

学位論文

嗅覚受容体の基礎活性による嗅神経回路の形成

Agonist-Independent Receptor Activity Regulates
Axon Targeting of Olfactory Sensory Neurons

平成 25 年 11 月博士（理学）申請

東京大学大学院理学系研究科
生物化学専攻
中嶋 藍

要旨

マウス嗅覚系において一次嗅覚系における神経細胞の個性は、発現する嗅覚受容体 (odorant receptor; OR)の種類により決定され、一群の軸索誘導分子の発現量として軸索末端に提示される。これら OR 依存的に転写制御される分子群は、嗅細胞の軸索投射位置を規定し、嗅球における糸球地図形成に重要な役割を果たす。しかしながら、OR に由来するどのようなシグナルがこの神経地図形成に関わるのか、その実体は殆ど解明されていない。

糸球地図形成に関して、胎生期に規定される大まかな軸索投射位置は外界要因に左右されず個体間でよく保存されているという知見から、匂いリガンドに依存しない OR の自立的活性によって制御されているというモデルが提唱されてきた。今回、我々は G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) が有する基礎活性が嗅球における神経地図形成に関与する可能性を検討した。我々は β 2-アドレナリン受容体が OR と同様に嗅細胞の軸索投射を制御する事を利用して、基礎活性に影響を与える一連の変異が投射に及ぼす影響について解析した。その結果、前後軸に沿った嗅細胞の軸索投射位置及び軸索ガイダンス分子の発現量が、GPCR の基礎活性によって決定されていることが明らかとなった。加えて、各々の OR 分子は多様かつ固有な基礎活性を有することを見出した。これら一連の結果から、OR に固有なレベルの基礎活性が cAMP を介して軸索ガイダンス分子の転写量へと変換されることで嗅細胞の投射位置を規定することが示された。

ここで得られた研究結果は、GPCR の自立的な基礎活性が神経回路構築という極めて重要な生理学的役割を果たすことを示した初めての例であり、神経発生学の分野のみならず、今後の GPCR を標的とした研究分野すべてに新たな視点を与えるものと考えられる。

Abstract

G-protein coupled receptors (GPCRs) are known to possess two different conformations, active and inactive, and spontaneously alternate between the two in the absence of ligands. Here, we analyzed the agonist-independent GPCR activity for its possible role in receptor-instructed axonal projection. We generated transgenic mice expressing activity mutants of the β 2-adrenergic receptor, a well-characterized GPCR with the highest homology to odorant receptors (ORs). We found that mutants with altered agonist-independent activity changed the transcription levels of axon targeting molecules, e.g., Neuropilin-1 and Plexin-A1, but not of glomerular segregation molecules, e.g., Kirrel2 and Kirrel3, thus, causing shifts in glomerular locations along the anterior-posterior (A-P) axis. Knockout and in vitro experiments demonstrated that G_s , but not G_{olf} , is responsible for mediating the agonist-independent GPCR activity. We conclude that the equilibrium of conformational transitions set by each OR is the major determinant of expression levels of A-P targeting molecules.

目次

要旨	1
Abstract	2
目次	3
第 1 章	4-8
序章	4-6
図表	7-8
第 2 章	9-23
2.1. 軸索ガイダンス分子 Nrp1 及び PlxnA1 の嗅覚系における発現パターン	9
2.2. OR 依存的な Nrp1、PlxnA1 発現量の規定	9-10
2.3. Nrp1 は嗅球前後軸に沿った軸索投射位置を規定する	11-12
2.4. 細胞接着分子 Kirrel2 及び Kirrel3 の嗅覚系における発現パターン	12
2.5. Kirrel2 は軸索末端の最終的な分離に関わる	13-14
図表	15-23
第 3 章	24-61
2.1. OR による軸索ガイダンス分子の多様な制御	25-28
2.2. OSN おける神経活動による軸索末端の分離・選別	28-29
2.3. OR 分子の持つリガンドに依らない基礎活性	29-31
2.4. 基礎活性レベルが変化した変異型b2-AR の探索	31-33
2.5. 基礎活性による嗅球前後軸に沿った軸索投射位置の制御	33-34
2.6. 基礎活性による軸索ガイダンス分子の制御	34
2.7. 軸索ガイダンス分子の時間的制御	34-36
2.8. 発現時期の異なる G タンパク質による糸球マップ形成の制御	36-39
図表	40-61
第 4 章	62-66
材料と方法	67-77
参考文献一覧	78-83
謝辞	84

第 1 章

序章

高度に複雑化した脳の機能は、秩序だって構築された神経回路網により支えられている。特異的な神経回路を構築するためには、神経細胞が自身の細胞個性に従って互いにシナプスを形成する必要がある。本研究で取り扱うマウス一次嗅覚系は、個々の細胞の個性が、発現される嗅覚受容体 (odorant receptor; OR) 分子の種類として明確に同定できるという点で、特異的な神経回路構築メカニズムを研究するうえで優れたモデル系を提供している。

Buck、Axel 両博士による OR 遺伝子の単離は、匂い受容の分子機構に関する研究を大きく前進させた (Buck & Axel, 1991)。OR 遺伝子は、げっ歯類においては 1000 種類を越す巨大な遺伝子ファミリーを形成している (Zhang & Firestein, 2002; Godfrey et al., 2004)。個々の嗅神経細胞 (olfactory sensory neuron; OSN)においては、このうち一種のみが相互排他的、かつ mono-allelic に発現される (Chess et al., 1994; Malnic et al., 1999; Ishii et al., 2001)。同種の OR を発現する OSN は、嗅上皮では散在しているものの、大脳前方部に位置する嗅球においては特定の糸球へと軸索末端を収斂させ、二次神経細胞とシナプス接続している (図 1-1)。したがって、匂い分子と受容体の結合により引き起こされる電氣的興奮は、嗅球上ではどの糸球が発火したかという二次元に展開されるパターンに変換され、さらに高次の嗅皮質へと伝達される。この受容体、OSN、糸球の間に成り立つ 1:1:1 の対応関係が、動物の高度な匂い識別能の分子的基盤をなすと考えられている。

匂い情報を二次元に展開するうえで基礎となる糸球地図形成の分子機構については、

以下の 4 つの重要な先行研究がある。Mombaerts らは一連のノックインマウスの解析から、OR 遺伝子 *P2* のコーディング領域を別の OR 遺伝子 *M4*, *M50*, *P3*, *P4* のコーディング領域に置換すると、正常な *P2* に対応する糸球に投射せず、別個の糸球へと軸索を伸長させることを見出した (Mombaerts et al., 1996; Wang et al., 1998; Feinstein & Mombaerts, 2004)。この観察は、OR 分子の種類が投射位置の決定に影響を与えることを示唆しているが、果たして OR 遺伝子産物がどのように軸索投射にかかわるのかは長い間解明されていなかった。

匂い分子と OR との結合は、G タンパク質を介してアデニル酸シクラーゼ III (ACIII) を活性化し、cAMP 濃度を上昇させる。cAMP は CNG チャネルを開口させ、これによりカチオンが流入し、活動電位が生じる (図 1-2)。このシグナル伝達の重要な構成要素である Golf、CNG チャネルのノックアウトマウスでは軸索投射に大きな異常が見られないことから (Belluscio et al., 1998; Lin et al., 2000; Zheng et al., 2000)、G タンパク質を介したシグナリングや神経活動は軸索投射に関与しないと考えられてきた。

これに対して当研究室の今井らは、cAMP シグナリングに関与する因子を阻害あるいは亢進させると、特定の OR 遺伝子に対応する投射先が前方あるいは後方にそれぞれ移動することを見出し、個々の OR 分子に固有な cAMP シグナルの活性化の度合いに応じて、OR 遺伝子が軸索投射位置の制御に関与するというモデルを提唱した (Imai et al., 2006)。さらに重要なことに、ガイダンス分子 Neuropilin-1 (Nrp1) が cAMP シグナルの下流にあって遺伝子発現のレベルで制御されており、嗅球前方に投射する OSN では低レベル、嗅球後方に投射する OSN では高レベルになるように濃度勾配を形成していることがわかった。この観察は、「OR 遺伝子を介する cAMP シグナルの強度に対応して軸索投射分子が発現制御を受け、その発現量によって投射位置が規定されている」というモデルを示唆するものである。しかしながら、(a) 軸索ガイダンス分子が実際に OR 遺伝子の制御化にあるのか、(b) 同じような制御を受ける分子がほかにもあるのか、(c)

Nrp1 や関連分子群が本当に OSN の軸索投射に関わるのか、といった点の検証が課題として残された。

一方、嗅球上の投射位置の決定機構に加えて、哺乳類の嗅覚系には OR 遺伝子の種類に応じて起こる軸索の収斂という重大な課題が存在する。石井らは、OR 遺伝子の多型を用いた解析から、わずか数残基のアミノ酸の相違が、OSN の投射先を隣接する異なる糸球体へと導くことを示した (Ishii et al., 2000)。これに関して当研究室の芹澤らは、一連の細胞認識・軸索ガイダンス分子群 (Kirrel, ephrin, Eph, Semaphorin, protocadherin) の発現が OR 分子の種類に依存して制御されていることを見出し、これらのうち、Kirrel と Ephrin に関して、トランスジェニックマウスを用いた強制発現系の実験から、OSN の軸索識別・収斂の過程に関与していることを示唆した (Serizawa et al., 2006)。更に興味深いことに、CNG チャネルのノックアウトマウス、或いは匂い刺激を遮断した鼻孔閉塞の個体では、これら細胞認識分子の発現量に変化することを発見した。この観察は、複数の細胞認識分子の発現レベルが神経活動依存的に制御されていることを示し、OR の種類によって与えられる neuronal identity は神経活動の頻度を介して細胞認識分子の発現量の相違という形で表現されている、という仮説を導いた。

第 1 章では、OR 分子の種類に依存して発現制御を受ける分子群のさらなる探索を進め、Nrp1 と関連の深い *Plexin-A1* (*PlxnA1*) 遺伝子が嗅覚系で発現していることを見出した。また、OR のコーディング領域を置換する実験によって、軸索ガイダンス分子 Nrp1 及び PlxnA1 が実際に OR 遺伝子の制御下に発現制御を受けるというモデルを確実なものとした。さらに Nrp1 ノックアウトマウスを用いた機能解析により、この分子が OSN の軸索投射位置決定の過程に関与することを示唆した。最後に、嗅覚受容体の下流で軸索投射位置の規定と軸索の収斂という二つの異なるプロセスで働く分子群の機能的な違いについて議論したい。

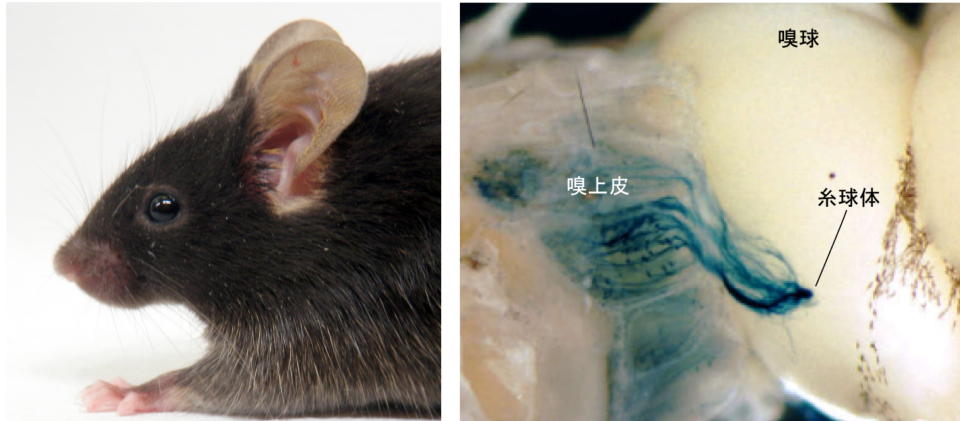
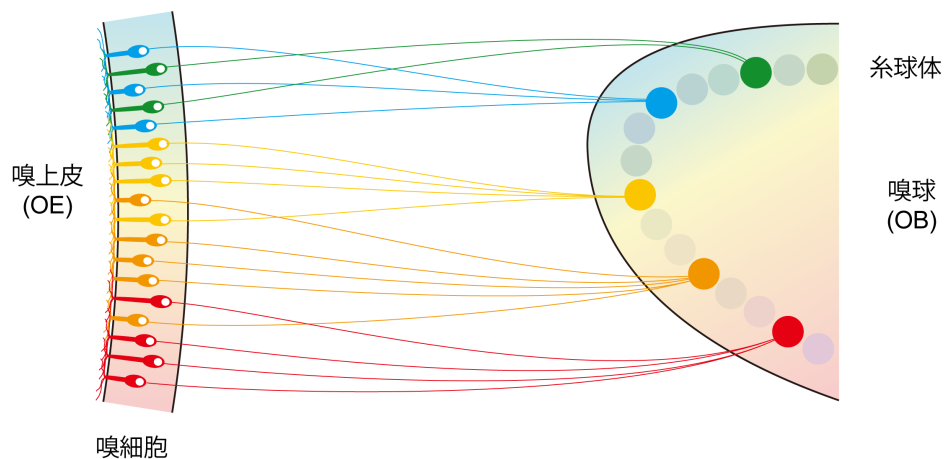
A**B**

図 1-1 マウスの嗅覚系

OR 遺伝子は、マウスにおいては約 1000 種類以上にも及ぶ類似遺伝子からなる巨大な多重遺伝系を構成している。個々の OSN はこのうち一種類のみを選択し、発現する。また同種の OR 遺伝子を選択した OSN は、投射先の嗅球においてはその軸索末端を特定の糸球構造へと収斂させる。トランスジェニックあるいはノックインシステムにおいて、特定の OR 遺伝子の下流から internal ribosomal entry site (IRES) 配列を介して標識タンパク (LacZ, EGFP など) を発現させることにより、その軸索投射の様子を可視化する事が出来る。図(A)は tau-lacZ により標識された MOR28 発現細胞の軸索投射を x-gal staining により検出した。(B)にはマウスの嗅覚系を模式的に示した。異なる種類の OR を発現する OSN を別々の色で表した。

