

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370087

研究課題名(和文) 嗅神経細胞の神経個性獲得の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of neuronal identity acquisition in olfactory sensory neurons

研究代表者

竹内 春樹 (Takeuchi, Haruki)

福井大学・医学部・客員准教授

研究者番号：70548859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの嗅覚系では、同一の嗅覚受容体(OR)を発現する嗅覚神経細胞は発生の過程で自身の軸索を収斂させ嗅球の特定の糸球体へと投射する。先行研究から、発現するORは複数の軸索ガイダンス、細胞選別分子の転写レベルを調節することによって軸索投射を制御することが明らかとなっている。しかしながら、どのようなシグナルによってORが活性化されるのかというシグナルソースについては明らかとされていなかった。本研究では、ORに由来するリガンドに依存しない基礎活性が軸索投射に重要な役割を果たすことを見出した。この発見は、元来ノイズと考えられていた基礎活性に生理学的な役割があることを示した初めての知見である。

研究成果の概要(英文)：In the mouse olfactory system, olfactory sensory neurons (OSNs) expressing the same olfactory receptor (OR) converge their axons to a specific set of glomeruli in the olfactory bulb. It has been demonstrated that ORs control transcriptional levels of axon guidance and sorting molecules to regulate axonal projection of OSNs. However, it remains unknown what is the signaling source for activating ORs. In the present study, we found that ligand-independent basal activities induced by expressed ORs play important roles in the targeting of OSN axons. This finding provides compelling evidence that the basal activity, which had been considered to be noise, is physiologically-important.

研究分野：神経科学

キーワード：神経科学 神経回路 嗅覚 発生 軸索ガイダンス 感覚情報 脳科学

1. 研究開始当初の背景

高等動物の脳は、多数の神経細胞から構成される神経回路によって入力情報の価値付けを行い、適切な出力行動の判断を行う。五感を介して入力される感覚情報は、まず脳内において“神経地図”と呼ばれる二次元の位置情報へと変換され、高次中枢へとその情報が伝達される。感覚情報処理の中核を担う“神経地図”の形成メカニズムは、神経科学における重要な課題と考えられており、中でもマウス嗅覚系は解剖学的な明瞭さから近年盛んに研究が進められている。

外界に存在する匂い分子は、鼻腔奥の嗅上皮に存在する嗅覚受容体 (olfactory receptor: OR) によって受容される。マウスの嗅覚系では、嗅上皮には約一千万個の嗅神経細胞 (嗅神経) が存在するが、それぞれはゲノム中に存在する約 1000 種類の OR の中からたった一種類を選択的に発現する。また同種の OR を発現した嗅神経の軸索は、発生の過程で大脳前方に位置する嗅球の特定の箇所へと投射し、糸球体構造を形成する。従って、嗅球上には OR の種類に対応した約 1000 個の糸球体からなる神経地図が形成され、香水のような数多くの匂い分子を含む複雑な匂い情報は、糸球体の発火パターンという二次元の画像情報へと変換される (図 1)

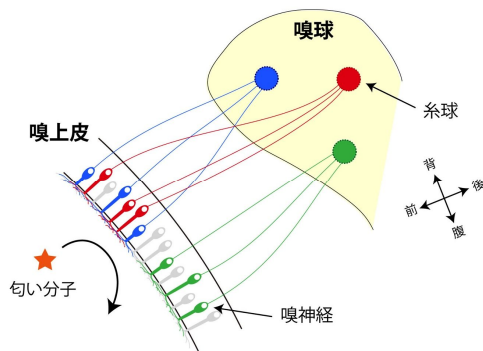


図 1. 個々の嗅神経は単一の OR を発現し、同一の OR を発現した嗅神経軸索は嗅球上の特定の糸球体へと投射する。

この嗅覚神経地図は、まず嗅神経軸索を嗅球の大まかな位置へと投射 (位置決め過程) させ、その後同種の OR を発現する軸索同士をまとめ上げること (軸索収束過程) によって形成される。さらに位置決め過程は、嗅球の背腹軸、前後軸方向に分けられ、異なる二つのメカニズムによって保証されている。背腹軸方向の軸索投射は、嗅上皮における嗅神経の位置と嗅球における軸索の投射位置との間に空間的な対応関係があることがわかっている。これは、それぞれの OR と軸索誘導を制御する軸索ガイダンス分子の発現が“嗅上皮の位置”という共通のパラメーターによって制御されることによ

