

シナプス分子機構研究チーム

Laboratory for Neurobiology of Synapse

チームリーダー 吉原良浩

YOSHIHARA, Yoshihiro

シナプス、それはニューロンからニューロンへと情報の伝達が行われる場であり、特異的シナプス結合を介してのニューロン間の配線パターンが脳の情報処理機構の基本原理となっている。従って脳を理解するためには、機能的神経回路網の詳細な知識を得ることが不可欠である。嗅覚系は匂い情報の受容・伝達・認識を司る神経システムであり、鼻腔の嗅上皮から脳の嗅球さらには嗅皮質へと至る精緻な神経回路網によって、匂い分子の識別・匂いイメージの形成がなされる。また嗅覚系はニューロンの新生、移動、軸索伸長、樹状突起形態形成、シナプス形成など、神経回路構築の様々な発達過程を研究するのに適したモデルシステムである。

当研究チームではこのような嗅覚系に焦点を絞り、マウスおよびゼブラフィッシュを用いた発生工学的技術を駆使して、嗅覚神経回路形成・維持・可塑的变化の分子・細胞メカニズムの解明さらには他の神経システムに普遍的な新たな概念・基本原理の発見を目指す。また、発達期および成体期のシナプスにおけるニューロン間の直接的相互作用を司る細胞認識・接着分子群に着目し、それらの構造・発現・機能を分子・細胞・神経回路および個体レベルで解析する。

1. 嗅覚系神経回路網形成・維持・可塑性の分子基盤 (宮坂, 吉原 (誠), 稲木, 川崎, 三津井, 藤田, 佐藤, 堅田 *)

嗅覚神経系は、嗅細胞および嗅球内抑制性介在ニューロンの永続的な再生、少数タイプのニューロンから成る比較的単純な神経回路、豊富な分子マーカーの存在、匂い分子受容体の発現をもとにした嗅細胞表現型の細かな分類などの特徴的な性質を備えており、ニューロンの発生・分化・軸索投射・機能的神経回路網形成などの研究に適した神経システムである。当研究チームでは嗅覚系の神経回路網形成・維持および可塑的变化過程の分子・細胞メカニズムさらには匂いイメージ形成に至るまでの神経機構を解明することを目的として研究を行っている。

(1) ゼブラフィッシュ嗅細胞軸索投射におけるガイダンス分子 Robo2 の役割

嗅上皮から嗅球へと至る一次嗅覚神経回路の初期形成に、軸索ガイダンス分子 Robo2 が必要であることを明らかにした。Robo2 を欠損するゼブラフィッシュ変異体 *astray* では、一部の嗅細胞軸索が嗅球に到達せずに、脳の他の部位へと侵入していた。またこの結果から、「発生初期の神経接続が足場となってその後の正しい神経配線が構築される」という新たなモデルを提唱した。

(2) マウス嗅覚神経系構築における転写因子 Arx の役割

ホメオボックス型転写因子 Arx が正常な嗅覚神経回路構築に必須の遺伝子であることを見いだした。Arx 欠損マウスにおいては嗅球の抑制性介在ニューロンの移動に障害が生じ、野生型マウスに比して小さな嗅球となっていた。また Arx は嗅細胞に発現していないにもかかわらず、Arx 欠損マウスの嗅細胞軸索投射に異常が見られ、嗅球から嗅細胞軸索投射を誘導する未知のシグナル分子の存在が示唆された。

(3) 発達期マウス嗅索における層構造の発見とその機能的意義の解明

嗅球から嗅皮質へと至る二次嗅覚神経回路の形成機構を

解析した。様々な細胞認識分子群の発現パターンの詳細な解析により、発達期の嗅索 (LOT: 嗅球の投射ニューロンの軸索束) 内に層構造 (laminar organization) が存在することを初めて見いだした。さらにこの層構造は、主嗅球と副嗅球からの異なった軸索投射および主嗅球の投射ニューロンの異なった発達段階を反映することを明らかにした。

2. ニューロン間相互作用を司る細胞認識・接着分子群 (松野, 川崎, 三津井, 藤田)