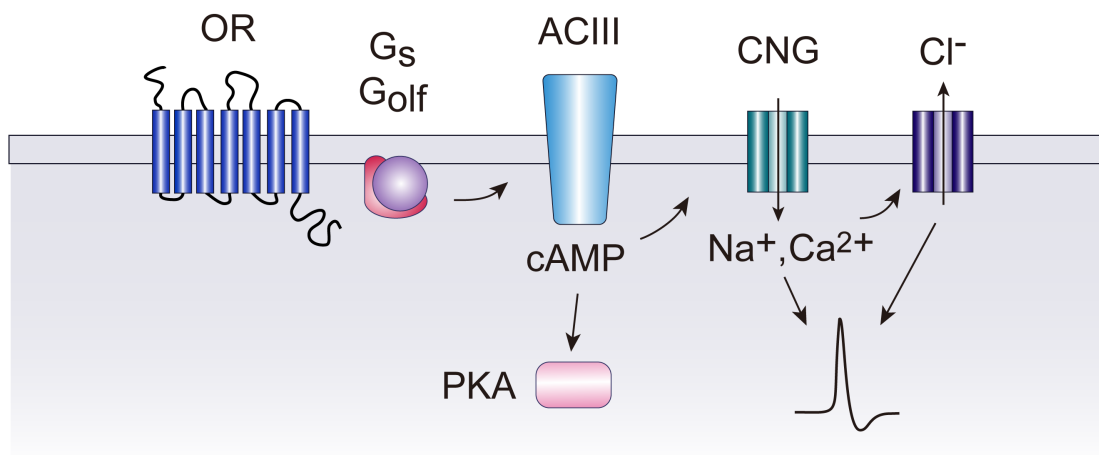


図 1-2 嗅細胞におけるシグナル伝達経路の模式図

OR がリガンドと結合した後、活動電位が生じるまでのシグナル伝達を模式的に示す。リガンドとの結合により活性化した OR は 3 量体 G タンパク質のグアニンヌクレオチド交換反応をひき起こす。GTP 結合型となった Golf の α サブユニットは、アデニル酸シクラーゼ III (ACIII) に結合し、活性化させる。この活性化により、ACIII は cAMP を合成する。産生された cAMP は cyclic nucleotide gated (CNG) チャンネルの開口をさせ、カチオンの流入、それに続く活動電位の発生をひき起こす。

第 2 章

2.1. 軸索ガイダンス分子 Nrp1 及び PlxnA1 の嗅覚系における発現パターン

今井らは、OR に依存した軸索投射位置の決定に軸索ガイダンス分子 Nrp1 が関与する可能性を報告したが (Imai et al., 2006)、軸索投射には複数の分子が関与する可能性が高く、OR 依存的に制御されるガイダンス分子は他にも存在すると考えられた。特に、軸索由来の Nrp1 タンパク質は嗅球の後方にのみ検出される (Imai et al., 2006) ことから、嗅球前方への投射を規定するような分子の存在が想定された。Xenopus の嗅覚系においては、Semaphorin レセプターである Plexin-A1 (PlxnA1) が Nrp1 と相補的に発現していることが知られている (Satoda et al., 1995、図 2-1A)。マウス嗅覚系においても同様の分子が発現し、ガイダンス分子として回路形成に関わる可能性は十分に考えられる。そこで嗅球切片に対する抗体染色及び嗅上皮切片に対する *in situ* hybridization (図 2-1B) を行い、ガイダンス分子 PlxnA1 がマウスの嗅覚系において発現しているかを調べた。その結果、OSN の軸索に由来する PlxnA1 タンパク質は、嗅球の前方で発現量が高く、後方に行くに従って低くなるという濃度勾配を作って分布していることが明らかとなった (図 2-2)。この発現分布は Nrp1 のそれと相補的である (図 2-2A)。一方、嗅上皮の OSN の細胞体で検出される *PlxnA1* 転写産物はモザイク状に分布しており、嗅上皮における細胞体の位置と転写レベルには相関がなかった (図 2-1B)。この結果は、嗅球の前後軸に沿った投射位置は、OSN の嗅上皮における位置に関わらず決まるという先行研究 (Miyamichi et al., 2005) とも合致する。

2.2. OR 依存的な Nrp1、PlxnA1 発現量の規定

Nrp1 及び PlxnA1 が OR の種類に依存した軸索投射に関与する分子である場合、これらの分子の発現量は発現する OR の種類依存的に変化するはずである。私は、この可能

性を検討する目的で、OR 遺伝子のコーディング領域を置換する実験を行った。

野生型マウスの嗅上皮において *PlxnA1* の発現を観察した場合、*MOR215-1* 発現細胞では発現量が高く、*MOR103-1* 発現細胞では低いことが判明している (図 2-3)。ノックインの手法を用い、*MOR215-1* のコーディング領域を *MOR103-1* のコーディング領域に置換したマウスを作製した (図 2-4、以下、Axel らの表記法 (Mombaerts et al., 1996; Wang et al., 1998; Feinstein & Mombaerts, 2004) に従い *MOR103-1*→*215-1* とする)。このマウスでは、*MOR215-1* プロモーターから *MOR103-1* を発現した細胞は *internal ribosome entry site (IRES)* を介して挿入した軸索マーカー *tauCFP* により標識される。同時にコントロールとして比較するため、内在性の *MOR215-1* 発現細胞を *ires-tau-GFP* により標識するノックインマウスも作製した(図 2-4A 左)。

これらのマウスについて、嗅球切片を作製し、OSN の軸索末端に局在する *PlxnA1* の発現を免疫染色により検出した (図 2-4B)。GFP-positive な *MOR215-1* 発現細胞の投射する糸球体では、*PlxnA1* の発現量が高いという内在性の *MOR215-1* 発現細胞と同様の結果が得られた。一方、同じ *MOR215-1* 遺伝子座から発現されているにも関わらず、CFP-positive な *MOR103-1* 発現細胞の投射先では、コントロールの *MOR215-1* と比較して、検出される *PlxnA1* シグナルが有意に低くなっていた (図 2-4B)。このことは、*PlxnA1* 発現量が、選択される OR 遺伝子座ではなく、発現する OR 遺伝子産物により制御されることを示唆している。また、先に述べたように OR の下流で軸索投射に関与することが示唆されている *Nrp1* の発現量は、*MOR215-1* 発現細胞では検出されず、*MOR103-1* 発現細胞では検出されるという逆の結果が観察された。これは *Nrp1* の発現が、OR の種類に依存して制御されることを示しており、今井らのモデルを支持するものである。また、ガイダンス分子の発現量の変化が観察されると同時に、*MOR103-1*→*215-1* に対応する糸球体は *MOR215-1* 発現細胞のそれと比較して嗅球後方に大きくシフトしていた (図 4)。これらの観察は、OR により一群のガイダンス分子が制御され、その発現量が軸

索投射位置を決定する上で重要な機能を果たすというモデルとよく一致する。

2.3. Nrp1 は嗅球前後軸に沿った軸索投射位置を規定する

前節までに、嗅球における軸索ガイダンス分子 Nrp1 及び PlxnA1 の発現パターンを同定し、その発現量が OR 遺伝子産物に依存した制御を受けることを明らかにした。では、実際にこれらのガイダンス分子は軸索投射に機能しているのだろうか。

これを明らかにする為には loss of function の実験が必須であるが、この際、全ての OSN から Nrp1 を欠失させてしまうと、同一個体において投射を比較できないため、Nrp1 が糸球マップ形成にどのように寄与するかを明確にできない可能性がある。理想的には、特定の OR 遺伝子を発現している OSN を 2 種類のグループに分け、一方のグループでは Nrp1 を欠失させ、他方は何も手を加えないインターナルコントロールとするのが望ましい。これを実現する為に、竹内らが開発したモザイク解析の系、H-Cre システムを用いた (Takeuchi et al., 2010)。この解析系は、OR 遺伝子プロモーターの活性化が確率的なプロセスであることと、OR 遺伝子のコーディング領域を除き、他の遺伝子配列で置換すると、OR 分子によるフィードバックシグナルが入らないために内在性の OR 遺伝子との共発現が起こることを利用している (Serizawa et al., 2003)。図 2-5 のコンストラクト (H-Cre) において、トランスジーン中の *MOR28* プロモーターを選択し、下流の Cre リコンビナーゼを発現した OSN では、さらに別の内在性 OR 遺伝子が活性化する。一方、先に内在性の OR 遺伝子を選択した OSN では、トランスジーンが発現は起こらない。このため、H-Cre マウスと目的遺伝子の floxed マウスを掛け合わせると、同種の OR 分子を発現する OSN で目的遺伝子の発現量の異なる 2 つの集団が存在する状況を作り出すことができる。この系を用いることによって、内在性のコントロールをとりつつガイダンス分子の機能を解析できる。

今回私は H-Cre マウスと Nrp1 floxed マウスを掛け合わせ、モザイクな *Nrp1* 遺伝子欠

失マウスを作製した。このモザイク Nrp1 KO マウスにおいて、もともと Nrp1 発現量の高い MOR256-17 の糸球が形成される位置を調べた (図 2-5)。MOR256-17 は野生型マウスにおいて、嗅球の最も後方に糸球を形成する。これに対し、モザイク Nrp1 KO マウスでは、野生型と同じく嗅球後方に形成される糸球に加えて、嗅球前方に形成される異所的な糸球が観察された。また各々の糸球について Nrp1 発現量を調べたところ、嗅球後方に存在する MOR256-17 の糸球は野生型と同じく Nrp1 発現量が高いのに対し、嗅球前方に検出された MOR256-17 の糸球では Nrp1 の発現が検出されなかった。

これらの結果を踏まえると、軸索ガイダンス分子 Nrp1 は OSN の嗅球前後軸に沿った軸索投射位置を規定する分子であると考えられる。

2.4. 細胞接着分子 Kirrel2 及び Kirrel3 の嗅覚系における発現パターン

これまでに、OR 依存的に発現が制御されるガイダンス分子が、OSN の軸索を嗅球前後軸に沿った適切な位置へと配置させる上で重要な役割を果たすことを示した。この嗅球上の軸索投射位置の決定機構に加えて、哺乳類の嗅覚系には OR 依存的に起こる軸索の収斂という現象があることは序論で述べた。ここでは、芹澤らの研究によってこの軸索収斂に機能することが報告された細胞接着分子 Kirrel2 及び Kirrel3 について、第 2 章の議論に役立つ範囲で概説したい。

芹澤らは、OSN 軸索末端の収斂現象には、OR の制御下にある機能分子が存在することを仮定し、嗅上皮において OR の種類に応じて発現量の変動する遺伝子群を探索した。Kirrel2/Kirrel3 はこのような分子群として同定されたものであり、その発現が OR の制御下にあることは OR スワップの実験によっても確認されている(図 2-6)。嗅球前後軸上の位置と Kirrel2/Kirrel3 の発現量との間に明確な相関関係はなく、発現量が高い糸球と低い糸球が入れ子になったモザイク状の発現パターンを示す (図 2-7)。この発現パターンは嗅球前後軸に沿った濃度勾配をなして分布する Nrp1 や PlxnA1 とは明らかに異なっ

ている。実際に、Nrp1 発現量と Kirrel2 発現量との間に相関関係は見られない (図 2-8)。

2.5. Kirrel2 は軸索末端の最終的な分離に関わる

Kirrel2/3 や Ephrin に関しては、トランスジェニックマウスを用いた強制発現系の実験から、OSN の軸索収斂の過程に関与していることが示唆されている。今回私は同じ実験系を用いて Nrp1 と Kirrel2 の糸球マップ形成における機能を比較する目的で、H-Cre マウスと Kirrel2 floxed マウスを掛け合わせ、モザイクな *Kirrel2* 遺伝子欠失マウスを作製した。このモザイク *Kirrel2* KO マウスにおいて、もともと *Kirrel2* 発現量の高い MOR256-17 発現細胞の糸球構造を調べた (図 2-9)。モザイク *Kirrel2* KO マウスにおいて、MOR256-17 を発現する OSN は *Kirrel2* を発現するものも、*Kirrel2* を欠失するものも、その軸索を同様に嗅球後方へと投射させる。しかしながら、*Kirrel2* positive な軸索と *Kirrel2* negative な軸索は同じ糸球構造へ収斂することではなく、隣接した別個の糸球を形成した。この表現型は図 2-5 で見た Nrp1 モザイク KO の結果とは明らかに異なっている。

本章において、一連の実験結果から明らかにされた点を簡潔にまとめる。

- 軸索ガイダンスレセプター *Neuropilin-1* および *Plexin-A1*、細胞接着分子 *Kirrel2/3* の発現は、ともに発現する OR 遺伝子に依存した発現制御を受ける。
- これらの分子群は、投射先である嗅球において検出されるタンパク質の発現パターンに従い、嗅球前後軸に沿って濃度勾配をなして分布するもの (*Neuropilin-1* 及び *Plexin-A1*) と、モザイク状に分布するもの (*Kirrel2* 及び *Kirrel3*) の 2 種類に分類される。
- Nrp1、*Kirrel2* の各々のモザイク KO マウスの解析から、Nrp1 が嗅球前後軸に沿った

投射位置の規定に機能するのに対し、Kirrel2 が軸索末端の収斂に関わるという、二つの分子には機能的な違いがあるものと考えられる。

第2章の実験結果から、OR は実に多様な遺伝子発現を行っていることが明らかとなった。嗅上皮から嗅球へと至る特異的回路を構築する機構を明らかにするためには、OR がどのようにしてこれらの機能分子群を制御するのかを知る必要がある。第3章では、OR が軸索ガイダンス・細胞接着分子を制御するシグナル経路について明らかにしていく。

