

(論文内容の要旨)

嗅覚系は主に嗅上皮 (olfactory epithelium (OE)) と嗅球 (olfactory bulb (OB)) 及び嗅皮質 (olfactory cortex) から構成されている。匂い分子は、嗅上皮に存在する嗅神経細胞 (olfactory receptor neurons (ORNs)) が発現する匂いレセプター (olfactory receptor) と結合し、匂いの情報は嗅上皮から嗅神経細胞の軸索 (嗅神経軸索: olfactory axons) を通って、嗅球、嗅皮質、さらに脳の他の領域へと伝わる。

嗅神経細胞が嗅球へ軸索を到達させるためには、投射の過程でパイオニア嗅神経軸索 (pioneer olfactory axons) が嗅球表面の基底膜 (central nervous system (CNS) basal lamina) を貫通する必要がある。この過程は、嗅覚系の発達に必要であるだけでなく、生殖器の発達にも重要である。なぜなら、嗅神経軸索が嗅球表面の基底膜を貫通できないと、その軸索を伝って嗅上皮から脳へと移動するゴナドトロピン放出ホルモン神経細胞 (gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons) が、脳内に到達できなくなるために性腺機能低下症 (hypogonadism) が起こるためである。このように、嗅神経軸索による基底膜貫通現象は発生学的に重要であるにも関わらず、現在までのところ、その分子機構は殆ど分かっていなかった。

Fezf1 は C2H2 型の zinc finger domain を持つたんぱく質をコードしており、嗅覚系においては嗅上皮のみに発現されている遺伝子である。本研究は、*Fezf1* が嗅覚系の発達においてどのような役割を果たすのか、さらにはこの遺伝子が上記のような嗅神経軸索の投射過程に関与するのかを明らかにすることを目的として行われた。

Fezf1 の役割を調べるため *Fezf1* 欠損マウスを作製した結果、このマウスにおいて、嗅神経軸索が嗅球へ到達しないことを確認し、さらに GnRH 神経細胞が脳に到達しないことが分かった。この遺伝子が嗅神経軸索による嗅球表面の基底膜貫通に関与するかを検討する実験を行った。組織学的解析を行った結果、*Fezf1* 欠損マウスでは嗅神経軸索が基底膜を貫通しないことが明らかになった。また、嗅神経軸索の基底膜を貫通する能力を調べるため、マトリゲル内で嗅上皮の培養を行ったところ、*Fezf1* を欠損した嗅上皮では軸索伸長の低下が認められた。さらに、*in situ* zymography により基底膜分解の活性を調べた結果、基底膜付近での gelatinase の活性が *Fezf1* 欠損サンプルで減少していることが示唆された。最後に、*Fezf1* 欠損マウスでは嗅神経軸索が嗅球表面の基底膜を貫通できないために嗅球へ到達できないのかを調べるために、基底膜を含む髄膜を嗅球から剥がした状態で嗅球と嗅上皮の共培養実験を行うと、*Fezf1* 欠損サンプルでも嗅神経軸索が嗅球へ到達できるようになることを見出した。

研究の結果、*Fezf1* は嗅神経軸索による嗅球表面の基底膜貫通に必要であることが明らかになった。本研究の成果は、神経軸索による基底膜貫通の分子機構の解明および、性腺機能低下症関連遺伝子の探索に新たな知見を与えると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

嗅上皮に存在する嗅神経細胞の軸索が終脳の嗅球へ到達するためには、発生の過程でパイオニア嗅神経軸索 (pioneer olfactory axons) が基底膜 (central nervous system (CNS) basal lamina) を貫通する必要がある。さらに胎生期には嗅上皮に存在するゴナドトロピン放出ホルモン神経細胞 (gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons) が嗅神経軸索に沿って脳内へ移動し、性腺の発達を制御することから、嗅神経軸索が基底膜を貫通するプロセスは生殖系の発達にも重要な意味をもつ。しかしながら嗅神経軸索による基底膜貫通プロセスの分子メカニズムについて多くは不明であった。

Fezf1 (*Fez*: Forebrain Embryonic Zinc-finger)は、神経誘導因子 *noggin* により誘導される神経組織特異的遺伝子として *Xenopus* において同定された zinc finger motif をもつ核内タンパクであり、胎生期 (E12.5) のマウスでは、軸索が終脳へ到達していない嗅神経細胞および前脳の一部に発現する。申請者は、*Fezf1* の嗅覚系神経回路発達における役割を明らかにするために、*Fezf1* 欠損マウスを作製し解析を行った。

Fezf1 欠損マウスでは、嗅球の発達が悪く、トレーサー実験により嗅神経軸索が嗅球へ到達しないこと、GnRH 神経細胞の脳内への移動が障害されていることを見いだした。さらに *Fezf1* 欠損マウスの嗅上皮においては、未分化な神経細胞のマーカーである *NeuroD1*(+) 嗅神経細胞が増加し、成熟した嗅神経細胞のマーカーである *Omp*(+) 嗅神経細胞が減少することを明らかにした。以上の結果は、*Fezf1* が嗅神経軸索投射および嗅神経細胞の分化に重要であることを示す。

さらに *Fezf1* の嗅神経軸索投射における役割を明らかにするために、嗅神経軸索の伸長活性、嗅神経軸索により誘導される細胞外マトリックス分解活性、および嗅神経軸索によるターゲット細胞の認識の有無について解析を行った。マトリゲル内で嗅上皮組織培養を行い、嗅神経軸索の伸長活性を測定したところ、*Fezf1* 欠損群において嗅神経軸索の伸長能が低下していた。次に *in situ* zymography により嗅神経軸索により誘導される細胞外マトリックス分解活性を測定したところ、*Fezf1* 欠損マウスでは嗅球表面の基底膜付近で *gelatinase* 活性が低下していることを明らかにした。最後に、嗅球表面から基底膜を除去し、嗅上皮と共培養を行い、嗅神経軸索によるターゲット細胞の認識の有無について解析を行った。その結果、*Fezf1* 欠損マウスにおいても嗅神経軸索がターゲットである嗅球へ到達することを見出した。以上の結果は、*Fezf1* が嗅神経軸索投射における軸索伸長と細胞外マトリックス分解の誘導に重要な役割を果たすこと、さらには、この *Fezf1* の働きが嗅神経軸索の基底膜貫通プロセスに必須であることを示す。

以上のように、本論文で述べられた成果は重要であり、本論文は博士 (生命科学) の学位論文として価値あるものと認められる。さらに、平成 21 年 4 月 8 日に論文公聴会を開催し、論文内容とそれに関連した試問を行った結果、合格と認めた。