神経回路網は個々のニューロンがその標的細胞を正確に認識し、シナプス結合をつくることによって形成される。このような標的認識/シナプス形成過程はニューロン間の直接的な相互作用によって制御されている。本研究テーマでは神経回路形成における細胞間相互作用に関わるシナプス機能分子群 (細胞認識・接着分子, シグナル伝達分子など) に焦点をあて、その構造・発現・機能の解析を行っている。これまでに我々はテレンセファリン (TLCN), BIG-1, BIG-2, OCAM, PCAM という 5 種の新規細胞接着分子を発見してきた。これら 5 分子はすべて免疫グロブリンスーパーファミリーに属する。また、それらの発現は脳の領域特異的、細胞タイプ特異的および発達ステージ特異的に厳密に制御されており、特異的神経回路の形成・維持・可塑性に重要な役割を果たすと考えられている。本年度はこれらのうち特に発現・機能がユニークな TLCN に焦点を絞り、その樹状突起選択的局在メカニズムを解析した。

ニューロンは軸索 (axon) と樹状突起 (dendrite) という構造および機能の全く異なった 2 種類の神経突起を有する。一般にニューロンの軸索の一部がシナプス前終末部を形成し、樹状突起あるいは細胞体がシナプス後部を形成する。すなわち軸索と樹状突起は神経伝達の方向性を決定しており、その接点であるシナプスを介して複雑であるが秩序だった神経ネットワークが構築され、脳が機能する。我々は、(1) ニューロンの極性、シナプス機能分子のトラフィッ

キング機構研究のための in vivo システムの開発, (2) 終脳特異的細胞接着分子 TLCN の樹状突起選択的ソーティングシグナルの同定を目的として研究を行った。まずマウス L7 プロモーターを用いて小脳プルキンエ細胞に TLCN を異所性発現させたトランスジェニックマウスを作製したところ, 終脳ニューロンと同様に TLCN タンパク質の樹状突起選択的局在が観察され, in vivo ニューロン内トラフィック機構解析システムの確立に成功した。次に TLCN の細胞内領域 (約 60 アミノ酸) に着目し, 3 種類の欠失変異体, 2 種類の点変異体をプルキンエ細胞に発現するトランスジェニックマウスを作製した。その結果, 樹状突起選択的局在には TLCN の C 末端領域 12 アミノ酸 (特にその中の Phe 残基) が必須であることを見だし, これまでに知られている Tyr モチーフ, Di-Leu モチーフとは異なった新たな樹状突起ソーティングモチーフの存在を発見した。

* 研修生

Information transfer between neurons takes place at the synapse. Wiring patterns among various types of neurons via specific synaptic connections is the basis of functional logic employed by the brain for information coding and processing. Thus, detailed knowledge on neuronal networks is essential for understanding the wide range of brain functions. With special reference to the mouse and zebrafish olfactory system, we aim to elucidate the molecular and cellular mechanisms underlying the formation, maintenance, and plasticity of functional neural circuits.

1. Development and functional architecture of the olfactory system

The olfactory system is a good model for studying neurogenesis, cell migration, neural differentiation, axon guidance, dendritic morphogenesis, synaptogenesis, and functional neural circuit formation. We attempt to elucidate the molecular and cellular mechanisms underlying development and functional architecture of the olfactory neural circuits in mouse and zebrafish with multi-disciplinary strategies.

(1) Robo2 mediates the formation of an initial axon scaffold essential for establishment of a precise glomerular map in the zebrafish olfactory system

Olfactory sensory neurons (OSNs) expressing a given odorant receptor project their axons to specific glomeruli, creating a topographic odor map in the olfactory bulb (OB). The mechanisms underlying axonal pathfinding of OSNs to their precise targets are not fully understood. Here, we demonstrate that Robo2/Slit signaling functions to guide nascent olfactory axons to the OB primordium in zebrafish. *robo2* is transiently expressed in the olfactory placode during the initial phase of olfactory axon pathfinding. In the *robo2* mutant, *astray* (*ast*), early growing olfactory axons misroute ventromedially or posteriorly, and often penetrate into the diencephalon without reaching the OB primordium. Four zebrafish *slit* homologs are expressed in regions adjacent to the olfactory axon trajectory, consistent with their role as repulsive ligands for Robo2. Masking of endogenous Slit gradients by ubiquitous misexpression of Slit2 in transgenic fish causes posterior pathfinding errors that resemble the *ast* phenotype. We also found that spatial arrangement of glomeruli in OB is perturbed in *ast* adults, suggesting an essential role for

the initial olfactory axon scaffold in determining a topographic glomerular map. These data provide functional evidence for Robo2/Slit signaling in the establishment of olfactory neural circuitry in zebrafish.