A

Xenopus 嗅覚系

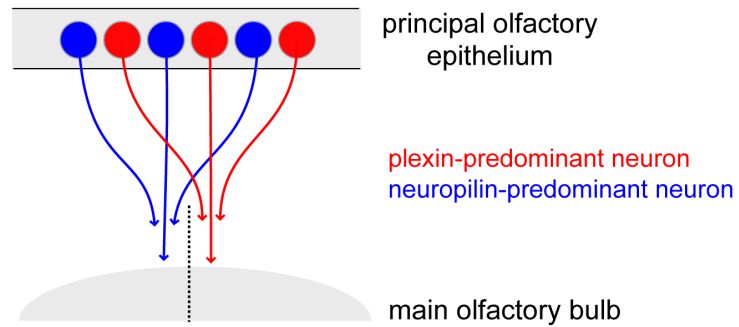
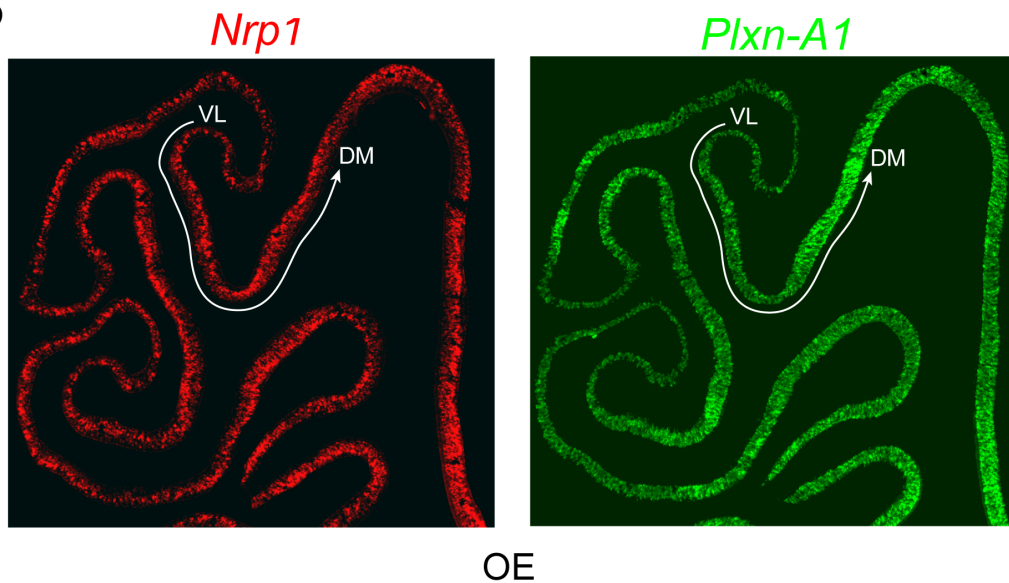
**B**

図 2-1 嗅上皮における *Nrp1* および *PlxnA1* の発現

(A) *Xenopus* 嗅覚系における軸索ガイダンス分子 Neuropilin/Plexin の発現。*Nrp* と *Plxn* は相補的に発現している。(B) 2 週令のマウス嗅上皮コロナル切片に対し、*Nrp1* および *PlxnA1* プローブを用いて *in situ hybridization* を行い、嗅細胞における *Nrp1* および *PlxnA1* mRNA を検出した。*Nrp1/PlxnA1* のシグナルは、嗅上皮においてはモザイク状に分布しており、位置的な情報を持たない。VL; ventrolateral, DM; dorsomedial.

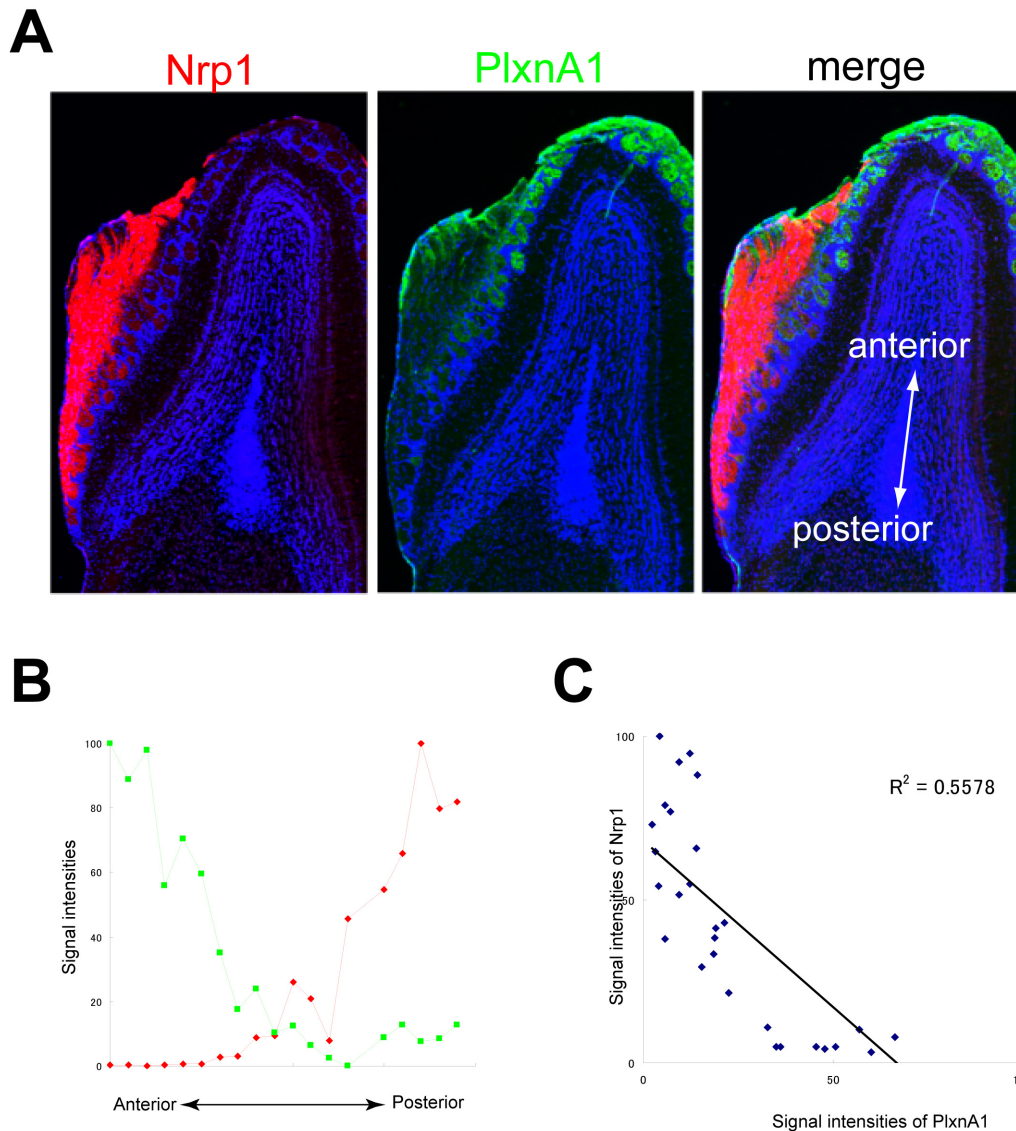


図 2-2 嗅球における嗅細胞由来の Nrp1 および PlxnA1 タンパク質の発現

(A) 嗅球水平切片に対し、抗 Nrp1 および抗 PlxnA1 抗体を用いて免疫染色を行い、OSN 軸索に由来する Nrp1 および PlxnA1 タンパクの局在を可視化した。PlxnA1 タンパク質は、嗅球の前方で発現量が高く、後方に行くに従って低くなるという濃度勾配を作って分布している。Nrp1 の発現分布はそれと相補的である。(B) 各糸球における PlxnA1 及び Nrp1 のシグナルを数値化し、嗅球前方から後方に至るまでシグナル強度がどのように変化するかプロットした。各ガイド分子の最も強いシグナル強度が 100 となるように値を標準化した。(C) 各糸球における PlxnA1 及び Nrp1 シグナルを数値化し、PlxnA1 発現量と Nrp1 発現量の間に相関関係が見られるかを検証した。PlxnA1 と Nrp1 発現量の間には負の相関関係が成り立っている。

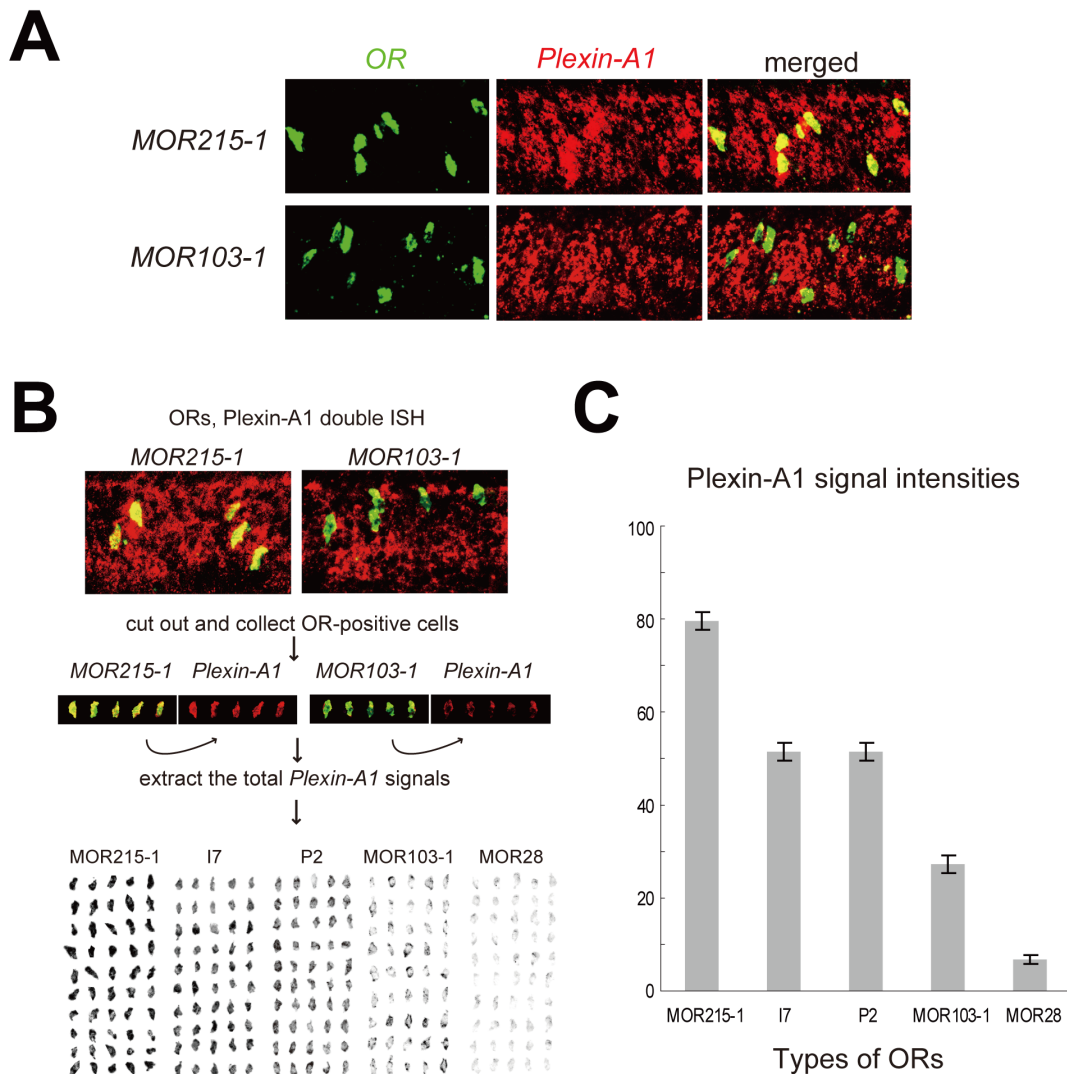


図 2-3 OR 遺伝子の種類と Plexin-A1 発現量は相関する

(A) 成獣マウスの嗅上皮において、double ISH 法を用いて OR 遺伝子と *Plexin-A1* の発現を検出した。発現する OR 遺伝子の種類と *Plexin-A1* 発現量の間には相関関係が見られる。写真に示したように、215-1 発現細胞では *Plexin-A1* 発現量が高いのに対し、103-1 を発現する細胞では *Plexin-A1* 発現量が低い。(B) 任意に選んだ 5 種類の OR 遺伝子(MOR215-1, I7, P2, MOR103-1, MOR28)と *Plexin-A1* の発現を double ISH 法で検出した。それぞれのシグナルを重ね合わせた写真から、任意の OR 遺伝子を発現する細胞(緑色)を無作為に 50 個選んで切り抜き、*Plexin-A1* のシグナル(赤色)を抽出した。これをグレースケールに変換し、Scion Image を用いてシグナル強度を測定した。その数値をまとめたグラフ (C) から、OR 遺伝子の種類と *Plexin-A1* の間に明瞭な相関関係があることがわかる。

