

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月23日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700364

研究課題名（和文） 嗅神経細胞における神経個性獲得のメカニズム

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

研究代表者

竹内 春樹 (TAKEUCHI HARUKI)

東京大学・大学院理学系研究科・特任助教

研究者番号：70548859

研究成果の概要（和文）：複雑な神経回路の形成メカニズムを明らかにすることは神経科学における中心課題の一つである。マウスの嗅覚系では、発現する嗅覚受容体が中心的な役割を担うことが知られているが、嗅覚受容体タンパク質を活性化するシグナルの実態については明らかにされていなかった。本研究課題では、嗅覚受容体が持つリガンドに依存しない基礎的活性に着目し、個々の受容体ごとに活性の度合いが異なっており、そのシグナル強度の差が軸索の投射位置を規定するというところを見出した。

研究成果の概要（英文）：The assembly of the functional neural circuit is one of the most complex developmental processes. Unraveling the mechanisms involved is vital for advancing basic scientific understanding. In the mouse olfactory system, expressed olfactory receptor (OR) plays a pivotal role in the axonal projection of olfactory sensory neurons (OSNs). However, it remains unknown about the nature of the signals for activating OR proteins. In this study, we focused on ligand-independent basal activity and found that each OR has a unique level of basal activity and signaling levels of the OR-derived basal activity regulate the projection site of OSN axons.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経回路網

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む高等動物の脳は、多数の神経細胞からなる複雑かつ精巧に組織された神経回路によって外界からの感覚情報を適切に処理し行動

する。この情報処理の根幹をなす神経回路がどのように形成されるのかという問題は、神経科学における重要な課題の一つである。神経細胞は、発生の過程で自身の神経個性を獲得し、それに基づいて適切な箇所に軸索を伸長させる。

マウス一次嗅覚系において、個々の嗅細胞は多数存在する嗅覚受容体 (odorant receptor: OR) 遺伝子の中からたった一種類のみを相互排他的に発現することによって自身の個性を獲得する。同種の OR 分子を発現した嗅細胞は、発生の過程で互いにその軸索を収斂させ嗅球の特定の箇所 (糸球) へと投射する (図 1)。マウスゲノムには約 1000 種類の OR 遺伝子が存在することから、マウス嗅覚系の神経回路は約 1000 種類もの異なる個性を持つ軸索を選別し、正しい箇所へと配線するという高度なメカニズムによって形成される。

これまでに申請者は、発現する OR 分子が様々な軸索選別分子の発現量を規定することで、軸索投射を制御することを明らかにした。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、及びその発現様式から大きく二つの種類に分類される。一つは、軸索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(Nrp1)、Plexin-A1 (PlxnA1))。もう一方は、軸索の収斂に関わる分子 (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(未発表)によって、両者の発現は共に OR 分子によって制御されること判明しているものの、二つの分子群の間で発現パターン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 (G タンパク質共役型受容体) で、G タンパク質と結合し、アデニル酸シクラーゼ III (ACIII) を活性化する。ACIII 欠損マウスにおいて、両者の発現に大幅な影響が現れることから、OR-ACIII pathway を介して産生される cAMP が重要な役割を担うことが判明している (未発表) が、依然としてこれら軸索選別分子の多様な発現様式を作り出す具体的なメカニズムに関しては殆ど明らかにされていない。

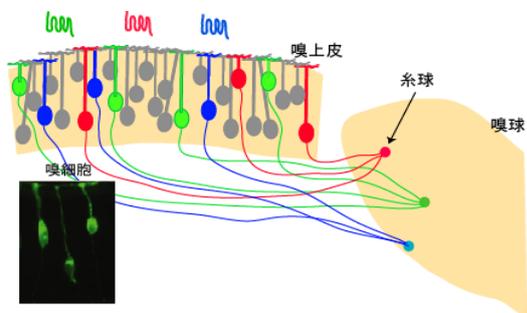


図 1. 哺乳類の嗅覚システム

図 1. 個々の嗅細胞は一種類の OR を発現し、発現された OR の種類に基づいて嗅球上の特定の箇所へ収斂して投射する。

2. 研究の目的

マウス嗅覚系では、発現する OR が様々な軸索ガイダンス分子の発現を制御することで軸索投射を制御する。しかしながら、OR タンパク質を活性化するシグナルの実態については明らかにされていない。本研究課題では、嗅覚系における神経回路形成の中心を担う OR のシグナルの実態を明らかにする。

3. 研究の方法

OR を活性化するインプットとしては、匂い物質などのリガンドによって引き起こされる extrinsic activity がよく知られているが、生後直後の鼻腔閉塞によって、外界からのリガンドを遮断した場合においても軸索投射に異常が観察されないことから、extrinsic activity による軸索投射への寄与は殆どないと考えられる。

OR を含む G 蛋白質共役型受容体 (G-protein coupled receptor; 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 の研究が殆ど行われてこなかった。その理由として、OR を培養細胞に発現させた場合の膜移行の効率が極めて悪かったことが挙げられる。そのため、*in vitro* におけるアッセイができず、タンパク質レベルでの OR の機能解析がほとんど行われてこなかった。

2004 年に Peter Mombaerts 博士らのグループによってアミノ酸配列上最も OR に近縁にあたる GPCR である b2 アドレナリン受容体が OR 様の振舞いをし、*in vivo* において軸索を収斂させるということが明らかとなった。b2 アドレナリン受容体は、古くから培養細胞上で研究がさかんに行われ、リガンド結合ドメインや、basal activity に関わるアミノ酸残基などの膨大な実験データが蓄積されている。さらに近年、b2 アドレナリン受容体の立体構造が明らかとなり、三次元構造をもとに機能解析を行うことが可能となってきた。申請者は、これらの知見に習って $\beta 2$ アドレナリン受容体に変異を加え、intrinsic activity の度合いを変化させた変異型 $\beta 2$ アドレナリン受容体を嗅細胞において発現させるトランスジェニックマウスを製作する。そのマウスにおいて、軸索投射の位置、及び軸索ガイダンス分子の発現にどのような影響が現れるのかを検証する。ま