て保障されている。

一方前後軸方向の投射及び軸索収束に関しては、発現する OR 分子が重要な役割を果たすことがわかっている。先行研究により、発現する OR 分子は様々な軸索選別分子の発現量を調節することで、軸索投射を制御していることが明らかとなっている。OR 分子によって制御される軸索選別分子は、投射に関わる機能と発現様式に基づいて大きく二つに分類される。一つは、軸索の前後軸方向の投射位置規定に関わるもの (以下 targeting 分子) で、嗅球上において濃度勾配を持った発現パターンを示す (ex:Neuropilin-1、Plexin-A1)。もう一方は、軸索収束に関わる分子 (segregation 分子) で、嗅球上においてモザイク状に分布する (ex:Kirrel2、Kirrel3)。OR 遺伝子を入れ替えた遺伝子改変マウスを用いた実験によって、両者の発現は共に OR 分子によって制御されるものの、二つの分子群の間で発現様式における有意な相関関係は認められない。OR は、七回膜貫通型の GPCR で、G タンパク質と結合し、アデニル酸シクラーゼ 3 (AC3) を活性化する。AC3KO マウスにおいて、両者の発現に大幅な影響が現れることから、共に OR-AC3 pathway を介して産生される cAMP が重要な役割を果たすことが判明しているが、これら軸索選別分子の多様な発現様式が OR 指令的にどのように作り出されているのかについてはほとんど明らかとされていない。

2. 研究の目的

マウス嗅覚系では、個々の嗅神経で発現する単一の嗅覚受容体 (OR) が軸索選別分子の発現量を調節することで前後軸方向の軸索投射及び軸索収束を制御する。本研究では、OR 分子に由来にするどのようなシグナルによって軸索選別分子群の多様な発現が制御されるのかを明らかにする。具体的には、OR 分子を基準にその上流として (1) OR を活性化する input の実態を、OR の下流として (2) 活動電位を伴う神経活動の寄与の二点に着目して研究を遂行する。

3. 研究の方法

(1) OR を活性化する input の実態

OR を活性化する input としては、外界のリガンドなどに起因する外因性の活性と OR 自身を持つ内因性の活性である basal activity の二つが挙げられる。軸索投射におけるリガンドの寄与については否定的な実験結果が得られているため、本研究では OR の持つリガンド非依存的な活性である basal activity に焦点を絞って解析を行う。

OR を含む G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) はリガンド非存在下においても非活性型と活性型との平衡状態にあり、下流にシグナルを伝達する基礎活性 (basal activity) を有す

ることが知られている。これまで OR における basal activity の研究は、培養細胞における OR 分子の膜移行の効率の悪さからほとんど研究が行われてこなかった。ところが近年、アミノ配列上最も近縁にあたる GPCR である b2 アドレナリン受容体が嗅神経において OR 様の振舞いをする事が明らかとなった。b2 アドレナリン受容体は、古くから盛んに解析が進められている遺伝子の一つで、リガンド結合ドメインや、basal activity の産生に関わるアミノ酸残基などの膨大な知見が蓄積されている。これらを利用して、2 アドレナリン受容体に変異を加え、basal activity の度合いのみを変化させた変異型 2 アドレナリン受容体を作製する。その後、それらの遺伝子を嗅細胞に発現させ、軸索の投射位置や軸索選別分子の発現にどのような影響が現れるのかを検証する。

(2) 活動電位を伴う神経活動の寄与

活動電位を伴う神経活動は、多くの神経細胞において神経回路形成や細胞の運命決定などに関わることが知られている。嗅細胞では、OR が G タンパク質を介して AC3 を活性化した後、CNG (cyclic nucleotide gated) チャネルの開口を促すことで活動電位が誘発される。内向き整流型カリウムチャネルである *Kir2.1* を嗅神経に強制発現させ神経活動を阻害すると軸索投射に異常が観察されることから、嗅覚系においても神経活動が何らかの形で回路形成に重要な役割を果たすことが明らかとされている。また、CNG チャネル KO マウスにより segregation 分子の発現に影響が観察されることから、OR-神経活動-segregation 分子の発現という pathway が重要であると考えられる。また segregation 分子は発現する OR の種類毎に固有な発現量を示すことから、神経活動は単に必要というだけでなくその中に含まれる情報 (発火頻度やパターンなど) が重要な役割を果たすものと想定される。そこで、OR の種類に着目して特定の OR を発現する嗅神経における神経活動を電気生理学的手法によって記録する。