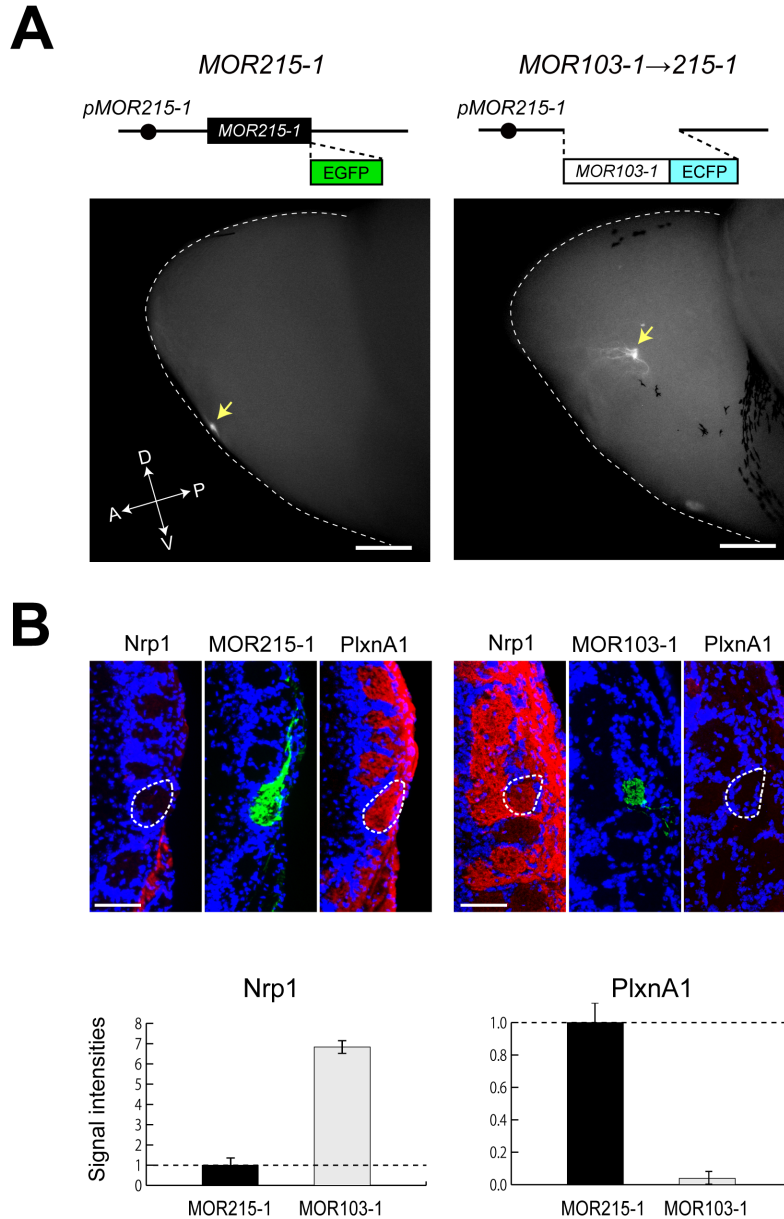


図 2-4 軸索ガイダンス分子 Nrp1 及び PlxnA1 の発現量は OR 分子により制御される
 (A) *MOR215-1-EGFP* マウス及び *MOR103-1→215-1-ECFP* マウスの嗅球を EGFP あ
 るいは ECFP の蛍光により観察した。*MOR103-1→215-1* に対応する糸球は *MOR215-1*
 に対応する糸球に比較して、嗅球の後方に大幅にシフトした。(B) 嗅球切片に対して抗
 Nrp1 抗体及び抗 PlxnA1 抗体を用い免疫染色を行った。*MOR215-1* 発現細胞に対応する
 糸球においては Nrp1 発現量が低く、PlxnA1 発現量が高い。これに対し、*MOR103-1*
 発現細胞に対応する糸球においては Nrp1 発現量が上昇し、PlxnA1 発現量が低下してい
 た。*MOR215-1* における発現量が 1 になるように標準化し、相対的なシグナル強度を比
 較した。D, dorsal; V, ventral; A, anterior; P, posterior. (A)におけるスケールバーは 500
 μm , (B)においては 100 μm .

H-Cre×Nrp1 floxed

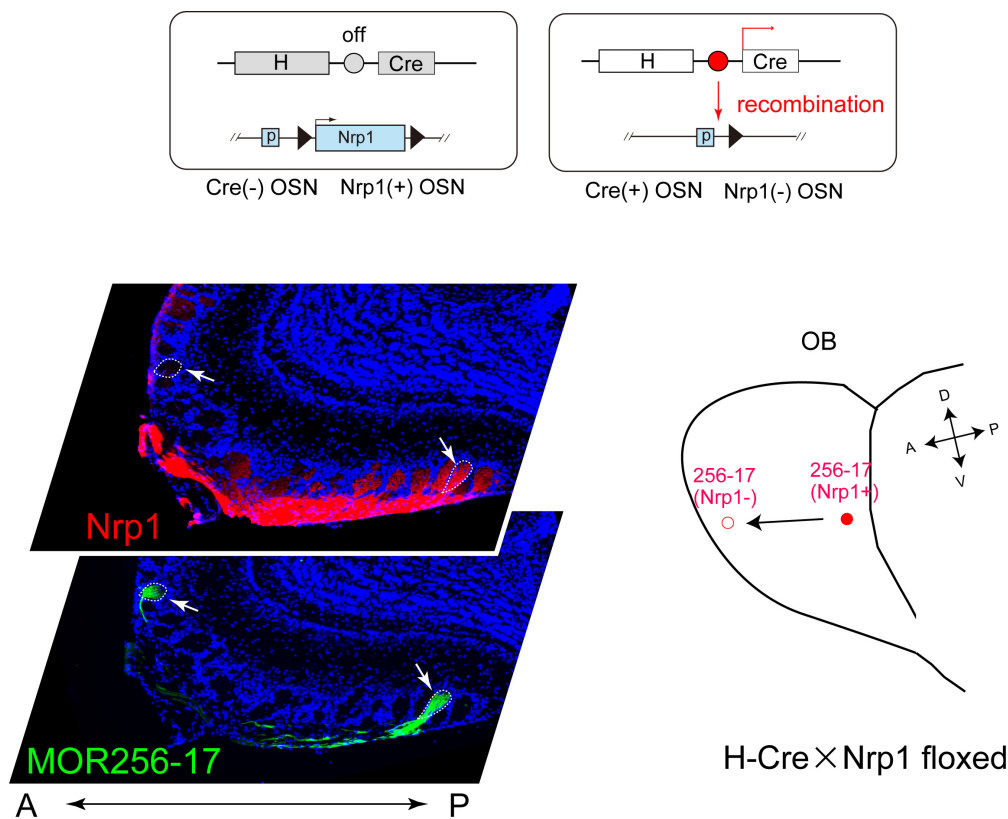


図 2-5 Nrp1 モザイクノックアウトマウスの解析

H-Cre マウスと Nrp1 floxed マウスを交配することにより、一部の嗅細胞で Nrp1 がノックアウトされたモザイクノックアウトマウスを作製した。このマウスでは、特定の嗅覚受容体(MOR256-17)を発現する OSN で、Nrp1 positive なものと Nrp1 negative なものの二つの集団が存在している。

このマウスの嗅球切片を作製し、抗体染色により MOR256-17 発現細胞の投射先を同定した。同時に、連続切片について免疫染色を行い、投射先における Nrp1 発現を検出した。MOR256-17 を発現し、Nrp1 を発現する OSN は嗅球後方に糸球を形成させる。一方、同じ MOR256-17 を発現しても、Nrp1 を欠損する OSN は嗅球前方に糸球を形成した。右に糸球形成の位置を模式的に示す。

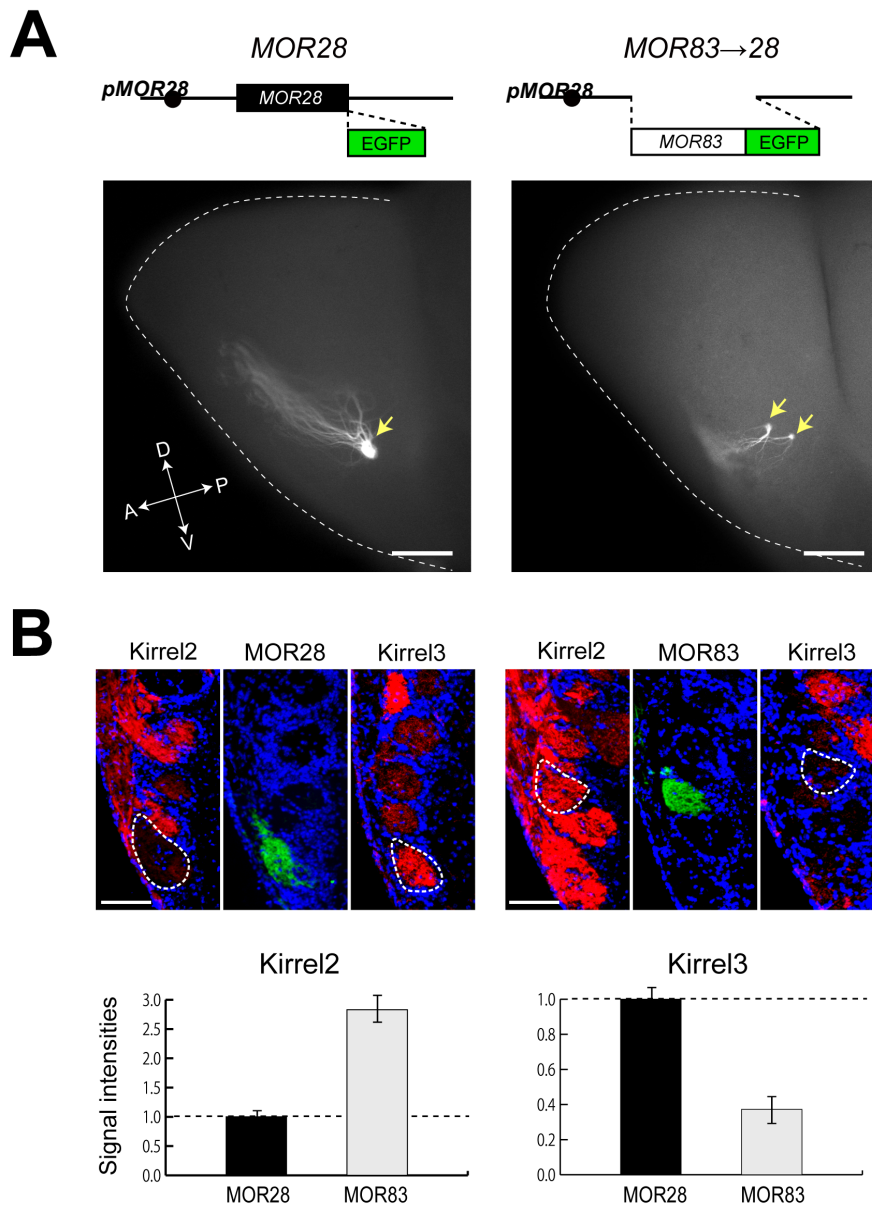


図 2-6 細胞接着分子 Kirrel2 及び Kirrel3 の発現量は OR 分子により制御される

(A) Tg *MOR28-EGFP* マウス及び Tg *MOR83→28-EGFP* マウスの嗅球を EGFP の蛍光により観察した。*MOR83→28* に対応する糸球は *MOR28* に対応する糸球と嗅球の後方に投射しており、投射位置が大きく異なるということはない。(B) 嗅球切片に対して抗 Kirrel2 抗体及び抗 Kirrel3 抗体を用い免疫染色を行った。*MOR28* 発現細胞に対応する糸球においては Kirrel2 発現量が低く、Kirrel3 発現量が高い。これに対し、*MOR83* 発現細胞に対応する糸球においては Kirrel2 発現量が上昇し、Kirrel3 発現量が低下していた。*MOR28* における発現量が 1 になるように標準化し、相対的なシグナル強度を比較した。D, dorsal; V, ventral; A, anterior; P, posterior. (A)におけるスケールバーは 500 μm , (B)においては 100 μm .

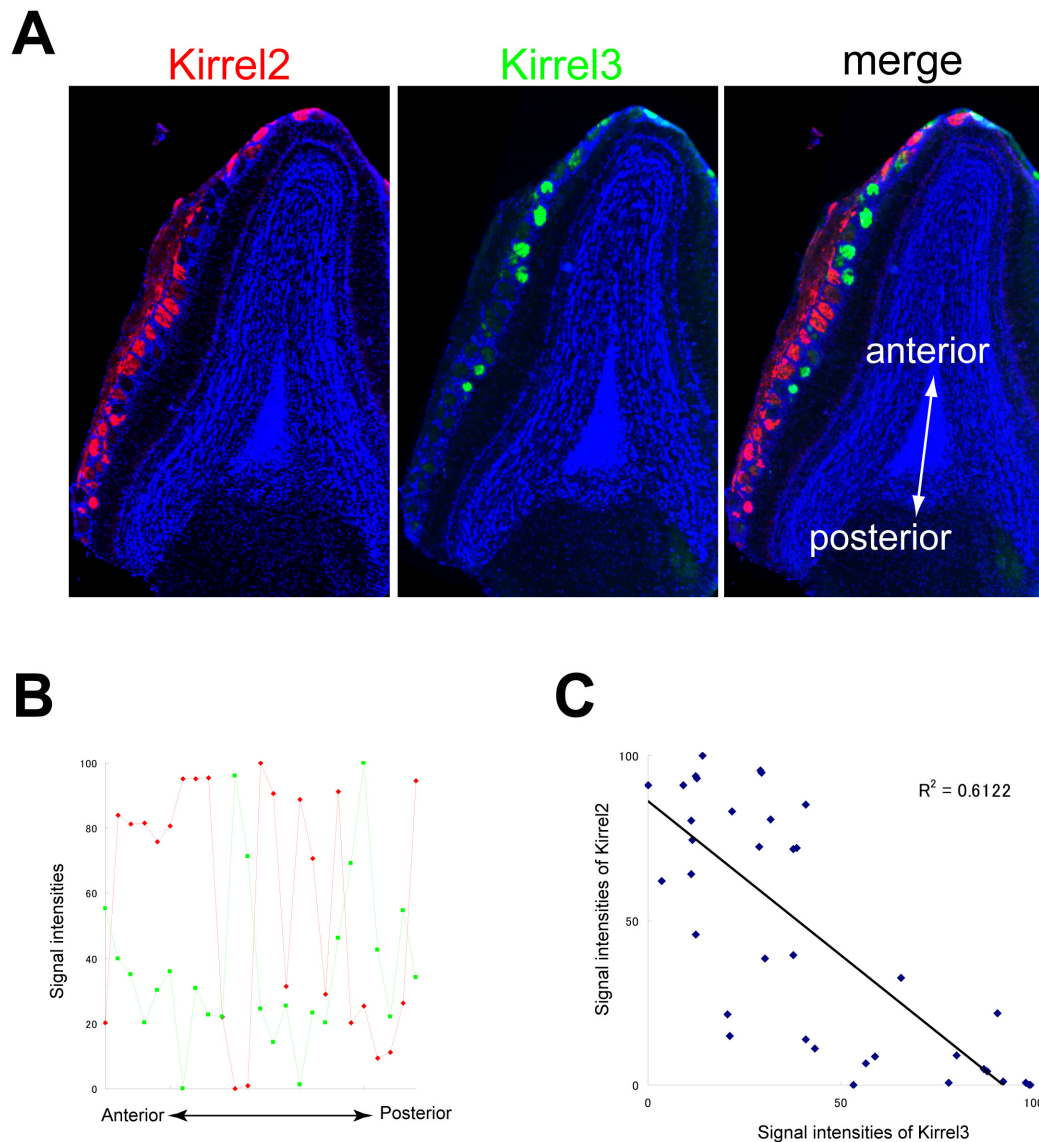


図 2-7 嗅球における嗅細胞由来の Kirrel2/Kirrel3 タンパク質の発現

(A) 嗅球水平切片に対し、抗 Kirrel2 および抗 Kirrel3 抗体を用いて免疫染色を行い、OSN 軸索末端における Kirrel2 および Kirrel3 タンパクの局在を可視化した。Kirrel2、Kirrel3 はモザイクかつ相補的な発現分布を示す。(B)各糸球における Kirrel2 及び Kirrel3 のシグナルを数値化し、嗅球前方から後方に至るまでシグナル強度がどのように変化するかプロットした。各ガイドンス分子の最も強いシグナル強度が 100 となるように値を標準化した。(C)各糸球における Kirrel2 及び Kirrel3 シグナルを数値化し、Kirrel2 発現量と Kirrel3 発現量の間に相関関係が見られるかを検証した。Kirrel2 と Kirrel3 発現量の間には負の相関関係が成り立っている。