た、最近になって、OR を膜へ輸送するシャペロン様の分子が同定され、OR 遺伝子と同時それらシャペロン分子を共発現させることでいくつかの OR に関して *in vitro* のアッセイが可能になってきた。従って、アッセイ可能な OR に関して *in vitro* で basal activity の測定を行い、嗅細胞における軸索ガイダンス分子の発現量との相関関係を検証する。

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。従って、OR プロモーターの下流にこれらの変異型 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 Nrp1、PlxnA1 などの軸索ガイダンス分子の発現も投射

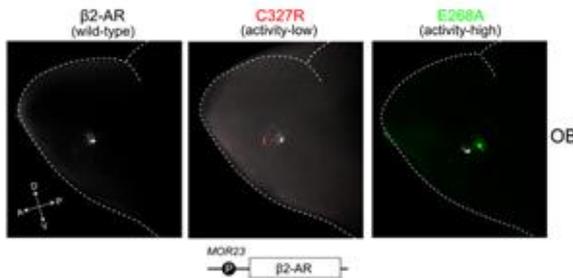


図 2. Basal activity を変化させた b2 アドレナリン受容体を嗅細胞に発現させた。その結果、basal activity の強度に依存して投射位置が前後にシフトした。

位置に相関して変化した (図 3)。この時、軸索の選別に関わると考えられる segregation 分子の発現には影響は見られなかった (data now shown)。このことから、OR に由来するリガンド非依存的な basal activity が targeting 分子の発現レベルを調節し、basal activity の強いものは嗅球の後方へ、basal activity の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。

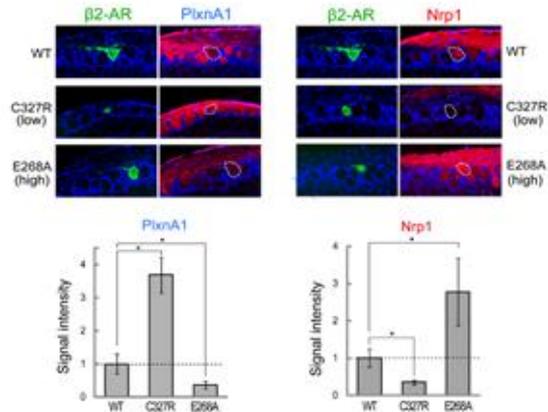


図 3. Basal activity を変化させた変異型 b2 アドレナリン受容体を発現した嗅細胞において、軸索ガイダンス分子の発現が変化する。

(2) OR の basal activity の測定

近年、RTP1 と呼ばれる OR 特異的なシャペロン様遺伝子が同定され、いくつかの OR に関しては培養細胞などにおける膜移行が観察され、*in vitro* のアッセイが可能となった。

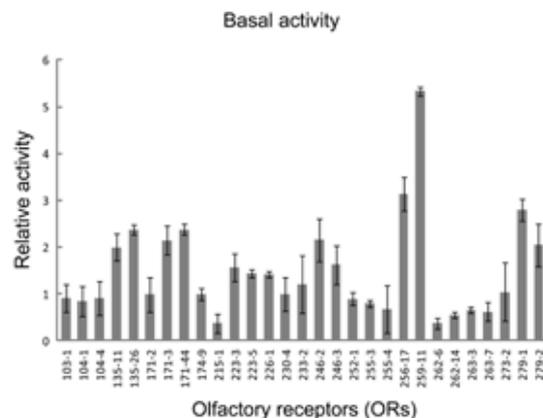


図 4. HEK293 細胞に OR 遺伝子とそのシャペロン様遺伝子をトランスフェクトし、Luciferase assay によってリガンド非存在下における活性の測定を行った。

この知見を利用して、OR 遺伝子と RTP1 遺伝子を同時にトランスフェクトして、OR の basal activity の測定を行った。その結果、basal activity の量は個々の OR ごとに固有であり、basal activity の低いものと高いものをくらべると 10 倍以上の違いがあることが分かった。

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 2 件)

① Haruki Takeuchi, Kasumi Inokuchi, Mari Aoki, Fumikazu Suto, Akio Tsuboi, Ikuo Matsuda, Misao Suzuki, Atsu Aiba, Shou Serizawa, Yoshihiro Yoshihara, Hajime Fujisawa and Hitoshi Sakano “Sequential Arrival and Graded Secretion of Sema3F by Olfactory Neuron Axons Specify Map Topography at the Bulb”, Cell、査読有り、141、2010、1056-1067

② 竹内春樹、井ノ口霞、青木真理、坂野仁 “嗅覚神経地図形成の時空的制御”、実験医学、査読なし、28 巻、2010、1756-1760

[学会発表] (計 2 件)

① 竹内春樹
“嗅覚系における背腹軸方向の軸索投射の分子基盤”
日本分子生物学会 2011 年 12 月 13~16 日 (横浜)

② Haruki Takeuchi
“Sequential Arrival and Graded Secretion of Sema3F by Olfactory Neuron Axons Specify Map Topography at the Bulb”
Keystone Symposia Synapses: Formation, Function and Misfunction April 11-15, 2010 (Utah, USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 春樹 (TAKEUCHI HARUKI)
東京大学・大学院理学系研究科・特任助教
研究者番号：70548859

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし