

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 5月11日現在

機関番号：12602
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22700410
 研究課題名（和文） マウス個体における cAMP シグナルの光制御を用いた神経機能・神経回路形成の解析
 研究課題名（英文） Control of neural circuit formation using light-regulated adenylyl cyclase in vivo.
 研究代表者
 石井 智浩（ISHII TOMOHIRO）
 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教
 研究者番号：60549947

研究成果の概要（和文）：

嗅神経細胞において多様な機能を制御している cAMP シグナルがどのように使い分けられているのかを調べるために、光依存的に cAMP 産生活性を制御できるタンパク質 PAC を一部の嗅神経細胞で発現するトランスジェニックマウスを作製した。PAC タンパク質の発現は樹状突起や軸索においても検出することができ細胞局所における活性化が可能である。現在、マウス個体を使って光により PAC の活性を制御し、神経回路形成における cAMP の機能解析を進めている。

研究成果の概要（英文）：

To understand how cAMP is used to exert various functions in mouse olfactory sensory neurons (OSNs), we generated transgenic mice in which PAC, photo-activated adenylate cyclase, is expressed under the control of the mouse olfactory receptor promoter. PAC was detected throughout OSN including dendrites and axons, allowing local activation of PAC. We are currently analyzing the function of cAMP in neural circuit formation by regulating PAC activity using light.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1600000	480000	2080000
2011年度	1500000	450000	1950000
年度			
年度			
年度			
総計	3100000	930000	4030000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学 ・ 神経・筋肉生理学

キーワード：1.神経科学 2.脳・神経 3.発生・分化 4.シグナル伝達 5.遺伝学

1. 研究開始当初の背景

cAMPは普遍的なセカンドメッセンジャーであり、細胞レベルでは遺伝子発現、代謝、分裂・増殖、分化、細胞死、分泌、神経伝達などあらゆる細胞機能に重要な役割を果たす。神経細胞に注目すると cAMP は活動電位

の発生や樹状突起・軸索の伸長、シナプス可塑性など多様な機能を制御することが知られている。cAMP という同一のシグナル分子がいかんして使い分けられているのか、という問題についてはほとんど判っていない。この主な理由として cAMP シグナルの機能を、神経発生の時期的な違いや樹状突起・軸索と

いった空間的な違いを区別して解析することが困難であったことが挙げられる。

マウス嗅覚系はその特異性の高い軸索投射様式から神経回路形成機構を調べるのに極めて優れたモデルシステムと言える。マウスは約 1,000 種類の嗅覚受容体遺伝子を用いて多様な匂い分子の受容・識別を行なっている。個々の嗅神経細胞は特定の一つの嗅覚受容体を発現し、同じ受容体を発現する細胞の軸索は嗅球上において2つの領域で収束して二次ニューロンとシナプス結合し糸球と呼ばれる構造体を形成する。これにより匂い情報のマップが嗅球上に形成される。このような神経回路形成に cAMP シグナルは重要な役割を果たすことが明らかにされている。

2. 研究の目的

マウス嗅神経細胞の神経回路形成において cAMP シグナルがどのように時間的・空間的な使い分けられているのかを明らかにすることを目指す。光により cAMP シグナルを操作できるオプトジェネティクスツールを利用する。使用するオプトジェネティクスツールの比較検討、マウス嗅神経細胞で光による cAMP シグナルを操作する実験系の確立、そして実際に光により人工的に cAMP シグナルを誘導することで、細胞に生じる変化を形態的観察および分子生物学的手法により解析する。

3. 研究の方法

光により cAMP シグナルを産生するタンパク質として、ミドリムシ由来の光依存性アデニルサイクラーゼ PAC あるいは人工タンパク質 opto-b2AR が報告されている。この2つ及びそれらに膜移行シグナルを検出するためのタグを付加したものを作製し比較検討する。候補となる遺伝子を赤色蛍光マーカー遺伝子 RFP と共に嗅覚受容体遺伝子 M71 発現細胞で共発現させるトランスジェニックマウスを作製する。RFP に関しては軸索末端までを明瞭に観察できるよう膜移行シグナルを付加しておく。M71 トランスジェニックマウスにおいてトランスジーンを発現する細胞が本来の M71 発現細胞の投射先と同一のところに軸索を投射するかを確認する。これは内在性 M71 が GFP で標識されたノックインマウスと掛け合わせることで比較が可能になる。