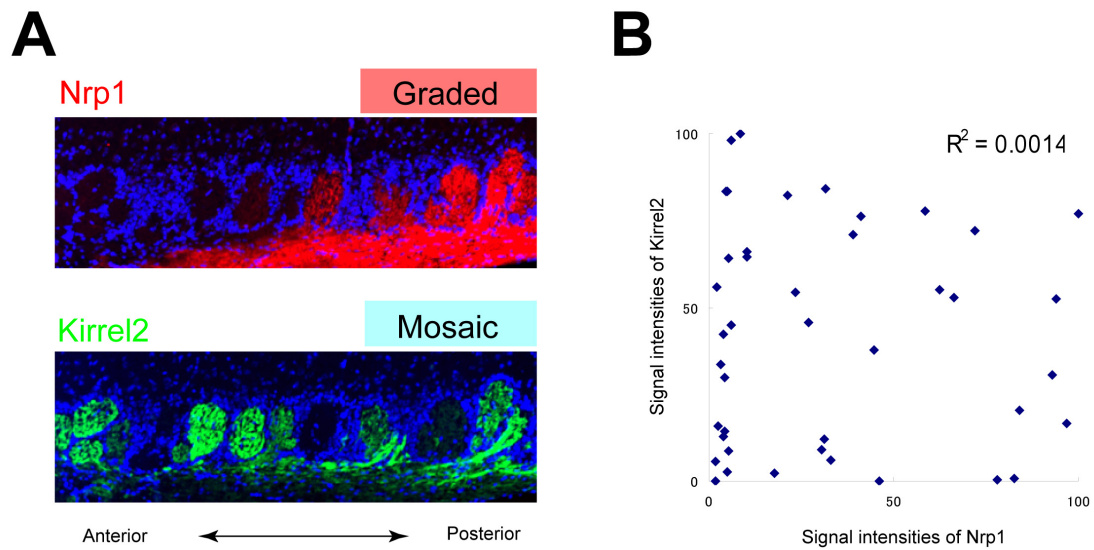


図 2-8 Nrp1 発現量と Kirrel2 発現量は相関しない

(A)嗅球切片に対し、抗 Nrp1 及び抗 Kirrel2 抗体を用いて免疫染色を行い、軸索末端におけるこれらのタンパク質の分布を可視化した。Nrp1 は嗅球の前後軸に沿った濃度勾配をなして分布するのに対し、Kirrel2 は位置情報とは関係なくモザイク状の分布を示す。(B) 各糸球における Kirrel2 及び Nrp1 シグナルを数値化し、Kirrel2 発現量と Nrp1 発現量の間に相関関係が見られるかを検証した。Kirrel2 と Nrp1 発現量の間には相関関係がない。抗体染色シグナルの数値化にあたっては、最も強い糸球のシグナルを 100、バックグラウンドが 0 となるように標準化を行った。

H-Cre×Kirrel2 floxed

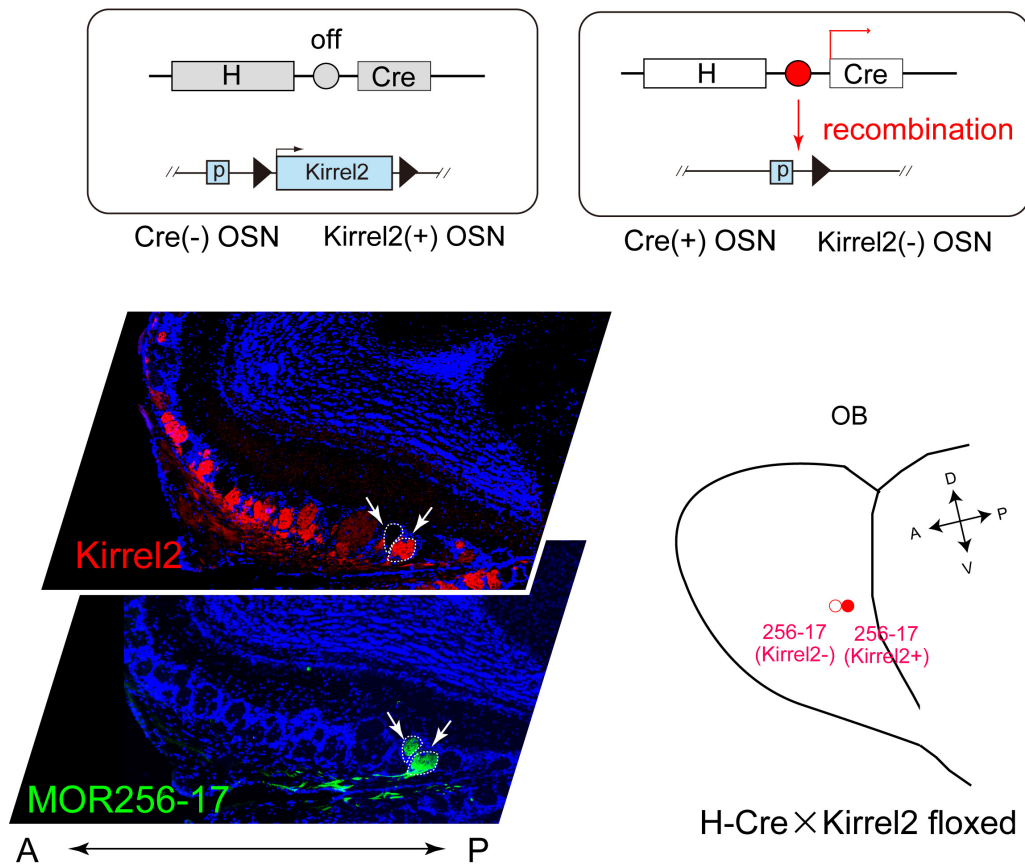


図 2-9 Kirrel2 モザイクノックアウトマウスの解析

H-Cre マウスと Kirrel2 floxed マウスを交配することにより、一部の嗅細胞で Kirrel2 がノックアウトされた Kirrel2 モザイクノックアウトマウスを作製した。このマウスでは、特定の嗅覚受容体(この場合 MOR256-17)を発現する OSN で、Kirrel2 positive なものと Kirrel2 negative なものの二つの集団が存在している。このマウスの嗅球切片を作製し、抗体染色により MOR256-17 発現細胞の投射先を同定した。同時に、連続切片について免疫染色を行い、投射先における Kirrel2 発現を検出した。

MOR256-17 を発現する Kirrel2 positive な軸索と Kirrel2 negative な軸索は同じ糸球構造へ収斂することはなく、隣接した別個の糸球を形成した。右に糸球形成の位置を模式的に示す。

第 3 章

第 2 章においては、Nrp1 及び PlxnA1 といった嗅球の前後軸に沿った軸索投射位置を規定する軸索ガイダンス分子、また Kirrel2/Kirrel3 に代表される最終的な軸索末端の分離に機能する細胞認識分子の発現量が、個々の OSN で発現する OR 遺伝子の種類に依存して規定されることを明らかにした。では、OR は如何にしてそれら分子の発現量を制御しているのだろうか。

序章で述べたように、匂い分子が OR 分子に結合すると、G タンパク質を介して ACIII が活性化され、セカンドメッセンジャーである cAMP が産生される。これにより CNG チャネルが開口し、活動電位の発生にいたる。OR に依存した軸索投射に関わる分子について、今井らは OR の下流にあると考えられるシグナル伝達の構成要素を改変したマウスを解析し、G タンパク質から cAMP を介し PKA を活性化するシグナル経路が *Nrp1* の発現量を規定するというモデルを提唱している (Imai et al., 2006)。

一方、芹澤らは、OR 依存的に制御され、最終的な軸索末端のより分けに機能する分子の発現は、OR から CNG チャネルを介した神経活動による制御を受けることを明らかにしている (Serizawa et al., 2006)。

これらの研究から、糸球地図形成に機能する分子には、二つのカテゴリーがあることが予想される。すなわち、嗅球上で濃度勾配をなして分布する、軸索投射にかかわる分子群と、モザイク状に分布し、軸索の選別に機能する分子群である。これらの発現制御に関して注目すべき点は、双方のシグナル伝達経路は共通のセカンドメッセンジャーとして cAMP を用いているのにも拘わらず、分子の発現パターンの多様性を生み出していることである。

本章では、軸索ガイダンス分子群の発現を制御する OR のシグナリングメカニズムを説明し、糸球地図形成における意義について考察する。

3.1. OR による軸索ガイダンス分子の多様な制御

OR の種類特異的に発現が制御され、糸球地図形成に機能する分子には、二つのカテゴリーがあることが予想される。すなわち、嗅球上で濃度勾配をなして分布する、軸索投射にかかわる分子群と、モザイク状に分布し、軸索の選別に機能する分子群である (図 3-1)。第一章で述べたように、軸索ガイダンスレセプターとして知られる Neuropilin-1 (Nrp1) 及び Plexin-A1 (PlxnA1) は、OSN の軸索末端に発現しており、嗅球前後軸によって相補的なグラジエントを形成している。トランスジェニックマウスのシステムを用い、OSN における Nrp1 の発現レベルを増減させた実験系から、この分子が OSN の前後軸に沿った糸球形成位置を規定するうえで必須の分子であることが示されている (Imai et al., 2009)。一方、細胞認識分子である Kirrel2 及び Kirrel3 は軸索末端において糸球特異的なモザイクパターンを示す。OSN の一部でこれらの分子を強制発現させる gain-of-function の実験あるいはモザイクノックアウトの実験から、これらの分子が同種の OR を発現する OSN の軸索末端を特定の糸球構造に収斂させる上で重要な機能を持つことが明らかとなっている (Serizawa et al., 2006)。

アデニル酸シクラーゼ III (adenylyl cyclase type III; ACIII) は、OSN において cAMP を産生する主な酵素と考えられており、実際にこの遺伝子を欠損したマウスは匂い分子の検出ができないことが電気生理学的・行動学的実験によって示されている (Wong et al., 2000)。最近の報告から、ACIII は匂い情報の伝達ばかりではなく、糸球地図形成にも重要な役割を果たすことが示唆されている (Col et al., 2007, Chesler et al., 2007)。ACIII ノックアウトマウスにおいては、特定の OR を発現する嗅細胞の軸索投射位置が大きく影響を受けるだけでなく、軸索末端の収斂にも異常が見られる。

このノックアウトマウスにおけるガイダンス分子の発現を、ISH 法ならびに RT-PCR 法により解析した。その結果、ノックアウトマウスの嗅上皮においては、野生型マウスと比較して *Nrp1* の発現が大幅に減少し、逆に *PlxnA1* 転写量は上昇していた。同時に

Kirrel2 の発現は大幅に減少し、*Kirrel3* の転写量は上昇していた (図 3-2)。また、AC III ノックアウトマウスの嗅上皮において *Nrp2* および *Robo2* といった嗅細胞の細胞系譜依存的に制御される軸索ガイダンス分子の発現パターンには影響が見られなかった (図 3-3)。

このことから、AC III を欠損したことにより特定の細胞集団が除去され、細胞集団の構成が変化した結果として *Nrp1/PlxnA1* および *Kirrel2/3* の発現の変化が検出されたという可能性は低いと考えられる。一連の結果は、これら軸索ガイダンスと軸索収斂という糸球マップ形成に関わる遺伝子の転写制御の上流には AC III が存在しており、OR に由来する cAMP シグナルによってこれらの分子の OR 特異的発現パターンが作られることを意味している。

芹澤らがすでに報告しているように、*Kirrel2/3*, *EphA5/ephrinA5* といった軸索収斂に関わる分子は cAMP 依存的に開口する cyclic nucleotide-gated channel (CNG チャンネル) の機能に必須なコンポーネントである *CNGA2* を欠損したマウスにおいて大きく発現プロファイルが変化する (Serizawa et al., 2006)。神経活動が低下することにより *Kirrel2* および *EphA5* の発現はほとんど見られなくなり、逆に *Kirrel3* および *ephrinA5* の転写量は上昇する。しかしながら、このノックアウトマウスにおいては、*Nrp1* や *PlxnA1* といった軸索伸長に関わる分子の転写量は野生型とほとんど相違なかった (図 3-4)。このことは、*Nrp1* と *PlxnA1* の転写制御には、CNG チャンネルを介して起こるカチオンの流入、膜の脱分極が関与していないことを示唆している。

さらに神経活動が軸索ガイダンス分子・細胞接着分子の発現に与える影響を検討するため、マウスの片側の鼻孔を閉塞する実験を行った。一般的に、鼻孔閉塞の操作は、外界の匂い分子の吸入を阻害し、それにより OSN の神経発火を抑制するものと考えられている (Nakatani et al., 2003)。閉塞後 2 週間飼育し、ISH 法ならびに RT-PCR 法を用いて嗅上皮での各遺伝子の発現を解析した。この結果、*Kirrel2/3* の転写量の変化は