(2) Arx homeobox gene is essential for development of the mouse olfactory system

We identified an *Arx* homeobox gene as a crucial molecule for development of the mouse olfactory system. The *Arx* protein is expressed strongly in the interneurons and weakly in the radial glia of OB, but neither in the OSNs nor OB projection neurons. *Arx*-deficient mice show severe anatomical abnormalities in the developing olfactory system: (a) size reduction of OB, (b) reduced proliferation and impaired migration of interneuron progenitors, (c) loss of tyrosine hydroxylase-positive periglomerular cells, (d) disorganization of layer structure of OB, and (e) abnormal axonal termination of OSNs in an unusual axon-tangled structure, the fibrocellular mass. Thus, *Arx* is required for not only the proper migration and differentiation of *Arx*-expressing interneurons, but also the establishment of functional olfactory neural circuitry by affecting *Arx*-non-expressing OSNs and projection neurons. These findings suggest a likely role of *Arx* in regulating the expression of putative instructive signals produced in the OB for the proper innervation of olfactory sensory axons.

(3) Laminar organization of the developing lateral olfactory tract revealed by differential expression of cell recognition molecules

The OB projection neurons (mitral and tufted cells) send axons through the lateral olfactory tract (LOT) onto several structures of the olfactory cortex. However, little is known on the molecular and cellular mechanisms underlying establishment of functional connectivity from the bulb to the cortex. We investigated the developmental process of LOT formation by observing expression patterns of cell recognition molecules in embryonic mice. We immunohistochemically identified a dozen molecules expressed in the developing LOT and some of them are localized to a subset of mitral cell axons. Combinatorial immunostaining for these molecules revealed that the developing LOT consists of three laminae: superficial, middle, and deep. Detailed immunohistochemical, in situ hybridization, and BrdU labeling analyses suggested that the laminar organization reflects: (a) the segregated pathways from the accessory and main OBs and (b) the different maturity of mitral cell axons. Mitral cell axons of the accessory OB were localized to the deep lamina, segregated from those of the main OB. In the main olfactory pathway, axons of mature mitral cells, whose somata is located in the apical sublayer of the mitral cell layer, were localized to the middle lamina within LOT, while those of immature mitral cells that located in the basal sublayer were complementarily localized to the superficial lamina. The results suggest that newly generated immature axons are added to the most superficial lamina of LOT successively, leading to the formation of piled laminae with different maturational stages of the mitral cell axons.

2. Cell recognition/adhesion molecules in neural development

The synapse is a specialized site of cell-cell interactions between neurons. We have been investigating structure, expression, and functions of cell recognition/adhesion molecules at the molecular, cellular, and system levels. Among the five cell recognition/adhesion molecules (telencephalin [TLCN], BIG-1, BIG-2, OCAM, PCAM), we particularly focus on TLCN, a unique member of the im-

munoglobulin superfamily, which is expressed only on dendrites of spiny neurons in the most rostral brain segment, telencephalon.

Neurons sort out a variety of functional molecules to appropriate subcellular destinations. TLCN (intercellular adhesion molecule-5 ; ICAM-5) is a cell adhesion molecule specifically localized to somatodendritic membranes in the telencephalic neurons. We established a new in vivo strategy to analyze neuronal sorting mechanisms by ectopic expression of molecules of interest in the cerebellar Purkinje cells of transgenic mice. By using this system, we identified a novel dendritic targeting determinant in the cytoplasmic tail region of TLCN. A full-length TLCN ectopically expressed in the Purkinje cells is localized exclusively to dendrites, but not to axons. In contrast, deletion of the cytoplasmic carboxyl-terminal 12 amino acids (residues 901-912) or a point mutation of Phe905 to Ala abrogate the dendrite-specific targeting with appearance of the truncated and point-mutated TLCN in both axons and dendrites. Furthermore, an addition of the carboxyl-terminal 17 amino acids (residues 896-912) of TLCN to an unrelated molecule (CD8) is sufficient for its specific targeting to dendrites in several types of neurons. Since the carboxyl-terminal region of TLCN does not contain any canonical dendritic targeting sequences such as the tyrosine-based motif or the dileucine motif, this study suggests a novel mechanism of protein trafficking to the dendritic compartment of neurons.