4. 研究成果

(1) 変異型 b2 アドレナリン受容体を発現する嗅細胞の解析

過去の文献及び立体構造をもとに、10 数種類の変異型 b2 アドレナリン受容体を作製した。それらを HEK293 細胞に発現させ、CRE プロモーターに Luciferase をつないだレポーターコンストラクトを用いて産生される cAMP の量をリガンド依存的、非依存的の二つに分けて定量した。それらの中から、リガンド非依存的な活性である basal activity にのみ影響を与える C327R (lower basal activity) と E268A (higher

basal activity) の二つを同定した。

b2 アドレナリン受容体は、OR に最も近縁な GPCR であり嗅細胞に発現させると、OR と同様の振舞いをする事が知られている。従って、OR プロモーターの下流に OR の替わりとしてこれらの変異型 b2 アドレナリン受容体をつないだコンストラクトを用いてトランスジェニックマウスを作製し、嗅神経軸索の投射位置を解析した。すると、basal activity が低い C327R 受容体を発現した嗅細胞の軸索はコントロールに比べて投射先である嗅球のより前方に軸索を伸長させ、basal activity のより高い E268A 受容体を発現した嗅細胞の軸索は嗅球のより後方へと投射することが分かった (図 2)。それに伴って、嗅細胞の前後軸方向の軸索投射を制御すると考えられている target 分子 (Neuropilin-1、Plexin-A1) の発現が投射位置に相関して

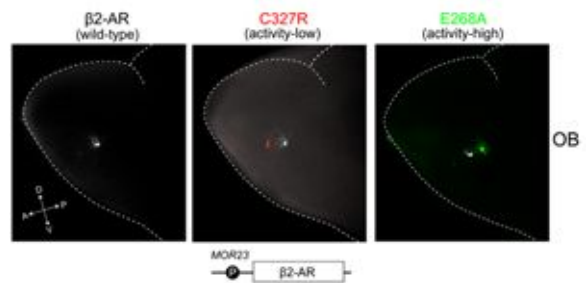


図 2. basal activity を変化させた b2 アドレナリン受容体を嗅細胞に発現させた。その結果、basal activity の強度に依存して投射位置が前後にシフトした。

変化した。ところが、軸索収斂に関わる segregation 分子の発現には変化は観察されなかった。このことから、OR に由来する basal activity は targeting 分子の発現レベルのみを調節し、basal activity の強いものは嗅球の後方へ、弱いものは嗅球の前方へと軸索を誘導しているものと考えられた。

(2) 活動電位を伴う神経活動の寄与

Kir2.1 強制発現マウス (神経活動阻害マウス) を入手し、特定の OR を発現する嗅神経軸索の投射様式を調べたところ、軸索は大まかな位置には到達できているものの最終的な収斂に重篤な異常があることがわかった。またそのマウスにおける軸索選別分子の発現変化を調べたところ、target 分子の発現に変化は見られず segregation 分子の発現のみが選択的に影響を受けるということも判明した。このことから、発生過程に生じる神経活動は嗅神経の大まかな位置決めには関与せず軸索収斂のみに関わるものと考えさ

れる。

次に神経活動のどのようなパラメーターが重要であるかを明らかにするために、特定の OR を発現する嗅神経を蛍光タンパク質である GFP で標識した 3 種類のマウス(MOR28, MOR P2, MOR M72)から嗅覚組織の急性スライスを作製して、パッチクランプ手法によって神経活動を記録した。その結果、発現する OR の種類とスパイク間隔 (interspike interval) との間に相関関係が存在することが分かった(図 3)。実験に使用した 3 種類の OR のうち、MOR28 発現細胞は segregation 分子である Kirrel2 が殆んど発現しておらず、残りの 2 種類の MOR P2 と MOR M72 においては中程度の発現が見られることがわかっている。この知見と図 3 の結果を踏まえると、kirrel2 の発現にはスパイク間隔が短い発火、つまりバースト様の神経発火が必要であると考察できる。いずれにしても、OR の種類とスパイクパターンとの間に相関関係が見受けられたことから、発生過程に生じる OR に固有な神経活動のパターンが、嗅神経によって読み取られ、OR の種類に相関した軸索選別分子群の発現量へと変換されるものと推測される。