CNGA2-KO マウスと同様の傾向にあることが判明した。すなわち鼻腔閉塞の操作により *Kirrel2* の発現は大幅に減少し、逆に *Kirrel3* の転写量は上昇していた。しかしながら、この操作においても *Nrp1* と *PlxnA1* の発現量についてはほとんど変化が見られなかった (図 3-4C)。鼻孔閉塞処理の有無では成熟 OSN のマーカーである *OMP*、あるいは未成熟な OSN を示す *Gap43* の転写量には大きな差が見られないことから、遺伝子の発現パターンに OSN の入れ替わりによる影響はほぼ無いと考えられる。

外界から OSN の神経活動の状態を変化させ得るもう一つの実験系として、特定の OR を活性化される匂い環境においてマウスを飼育する実験を行うこととした。MOR29B は、BAC トランスジェニックマウス (BAC Tg-MOR29AB) の系によりその軸索が嗅球の背側領域に投射することが示されており、且つそのリガンド分子が培養細胞を用いた再構成系により複数同定されている (Tsuboi et al., 2011)。生後 5 日の時点より 2 週間にわたり新生児 BAC Tg-MOR29AB マウスを、MOR29B を活性化するリガンド群の一つである vanillin に曝露する条件下で飼育し、軸索ガイダンス分子 (*Nrp1*) 及び細胞接着分子 (*Kirrel2*) への影響を解析した。コントロールとして vanillin 非存在下で飼育したマウスにおいては、MOR29-positive な糸球の *Kirrel2* の免疫染色強度は低いのに対し、vanillin に曝露したマウスの MOR29-positive な糸球における *Kirrel2* の染色強度は上昇していた。また、vanillin に応答しない MOR28-positive な糸球の *Kirrel2* 染色強度を比較した場合には、飼育条件による変化は観察されなかった (図 3-5)。同一の実験条件において *Nrp1* の染色強度を MOR29B-positive な糸球について調べた場合には、MOR28-positive な糸球と同じように飼育条件による変化は観察されなかった (図 3-5B)。

CNGA2-KO マウスの解析、鼻孔閉塞・特定の匂い環境下での飼育実験から得られた結果を踏まえると、*Kirrel2/3* と *Nrp1*, *PlxnA1* は同じ OR-cAMP シグナルの影響下にあっても、異なる転写制御を受けていることが示唆される。

3.3. より軸索投射の過程と軸索収斂の過程を制御する OR からのシグナル機構について

て模索するが、その前に 3.2.において OSN における神経活動が糸球マップ形成に果たす役割について検証する。

3.2. OSN の神経活動による軸索末端の分離・選別

Yu らは遺伝学的な手法を用いて OSN 特異的に神経活動を阻害する実験を行い、神経活動が糸球マップ形成に与える影響の検証を行った。この実験系は、OSN 特異的な *OMP* プロモーター制御下で *ttA* を発現させ、かつ *tetracycline-responsive element* (TRE) 配列下流に目的遺伝子を導入することで、ドキシサイクリン (Dox) 非添加時に強制的に、かつ過剰に目的遺伝子を発現させる *tet-off* システムを用いている (図 3-6A)。内向き整流性カリウムチャネルである *Kir2.1* をこの実験系により強制発現させると、OSN が過剰した状態となる。このため、OSN における活動電位は匂い分子の受容によるものならず、自発的なものも含めてほぼ完全に阻害される (Yu et al., 2004)。

Yu らは、この *Kir2.1* 過剰発現マウスにおいて、個々の OR の種類に対応した OSN の軸索収斂、糸球構造形成に異常が生じる事を報告している。通常、嗅覚受容体 MOR10 を発現する OSN は嗅球の lateral 側と medial 側に一カ所ずつ糸球構造を形成する (図 3-6B)。これに対して、神経活動を阻害した場合には、MOR10 発現 OSN の軸索末端は特定の糸球構造に収斂せず、近傍の複数の糸球構造へ入り込む様子が観察される (図 3-6C)。

このように、神経活動を遮断したマウスにおいては局所的な軸索の選り分けに影響が見られたものの、嗅球前後軸に沿った大まかな軸索投射の位置には目立った変化は見られなかった (図 3-6)。さらに各ガイドランス分子・細胞接着分子の発現にどのような影響が見られるかを検証するため、野生型マウスと *Kir2.1* 過剰発現マウスの嗅上皮を ISH 法および RT-PCR 法により解析、比較した。その結果、変異マウスの OSN において細胞接着分子である *Kirrel2* の発現は大幅に減少するものの、軸索ガイドランス分子である

Nrp1 の発現には影響が見られなかった (図 3-7)。これは CNG チャネルの欠損や、鼻孔閉塞によって神経活動を減少させた場合の実験結果と同様である。

Kir2.1 過剰発現マウスと 1.1.1.における一連の実験結果を踏まえると、OR の活性化に由来する cAMP シグナルによって引き起こされる神経活動は、Kirrel2/3 といった分子の機能を介して軸索末端を糸球構造へと収斂させるプロセスに重要な役目を果たすと考えられる。同時にこれらの結果は、匂い分子に依るもの、自発的なものを含め OSN における神経活動は、軸索を嗅球のどこへ配置するかという初期投射のプロセスには影響しない事を示唆している。

3.3. OR 分子の持つリガンドに依らない基礎活性

共通のセカンドメッセンジャーである cAMP を用いているにもかかわらず、OR はどのようにして軸索ガイダンス分子と軸索分離に関わる分子の異なる発現制御を達成しているのだろうか。また、OR のどのような活性が軸索ガイダンス分子の発現制御に重要であるのか、そのシグナルの実態はこれまでに解明されていない。

OR の活性化の由来としては、大きく分けて匂い分子等を含む外部刺激によって引き起こされるものと、受容体そのものがもつ内因性の活性の二つが考えられる。初期投射のプロセスにおいて決定される大まかな軸索投射のパターンは生育環境に関わらず個体間でよく保存されているという知見を踏まえると、外部刺激に由来するシグナルが関与しているという可能性は低いと考えられた。また、3.1.で述べたように、鼻腔閉塞により匂い分子の吸入を減少させた場合、あるいは特定の匂い分子の吸引を上昇させた場合においても Nrp1/PlxnA1 の発現に変化が見られないという結果は、より直接的に外部刺激の関与を否定するものである。以上の理由から、私はリガンドに依存しない OR の自律的な活性に着目し、以降の実験を行うこととした。

典型的な G タンパク質共役型受容体 (GPCR) 活性化のモデルにおいては、アゴニストが膜内に位置するアミノ酸残基に結合することで非活性型受容体から活性型への構造変換が引き起こされると考えられている (図 3-8B) (Bond and Ijzerman, 2006; Kobilka and Deupi, 2007)。この構造変換により、受容体の細胞質側に存在する G タンパク質結合領域に G タンパク質 (G_i) が入り込み、結果として下流のシグナル伝達経路が活性化される。このような外部刺激に駆動される構造変換に加えて、GPCR はリガンド非存在下においても非活性型と活性型のコンフォメーションをとる平衡状態にあることが立体構造解析等の研究から明らかにされている。従って、外部刺激により引き起こされる活性と比較すると低いレベルではあるものの、アゴニストが存在しない状況下においても GPCR は下流のシグナル伝達経路を活性化している (Bond and Ijzerman, 2006) (図 3-8C)。この活性は basal activity あるいは constitutive activity と呼ばれ、オピオイドレセプターにおいて初めて観察されて以降、OR も含め様々な GPCR がこの活性を有することが示唆されている (Bond and Ijzerman, 2006; Kato et al., 2008; Vassart and Costagliola, 2011)。

基礎活性が OSN の前後軸に沿った軸索投射位置の規定に関与するという可能性を検討することを目的として、まず特定の OR タンパク質が培養細胞の再構成系において示す基礎活性と、その OR を発現した OSN が嗅球上に形成する糸球体の位置に相関関係が存在するかを検証した。この目的のため、遺伝学的手法あるいは免疫染色からすでに投射位置が判明している OR に加え、今回新たに軸索投射位置が前後軸に沿って異なる複数の OR を同定し、その基礎活性を測定することを試みた。

OSN で発現する OR の mRNA は、OSN の細胞体のみならずその軸索末端にあたる糸球体においても検出される (Ressler et al., 1994; Vassar et al., 1994)。この特性を利用して、嗅球の糸球体部分を繰り返し剥いて mRNA を抽出し、その cDNA を鋳型として degenerated PCR を行うことで特定の糸球体に収斂する OR の種類を同定することに成功している

(Singer et al., 1998; Yang and Marchand, 2002)。この手法を発展させ、嗅球の anterior 側に投射する OR 群と posterior 側に投射する OR 群とを同定した。具体的には、嗅球の切片を作製し、anterior 側/ posterior 側の糸球層より RNA を抽出し、縮重 PCR により OR をクローニングした (図 3-9A)。

同定した OR 中、HEK293 細胞膜表面でのタンパク質発現が認められた 30 種類の OR について、培養細胞におけるリガンドに依存しない活性を比較することとした。

齊藤らはルシフェラーゼを用いたアッセイ系を利用し、複数の嗅覚受容体に対するリガンドのスクリーニング・同定に成功している (Saito et al., 2004; Saito et al., 2009)。この実験システムは、培養細胞 (HEK293 細胞) に OR 発現ベクターと共に cAMP 産生に応じてホタルルシフェラーゼを発現するレポータープラスミド (CRE-Luc) をトランスフェクトし、受容体の活性を定量化するものである。このルシフェラーゼアッセイの系により各 OR 分子の活性をリガンド非存在下で測定したところ、その値は OR 分子に固有であり、かつ OR 分子の種類ごとに多様な値を示すことが判明した。更に、*in vitro* において測定された活性の値と嗅球上の軸索投射領域との対応を検証したところ、嗅球前方領域に投射する OR の基礎活性は低いのに対して、嗅球後方領域に投射する OR の基礎活性は有意に高いという傾向にあった (図 3-9B 及び C)。ここに見られる対応関係は、リガンドに依存しない OR の基礎活性が軸索投射の規定に指令的に働いているという仮説を支持するものである。

3.4. 基礎活性レベルが変化した変異型 β 2-AR の探索

この OR に由来する自律的基礎活性が糸球地図形成に主導的な役割を果たしているかを検証するためには、*in vivo* において OSN に発現するレセプターの basal activity レベルを段階的に変化させる実験を行うことが必須となる。しかしながら、OR については培養細胞の再構成系で生化学的性質を検証した知見が少なく、また相同遺伝子が 1000

種類と多様であることなどから、OR 配列中で basal activity に関与する機能領域を同定することが困難であった。この問題を解決するため、私は OR と相同性が高い GPCR である $\beta 2$ -アドレナリン受容体 ($\beta 2$ -AR) に着目した。 $\beta 2$ -AR は最も生化学的な機能解析が進められている GPCR であり、構造解析も盛んに行われている (Rasmussen et al., 2011a; Rasmussen et al., 2011b; Rosenbaum et al., 2009)。加えて、OR プロモーター制御下で OSN に発現させると、OR と同様に振る舞い軸索投射を制御することも報告されている (Feinstein et al., 2004)。これらの利点を利用し、basal activity に影響を与えるような変異型 $\beta 2$ -AR を同定し、その変異が OSN の軸索投射に及ぼす影響について解析を行うこととした。

近年、Brian Kobilka らの精力的な研究により、 $\beta 2$ -AR の不活性型・活性型の構造が明らかにされた (Rasmussen et al., 2011a; Rasmussen et al., 2011b; Rosenbaum et al., 2009) (図 3-8A)。私は、一連の変異体を作製するにあたって、この構造学的知見に基づき、基礎活性及びリガンドに依存した活性に影響を与えるアミノ酸残基を予測した。

膜貫通領域 (transmembrane region: TM region)、特に TM3、4、5 にはリガンド (アゴニスト及びアンタゴニスト) と静電的に相互作用する残基が集中している。また、細胞質内ループ (intracellular loop: ICL) およびカルボキシル末端 (C-terminal) には G タンパク質との相互作用の安定化・特異性に関与すると考えられる残基、受容体を不活性型に安定化させる領域 (ionic lock) が集中している (Ballesteros et al., 2001; O'Dowd et al., 1988; Savarese and Fraser, 1992)。これらの残基に突然変異を導入し、変異型 $\beta 2$ -AR のアゴニスト (10^{-5} M Norepinephrin) 刺激下での活性、及びリガンド非存在下での活性をルシフェラーゼアッセイの系によって測定した (図 3-10)。

一連の変異型 $\beta 2$ -AR の活性を野生型のそれと比較すると、変異による影響は①基礎活性のみに影響が見られるもの、②リガンド依存的な活性のみに影響が見られるもの、③双方の活性に影響が見られるもの、という 3 つのカテゴリーに分類する事が出来る (図

3-10B)。更に *in vivo* における機能を検証していくため、今回私は basal activity に影響を与える三つの変異体を利用し以降の解析を行った。327 番目のシステイン残基をアルギニンに置換した変異体 (C327R) では、野生型 β 2-AR と比較して 30 %程度に basal activity レベルが低下する。267-273 番目のアミノ酸残基を欠損させた変異型受容体 (Δ 267-273) では、basal activity のレベルが 60 %程度まで減少する。一方、268 番目のグルタミン酸残基をアラニンで置換したもう 1 つの変異体 (E268A) は、野生型と比較して約 4 倍の活性を示す恒常活性化型の変異体である (図 3-11B、左)。これらの変異体が細胞膜上に正しく配向出来る事を、HEK293T 細胞にて発現させた後、免疫染色を行うことで確認し、以降のトランスジェニックマウスを用いた実験を行うこととした (図 3-11A 及び B)。

