

氏 名	米 倉 淳 一 郎
学位(専攻分野)	博 士 (医 科 学)
学 位 記 番 号	医 科 博 第 2 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 医 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Conditional genetic labeling of mitral cells of the mouse accessory olfactory bulb to visualize the organization of their apical dendritic tufts (条件的標識法を用いたマウス副嗅球僧帽細胞の可視化と、その尖端樹状突起房状末端部の分布様式の解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 渡 邊 大 教 授 芹 川 忠 夫 教 授 伊 藤 壽 一

論 文 内 容 の 要 旨

<序論>

多くの脊椎動物は副嗅覚系と呼ばれる嗅覚情報処理系を通じて、種特異的なフェロモン分子および特定の匂い分子の受容と処理を行う。副嗅覚系では、鼻の下部に位置する鋤鼻器官に存在する鋤鼻神経細胞によって化学情報が受容され、その情報が鋤鼻神経細胞の投射先である副嗅球へと伝達される。副嗅球では二次神経細胞である僧帽細胞が鋤鼻神経細胞の情報を受け取り、扁桃体内側部へと投射する。近年、遺伝学的手法を用いて各フェロモン受容体を発現する鋤鼻神経細胞を標識し、その投射パターンを解析する試みが行われてきた。しかし副嗅球僧帽細胞に関しては、細胞種を限定した簡便な標識手法が無いこともあり、形態学的な解析が現在まで殆ど行われていなかった。そのため本研究では単一の副嗅球僧帽細胞を標識し形態観察を可能にするツールの開発、そして副嗅球細胞の情報入力部、すなわち各細胞に通常複数個存在する尖端樹状突起房状末端部 (apical dendritic tuft) の分布の記述と解析を行うことを目的とした。

<結果と考察>

A. 単一の副嗅球僧帽細胞の形態を可視化するためのツールの作製

主嗅球および副嗅球僧帽細胞特異的な遺伝子発現を誘導するプロトカドヘリン 21 (pcdh21) 遺伝子の上流ゲノム領域直下に、タモキシフェン誘導性組み替え酵素 CreER 遺伝子を繋いだ外来遺伝子を持つトランスジェニックマウス (Pcdh21-CreER 系統) を作製した。Pcdh21-CreER 系統は CreER タンパク質を主嗅球および副嗅球の僧帽細胞において発現した。次にこのマウス系統を、広範な発現を呈するプロモーター下で "loxP-stop-loxP-アルカリフォスファターゼ" カセットを発現するレポーターマウス系統 Z/AP と掛け合わせ、両方の外来遺伝子を持つ個体を作出した。この個体に少量のタモキシフェンを投与することで、ごく少数の細胞でのみ CreER 組換え酵素の活性化および Cre 活性依存的な loxP カセットの組み替えを誘導し、単一の副嗅球僧帽細胞の形態をアルカリフォスファターゼ染色により簡便に可視化することに成功した。

B. 副嗅球僧帽細胞情報入力部 (apical dendritic tuft) の分布様式の解析

上記の系を用いて可視化した単一の副嗅球僧帽細胞の形態解析から、以下の知見を得た。

- (1) 多くの副嗅球僧帽細胞は外叢状層の底部に細胞体を持ち、平均して 4.05 個の tuft を有していた。その一方で、外叢状層の最表層部に小さなサイズの細胞体を持ち、平均して 1.17 個の tuft を近接する糸球体に伸ばす一群の細胞を発見した。
- (2) 過去の報告の通り、前部外叢状層に位置する副嗅球僧帽細胞は前部糸球体層にのみ tuft を伸ばし、一方で後部の細胞は後部糸球体層にのみ tuft を形成する傾向が見られた。しかし、境界部付近に存在する僧帽細胞では上述の対応関係が見ら

れない場合があり、副嗅球における前部と後部の境界線は糸球体層と外叢状層において異なる、もしくは境界部では前部と後部の僧帽細胞がある程度混じり合っている可能性を示唆した。

(3) 副嗅球前部に糸球体を持つ僧帽細胞に関して、副嗅球の矢状断連続切片を再構成することで、副嗅球内での各細胞の細胞体と tuft の位置をプロットした。その結果、65%の細胞は副嗅球糸球体層の腹背軸方向に局限された領域(25%以内)に複数の tuft を持ち、残りの細胞は腹背軸方向により広く分布した tuft を持つことが示された。

<結論>

本研究の結果は、副嗅球および主嗅球の僧帽細胞の形態観察における強力かつ簡便なツールを提供するものであり、嗅覚系回路形成の研究に対する更なる応用が可能である。また副嗅球僧帽細胞情報入力部の分布に関する解析結果は、各フェロモン受容体の情報は僧帽細胞のレベルで独立に伝達されるのか、或いはある程度の統合が起こるのかという積年の問題に対する、重要な知見を提供するものである。

論文審査の結果の要旨

多くの生物種において、副嗅覚系はフェロモン等の化学シグナルを受容し、典型的な行動や生理的变化の発現をもたらす系である。副嗅覚系の二次神経細胞である副嗅球僧帽細胞は、情報入力部である尖端樹状突起房状末端部を副嗅球の複数の糸球体に伸ばし、情報の統合を行う。しかし従来の研究手法では副嗅球僧帽細胞を単一細胞レベルで簡便に標識することが困難であり、情報入力部の分布様式に関する知見は乏しかった。

申請者は、タモキシフェンにより活性誘導が可能な組換え酵素 CreER を、副嗅球僧帽細胞および主嗅球僧帽細胞で働くプロトカドヘリン 21 遺伝子のプロモーター領域下で発現するトランスジェニックマウス(Pcdh21-CreER 系統)を作製した。次に Z/AP レポーターマウスとのダブルトランスジェニックマウスを作製し、低量のタモキシフェンを投与することで、単一或いはごく少数の副嗅球僧帽細胞を標識した。その上で申請者は副嗅球僧帽細胞の情報入力部および細胞体の分布様式の解析を行い、副嗅球僧帽細胞の形態上の多様性を明らかにした。

本研究は副嗅球僧帽細胞情報入力部の分布様式の非画一性を提示し、その情報統合機構の複雑性を示唆するとともに、今後の研究における基盤的情報を提供している。また本研究で開発された系は、各嗅覚系の二次神経細胞の形態観察を容易にするものであり、各嗅覚系の中枢レベルでの情報統合機構の研究において汎用性のある、重要なツールとなり得るものである。

したがって、本論文は博士(医科学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 20 年 2 月 1 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。