

論文内容の要旨

嗅神経細胞の軸索投射位置決定における cAMP シグナルの役割 Roles of G Protein-Mediated cAMP Signals in Positioning Glomeruli in the Mouse Olfactory Bulb

今井 猛

哺乳類の嗅覚系は、数十万種類もの匂い物質を識別できると言われているが、その匂い物質を受容する分子の実体は、約 1,000 種類存在する嗅覚受容体(Odorant Receptor; OR)である。OR は 7 回膜貫通型受容体であり、嗅上皮の嗅繊毛に発現して、様々な匂い物質と結合する。嗅上皮に存在する個々の嗅神経細胞は、約 1,000 種類の OR 遺伝子のうち、ただ 1 種類のみを、しかも mono-allelic に発現している。また、同一の OR を発現する嗅神経細胞は、嗅上皮上では散在しているにも拘らず、その投射先である脳の嗅球においては、一对の「糸球」と呼ばれる構造に軸索を収束させる。この結果、嗅上皮上の 1,000 種類の嗅神経細胞によって認識された匂い分子の結合情報は、嗅球上では 1,000 種類の糸球の発火パターンという 2 次元情報に変換されることになる。

このように、単一の嗅神経細胞に 1 種類の OR のみが発現するという「1 細胞-1 受容体ルール」と、同種の OR を発現する嗅神経細胞が特定の糸球に軸索を収束させるという「1 糸球-1 受容体ルール」が、末梢嗅覚系を形成する上での基礎となっている。ここで興味深いのは、これらのルールを保障する分子機構に関して、いずれも OR タンパク質そのものが関与しているらしい、ということである。前者に関しては、OR 遺伝子のコーディング領域のみを欠失させるなどして、OR タンパク質ができないようにすると、その変異型遺伝子を発現する嗅神経細胞では、別の OR 遺伝子が共発現するようになり、単一遺伝子発現が崩れることが知られている。従って、抗原受容体遺伝子における対立遺伝子排除の機構と同様、OR タンパク産物からの抑制性シグナルが更なる OR 遺伝子の発現を抑えるという、ネガティブフィードバックの機構が単一遺伝子発現を保障しているのではないかとされている。また、後者については、OR 遺伝子のコーディング領域を改変し、OR のアミノ酸配列や発現量を変化させると、その変異型遺伝子を発現する嗅神経細胞は、本来の投射位置とは異なる場所に軸索を投射させることが観察されている。従って、OR タンパク質は軸索投射位置決定にも重要な役割を果たすと考えられているが、その分子機構については不明である。

OR が匂い物質を認識する際には、OR は 3 量体 G タンパク質 G_{olf} を活性化し、さらに III

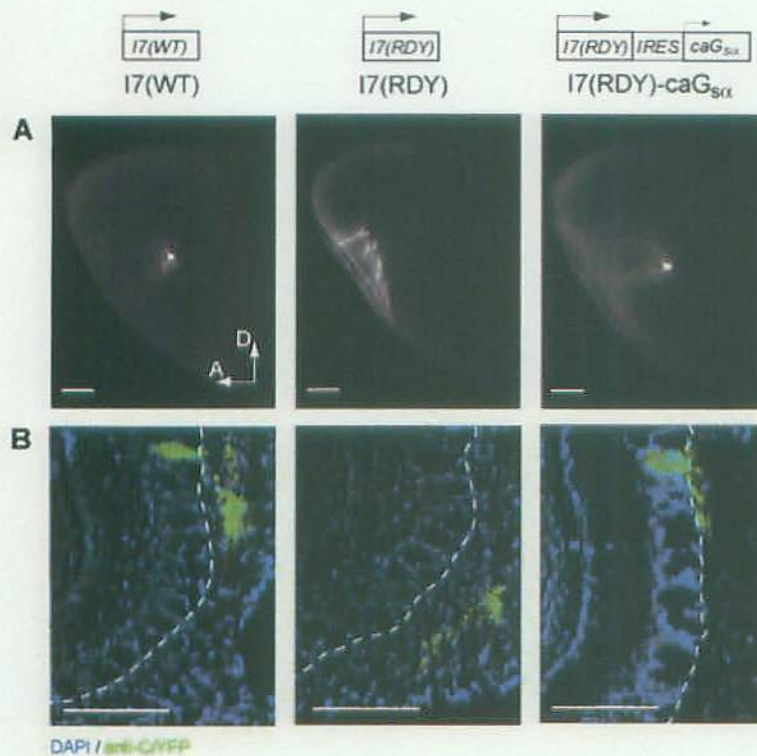
型アデニル酸シクラーゼの活性化、CNG チャンネルの開口を経て膜電位の脱分極を惹き起こすと考えられている。実際、CNG チャンネルの必須サブユニットである CNGA2 のノックアウトマウスにおいては、ほぼ完全に匂い物質に対する電気生理学的な応答が失われ、行動学的にも匂い物質を認識できなくなる。しかしながら、この CNGA2 ノックアウトマウスにおいては、「1 細胞-1 受容体ルール」も「1 糸球-1 受容体ルール」もほぼ完全に守られていることが判っている。従って、OR 遺伝子の単一発現と軸索投射には CNG チャンネルを介した匂い刺激依存的な活動電位は必要ないと考えられている。CNG チャンネルを介さない cAMP シグナルや、G_s/G_{olf} 以外の 3 量体 G タンパク質、それ以外の分子が関与している可能性がある。

