずかに検出された (矢頭)。

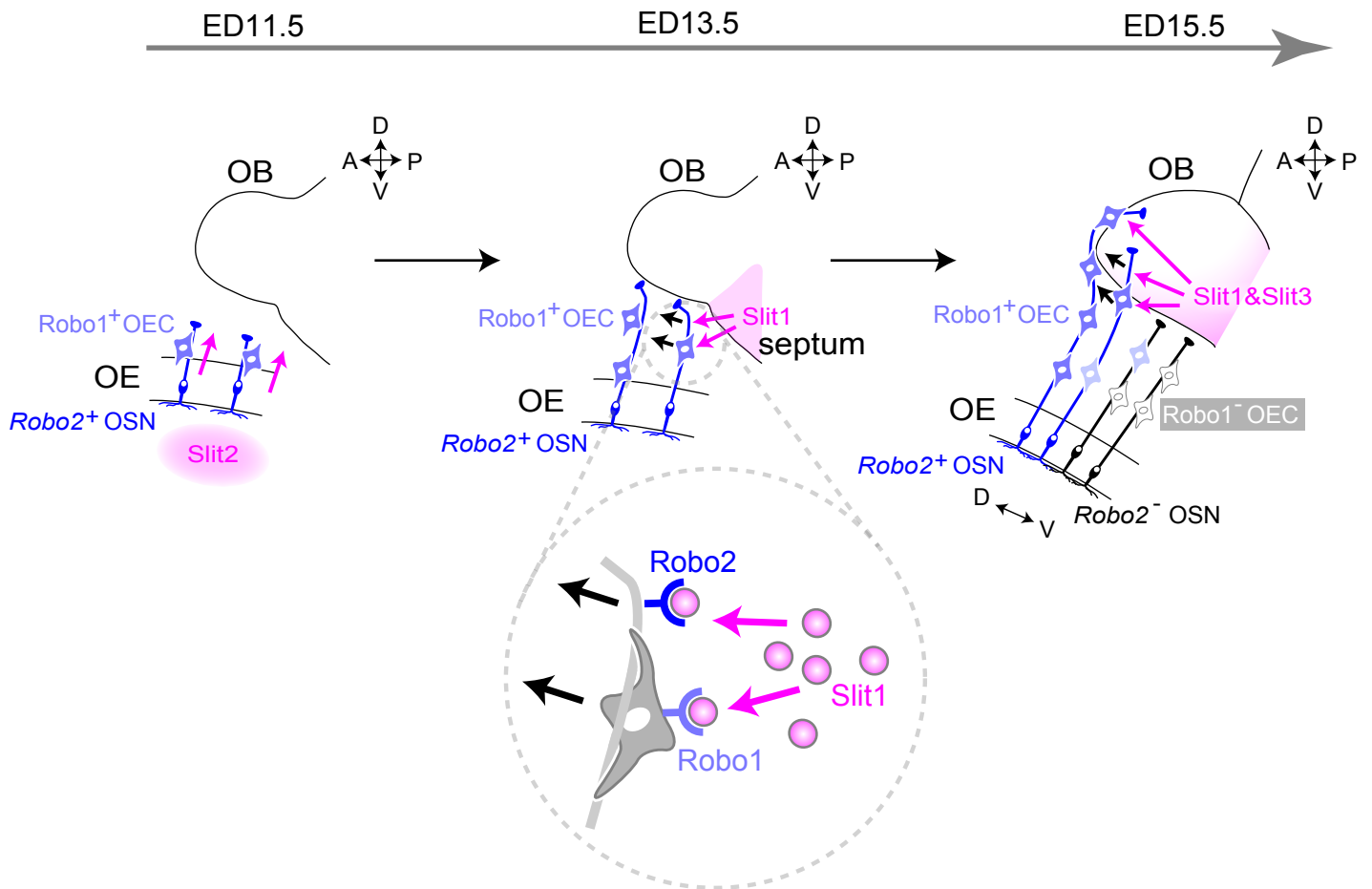
PD, postnatal day; OE, olfactory epithelium; OB, olfactory bulb; OSN, olfactory sensory neuron; OEC, olfactory ensheathing cell, D, dorsal; V, ventral; A, anterior; P, posterior



**Figure 21. OSN の軸索投射経路における Robo1 の反発性リガンド *Slit1*、*Slit2*、*Slit3* の発現**

マウス胎生期 11.5 日目、13.5 日目、15.5 日目 (ED11.5、ED13.5、ED15.5) の sagittal 切片において *Slit1*、*Slit2*、*Slit3* のアンチセンス鎖のプローブを用いて *in situ* hybridizaion を行ない、*Slit1*、*Slit2*、*Slit3* の mRNA の局在を検出した。胎生期 11.5 日目のマウス嗅覚組織においては、*Slit2* が olfactory pit (OP) の腹側で、胎生期 13.5 日目のマウス嗅覚組織においては *Slit1* が前脳基底部 (basal telencephalon) の一部である中隔 (septum) で、胎生期 15.5 日目のマウス嗅覚組織においては *Slit1* が嗅球腹側で、*Slit3* が嗅球全域でそれぞれ発現が観察された。

ED, embryonic day; OE, olfactory epithelium; OB, olfactory bulb; D, dorsal; V, ventral; A, anterior; P, posterior



**Figure 22. Robo1 陽性 OEC による OSN の軸索誘導機構のモデル**

マウス胎生期 11.5 日目 (ED11.5) において、先に成熟した Robo2 陽性背側 OSN は、Robo1 陽性 OEC を付随して軸索伸長を開始し、Slit2 からの反発作用を受けて軸索を伸長する方向を調節する。

胎生期 13.5 日目 (ED13.5) において、終脳表面に到達した Robo2 陽性 OSN の軸索並びに軸索に付随する Robo1 陽性 OEC が、終脳の septum で発現する Slit1 からの反発作用を受けることにより、OSN 軸索は嗅球へと誘導される。

胎生期 15.5 日目 (ED15.5) において、嗅球腹側で発現が開始する Slit1 および Slit3 によって、Robo1 陽性 OEC を付随した Robo2 陽性背側 OSN の軸索は嗅球背側へ誘導され、Robo1 陽性 OEC を付随しない Robo2 陰性 OSN の軸索は嗅球腹側にそのまま投射する。

OEC は突起を伸ばして嗅細胞を取り囲んでいるため、Slit からの反発作用を受けた Robo1 陽性 OEC が Slit から遠ざかる方へ移動するのに伴い、取り囲んだ OSN 軸索を Slit から遠ざかる方へ誘導する。

ED, embryonic day; OE, olfactory epithelium; OB, olfactory bulb; OSN, olfactory sensory neuron; OEC, olfactory ensheathing cell, D, dorsal; V, ventral; A, anterior; P, posterior

## ◆◆◆ 引用文献 ◆◆◆

**Astic, L., Pellier-Monnin, V. and Godinot, F.** (1998). Spatio-temporal patterns of ensheathing cell differentiation in the rat olfactory system during development. *Neuroscience* **84**, 295-307.

**Astic, L., Saucier, D. and Holley, A.** (1987). Topographical relationships between olfactory receptor cells and glomerular foci in the rat olfactory bulb. *Brain Res* **424**, 144-152.

**Au, W. W., Treloar, H. B. and Greer, C. A.** (2002). Sublamina organization of the mouse olfactory bulb nerve layer. *J Comp Neurol* **446**, 68-80.

**Barnett, S. C. and Chang, L.** (2004). Olfactory ensheathing cells and CNS repair: going solo or in need of a friend? *Trends Neurosci* **27**, 54-60.

**Brose, K., Bland, K., Wang, K., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C., Tessier-Lavigne, M. and Kidd, T.** (1999). Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* **96**, 795-806.

