

論文の内容の要旨

論文題目 Eph/Ephrin による嗅覚系神経回路形成制御機構の解明

氏 名 安藏 まりえ

《序論》

脳神経系が機能的に働くためには膨大な数の神経による精巧な回路形成が必要不可欠である。神経回路形成の際、個々の神経は軸索及び樹状突起を目的の領域へと投射させ正しい相手とシナプス結合する。また脳のような限られたスペースの中では、たとえ隣接していても機能的に異なる神経回路はそれぞれ適切に分離する必要がある。これらのプロセスが破綻すると、神経情報の伝達、整理、蓄積に不都合が生じる。今日までに軸索投射に関する研究は活発に行われてきた一方、樹状突起投射に関する研究はその形態が多様・複雑であることと、さらにそれらが脳内で絡み合っているために解析が困難であったことから知見が少ない。そこで本研究では高度な遺伝学的手法が確立されているショウジョウバエ嗅覚系神経回路をモデルに樹状突起投射の制御機構の解明を目指した。その結果、軸索ガイダンス分子として知られる Eph/Ephrin が「機能的に異なる樹状突起の分離」を制御していることを見出したので報告する。

《方法と結果》

1. Eph 及び Ephrin の欠損は樹状突起の投射異常を示す

ショウジョウバエ嗅覚系一次中枢である触角葉は約 50 個の糸球体と呼ばれるシナプス構造体から構成される。各糸球体を介する神経回路は特定の嗅覚情報を処理し、投射神経の樹状突起は個々のクラスに応じ特定の 1 つの糸球体のみ投射する。Eph, Ephrin が樹状突起投射に関与するかを検証する目的で、遺伝学的モザイク法 (MARCM 法) を用い、一部の投射神経をラベルした。野生型の投射神経の大部分は、側方細胞系譜 (l-lineage) の投射神経 (l-PN) または前方背側細胞系譜 (ad-lineage) の投射神経 (ad-PN) に分類され、両者は重複なく特定の糸球体に樹状突起を投射する。Eph^{X652} ヌル変異体では、l-PN が本来投射するはずのない ad-lineage の糸球体へと異所的な樹状突起投射を示した。Eph^{X652} ヌル変異体では ad-PN も、本来は投射しないはずの l-lineage の糸球体へと異所的な樹状突起投射が観察された。Ephrin は既存のヌル変異体がなかったことから、私は CRISPR/Cas9 法を用いて内在性 *ephrin* 遺伝子の翻訳領域全長を欠損させた系統 (*ephrin*¹⁹⁵) を作出した。この *ephrin*¹⁹⁵ ヌル変異体でも Eph^{X652} ヌル変異体同様に本来投射するはずのない糸球体へと異所的な樹状突起投射を示した。このことから、Eph, Ephrin とともに樹状突起投射へと関与することが強く示唆された。

2. Eph タンパク質は生殖行動に関与する嗅覚系神経回路特異的に高い発現を示す

私は本学修士課程在籍時、CRISPR/Cas9法を用いて内在性 *Eph* 遺伝子の翻訳領域 3' 末尾に *myc* 配列をノックインし *Eph-myc* 系統を作出した。この系統を抗 Myc 抗体を用いて染色することで内在性 *Eph-myc* タンパク質の発現部位を検出することができる。投射神経に発現する *GHI46-Gal4* と組み合わせて *Eph-myc* の発現パターンを解析した結果、蛹化後 50 時間の触角葉ではショウジョウバエの生殖行動に関与する DL3, DA1, VA1_{lm} と VL2a 糸球体で特異的に *Eph-myc* が高発現していることを見出した。この *Eph-myc* シグナルは投射神経特異的な *Eph* ノックダウン (*Eph-shRNA*) で減弱した。これらの結果から、*Eph* は触角葉の発生過程で投射神経に発現し、とりわけ生殖行動に関与する糸球体で高く発現していることが明らかとなった。

3. Eph は DA1 I-PN 樹状突起が隣接する糸球体へと漏れ出すのを防いでいる

次に *Eph* の発現がどのように樹状突起投射を制御しているか調べる目的で、遺伝学的モザイク法 (MARCM 法) を用い、一部の投射神経のみをラベルし、同時に *Eph-shRNA* を発現させて *Eph* をノックダウンした。投射神経で *Eph* をノックダウンした際 I-PN の樹状突起は、本来投射するはずのない ad-lineage の糸球体へも誤って投射していた。80% 以上の高頻度で誤った樹状突起投射が確認された糸球体は全て「*Eph* を高発現する DA1 糸球体に隣接」していた。対照的に、ad-PN で *Eph* をノックダウンしても殆ど異常は観察されなかった。DA1 糸球体周辺をより詳しく解析した結果、*Eph* がノックダウンされた DA1 I-PN 樹状突起 (本来 DA1 糸球体へ投射する I-PN 樹状突起) は、隣接する VA1_d 糸球体へと漏れ出していた。この樹状突起の漏れ出しは *Eph-shRNA* 耐性型の *Eph^{resistant}-myc* を発現することによってレスキューされた。これらの結果から、*Eph* は DA1 I-PN 樹状突起が隣接する糸球体へと漏れ出ないために必要であり、細胞自律的に機能していることが明らかとなった。