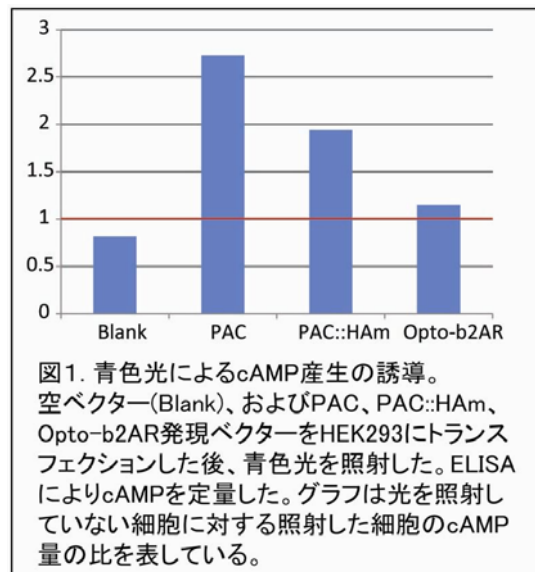
このような実験系が確立した後、生きたマウスにおいて嗅上皮あるいは嗅球の上方から青色 LED により cAMP シグナルを自在に誘導し、軸索投射や遺伝子発現の解析を行う。また、蛍光顕微鏡下でレーザーにより cAMP シグナルを局所的に誘導することで、高解像

度で細胞の形態変化を観察する。

4. 研究成果

(1) 光依存的に cAMP シグナルを産生するシステム

実験系に使用する cAMP シグナルを光依存的に誘導するタンパク質を選ぶために PAC と opto-b2AR を比較検討した。それぞれの発現ベクターを HEK293 細胞にトランスフェクションし遺伝子を発現させ、青色 LED で 10 分刺激した。ELISA 法により細胞内 cAMP を定量した。PAC 発現細胞では光の照射により cAMP 濃度が約 2.7 倍上昇したのに対し、opto-b2AR ではほとんど上昇は観察されなかった (図 1)。この原因を探るために opto-b2AR の YFP 融合タンパク質や opto-b2AR に HA タグを付加したタンパク質を HEK293 細胞に発現させ細胞内局在を調べたところ、本来、膜タンパク質であるはずの opto-b2AR が細胞内小器官に留まり、細胞膜への移行はほとんど観察されなかった。このような実験結果から本研究では PAC を使って実験を進めることにした。



cAMP シグナルの光操作を、細胞体のみならず軸索末端においても十分に行えるように、PAC には膜移行シグナルを付加した。またタンパク質の検出を可能にするために HA タグを付加した。この融合タンパク質(PAC::HAM)を HEK293 細胞に発現させたところ、実際に細胞膜に局在していることを確認することができた。アデニルサイクラーゼ活性に関しても、先の実験と同様に PAC::HAM を HEK293 に発現させ青色 LED による刺激を行い、そして細胞内 cAMP の量を ELISA 法により解析した。光刺激により細胞内 cAMP 濃度が上昇していることを確認することができた (図 1)。

修飾のない PAC に比べ、膜移行シグナルを付けた PAC の方がやや活性が低い可能性があるが、これは PAC の分布が空間的に限定されていることを反映しているものと考えている。

(2) PAC トランスジェニックマウスの作製

一部の嗅神経細胞で PAC::HAm を発現させるために、嗅覚受容体遺伝子 M71 の発現制御領域を用いたトランスジェニックマウスを作製した。軸索も可視化できるように赤色蛍光タンパク質 RFP (膜移行シグナル付) を同時に発現させるようにした。具体的にはトランスジェニックコンストラクトとして M71-IRES-PAC::HAm-IRES-RFP を作製した。このトランスジーン の転写産物からは M71、PAC::HAm、RFP の 3 つのタンパク質が独立に翻訳される。

作製されたトランスジェニックマウス (M71-PAC-RFP) では予想通り一部の嗅神経細胞群で RFP が発現していた。これまでの報告から嗅覚受容体遺伝子の発現は mono-allelic であり、トランスジーンはそれに対応する内在性遺伝子とは別の細胞で発現することが知られている。内在性の M71 遺伝子が GFP で標識されている M71 ノックインマウス M71-GFP を入手し、今回作製した M71-PAC-RFP トランスジェニックマウスを掛け合わせて M71 の発現を解析した (図 2)。マウス個体において嗅上皮の上部の骨を除いて蛍光顕微鏡下で観察したところ内在性 M71 を発現する緑の細胞とトランスジーン M71 を発現する赤の細胞が観察された (図 2 A)。また嗅上皮の切片を作製し詳細に観察した (図 2 B)。予想どおり内在性 M71 とトランスジーン M71 を発現する細胞は別々の細胞であった。