**Buck, L. and Axel, R.** (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* **65**, 175-187.

**Chehrehasa, F., Windus, L. C., Ekberg, J. A., Scott, S. E., Amaya, D., Mackay-Sim, A. and St John, J. A.** (2010). Olfactory glia enhance neonatal axon regeneration. *Mol Cell Neurosci* **45**, 277-288.

**Chen, H., Chedotal, A., He, Z., Goodman, C. S. and Tessier-Lavigne, M.**

(1997). Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron* **19**, 547-559.

**Chen, H., He, Z., Bagri, A. and Tessier-Lavigne, M.** (1998). Semaphorin-neuropilin interactions underlying sympathetic axon responses to class III semaphorins. *Neuron* **21**, 1283-1290.

**Chesler, A. T., Zou, D. J., Le Pichon, C. E., Peterlin, Z. A., Matthews, G. A., Pei, X., Miller, M. C. and Firestein, S.** (2007). A G protein/cAMP signal cascade is required for axonal convergence into olfactory glomeruli. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 1039-1044.

**Cho, J. H., Kam, J. W. and Cloutier, J. F.** (2012). Slits and Robo-2 regulate the coalescence of subsets of olfactory sensory neuron axons within the ventral region of the olfactory bulb. *Dev Biol* **371**, 269-279.

**Cho, J. H., Lepine, M., Andrews, W., Parnavelas, J. and Cloutier, J. F.** (2007). Requirement for Slit-1 and Robo-2 in zonal segregation of olfactory sensory neuron axons in the main olfactory bulb. *J Neurosci* **27**, 9094-9104.

**Cho, J. H., Prince, J. E., Cutforth, T. and Cloutier, J. F.** (2011). The pattern of glomerular map formation defines responsiveness to aversive odorants in mice. *J Neurosci* **31**, 7920-7926.

**Chuah, M. I. and West, A. K.** (2002). Cellular and molecular biology of ensheathing cells. *Microsc Res Tech* **58**, 216-227.

**Crandall, J. E., Dibble, C., Butler, D., Pays, L., Ahmad, N., Kostek, C., Puschel, A. W. and Schwarting, G. A.** (2000). Patterning of olfactory sensory connections is mediated by extracellular matrix proteins in the nerve layer of

the olfactory bulb. *J Neurobiol* **45**, 195-206.

**Cuschieri, A. and Bannister, L. H.** (1975). The development of the olfactory mucosa in the mouse: light microscopy. *J Anat* **119**, 277-286.

**Feinstein, P., Bozza, T., Rodriguez, I., Vassalli, A. and Mombaerts, P.** (2004). Axon guidance of mouse olfactory sensory neurons by odorant receptors and the beta2 adrenergic receptor. *Cell* **117**, 833-846.

**Franceschini, I. and Barnett, S.** (1996). Low-affinity NGF-receptor and E-N-CAM expression define two types of olfactory nerve ensheathing cells that share a common lineage. *Dev Biol* **173**, 327-343

**Gall, C. M., Berschauer, R. and Isackson, P. J.** (1994). Seizures increase basic fibroblast growth factor mRNA in adult rat forebrain neurons and glia. *Brain Res Mol Brain Res* **21**, 190-205.

**Giger, R. J., Urquhart, E. R., Gillespie, S. K., Levensgood, D. V., Ginty, D. D. and Kolodkin, A. L.** (1998). Neuropilin-2 is a receptor for semaphorin IV: insight into the structural basis of receptor function and specificity. *Neuron* **21**, 1079-1092.

**Gong, Q., Bailey, M. S., Pixley, S. K., Ennis, M., Liu, W. and Shipley, M. T.** (1994). Localization and regulation of low affinity nerve growth factor receptor expression in the rat olfactory system during development and regeneration. *J Comp Neurol* **344**, 336-348.

**Hinds, J. W. and Hinds, P. L.** (1976). Synapse formation in the mouse olfactory bulb. I. Quantitative studies. *J Comp Neurol* **169**, 15-40.