3.5. 基礎活性による嗅球前後軸に沿った軸索投射位置の制御

今回私は OSN において OR の代わりに β 2-AR を発現させるため、今井らが同定した MOR23 発現カセットを用いた (Imai et al., 2006)。この発現カセットについて、プロモーター領域はそのままに、MOR23 コーディング領域部分を野生型 β 2-AR、あるいは 3.4. で同定した変異型 β 2-AR のコーディング領域で置換したコンストラクトを作製し、トランスジェニックマウスを得た (図 3-12)。

これらのトランスジェニックマウスの OSN において、 β 2-AR は OR プロモーター下流から発現され、軸索投射を指令することが出来た。野生型 β 2-AR を発現する OSN は嗅球 medial 側においては、ほぼ中央に糸球体を形成した (図 3-12B)。また二次ニューロンである僧帽細胞はこの糸球に対して樹状突起を伸長させており、シナプス結合を形成していることから、 β 2-AR 発現 OSN の糸球は機能的なものであると言える (図 3-12C)。

野生型 β 2-AR と同様に、先に述べた C327R、 Δ 267-273、E268A 変異体を MOR23 プロモーター制御下で OSN に発現する遺伝子改変マウスを作製した (図 3-13A)。活性が低

下する C327R 変異体を発現する OSN (赤) および Δ 267-273 変異体を発現する OSN (オレンジ) は、野生型 (白) と比較して嗅球のより前方に軸索を投射させた (図 3-13B)。これに対して、basal activity が上昇した E268A 変異体を発現する OSN の投射先 (緑) は、野生型 (白) よりも嗅球の後方に観察された (図 3-13B、右)。基礎活性の変化の度合いと軸索投射位置の変化がよく一致しているというこの観察結果は、前後軸に沿った OSN の軸索投射位置が、GPCR のリガンド非依存的な basal activity によって決定されていることを示唆している。

3.6. 基礎活性による軸索ガイダンス分子の制御

3.5. で観察された軸索投射位置の変化に加え、免疫染色によって野生型及び変異型 β 2-AR を発現する OSN における各軸索誘導分子の発現をタンパク質レベルで比較した。その結果、軸索ターゲティングに機能する分子の発現は basal activity の変異体において影響を受けることが明らかとなった。Nrp1 タンパク質の発現レベルは恒常活性型変異体 E268A において顕著に上昇し、基礎活性が低下した C327R 変異体及び Δ 267-273 変異体においては有意に減少した。逆に PlxnA1 タンパク質の発現レベルは E268A 変異体においては減少し、C327R 変異体及び Δ 267-273 変異体においては上昇していた (図 3-14)。

一方、興味深いことに、野生型 β 2-AR と basal activity を変化させた変異体との間で、Kirrel2、Kirrel3 タンパク質の発現レベルに有意な差は見られなかった (図 3-15)。

この結果は Kirrel2、Kirrel3 の発現が神経活動依存的に起こるという過去の知見と一致する。ここで得られた結果、及び鼻腔閉塞の実験から、軸索投射位置を規定する Nrp1 及び PlxnA1 と、最終的な糸球構造の形成に機能する Kirrel2 及び Kirrel3 は二つの異なる OR 由来のシグナルによって制御されていることが示唆される。

では、この二つのシグナルはどのようにして二つのカテゴリーに属する分子群を別々に発現制御しているのだろうか。同じ cAMP というセカンドメッセンジャーを用いてグ

ラジエントとモザイクという異なる発現プロファイルを作り出すためには、シグナルのクロストークが起こらないようにする何らかのメカニズムが存在すると考えられる。この機構の一つに関して次節で論じる。

3.7. 軸索ガイダンス分子の時間的制御

シグナルの混乱を避けるための機構の一つとしては、軸索投射位置の規定に関与する分子群は、OSN の発生段階の初期に発現量の決定が行われ、軸索の収斂に関与する分子群は、それよりも後のステージで発現制御を受けている、というモデルが考えられる。嗅球においてグラジエントをなして分布する分子群と、モザイク状に分布する分子群の発現制御が時間的に分離されていると仮定すると、cAMP を共通のセカンドメッセンジャーとして利用していても、シグナルのクロストークが起こることなくそれぞれ OR の種類に対応したプロファイルを作ることが可能になると考えられる。

この仮説を検証するため、胎児期から新生児期にいたる発生の段階を追って、OSN における軸索ガイダンス分子及び細胞接着分子の発現開始時期を調べた。ED13.5, ED16.5, PD0 の異なる発生段階にある個体の嗅上皮切片に対して *in situ* hybridization 法により *Nrpl*, *PlxnA1*, *Kirrel2*, *Kirrel3* の発現を解析した (図 3-16)。同時に、胎児期の各段階における個々の OSN の分化段階を知る目的で、未成熟な神経細胞のマーカーである *Gap43* と成熟細胞のマーカーである *OMP* の発現を検出した。

大まかな軸索のターゲティングに機能する *Nrpl* と *PlxnA1* は、ED13.5 の時期から未熟な OSN で発現が認められた。一方、軸索末端収斂に機能する *Kirrel2* や *Kirrel3* は、胎児期のより後期にあたる ED16.5 からサブセットの OSN で発現し始め、PD0 においては、多くの OSN で強く発現するようになる (図 3-16A)。これらの結果は、実際に *Nrpl* や *PlxnA1* の制御と *Kirrel2* や *Kirrel3* の制御が時間的に隔離されていることを強く示唆するものである。

また cAMP シグナルに関与するシグナル伝達分子、 G_s/G_{olf} 、 PKA 、 $CNG-A2$ についても発生段階における発現時期の解析を行った。その結果、 G_s 及び $PKA-C$ 遺伝子のシグナルは ED13.5 の時点で検出された。一方、 G_{olf} 及び $CNG-A2$ 遺伝子のシグナルは、より後期の ED16.5 から PD0 の段階で検出され始めた。 G_s 及び $PKA-C$ 遺伝子の発現時期が $Nrp1$ や $PlxnA1$ の発現時期と、また G_{olf} と $CNG-A2$ の発現時期が $Kirrel2$ や $Kirrel3$ の発現時期とよく一致していた (図 3-16B)。これらの観察結果から、 $Nrp1$ および $PlxnA1$ の発現と、 $Kirrel2$ および $Kirrel3$ の発現は、異なる分化段階にある OSN において、異なるシグナル伝達因子によってプロセスされた cAMP シグナルによって制御されると予想される。

3.8. 発現時期の異なる G タンパク質による糸球マップ形成の制御

この仮説をさらに機能的に検証するため、私は OSN で発現することが知られている 2 種類の G_s サブユニット、 G_s 及び G_{olf} に着目した。 G_s 、 G_{olf} はアミノ酸配列の相同性が 80 % 超と極めて高く、両者とも OR 分子と共役し AC III シグナル伝達経路を活性化するという点で生化学的機能にも大きな違いはないと考えられてきた。しかしながら、前節 2.7. でも示したように、これら二つのサブユニットは OSN におけるその発現時期が異なる。 G_s は主として未成熟な OSN で発現し、成熟に従って発現が消失する。これに対して G_{olf} は未成熟な嗅細胞では検出されないが、成熟した OSN では一様に強く発現している。この発現時期の特異性はタンパクレベルでも同様である (図 3-17A)。

このような特性を踏まえ、OSN の異なる developmental stage に発生する cAMP シグナルが糸球マップ形成に与える影響を検証する目的で、 G_s あるいは G_{olf} 遺伝子の欠失が軸索ガイダンス分子 ($Nrp1$) および細胞接着分子 ($Kirrel2$) の発現に与える影響を観察した。 G_{olf} -KO マウスにおいて、 $Kirrel2$ タンパク質の発現はほぼ完全に消失していたことから (図 3-17B)、 G_{olf} は軸索の収斂に関与する分子群の発現制御に必須であると考えら

れる。これとは対照的に、軸索投射位置の規定に関わる *Nrp1* の発現は G_{olf} の欠損では全く影響を受けていなかった。

G_s の発現は嗅組織のみならず、脳の広い領域で検出され、全身で G_s タンパクを欠失したマウス(G_s null 変異体)は ED10.5 程度で胎生致死となることが知られている (Yu et al., 1998)。この段階では嗅組織の発生が充分に進んでいないことから、通常のノックアウトでは G_s 遺伝子の欠損が糸球マップ形成に与える影響を検証することが不可能であった。この問題を解決するため、今回私は G_s -floxed マウス (Chen et al., 2005) を嗅上皮の背側領域特異的に Cre リコンビナーゼを発現する OMACS-Cre マウス (Kobayakawa et al., 2007) と交配することにより、コンディショナルノックアウトマウス (G_s -CKO マウス) を作製し、各分子の発現解析を行った。生後 0 日 (postnatal day 0; PD0) におけるこの G_s -CKO マウスの嗅球では、野生型と比較して 3 分の 1 程度まで *Nrp1* タンパク質の発現は減少していたのに対し、*Kirrel2* タンパク質の発現は全く影響を受けていなかった (図 3-17B)。この結果は、相同な機能を持ち、発生後期で発現してくる G_{olf} タンパクがある程度補完的に働くものの、未成熟な OSN で発現する G_s が軸索の大まかな位置決めに関わる *Nrp1* の発現制御にドミナントに効いている為と考えられる。一方、*Kirrel2* の発現には成熟 OSN における G_{olf} を介したシグナルが必要充分であると考えられる。加えて、 G_s 及び G_{olf} を二重に欠損したコンディショナルノックアウトマウス (G_s/G_{olf} -KO) では、嗅球背側領域において *Nrp1* 及び *Kirrel2* の発現がタンパク質レベルで完全に消失していることが確認された (図 3-17B、右)。

さらに私は、 G_s あるいは G_{olf} の欠失によって *Nrp1* や *Kirrel2* の発現が変化すると共に、糸球マップ形成のどの段階に影響が生じているかを解析した。OSN の軸索投射の特異性の変化をより明瞭な形で観察するために、各 G タンパク質のノックアウトマウスと、今井らが作製した嗅球背側領域で活性化される *MOR23* プロモーター制御下でラット *I7* (*rI7*) を発現するトランスジェニックマウスを交配した (Imai et al., 2006)。このトラン

スジーンを選択し、r17 を発現する OSN の軸索は ECFP の発現により可視化され、コントロールマウスにおいてはその投射先は嗅球背側領域に一对の糸球として観察できる。G_{olf} 欠損下で r17 を発現する OSN の嗅球前後軸に沿った投射位置は野生型と比較して変わらなかった。これは以前の Belluscio らの報告と一致する (Belluscio et al., 1998)。それに対し、G_s-KO 欠損下では、r17 発現 OSN は嗅球前方にも投射しており、複数の糸球がクラスター状に散在している様子が観察された。また、G_s、G_{olf} 二重欠損下では、r17 発現 OSN の軸索は嗅球前方にスタックしており、特定の糸球構造へと収斂する様子は観察されなかった (図 3-18)。G_s 及び G_{olf} が共に AC III を活性化する G タンパク質であることを鑑みると、G_s あるいは G_{olf} がそれぞれ特定のシグナルコンポーネントと作用している可能性は低い。未成熟な OSN における OR-cAMP シグナルが Nrp1/PlxnA1 といった軸索ガイダンス分子の発現を介して前後軸に沿った大まかな軸索ターゲティングの位置を規定し、成熟した OSN における OR-cAMP シグナルが Kirrel2/3 といった細胞接着分子の発現を介して軸索の選別の過程に寄与するといった細胞の発生段階に応じたシグナルの使い分けが起きている可能性が高いと考えられる。

ここで、第 3 章において、一連の実験により明らかにされた点を図 3-19 と以下の文章に簡潔にまとめる。

- ・ 大まかな軸索投射に関与する分子 *Neuropilin-1* および *Plexin-A1*、軸索の収斂に関わる分子 *Kirrel2/3* の発現は、ともに AC III の下流にある。
- ・ *Kirrel2/3* の発現は外界の匂い分子・神経活動の影響を受けるが、*Neuropilin-1* および *Plexin-A1* は神経活動による影響を受けない。
- ・ 嗅覚受容体は其々固有のレベルの外部刺激に依存しない基礎活性を持つ。
- ・ 嗅細胞においては、発現する G タンパク質共役型受容体を持つ基礎活性のレベルに

従って Neuropilin-1 および Plexin-A1 の発現が制御される。

- 嗅細胞の嗅球前後軸に沿った軸索投射位置は、発現する G タンパク質共役型受容体の基礎活性レベルに従って規定される。
- 大まかな軸索投射位置を規定する Neuropilin-1/Plexin-A1 は嗅細胞の未成熟な時期(図 3-19 上)に、最終的な軸索収斂に寄与する Kirrel2/3 は嗅細胞の成熟期に発現量が制御されている (図 3-19 下)。

第2章および第3章の結果から考えられるモデルと、これからの課題・展望について、次章に考察を述べる。

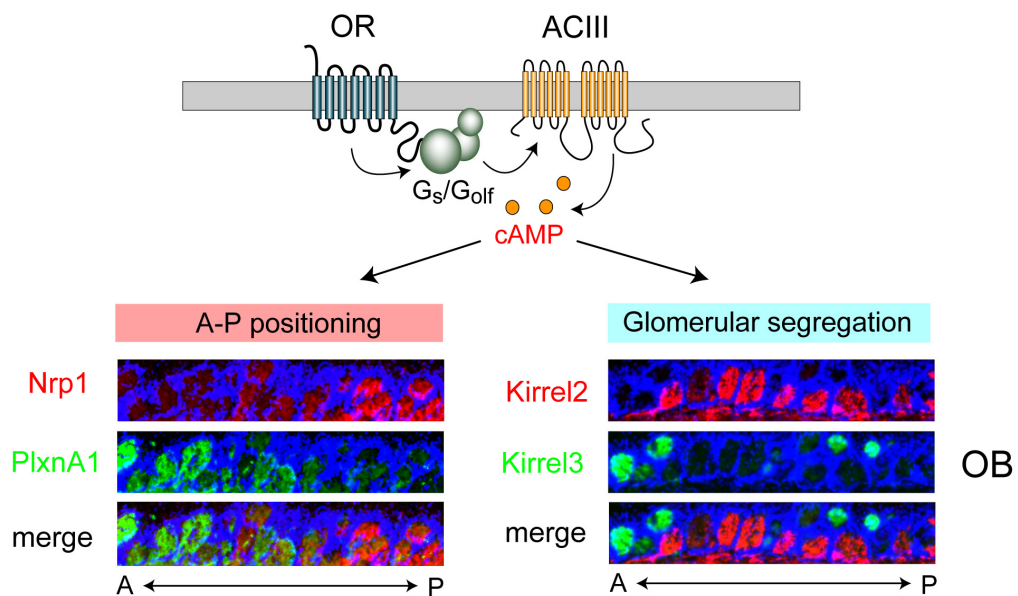


図 3-1 OR による軸索ガイダンス・細胞接着分子の多様な制御

OR の種類特異的に発現が制御され、糸球地図形成に機能する分子には、二つのカテゴリーがある。すなわち、濃度勾配をなして分布する、軸索投射にかかわる分子群と、モザイク状に分布し、軸索の選別に機能する分子群である。軸索ガイダンスレセプターNrp1 及び PlxnA1 は、OSN の軸索末端に発現しており、嗅球前後軸にそって相補的なグラジエントを形成している。一方、細胞認識分子である Kirrel2 及び Kirrel3 は軸索末端において糸球特異的なモザイクパターンを示す。