そこで本研究では、OR に依存して生じる軸索投射の分子機構について、シグナル伝達という観点から検討することにした。まず最初に、3 量体 G タンパク質を介したシグナルの関与について検討するため、I7 という OR について、G タンパク質と共役できない点変異体を作製し、これを発現するトランスジェニックマウスを作製した。OR には Type-A GPCRs によく保存された DRY モチーフと呼ばれるトリペプチドモチーフが存在する。ロドプシンや α_{1B} -アドレナリン受容体、バソプレシン V₂ 受容体では、このモチーフの電荷残基 D、R を入れ替えると G タンパク質との共役が損なわれることが判っていたため、I7 にも同様の変異を導入した。実際に G タンパク質の活性化が損なわれていることは、トランスジェニックマウスの嗅神経細胞を用いたカルシウムイメージングによって確認した。野生型 I7 (I7(WT)) を発現する嗅神経細胞は I7 のリガンドであるオクタナールに応答を示したのに対して、変異型 I7 (I7(RDY)) を発現する嗅神経細胞はオクタナールに全く応答を示さなかった。

この変異型 OR、I7(RDY) を発現する嗅神経細胞で OR 遺伝子の単一発現が守られているかどうかを検討するため、蛍光免疫組織化学/蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション共染色と単一細胞 RT-PCR を行った。その結果、コーディング領域を Cre 組み換え酵素遺伝子に置き換えた欠失型トランスジーン (Cre) 発現細胞では、内在性 OR 遺伝子の共発現が高頻度で見られたのに対し、I7(WT) や I7(RDY) の発現細胞では共発現はほとんど見られなかった。従って、I7(RDY) では OR 遺伝子の単一発現には異常がないと考えられた。単一発現を保障するための抑制性シグナルは、G タンパク質以外のシグナル分子を介している可能性がある。

次に、I7(RDY) を発現する嗅神経細胞の軸索投射について検討した。嗅球のホールマウントを観察したところ、I7(RDY) を発現する嗅神経細胞の軸索は、I7(WT) に比べると嗅球前側にのみ見出され、しかも収斂しづらくなっていることが判明した。また、嗅球の切片を作製して解析したところ、I7(RDY) 発現細胞の軸索は、嗅球の糸球層には全く見出されず、2 次神経細胞とはシナプスを形成していないことが判った。

この結果は、OR が何らかの G タンパク質にシグナルを伝えることによって軸索投射の制御を行っていることを示唆している。発現解析の結果から、この G タンパク質の候補の 1 つとして G_s が考えられたので、I7(RDY) とともに恒常活性化型 $G_{s\alpha}$ ($caG_{s\alpha}$) を共発現させることを試みた。I7(RDY) の下流に IRES- $caG_{s\alpha}$ を挿入することで、このトランスジーン (I7(RDY)- $caG_{s\alpha}$) を発現する嗅神経細胞では、OR としては I7(RDY) を発現しているながら、 G_s シグナルを回復させることができる。その結果、このトランスジェニックマウスでは、正常に軸索投射・収斂が起こり、軸索は 2 次神経細胞とシナプス形成できることが判明した。この結果から、OR が G_s タイプの G タンパク質 (G_s ないし G_{olf}) にシグナルを伝えることが軸索投射に必要であることが示唆された。