**Hirata, T., Nakazawa, M., Yoshihara, S., Miyachi, H., Kitamura, K.,**



**Yoshihara, Y. and Hibi, M.** (2006). Zinc-finger gene Fez in the olfactory sensory neurons regulates development of the olfactory bulb non-cell-autonomously. *Development* **133**, 1433-1443.

**Honore, A., Le Corre, S., Derambure, C., Normand, R., Duclos, C., Boyer, O., Marie, J. P. and Guerout, N.** (2012). Isolation, characterization, and genetic profiling of subpopulations of olfactory ensheathing cells from the olfactory bulb. *Glia* **60**, 404-413.

**Huang, Z. H., Wang, Y., Su, Z. D., Geng, J. G., Chen, Y. Z., Yuan, X. B. and He, C.** (2011). Slit-2 repels the migration of olfactory ensheathing cells by triggering Ca<sup>2+</sup>-dependent cofilin activation and RhoA inhibition. *J Cell Sci* **124**, 186-197.

**Imai, T., Suzuki, M. and Sakano, H.** (2006). Odorant receptor-derived cAMP signals direct axonal targeting. *Science* **314**, 657-661.

**Imai, T., Yamazaki, T., Kobayakawa, R., Kobayakawa, K., Abe, T., Suzuki, M. and Sakano, H.** (2009). Pre-target axon sorting establishes the neural map topography. *Science* **325**, 585-590.

**Jones, D. T. and Reed, R. R.** (1989). Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science* **244**, 790-795.

**Key, B., Treloar, H. B., Wangerek, L., Ford, M. D. and Nurcombe, V.** (1996). Expression and localization of FGF-1 in the developing rat olfactory system. *J Comp Neurol* **366**, 197-206.

**Kidd, T., Brose, K., Mitchell, K. J., Fetter, R. D., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S. and Tear, G.** (1998). Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* **92**, 205-215.

**Kobayakawa, K., Kobayakawa, R., Matsumoto, H., Oka, Y., Imai, T., Ikawa, M., Okabe, M., Ikeda, T., Itohara, S., Kikusui, Mori, K. And Sakano, H.** (2007). Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb. *Nature* **450**, 503-508.

**Kott, J. N., Westrum, L. E., Raines, E. W., Sasahara, M. and Ross, R.** (1994). Olfactory ensheathing glia and platelet-derived growth factor B-chain reactivity in the transplanted rat olfactory bulb. *Int J Dev Neurosci* **12**, 315-323.

**Liu, K. L., Chuah, M. I. and Lee, K. K.** (1995). Soluble factors from the olfactory bulb attract olfactory Schwann cells. *J Neurosci* **15**, 990-1000.

**Liu, Z., Patel, K., Schmidt, H., Andrews, W., Pini, A. and Sundaresan, V.** (2004). Extracellular Ig domains 1 and 2 of Robo are important for ligand (Slit) binding. *Mol Cell Neurosci* **26**, 232-240.

**Liu, H. Y., Wenzel-Seifert, K., Seifert, R.** (2001). The olfactory G protein G(alphaolf) possesses a lower GDP-affinity and deactivates more rapidly than G(salphashort): consequences for receptor-coupling and adenylyl cyclase activation. *J Neurochem* **78**, 325-338.

**Malnic, B., Hirono, J., Sato, T. and Buck, L. B.** (1999). Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* **96**, 713-723.

**McLaughlin, T. and O'Leary, D. D.** (2005). Molecular gradients and development of retinotopic maps. *Annu Rev Neurosci* **28**, 327-355.

**Miller, A. M., Treloar, H. B. and Greer, C. A.** (2010). Composition of the migratory mass during development of the olfactory nerve. *J Comp Neurol* **518**, 4825-4841.

**Miragall, F., Kadmon, G. and Schachner, M.** (1989). Expression of L1 and N-CAM cell adhesion molecules during development of the mouse olfactory system. *Dev Biol* **135**, 272-286.