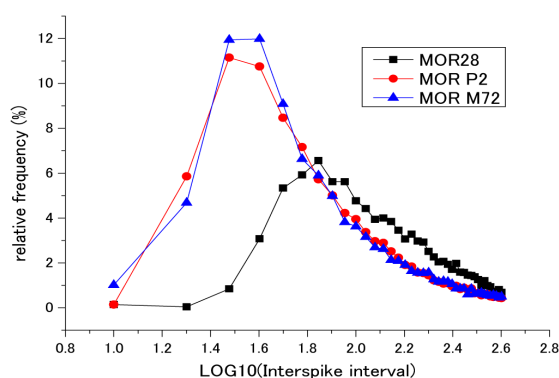


図 3. 特定の OR を発現する嗅神経における interspike interval (ISI) の分布

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

竹内春樹、生体の科学、Vol165, 2014, pp.516-517、査読無

Takeuchi H and Sakano H, *CMLS review*, Vol171, 2014, pp.3049-57、査読有
doi: 10.1007/s00018-014-1597-0.

Shirasu M, Yoshikawa K, Takai Y, Nakashima A, Takeuchi H, Sakano H, Touhara K, *Neuron*, Vol.81, 2014, pp.165-78、査読有
doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.021.

Nakashima A, Takeuchi H, Imai T, Saito H, Kiyonari H, Abe T, Chen M, Weinstein LS, Yu CR, Storm DR, Nishizumi H and Sakano H *Cell*, Vol.154 1314-1325, 2013、査読有
doi: 10.1016/j.cell.2013.08.033.
equally contributed

Aoki M, Takeuchi H, Nakashima A, Nishizumi H and Sakano H, *Dev. Neurobiol.*, Vol73, 2013, pp.828-40、査読有
doi: 10.1002/dneu.22103.
equally contributed

〔学会発表〕(計 10 件)

Takeuchi H, 生命動態の分子メカニズムと数理, 京都大学(京都市), 2015/03/15-16

Takeuchi H, Nakashima A and Sakano H, CREST symposium, OIST (沖縄県恩納村), 2014/10/28-29

Aoki M, Takeuchi H, Nakashima A, Nishizumi H and Sakano H
The 11th international Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception, 九州大学(福岡市), 2013/10/31-11/2

Inokuchi K, Takeuchi H and Sakano H
Sensory Systems & Neural Circuits sponsored by IIAS, 東京大学(文京区), 2013/2/11,12

Nakashima A, Takeuchi H and Sakano H
Sensory Systems & Neural Circuits sponsored by IIAS, 東京大学(文京区), 2013/2/11,12

Aoki M, Takeuchi H, Nakashima A, Nishizumi H and Sakano H
Sensory Systems & Neural Circuits sponsored by IIAS, 東京大学(文京区), 2013/2/11,12

Inokuchi K, Takeuchi H and Sakano H
XVI international Symposium on Olfaction and Taste ISOT, Stockholm (Sweden), 2012/6/23-27

Nakashima A, Takeuchi H and Sakano H, *Frontiers in Neuroscience*, IIAS (京都府木津川市) 2011/12/6-9

Inokuchi K, Takeuchi H and Sakano H, *Frontiers in Neuroscience*, IIAS (京都府木津川市) 2011/12/6-9

Nakashima A, Takeuchi H and Sakano H,
*The 10th international Symposium on
Molecular and Neural Mechanisms of Taste
and Olfactory Perception*, 九州大学 (福
岡市), 2011/11/4-6

6 . 研究組織

(1)研究代表者

竹内 春樹 (TAKEUCHI, Haruki)
福井大学・医学部・客員准教授
研究者番号 : 70548859

(2)研究協力者

中嶋 藍 (NAKASHIMA, Ai)
福井大学・医学部・学術研究員
研究者番号 : 60706331