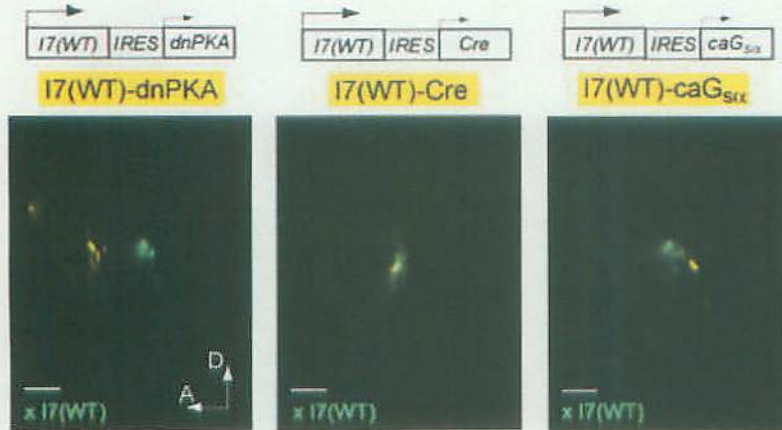
【図1】 G_s シグナルは嗅神経細胞の軸索投射に必要である。

3量体Gタンパク質と共役できない変異型OR、I7(RDY)を発現する嗅神経細胞は、正常に軸索投射できず、糸球形成に至らない。これに対し、恒常活性化型 G_s ($caG_{s\alpha}$) をI7(RDY)と共発現させると、その発現細胞の軸索はI7(WT)と同様に収斂し、糸球を形成できるようになる。(A) ホールマウント蛍光写真(軸索マーカーのCFP/YFP)。スケールは500 μ m。A, 前側; D, 背側 (B) 嗅球切片。点線は糸球層の境界を示す。スケールは250 μ m。

更に、この G_s/G_{olf} シグナルが軸索投射先の位置決めに関与している可能性について検討するため、 $caG_{s\alpha}$ を I7(WT) と共発現させ、軸索投射について解析した。コントロールとして、Cre 組み換え酵素を I7(WT) と共発現させた場合には投射位置にほとんど変化がなかったのに対して、 $caG_{s\alpha}$ を共発現させた場合には、投射位置は嗅球においてより後側にシフトすることが判明した。この場合、軸索の収斂・糸球形成には異常は見られなかった。また、同じ $caG_{s\alpha}$ を I7(RDY) と共発現させた場合、I7(WT) と共発現させた場合では、後者の方が後側に軸索を投射した。

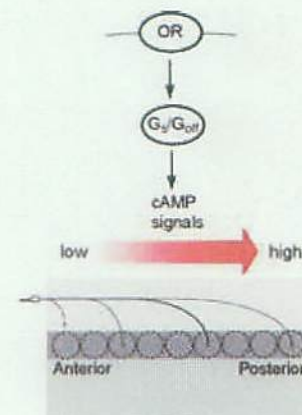
G_s/G_{olf} はアデニル酸シクラーゼを活性化し、cAMP の産生を促すが、cAMP は多くの場

合、protein kinase A (PKA) を介して細胞内シグナルの制御を行うと考えられている。そこで、次に、ドミナントネガティブ型 PKA (dnPKA) を I7(WT) と共発現させ、cAMP シグナルを弱くした場合の軸索投射について検討した。その結果、caG_{src} の場合とは逆に、軸索投射位置は嗅球前側にシフトすることが判明した。糸球構造の形成およびシナプス形成に異常は認められなかったが、軸索末端の位置は I7(RDY) とよく一致していた。



【図2】 cAMPシグナルの増減に伴う軸索投射位置の変化。
野生型OR、I7(WT)とともにcaG_{src}ないしドミナントネガティブ型PKA (dnPKA) を共発現させると、発現細胞の軸索投射位置はそれぞれ後側、前側にシフトする。

以上の結果から、OR-G_s/G_{olf} シグナルが嗅神経細胞の正常な軸索投射に必要であること、更に OR から入力される cAMP シグナルの強さが、嗅球前後軸方向の軸索投射位置を規定している可能性が示唆された。これまで OR の違いがどのようにして軸索投射位置の違いに反映されているのかについては全く未解明であったが、本研究の結果は、cAMP シグナルの強さが軸索投射位置を規定する重要パラメーターであるということを示唆している。嗅覚系における軸索投射様式が視覚系やその他の感覚系と大きく異なるのは、軸索投射に際して位置情報の再編成が起こるという点である。脳の高度な演算能力を保証する上では、このような位置情報の再編成は重要な意味を持つと考えられる。今後、cAMP シグナルの支配を受ける分子群の解析を通し、多様で複雑な神経回路網の形成を制御する分子メカニズムが明らかにされると期待される。



【図3】 モデル
OR-cAMPシグナルの強さによって嗅神経細胞の軸索投射位置が規定されていると考えられる。