**Miyamichi, K., Serizawa, S., Kimura, H. M. and Sakano, H.** (2005). Continuous and overlapping expression domains of odorant receptor genes in the olfactory epithelium determine the dorsal/ventral positioning of glomeruli in the olfactory bulb. *J Neurosci* **25**, 3586-3592.

**Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S. K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J. and Axel, R.** (1996). Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* **87**, 675-686.

**Moriyoshi, K., Richards L. J., Akazawa, C., O'Leary, D. D., Nakanishi, S.** (1996). Labeling neural cells using adenoviral gene transfer of membrane-targeted GFP. *Neuron* **16**, 255-260.

**Nguyen-Ba-Charvet, K. T., Di Meglio, T., Fouquet, C. and Chedotal, A.** (2008). Robos and slits control the pathfinding and targeting of mouse olfactory sensory axons. *J Neurosci* **28**, 4244-4249.

**Nguyen Ba-Charvet, K. T., Brose, K., Marillat, V., Kidd, T., Goodman, C. S., Tessier-Lavigne, M., Sotelo, C. and Chedotal, A.** (1999). Slit2-Mediated chemorepulsion and collapse of developing forebrain axons. *Neuron* **22**, 463-473.

**Norlin, E. M., Alenius, M., Gussing, F., Hagglund, M., Vedin, V. and Bohm, S.** (2001). Evidence for gradients of gene expression correlating with zonal topography of the olfactory sensory map. *Mol Cell Neurosci* **18**, 283-295.

**Puche, A. C. and Key, B.** (1995). Identification of cells expressing galectin-1,

a galactose-binding receptor, in the rat olfactory system. *J Comp Neurol* **357**, 513-523.

**Raisman, G.** (1985). Specialized neuroglial arrangement may explain the capacity of vomeronasal axons to reinnervate central neurons. *Neuroscience* **14**, 237-254.

**Ramon-Cueto, A., Perez, J. and Nieto-Sampedro, M.** (1993). In vitro enfolding of olfactory neurites by p75 NGF receptor positive ensheathing cells from adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* **5**, 1172-1180.

**Ramon-Cueto, A. and Avila, J.** (1998). Olfactory ensheathing glia: properties and function. *Brain Res Bull* **46**, 175-187.

**Ressler, K. J., Sullivan, S. L. and Buck, L. B.** (1993). A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell* **73**, 597-609.

**Ressler, K. J., Sullivan, S. L. and Buck, L. B.** (1994). Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell* **79**, 1245-1255.

**Rothberg, J. M., Hartley, D. A., Walther, Z. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1988). slit: an EGF-homologous locus of *D. melanogaster* involved in the development of the embryonic central nervous system. *Cell* **55**, 1047-1059.

**Rothberg, J. M., Jacobs, J. R., Goodman, C. S. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1990). slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Genes Dev* **4**, 2169-2187.

**Sakano, H.** (2010). Neural map formation in the mouse olfactory system. *Neuron* **67**, 530-542.

**Schwarting, G. A., Kostek, C., Ahmad, N., Dibble, C., Pays, L. and Puschel, A. W.** (2000). Semaphorin 3A is required for guidance of olfactory axons in mice. *J Neurosci* **20**, 7691-7697.

**Serizawa, S., Ishii, T., Nakatani, H., Tsuboi, A., Nagawa, F., Asano, M., Sudo, K., Sakagami, J., Sakano, H., Ijiri, T. et al.** (2000). Mutually exclusive expression of odorant receptor transgenes. *Nat Neurosci* **3**, 687-693.

**Serizawa, S., Miyamichi, K., Nakatani, H., Suzuki, M., Saito, M., Yoshihara, Y. and Sakano, H.** (2003). Negative feedback regulation ensures the one receptor-one olfactory neuron rule in mouse. *Science* **302**, 2088-2094.

**Serizawa, S., Miyamichi, K., Takeuchi, H., Yamagishi, Y., Suzuki, M. and Sakano, H.** (2006). A neuronal identity code for the odorant receptor-specific and activity-dependent axon sorting. *Cell* **127**, 1057-1069.