Staff

Laboratory Head

Dr. Yoshihiro YOSHIHARA

Research Scientists

Dr. Koichiro INAKI

Dr. Nobuhiko MIYASAKA

Dr. Seiichi YOSHIHARA

Research Associates

Ms. Hitomi MATSUNO

Technical Staff I

Ms. Hiroko FUJITA

Ms. Miwa KAWASAKI

Ms. Sachiko MITSUI

Ms. Yuki SATO

Assistants

Ms. Izumi YOSHIDA

Visiting Scientists

Dr. Ichiro MATSUMOTO (Univ. Tokyo)

Dr. Kensaku MORI (Univ. Tokyo)

Dr. Hiroshi NAGAO (Univ. Tokyo)

Dr. Kazushige TOUHARA (Univ. Tokyo)

Dr. Masahiro YAMAGUCHI (Univ. Tokyo)

Trainees

Ms. Miwako HIRAMATSU (Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)

Ms. Sayako KATADA (Grad. Sch. Front. Sci., Univ. Tokyo)

Mr. Makoto OHMOTO (Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)

Ms. Yoshiko TOKUDA (Fac. Eng., Nagaoka Univ. Technol.)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文

Inoue M., Nishimura S., Hori G., Nakahara H., Saito M., Yoshihara Y., and Amari S.: "Improved parameter estimation for variance-stabilizing transformation of gene-expression microarray data", *J. Bioinf. Comput. Biol.* **2**, 669-679 (2004). *

Inaki K., Nishimura S., Nakashiba T., Itohara S., and Yoshihara Y.: "Laminar organization of the developing lateral olfactory tract revealed by differential expression of cell recognition molecules", *J. Comp. Neurol.* **479**, 243-256 (2004). *

Hasegawa S., Yamaguchi M., Nagao H., Yoshihara Y., and Mori K.: "Activated natural killer cells adhere to cultured hippocampal neurons and affect the dendritic morphology", *J. Neuroimmunol.* **151**, 126-136 (2004). *

Nagayama S., Takahashi Y. K., Yoshihara Y., and Mori K.: "Mitral and tufted cells differ in the decoding manner of odor maps in the rat olfactory bulb", *J. Neurophysiol.* **91**, 2532-2540 (2004). *

Yoshihara S., Omichi K., Yanazawa M., Kitamura K., and Yoshihara Y.: "*Arx* homeobox gene is essential for development of mouse olfactory system", *Development* **132**, 751-762 (2005). *

Miyasaka N., Sato Y., Yeo S., Hutson L. D., Chien C., Okamoto H., and Yoshihara Y.: "Robo2 is required for establishment of a precise glomerular map in the zebrafish olfactory system", *Development* **132**, 1283-1293 (2005). *

Mitsui S., Saito M., Hayashi K., Mori K., and Yoshihara Y.: "A novel phenylalanine-based targeting signal directs telencephalin to neuronal dendrites", *J. Neurosci.* **25**, 1122-1131 (2005). *

(総 説)

Miyasaka N., Sato Y., and Yoshihara Y.: "Axon guidance of olfactory sensory neurons in zebrafish", *Chem. Senses* **30**, i92-i93 (2005).

吉原良浩: "細胞認識・接着分子群による神経回路形成の制御: 嗅覚神経系をモデルシステムとして", *神経研究の進歩* **49**, 105-114 (2005).

[単行本・Proc.]

(その他)

吉原良浩: “嗅覚系”, 香りの百科事典, 谷田貝光克, ほか (編), 丸善, 東京, pp. 228–235 (2005).
 宮坂信彦: “生物の嗅覚系 1. 魚”, 香りの百科事典, 谷田貝光克, ほか (編), 丸善, 東京, pp. 473–476 (2005).
 谷田貝光克, 川崎光昭, 吉原良浩, ほか (編), 香りの百科事典 (全一冊), 丸善, 東京, (2005).

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Hasegawa S., Yamaguchi M., Nagao H., Yoshihara Y., and Mori K.: “Changes in dendritic morphology of cultured hippocampal neurons induced by activated natural killer cells”, 6th IBRO World Congr. of Neuroscience, Prague, Czech, July (2003).

Nagayama S., Takahashi Y. K., Yoshihara Y., and Mori K.: “Mitral cells and tufted cells are distinct in their odorant-response properties”, 33rd Ann. Meet. of Soc. for Neuroscience (Neuroscience 2003), New Orleans, USA, Nov. (2003).

