

審査の結果の要旨

氏名 安藏まりえ

本研究は、嗅覚系神経回路形成の際に比較的広範囲におよぶ膜分子を介した投射制御機構に加え、ごく限定的に神経の樹状突起投射を膜分子の **Eph/Ephrin** が制御する機構を新たに見出した。とりわけ「機能的に異なる樹状突起の分離」を制御することを明らかにした。

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須であり、それがどのような機構で形成されるのかは今なお新たな課題が次々に立ち現れてくる深い問題である。神経回路形成では、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必要がある。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、樹状突起投射はその形態が多様・複雑であり、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不明な点が多い。そこで学位申請者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用いた。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。これまでの知見により、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。しかしながら、これまでの報告のみでは個々の投射神経の樹状突起が約 50 個の糸球体から特定の 1 つのみを選出する機構としては不十分であることが想定された。そこで申請者は新規樹状突起投射の制御機構の解明を目指し、新たに軸索ガイダンス分子として知られる **Eph/Ephrin** が、樹状突起の投射において機能的に異なる樹状突起間の分離を担うことを見出した。

本研究室の先行研究において **Ephrin** の樹状突起投射への関与が示唆されていたことから、申請者はまず **Eph^{X652}** 及び **ephrin¹⁹⁵** ヌル変異体において樹状突起の投射パターンを解析し、**Eph/Ephrin** が樹状突起に関与するか調べた。**ephrin¹⁹⁵** ヌル変異体は申請者が新たに作出し、CRISPR/Cas9 法を用い内在性 **ephrin** 遺伝子の全翻訳領域を欠損させている。これら **Eph^{X652}**, **ephrin¹⁹⁵** ヌル変異体において、遺伝学的モザイク法 (MARCM 法) を用い、一部の投射神経のみを標識したところ、両変異体ともに本来投射するはずのない糸球体へと樹状突起の投射異常を示した。樹状突起投射における **Eph**, **Ephrin** の関与が示されたことから、嗅覚系神経投射の起こる発生過程において **Eph**, **Ephrin** タンパク質の発現を解析した。申請者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た **Eph-myc** 系統を作出している。この系統を抗 **Myc** 抗体に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。**Eph-myc** の発現パターンを解析した結果、蛹化後 50 時間の触角葉においてショウジョウバエの生殖行動に関与する **DL3**, **DA1**, **VA11m** と **VL2a**

糸球体で特異的に Eph-myc が高く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*) で一部減弱したことから、Eph は触角葉の発生過程で投射神経でも発現することを示した。

次に申請者は MARCM 法を用い投射神経特異的に *Eph-shRNA* を発現させて Eph をノックダウンした。Eph がノックダウンされた投射神経では、特異的に Eph を高く発現する DA1 糸球体から隣接する糸球体へと樹状突起が漏れ出していた。この Eph ノックダウンによって生じた樹状突起の漏れ出しは *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を申請者は明らかにしている。また DA1 投射神経に隣接する VA1d 投射神経(本来 Eph を低く発現する)で Eph を過剰発現した際、VA1d 樹状突起が DA1 糸球体へと漏れ出し、過剰発現量に相関して漏れ出しの程度も強くなったことから DA1 とそれに隣接する VA1d 投射神経の樹状突起間では Eph の発現濃度差を感知していることも見出した。

申請者は「DA1 樹状突起上の Eph が VA1d 樹状突起上の Ephrin をリガンドとして認識する結果、両樹状突起間に明瞭な境界が形成されるのではないか」という仮説を立てた。そこで VA1d 投射神経で *ephrin* をノックダウンした際の野生型 DA1 樹状突起の挙動を解析した。野生型 DA1-VA1d 間では明瞭な樹状突起境界が形成されるのに対し、VA1d 投射神経で *ephrin* をノックダウンした際の野生型 DA1 樹状突起は VA1d 糸球体へと漏れ出した。さらに VA1d 樹状突起自身も DA1 糸球体へと漏れ出した。VA1d 投射神経で *ephrin* をノックダウンした際に生じた樹状突起の漏れ出しは、*ephrin^{resistant}-myc* を発現することによってレスキューされた。申請者の予想通り、DA1 樹状突起上の Eph と VA1d 樹状突起上の Ephrin 間の相互作用の結果、両樹状突起間に明瞭な境界が形成されることが明らかとなった。また、DA1 樹状突起では Eph、VA1d 樹状突起では Ephrin がそれぞれ細胞自律的に働いていることも見出している。

最後に、申請者は DA1-VA1d 間の樹状突起境界形成は、DA1 樹状突起上の Eph と VA1d 樹状突起上の Ephrin との *trans* 相互作用が担うか検証した。*trans* 相互作用の際に使用される Eph リガンド結合ドメインを欠損型の Eph^{ALBD} では、Eph ノックダウンによって生じた樹状突起の漏れ出しがレスキューできないこと、また、*trans* 相互作用の責任ドメインに変異を入れた Ephrin^{E320K} でも *ephrin* ノックダウンによって生じた樹状突起の漏れ出しもレスキューできないことを確認した。以上の結果から DA1-VA1d 間の樹状突起境界形成への *trans* 相互作用の関与が示唆された。

以上、本論文で申請者は発生過程の嗅覚系二次神経では Eph がごく一部の樹状突起でのみ特異的に高く発現し、それに隣接する樹状突起に発現する Ephrin との *trans* 相互作用していることを明らかにした。また、その Ephrin-Eph 間 *trans* 相互作用が、投射神経の樹状突起同士の混線を防いでいることも明らかにした。本研究は、今日までに報告されてきた触角葉内の糸球体全体(または大部分)に作用する投射制御機構に加え、ごく一部の触角葉神経回路での樹状突起分離を特異的に制御する機構も存在することを示した点からも、神経回路形成の制御機構解明において非常に重要な成果であると認識する。

よって本論文は博士(薬科学)の学位請求論文として合格と認められる。