4. DA1 I-PN 樹状突起上の Eph は周囲の ad-PN に発現する Ephrin をリガンドとして認識し樹状突起間の境界形成をしている

DA1 I-PN 樹状突起上の *Eph* は何をリガンドとして認識し、自身の樹状突起が隣接する糸球体へと漏れ出ないように制御しているのだろうか。私は Ephrin に着目し、隣接する ad-PN で *ephrin* をノックダウンした際の野生型 DA1 I-PN の挙動を解析した。対照群 (WT) では DA1 I-PN と VA1_d ad-PN の樹状突起は交わることなく明瞭な境界を形成している。一方、実験群では ad-PN で *ephrin* をノックダウンした際、野生型の DA1 I-PN は隣接する VA1_d 糸球体へと漏れ込んだ。さらに実験群では *ephrin* がノックダウンされた VA1_d ad-PN 自体も DA1 糸球体へと漏れ込むことが観察された。このことから、DA1 I-PN 樹状突起上の *Eph* は隣接する ad-PN 上の Ephrin をリガンドとして認識し、自身の樹状突起が DA1 糸球体から漏れ出ないように制御していることが強く示唆された。また、Ephrin は VA1_d ad-PN の樹状突起が隣接する DA1 糸球体へと漏れ込まないように細胞自律的に制御していることも示唆された。

5. DA1 I-PN Eph – VA1d ad-PN Ephrin 間の *trans* 相互作用によって樹状突起の境界が形成される

これまでの結果から DA1 I-PN 樹状突起上の Eph と VA1d ad-PN 樹状突起上の Ephrin の *trans* 相互作用により樹状突起間の境界が形成されていることが推察される。本仮説を検証する目的で Eph のリガンド結合ドメイン欠損型の Eph^{ALBD} を作成した。*in vitro* で Eph^{ALBD} が *trans* に Ephrin-Fc と結合しないことを共免疫沈降法等で確認した後、*in vivo* で Eph ノックダウンによって生じた DA1 I-PN 樹状突起の漏れ出しが Eph^{resistant, ALBD} の発現でレスキューされるか検証した。その結果、Eph^{resistant, ALBD} では DA1 I-PN 樹状突起の漏れ出しをレスキューできなかった。以上の結果より、樹状突起の境界形成には DA1 I-PN Eph – VA1d ad-PN Ephrin 間の *trans* 相互作用が必要であることが示唆された。

《まとめと考察》

神経細胞が正しい相手と結合するために生体内でどのような制御システムが働いているかは、非常に複雑かつ精巧な神経回路がどう形成されるかを理解する上で非常に重要な問いである。これまでに嗅覚系を用いた神経回路形成に関する研究から、膜分子の軸に沿った濃度勾配やモザイク状に発現する膜分子の有無によって樹状突起投射が制御されていることが明らかとなっていた。これらの知見に加え、ごく一部の種類の神経の樹状突起投射を特異的に制御し、とりわけ機能的に異なる神経回路の樹状突起間の分離を担う分子の存在が今回明らかになった。発生期の嗅覚系神経回路では Eph が生殖行動に関連する糸球体でのみ局所的に高く発現しており、その内の DA1 I-PN 樹状突起上の Eph とそれに隣接する ad-PN 樹状突起上の Ephrin との *trans* 相互作用により樹状突起間の境界形成がなされることを本研究では示した。この *trans* 相互作用の結果、DA1 I-PN 樹状突起内には Eph フォワードシグナルが、隣接する ad-PN 樹状突起内には Ephrin リーバースシグナルが伝達されることにより両樹状突起は互いに分離し合い混線を防いでいると想定される。今後は、嗅覚系以外の神経回路形成においても Eph/Ephrin が同様の機能を有するか確認する必要がある。

Eph, Ephrin はショウジョウバエのみならず、蛾やマウスにおいても性行動に関係する嗅覚系神経回路で高発現している。このことから Eph/Ephrin シグナルは性フェロモン感知に関わる神経回路を他の匂い物質感知に関わる神経回路と分離するのに適したシステムであると同時に、性フェロモン感知に関わる神経回路は Eph/Ephrin のような特殊な分子機構を用いてでも他の神経回路と分離する必要があることが示唆される。今後 Eph/Ephrin を操作した個体における性行動を解析することで進化的に保存された神経回路の分離システムとしての Eph/Ephrin への理解が深まることが期待される。

《参考文献》 [Anzo M., Sekine S., Makihara S., Chao K., Miura M., and Chihara T., Dendritic Eph organizes dendrodendritic segregation in discrete olfactory map formation in Drosophila, *Genes Dev.* 31:1054-65, 2017](#)