

研究課題別評価

1. 研究課題名： 神経軸索側枝の形成機構

2. 研究者氏名： 川崎能彦

3. 研究の狙い：

脳の神経回路の多くは、神経軸索の枝分かれ“軸索側枝”を介して形成される。しかしながら、その形成機構は多くの点で未知のままである。その主な理由として、正確な軸索側枝形成を観察する培養系が存在しなかったことが挙げられる。本研究では、マウス嗅球-終脳神経回路をモデルとして、側枝の形成機構を明らかにすることを目指して研究を行った。具体的なアプローチとして、軸索側枝の形成を再現する培養系を確立した後、タイムラプス撮影により生体に近い状態での軸索側枝形成の過程を可視化して解析するとともに、各種の遺伝子破壊マウスを用いて軸索側枝を制御する分子機構の探索を行った。

4. 研究結果：

(1) 嗅球-終脳神経回路を用いて、培養下で軸索側枝形成を正確に再現する系を確立した。培養条件を検討した結果、終脳組織の器官培養下で *in vivo* に近い状態の軸索側枝形成を再現することが出来るようになった。このことにより、生体内に近い状態での軸索側枝の形成過程を培養下で解析することが可能となった。

(2) 正立型顕微鏡下で、タイムラプス撮影を行うための新しいシステムを構築し、これらのシステムを用いて、軸索側枝の形成過程を鮮明な映像として撮影することに成功した。得られた映像を解析した結果、(I) 軸索側枝形成は可逆的な幾つかのステップを経て主軸作上に形成されること、(II) 主軸索上の瘤状構造の位置と側枝の形成部位には大きな相関は認められないこと、(III) 側枝が伸長する際には生長円錐に似た構造体が側枝上を移動すること、などを明らかにすることができた。また、確立したタイムラプス撮影システムを用いて、嗅球軸索のガイドポスト細胞の移動を詳しく解析することなどにも成功した。器官培養に対しての汎用性の高いタイムラプス観察システムを構築することができたと言える。

(3) ノックアウトマウスを用いた実験から、Neuropilin/PlexinA/sema3 シグナル経路の一部が欠失すると、嗅球軸索の側枝形成が低下することを見いだした。これらの結果は、これらのシグナルが嗅球軸索の側枝形成に関与することを示唆している。

(4) 嗅球軸索のガイドポスト細胞の移動と、嗅球軸索の伸長の制御に Netrin-1/DCC シグナルが関与する事を明らかとした。一方、軸索側枝形成には Netrin-1/DCC シグナルの関与は認められないことも明らかとなった。これらの結果は、主軸索の伸長制御機構と、軸索側枝の伸長制御機構は、異なる分子機構によって制御されていることを示唆している。

(5) 嗅球神経細胞のサブタイプに注目して軸索伸長の制御機構の解析を行い、サブタイプごとに異なる分子機構が軸索伸長を制御していることを見いだした。

5. 自己評価：

・神経軸索の側枝形成の過程を可視化できたことにより、軸索側枝形成という現象についての全体的なイメージを得ることができた。これらの映像からは、幾つかの重要な情報を見いだすことができた。また、試行錯誤の末に側枝形成の美しい映像を観察できたことは大きな喜びでもあった。側枝形成の分子機構の解析はなかなか進展しなかったが、遺伝子破壊マウスを用いた解析から、嗅球軸索の側枝形成に関わる分子を見いだすことができた。ただし、これらの分子が側枝形成時にどのように機能するのかなど、依然として未知の部分が多く、さらに解析を進める

必要がある。

・側枝形成のモデルとして用いてきた嗅球-終脳神経回路は、臭い情報を伝達する嗅覚2次ニューロンの神経回路としての役割を担っている。嗅球神経細胞のサブタイプに注目した解析から、それぞれのサブタイプごとに異なる軸索伸長制御機構が存在することが明らかとなった。これらの研究は、嗅球に集められた臭い情報が終脳にどのように伝達されるのかという問題に対しての有効なアプローチの一つであると考えている。

・本研究過程に多くの成果を得る事ができたものの、多くのことに手を出した結果、論文としてまとめる作業が遅れてしまっていることは、大いに反省すべき点だと考えている。特に、形態形成のイメージング解析からは、新たな疑問点や研究の方向性を導きやすい反面、得られた映像を記述可能なデータとして数値化し整理するためには、幾つかの工夫を必要とすることもあり、これらの作業を急いで進めている。

6. 研究総括の見解:

蛍光染色法を巧みに活用し、嗅覚器からの神経軸索の成長を生体観察し得る脳の器官培養系を確立できたことは、この実験系の汎用性からみても、極めて高く評価できる。また、この実験系によって各種のノックアウトマウスについて嗅球神経軸索の側枝形成について多くの観察結果を得た。現在なお、観察記述の域に止まっており、成果の公表も遅れがちではあるが、当初の目的は概ね達成したと評価する。今後、解析的に研究を鋭意推進し、本課題の目標である神経軸索側枝形成の分子機構の解明に迫ることを期待する。

7. 主な論文等:

論文

1. Kawasaki T, Takagi Y, Yamatani H and Hirata T: Systematic screening and identification of antigens recognized by monoclonal antibodies raised against the developing lateral olfactory tract. *J. Neurobiol.* 62: 330-340, 2005
2. Kawasaki T, Ito K and Hirata T: Netrin-1 regulates ventral tangential migration of guidepost neurons in the lateral olfactory tract. *Development* (in press)

招待講演

2004.02.20 嗅球軸索ガイドポスト細胞と嗅球軸索束形成 東北大学医学部

口頭発表

1. 2004.06.04 嗅索ガイドポスト細胞の移動と嗅球軸索束形成 日本発生生物学会大 37 回大会
2. 2004.09.19 Mechanism of ventral tangential migration of guidepost neurons in the lateral olfactory tract: Cold Spring Harbor Laboratory meeting; Axon Guidance & Neural Plasticity.