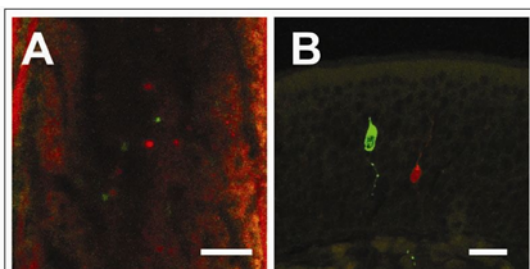


図 2. M71-GFP/M71-PAC-RFPマウスの嗅上皮。

(A) 嗅上皮を上方から観察した蛍光像。

スケールバー、100 μm 。

(B) 切片を用いた嗅上皮の観察。

内在性M71(緑)とトランスジーンM71(赤)は別々の細胞で発現している。

スケールバー、20 μm 。

次に軸索投射を観察した。嗅球の上部の骨

を除き蛍光顕微鏡下で軸索を観察した (図 3)。嗅球のホルマウントで観察したところ赤い蛍光を発する軸索と緑の蛍光を発する軸索が嗅球表面を通過して特定の部位に収束していることが判った (図 3 A)。また嗅球の切片の観察からこれらは同一の糸球に収束していることが明瞭に示された (図 3 B)。cAMP の機能の一つに軸索投射先の前後軸の決定があるが、PAC の発現により投射先が変化することがなかったことから、PAC の basal の活性 (光を照射していない状態での活性) は極めて低く、仮にあるとしても影響のないレベルであると言える。

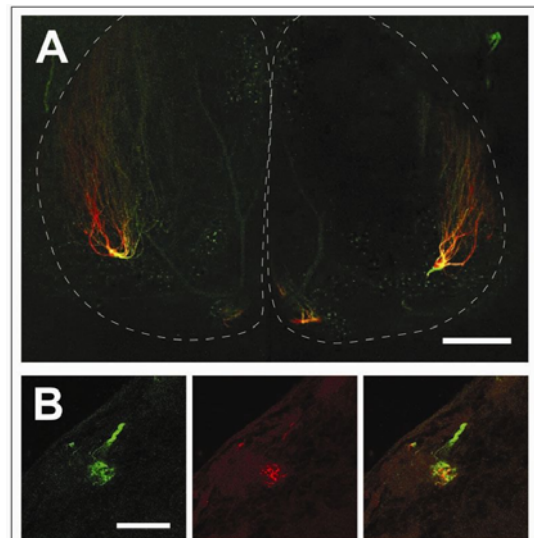


図 3. M71-GFP/M71-PAC-RFPマウスの嗅球。

(A) 嗅球を上方から観察した蛍光像。

スケールバー、500 μm 。

(B) 切片を用いた嗅球上の投射先の観察。

緑の軸索と赤の軸索は同一の場所に投射している。スケールバー、50 μm 。

PAC タンパク質が軸索にも分布していることを確認するために、嗅上皮・嗅球の切片に対して蛍光免疫染色を行った。PAC タンパク質は細胞体や樹状突起、更には軸索でも観察され、細胞局所での cAMP シグナルの誘導が可能であると思われる。

以上のように、光により cAMP シグナルを誘導するマウスシステムを確立した。現在、M71-PAC-RFP/M71-GFP マウス個体を使って光により PAC の活性を制御し、神経回路形成における cAMP の機能解析を進めている。

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 1 件)

1. Ishii T, Mombaerts P.
Coordinated coexpression of two vomeronasal receptor V2R genes per neuron in the mouse.
Mol Cell Neurosci. (2011) 46:397-408.
査読有

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

1.
名称：ポリペプチド、単離された核酸、組み換えベクター、遺伝子導入キット、形質転換体、および細胞内カルシウムシグナルの調整方法
発明者：石井智浩、中田隆夫
権利者：東京医科歯科大学
種類：特許
番号：PCT/JP2012/053705
出願年月日：2012年2月16日
国内外の別：外国

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/cbio/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 智浩 (ISHII TOMOHIRO)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科細胞生物学分野・助教
研究者番号：60549947