

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20509002

研究課題名 (和文) 嗅覚系軸索投射における嗅覚受容体シグナルの役割

研究課題名 (英文) Roles of odorant receptor signaling in axonal projection of olfactory sensory neurons

研究代表者

今井 猛 (IMAI TAKESHI)

東京大学・大学院理学系研究科・客員共同研究員

研究者番号：70509851

研究成果の概要 (和文)：

マウス嗅神経細胞において、cAMP シグナルは軸索投射位置の global な位置決めと、local な軸索の選り分けという異なるステップを制御している。本研究では、global な位置決めには幼弱な嗅神経細胞で発現する Gs が 3 量体 G タンパク質として使われており、一方、より成熟した嗅神経細胞においては Golf が使われているということが判明した。また、本研究では、軸索投射位置の global な位置決めのロジックに関して、軸索間相互作用が重要な役割を果たしているということを見いだした。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, we found that odorant receptors control axonal projection of olfactory sensory neurons via Gs and Golf, each controlling distinct phase of axon guidance. We also analyzed the pre-target axon sorting for olfactory map formation in mice, and found that pre-target axon sorting plays an important role in establishing the topographic order based on the relative levels of guidance molecules expressed by axons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	0	2,200,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	390,000	3,890,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：シグナル伝達、発生・再生、神経科学、脳・神経

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の中樞神経系は、1,000 億個もの神経細胞が秩序だった回路形成を行うことによって機能している。しかしながら、これほど多様な神経細胞の個性がどのように分子コード化されて特異的なシナプス形成が行われるのかに関してはほとんど解明されていない。私はこの問題を解くため、マウス嗅覚系に着目してこれまで研究を行ってきた。

マウスにおいて匂い分子は、約 1,000 種類の嗅覚受容体 (OR: odorant receptor) を用いて検出されている。嗅上皮に存在する約 1,000 万個の嗅神経細胞は、それぞれが 1,000 種類の OR の中からたった 1 種類のみを発現して匂い分子の検出にあたっている。また個々の嗅神経細胞は、大脳前方の嗅球に存在する 1,000 対の糸球構造の特定の 1 対に軸索を投射するが、その投射位置は発現する OR

の種類によって決まっている。従って、1,000種類のORによって検出された匂いの情報は、嗅球においては1,000個の糸球のどれが発火するかという位置情報に変換される。これまでの研究により、嗅球における糸球の2次元配置のうち、背腹軸については嗅神経細胞の嗅上皮における位置が重要なパラメーターになっていると言われている。一方、前後軸についてはOR分子の種類が何らかの形で投射位置を規定すると考えられてきた。そこで私は、ORタンパク質がどのような分子機構によって軸索投射位置の決定に関わるのかについて、遺伝学的解析を行った。

申請者はまず、ORから入力されるシグナルの関与について検討した。トランスジェニックマウスを用いて、3量体Gタンパク質との共役が損なわれたORによる軸索投射の様子を観察したところ、軸索は正常に嗅球に投射できず、シナプス形成に至らないことが判明した。一方、このような表現型は恒常活性化型のGs、PKA、CREB変異体によりレスキューされた。このことから、ORからGs、PKA、CREBを介して入力されるcAMPシグナルが嗅神経細胞の軸索投射に必要であることが判明した。次に、ORの種類は変えずにcAMPのシグナル強度を変える実験を行ったところ、軸索の投射位置が嗅球の前後軸に沿ってシフトすることが見出された。従って、嗅球の前後軸に沿った軸索の投射位置は、それぞれのORから入力されるcAMPシグナルの強度によって規定されていることが示された。さらに私は、嗅神経細胞においてcAMPのシグナル強度に相関して発現する遺伝子のスクリーニングを行い、その結果、種々の軸索ガイダンス分子がORとcAMPシグナルに依存した軸索投射に関与していることが明らかにされた。cAMPシグナルの強度が脳のマップに変換されるという私の発見は2006年にScience誌に公表され、嗅覚系のみならず神経科学の広い分野の研究者から非常に高い評価を得ることとなった。

## 2. 研究の目的

cAMPのシグナル強度という非常にシンプルでubiquitousなパラメーターで一旦複雑な軸索投射の特異性が決まるという現象は、嗅覚系のみならず中枢神経系の複雑な回路形成のロジックを明らかにしていく上でも非常に重要なヒントを与えるものと考えられる。そこで本研究では、第一にcAMPシグナルに依存して神経回路形成を担う分子ネットワークの同定を試みる。これまでの私の研究から、cAMPシグナルは主として遺伝子発現を介して軸索投射の制御を行っていると考えられるので、cAMPシグナルの下流にある遺伝子群を単一細胞マイクロアレイ法によって探索する。

興味深いことに、cAMPシグナルは軸索投射において異なる二つのphaseを制御していることが判明している。ひとつはglobalな軸索投射の位置決めであり、もうひとつはlocalな軸索の選別である(図1)。この二つの組み合わせによって一旦複雑な嗅覚マップが形成されている。これらはcAMPという同じセカンドメッセンジャーの制御を受けていながら異なるロジックでマップ形成に寄与している。そこで、第二に、これら二つのcAMP経路がどのように使い分けられているのか、cAMP依存的遺伝子がそれぞれどちらの経路で機能しているのかを調べていく。