Miyasaka N., Sato Y., and Yoshihara Y.: “Axon guidance of olfactory sensory neurons in zebrafish”, ISOT/JASTS 2004, Kyoto, July (2004).

Inaki K., Nishimura S., Nakashiba T., Itoharu S., and Yoshihara Y.: “Laminar organization of the developing lateral olfactory tract revealed by differential expression of cell recognition molecules”, ISOT/JASTS 2004, Kyoto, July (2004).

Yoshihara S., Omichi K., Yanazawa M., Kitamura K., and Yoshihara Y.: “*Arx* homeobox gene is essential for development of mouse olfactory system”, ISOT/JASTS 2004, Kyoto, July (2004).

Ichinohe N., Ogawa M., Ohshima T., Terashima T., Knight A. E., Yoshihara Y., Mikoshiba K., and Rockland K. S.: “Patch-matrix organization in the retrosplenial cortex of the reeler mouse and Shaking Rat Kawasaki”, 16th Int. Congr. of the IFAA: Anatomical Science 2004 from Gene to Body, Kyoto, Aug. (2004).

Miyasaka N., Sato Y., Yeo S., Chien C., Okamoto H., and Yoshihara Y.: “Robo2 regulates axonal targeting of olfactory sensory neurons in zebrafish”, 34th Ann. Meet. of Soc. for Neuroscience (Neuroscience 2004), San Diego, USA, Oct. (2004).

Sato Y., Miyasaka N., and Yoshihara Y.: “Two distinct

neural pathways in the zebrafish olfactory system visualized by transgenesis with cell type-specific promoters”, 34th Ann. Meet. of Soc. for Neuroscience (Neuroscience 2004), San Diego, USA, Oct. (2004).

Yoshihara S., Omichi K., Yanazawa M., Kitamura K., and Yoshihara Y.: “*Arx* homeobox gene is essential for development of mouse olfactory system”, 34th Ann. Meet. of Soc. for Neuroscience (Neuroscience 2004), San Diego, USA, Oct. (2004).

(国内会議)

佐藤友紀, 宮坂信彦, 吉原良浩: “ゼブラフィッシュにおける二つの異なる嗅覚神経回路の可視化”, 第27回日本神経科学大会・第47回日本神経化学学会大会合同大会 (Neuro2004), 大阪, 9月 (2004).

三津井五智子, 齊藤美知子, 林研, 吉原良浩: “細胞接着分子テレンセファリンの樹状突起選択的局在機構の解明”, 第27回日本神経科学大会・第47回日本神経化学学会大会合同大会 (Neuro2004), 大阪, 9月 (2004).

川上功, 堀江建生, 吉原良浩, 日下部岳広, 津田基之: “小麦胚芽凝集素 (WGA) トランスジェーンを用いたホヤ幼生の視覚神経経路可視化 (2)”, 第27回日本神経科学大会・第47回日本神経化学学会大会合同大会 (Neuro2004), 大阪, 9月 (2004).

吉原誠一, 大道佳世, 柳澤昌子, 北村邦夫, 吉原良浩: “嗅覚神経系発達過程におけるホメオボックス型転写因子 *Arx* の機能解析”, 第27回日本神経科学大会・第47回日本神経化学学会大会合同大会 (Neuro2004), 大阪, 9月 (2004).

宮坂信彦, 佐藤友紀, Yeo S., Chien C., 岡本仁, 吉原良浩: “Robo2 mediates the formation of an initial axon scaffold essential for establishment of precise glomerular map in the zebrafish olfactory system”, 第10回小型魚類研究会, 神戸, 11月 (2004).

佐藤友紀, 宮坂信彦, 吉原良浩: “Two distinct neural pathways in the zebrafish olfactory system visualized by transgenesis with cell type-specific promoters”, 第10回小型魚類研究会, 神戸, 11月 (2004).

吉原良浩, 佐藤友紀, 宮坂信彦: “トランスジェニックゼブラフィッシュを用いた嗅覚神経系軸索投射様式の解析”, 第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月 (2004).

岡本仁, 政井一郎, 吉原良浩, 川上浩一, 高田慎治, 菊池裕, 舟橋淳一, 川原敦雄: “ナショナルバイオリソースプロジェクト「ゼブラフィッシュ」”, 第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月 (2004).