**Takeuchi, H., Inokuchi, K., Aoki, M., Suto, F., Tsuboi, A., Matsuda, I., Suzuki, M., Aiba, A., Serizawa, S., Yoshihara, Y., Fujisawa, H. And Sakano, H.** (2010). Sequential arrival and graded secretion of Sema3F by olfactory neuron axons specify map topography at the bulb. *Cell* **141**, 1056-1067.

**Tennent, R. and Chuah, M. I.** (1996). Ultrastructural study of ensheathing cells in early development of olfactory axons. *Brain Res Dev Brain Res* **95**, 135-139.

**Treloar, H., Tomasiewicz, H., Magnuson, T. and Key, B.** (1997). The central pathway of primary olfactory axons is abnormal in mice lacking the N-CAM-180 isoform. *J Neurobiol* **32**, 643-658.

**Tsuboi, A., Yoshihara, S., Yamazaki, N., Kasai, H., Asai-Tsuboi, H., Komatsu, M., Serizawa, S., Ishii, T., Matsuda, Y., Nagawa, F. And Sakano, H. (1999).** Olfactory neurons expressing closely linked and homologous odorant receptor genes tend to project their axons to neighboring glomeruli on the olfactory bulb. *J Neurosci* **19**, 8409-8418.

**Valverde, F., Santacana, M. and Heredia, M. (1992).** Formation of an olfactory glomerulus: morphological aspects of development and organization. *Neuroscience* **49**, 255-275.

**Vassar, R., Chao, S. K., Sitcheran, R., Nunez, J. M., Vosshall, L. B. and Axel, R. (1994).** Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell* **79**, 981-991

**Vassar, R., Ngai, J. and Axel, R. (1993).** Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell* **74**, 309-318.

**Walz, A., Feinstein, P., Khan, M. and Mombaerts, P. (2007).** Axonal wiring of guanylate cyclase-D-expressing olfactory neurons is dependent on neuropilin 2 and semaphorin 3F. *Development* **134**, 4063-4072.

**Wang, K. H., Brose, K., Arnott, D., Kidd, T., Goodman, C. S., Henzel, W. and Tessier-Lavigne, M. (1999).** Biochemical purification of a mammalian slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching. *Cell* **96**, 771-784.

**Wang, Y. and Huang, Z. H. (2012).** Morphological phenotypes of olfactory ensheathing cells display different migratory responses upon Slit-2. *Exp Cell Res* **318**, 1889-1900.

Wong, K., Ren, X. R., Huang, Y. Z., Xie, Y., Liu, G., Saito, H., Tang, H., Wen, L., Brady-Kalnay, S. M., Mei, L. et al. (2001). Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway. *Cell* **107**, 209-221.

Woodhall, E., West, A. K. and Chuah, M. I. (2001). Cultured olfactory ensheathing cells express nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, glia cell line-derived neurotrophic factor and their receptors. *Brain Res Mol Brain Res* **88**, 203-213.

Ypsilanti, A. R., Zagar, Y. and Chedotal, A. (2010). Moving away from the midline: new developments for Slit and Robo. *Development* **137**, 1939-1952.

Yuan, W., Zhou, L., Chen, J. H., Wu, J. Y., Rao, Y. and Ornitz, D. M. (1999). The mouse SLIT family: secreted ligands for ROBO expressed in patterns that suggest a role in morphogenesis and axon guidance. *Dev Biol* **212**, 290-306.

## 謝辞

本研究を行なうにあたり、多くの方々にお世話になりました。最後になりましたが、ここにお礼を申し上げます。本研究の全般にわたってご指導、ご協力いただきました、東京大学理学系研究科生物化学専攻坂野研究室の竹内春樹特任助教に心から感謝いたします。また、論文を作成するにあたってご尽力いただきました、同研究室西住裕文助教に感謝致します。さらに、同研究室のみなさまから、多くの有益な助言をいただきました。最後に、研究の機会を与えていただき、ご指導してくださった坂野仁教授に心から感謝致します。