第三に、cAMPシグナル依存的に発現制御されている軸索ガイダンス分子がどのように嗅覚マップ形成を制御しているのか解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) cAMPシグナルに依存して発現する遺伝子群の同定

私は、マウスの嗅覚系において、ORからGsを介して入力されるcAMPシグナルの強さが軸索投射位置の特異性を決めている重要なパラメーターであることを見出した(Imai et al., Science, 2006)。また、cAMPシグナルは、投射位置決定のみならず、シナプス形成や可塑性、神経細胞の代謝・寿命制御にも関与していることを示唆する予備的なデータも得ている。これらには主としてCREBを介した転写制御に関与しているというデータを得ている。そこで、これらのcAMP依存的プロセスにいかなる遺伝子群が関与しているのかを調べる目的で、嗅神経細胞を用いたマイクロアレイ解析を行う。

実験材料としては、特定の嗅神経細胞でcAMPシグナルのレベルを人為的に改変したトランスジェニックマウスを用いる(Imai et al., Science, 2006)。これらのマウスではトランスジーンを発現する嗅神経細胞がC/YFP蛍光標識されているので、それらをマイクロマニピュレーターを用いて回収し、単一細胞由来のcDNAライブラリーを作製する。このcDNAを用い、マイクロアレイ解析を行う。単一細胞マイクロアレイのメリットは、均質な細胞集団を使用できるという点である。これまでの予備的な実験では、単一細胞1個では信頼性が低いものの、単一細胞由来のcDNAを10細胞分程度集めてアレイハイブリダイゼーションに用いることにより、通常の発現レベルの軸索ガイダンス分子等は十分に検出できることを確認している。また、データの再現性・信頼性を得るため、アレイハイブリダイゼーションのデータは6ないし8回程度の反復実験(60-80細胞分)が必要になる。

(2) global targeting と local segregation における cAMP シグナルの使い分け

先述のように cAMP シグナルは投射位置の global な位置決めと、local な軸索の選り分けという異なる phase を制御している。同じ cAMP というセカンドメッセンジャーがこれら二つをどのように区別して制御しているのか調べたところ、global な位置決めには幼弱な嗅神経細胞で発現する Gs が 3 量体 G タンパク質として使われており、より成熟した嗅神経細胞においては Golf が使われているということを見出した。

そこで、Gs および Golf のノックアウトマウスを用いることで 1) において同定された遺伝子に関して、どちらの制御を受けているのか明らかにする。すなわち、Gs のノックアウトの影響をより受けているものは global な位置決めに関わっており、Golf のノックアウトの影響をより大きく受けるものは local な軸索の選別に参与しているものと推定できる。

Gs の嗅覚系特異的ノックアウトマウス、Golf のノックアウトマウスについてはすでに作製済みであり、すぐに解析が可能である。

(3) 嗅覚マップ形成ロジックの解明: 軸索-ターゲット vs. 軸索-軸索相互作用

こうして同定された軸索ガイダンス分子群について、どのように軸索投射に関与しているのかを解明する。そのため、ノックアウトマウス、トランスジェニックマウスをもちいた機能解析およびガイダンス分子の生化学的解析を行う。

一般的に、神経系におけるトポグラフィックマップは、軸索投射先に濃度勾配を持ったキューが存在しており、軸索-ターゲット間相互作用によって形成されると信じられている。たとえば、視覚系のマップは、ターゲットに発現する ephrin の濃度勾配を軸索側で発現する Eph レセプターが検出することで投射位置が決定すると考えられている。トポグラフィックマップの形成に軸索-軸索間相互作用が寄与する可能性についてはこれまでほとんど無視されてきたが、申請者は予備的な実験により、嗅覚系のトポグラフィックマップ形成に軸索間相互作用が寄与していることを見出している。この軸索間相互作用に関与する分子の同定・解析によって、神経マップ形成の新しいロジックを提示できると考えている。

#### 4. 研究成果

(1) 申請者が開発した高感度で簡便な単一細胞マイクロアレイ法を用い、嗅神経細胞において cAMP 依存的な発現を示す遺伝子群の網羅的スクリーニングを行った。そのなかから、片鼻閉塞によって影響を受ける遺伝子群

と受けない遺伝子群をそれぞれ同定することが出来た。これらのうち、Neuropilin-1 と Semaphorin-3A に関しては、cAMP 依存的に global に軸索投射位置を決定する遺伝子であることを明らかにした。

(2) マウス嗅神経細胞において、cAMP シグナルは軸索投射位置の global な位置決めと、local な軸索の選り分けという異なるステップを制御している。それぞれのステップでは、cAMP シグナルは異なる種類の軸索ガイダンス分子の遺伝子発現を異なる様式で制御している。同じ cAMP というセカンドメッセンジャーがこれら二つのステップをどのように区別して制御しているのかを遺伝学的に調べたところ、global な位置決めには幼弱な嗅神経細胞で発現する Gs が 3 量体 G タンパク質として使われており、一方、より成熟した嗅神経細胞においては Golf が使われているということが判明した。

培養細胞の系で様々な Gs と Golf の活性の特性について調べたところ、Gs は basal activity が高く、Golf は低いことが明らかとなった。更に、様々な嗅覚受容体における basal activity を測定したところ、嗅覚受容体の種類毎に固有の basal activity を有している事が明らかとなった。これらの結果は、幼弱嗅神経細胞において、嗅覚受容体がリガンド非依存的な basal activity によって Gs を活性化し、種々の軸索ガイダンス分子の発現制御を行っている可能性を示唆している。培養細胞の系でリガンド非存在下での basal activity を測定すると嗅覚受容体ごとに異なるレベルの活性が見られることから、これが Gs 依存性のシグナルの実体である可能性である。一方、Golf 依存性のシグナルについては、現在嗅神経細胞の in vivo でのカルシウムイメージングを行う為の GCaMP3 マウスが現在樹立できつつあり、近く解析できると期待している。

(3) 本研究では、軸索投射位置の global な位置決めロジックに関して、Neuropilin-1 とそのリガンド Semaphorin-3A が重要な役割を果たしているということを見いだした。これまで一般的に軸索投射位置決定は軸索と投射先との相互作用によって生じるとされてきたが、本研究では、軸索由来の Semaphorin-3A が Neuropilin-1 発現細胞の軸索投射に必要なところを見いだした。この結果は、これまでの考えに反し、軸索間相互作用が投射位置決定において重要な役割を果たしているということの意味している。これはこれまでの神経地図形成に関する我々の概念を一新するものである。この結果は *Science* 誌に Research Article として発表された。

## 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7件)

- ① Imai T and Sakano H. Axon-axon interactions in the neuronal circuit assembly -- lessons from olfactory map formation. *Eur J Neurosci*. 査読有、in press 掲載確定
- ② Tsuboi A\*, Imai T\*, Kato HK, Matsumoto H, Igarashi KM, Suzuki M, Mori K, Sakano H. (\*equally contributed) Two highly homologous mouse odorant receptors encoded by tandemly-linked MOR29A and MOR29B genes respond differently to phenyl ethers. *Eur J Neurosci*. 査読有、2011 Jan;33(2):205-13.
- ③ Imai T, Sakano H, Vosshall LB. Topographic mapping--the olfactory system. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 査読有、2010 Aug 1;2(8):a001776. Review
- ④ Imai T, Yamazaki T, Kobayakawa R, Kobayakawa K, Abe T, Suzuki M, Sakano H. Pre-target axon sorting establishes the neural map topography. *Science*. 査読有、2009 Jul 31;325(5940):585-90.
- ⑤ Imai T, Sakano H. Odorant Receptor Gene Choice and Axonal Projection in the Mouse Olfactory System. *Results Probl Cell Differ*. 査読有、2009;47:57-75. Review
- ⑥ Imai T, Sakano H. Odorant receptor-mediated signaling in the mouse. *Curr Opin Neurobiol*. 査読有、2008 18: 251-260. Review.
- ⑦ Imai T, Sakano H. Interhemispheric olfactory circuit and the memory beyond. *Neuron*. 査読無、2008 May 22;58(4):465-7. Preview.

[学会発表] (計5件)

- ① 第33回日本神経科学大会/第53回日本神経化学会大会/第20回日本神経回路学会大会合同大会 Neuro2010 A distinct cAMP signaling pathway mediates the odorant receptor-instructed coarse targeting of axons. 嗅覚受容体依存的な軸索投射を制御する cAMP シグナル. 今井猛、鈴木悟、坂野仁. 口頭発表、2010年9月2日、神戸、兵庫県
- ② Janelia Farm Conference Constructing Neural Circuits. Pre-target axon

sorting for the topographic map formation in the mouse olfactory system. Imai T, Yamazaki T, Sakano H. ポスター発表、2009年5月3-6日、Ashburn, VA, USA

- ③ Keystone Symposia Chemical Senses: Receptors and Circuits. Pre-Target Axon-Axon Interactions Establish the Neural Map Topography. Imai T, Yamazaki T, Sakano H. 口頭発表、ポスター発表、2009年3月15-19日、Tahoe City, CA, USA
- ④ Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Axon Guidance, Synaptogenesis & Neural Plasticity. Axon-axon interaction in the neural map formation. Imai T, Yamazaki T, Sakano H. 口頭発表、2008年9月10-14日、ニューヨーク
- ⑤ 第31回日本神経科学大会 Neuroscience2008 Novel Mechanisms of Glomerular Map Formation by Sorting Axons of Olfactory Sensory Neurons Imai T, Yamazaki T, Sakano H. 口頭発表、2008年7月9-11日、東京

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

[http://www.cdb.riken.go.jp/jp/02\\_research/0202\\_creative26.html](http://www.cdb.riken.go.jp/jp/02_research/0202_creative26.html)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 猛 (IMAI TAKESHI)

東京大学・大学院理学系研究科・客員共同研究員

研究者番号：70509851