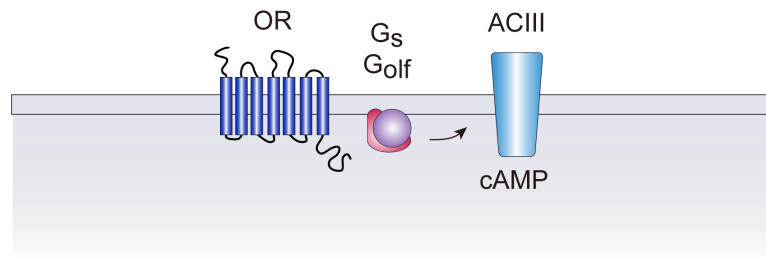
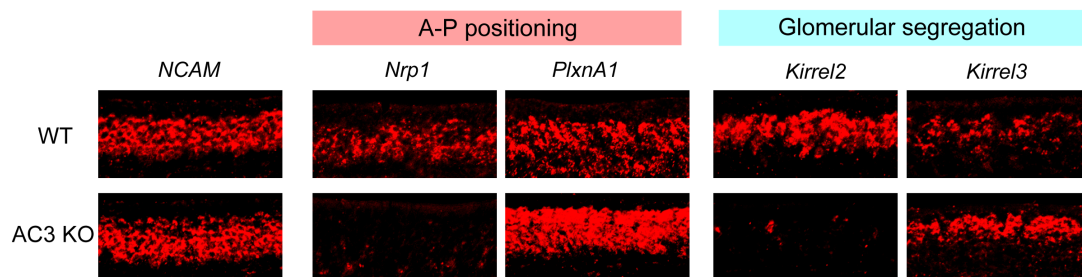
A**B**

図 3-2 AC3 ノックアウトマウスの解析

(A)OR の活性化から AC3 による cAMP シグナル伝達経路を模式的に示す。(B) AC3 ノックアウトマウスの嗅上皮について、ISH 法を用いて *Nrp1* および *PlxnA1*, *Kirrel2/3* の発現を解析した。*Nrp1* および *PlxnA1* は、AC III ノックアウトマウスにおいて、大幅にその発現パターンが変化した。*Nrp1* の発現は減少し、反対に *PlxnA1* の発現量は上昇した。同様に、*Kirrel2/3* の発現量も、AC3 ノックアウトマウスにおいて大きく変化した。*Kirrel2* は発現が大幅に減少し、反対に、*Kirrel3* は発現量が大幅に上昇した。

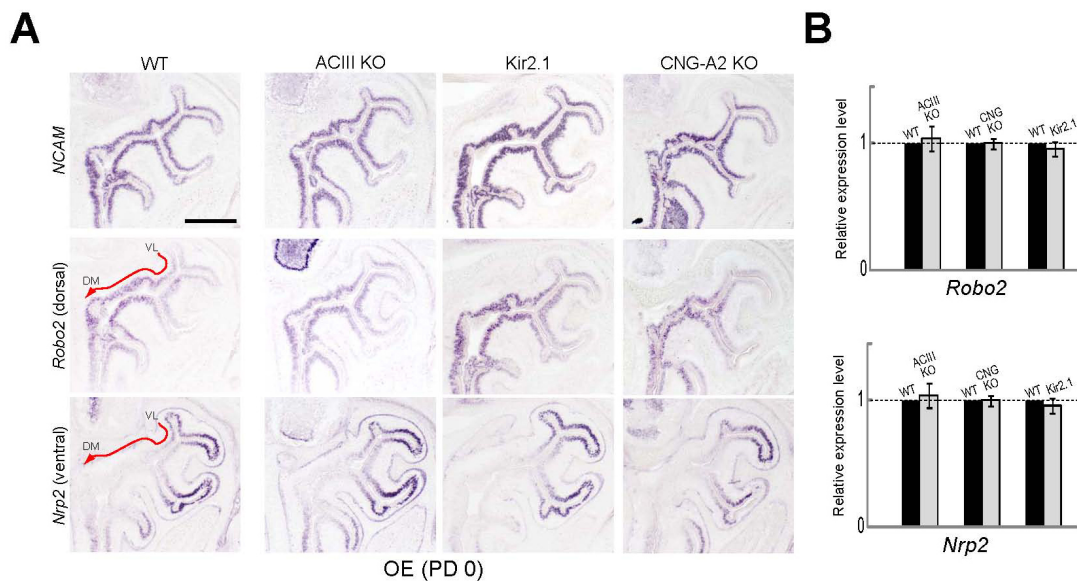


図 3-3 ノックアウトマウスにおける *Nrp2/Robo2* の発現解析

(A) AC3 ノックアウトマウス、*Kir2.1* 過剰発現マウス、*CNG-A2* ノックアウトマウスの嗅上皮について、ISH 法を用いて *Nrp2* および *Robo2* の発現を解析した。*Nrp2* および *Robo2* は、各遺伝子改変マウスにおいて、その発現パターンが変化しなかった。VL; ventrolateral, DM; dorsomedial. (B) RT-PCR により、野生型マウスと AC3 ノックアウトマウス、*Kir2.1* 過剰発現マウス、*CNG-A2* ノックアウトマウスの嗅上皮での *Nrp2* および *Robo2* の発現レベルを比較した。この手法において、各遺伝子改変マウスとコントロールマウスで *Nrp2* および *Robo2* の発現量の変化は見られなかった。グラフにおける値はコントロールマウスにおける mRNA の発現量を 1 とした時の相対的な値である。また、エラーバーは SD を示す。

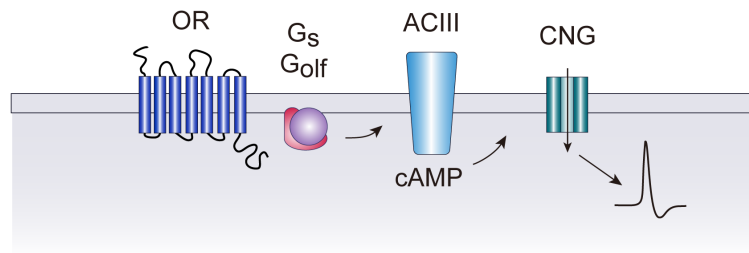
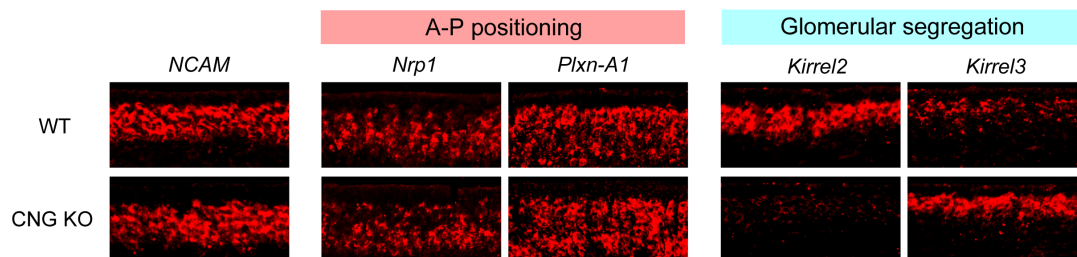
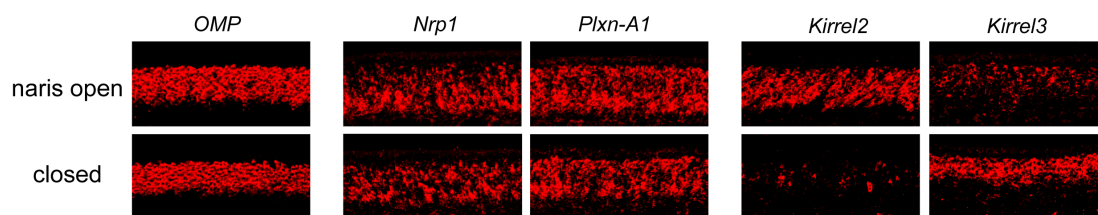
A**B****C**

図 3-4 CNG チャネルノックアウトマウス、片鼻閉塞の解析

(A) CNG チャネルの開口に至るまでのシグナル伝達経路を模式的に示す。(B) CNG ノックアウトマウスの嗅上皮について、ISH 法を用いて *Nrp1* および *PlxnA1*, *Kirrel2/3* の発現を解析した。*Nrp1* および *PlxnA1* は、CNG チャネルをノックアウトしたマウスにおいては発現量が変化しなかった。一方、*Kirrel2/3* は、CNG チャネルノックアウトマウスにおいても、発現量が大きく変化した。*Kirrel2* は発現が大幅に減少し、反対に、*Kirrel3* は発現量が大幅に上昇した。(C) 鼻腔閉塞がガイダンス分子・細胞接着分子の発現に与える影響。片鼻を閉じることによってリガンドの吸入を減らし、神経活動を抑制した場合においても *Nrp1* および *PlxnA1* 発現量は変化せず、*Kirrel2/Kirrel3* の発現が変動するという CNG チャネルノックアウトマウスと同様の傾向が観察された。

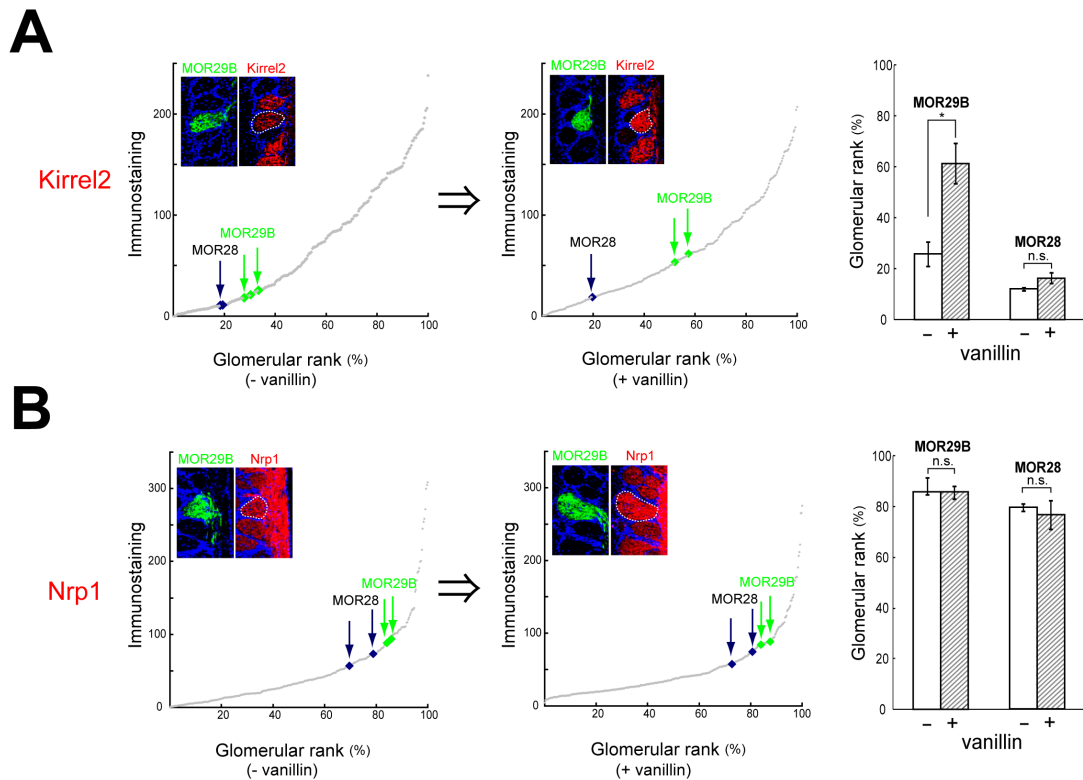


図 3-5 特定の匂い環境における軸索ガイダンス分子・細胞接着分子の発現量の変化

(A) BAC トランスジェニックマウス MOR29B-YFP (BAC Tg-MOR29B) を vanillin 存在下あるいは非存在下で二週間飼育した。MOR29B 及び MOR28 の糸球位置をそれぞれ抗 GFP 抗体及び抗 MOR28 抗体を用いた抗体染色によって同定し、隣接切片について抗 Kirrel2 抗体を用い抗体染色を行った。異なる個体間での染色強度の比較を行うため、各個体において MOR29B、MOR28 を含む 300 個の糸球の Kirrel2 染色シグナル強度を測定し、その順位付けを行った。中央値の値を 50 として各糸球の Kirrel2 シグナル強度を標準化したものをグラフに示した。(B) (A) と同様にして MOR29B、MOR28 を含む 300 個の糸球の Nrp1 染色シグナル強度を測定し、その順位づけを行った。中央値の値を 50 として各糸球の Nrp1 シグナル強度を標準化したものをグラフに示した。(A) (B) 共に vanillin 存在下で飼育するグループ、非存在下で飼育するグループ共に 4 個体ずつ解析を行った。* $p < 0.01$, Student's t-test. n.s., not significant. エラーバーは SEM を示す。

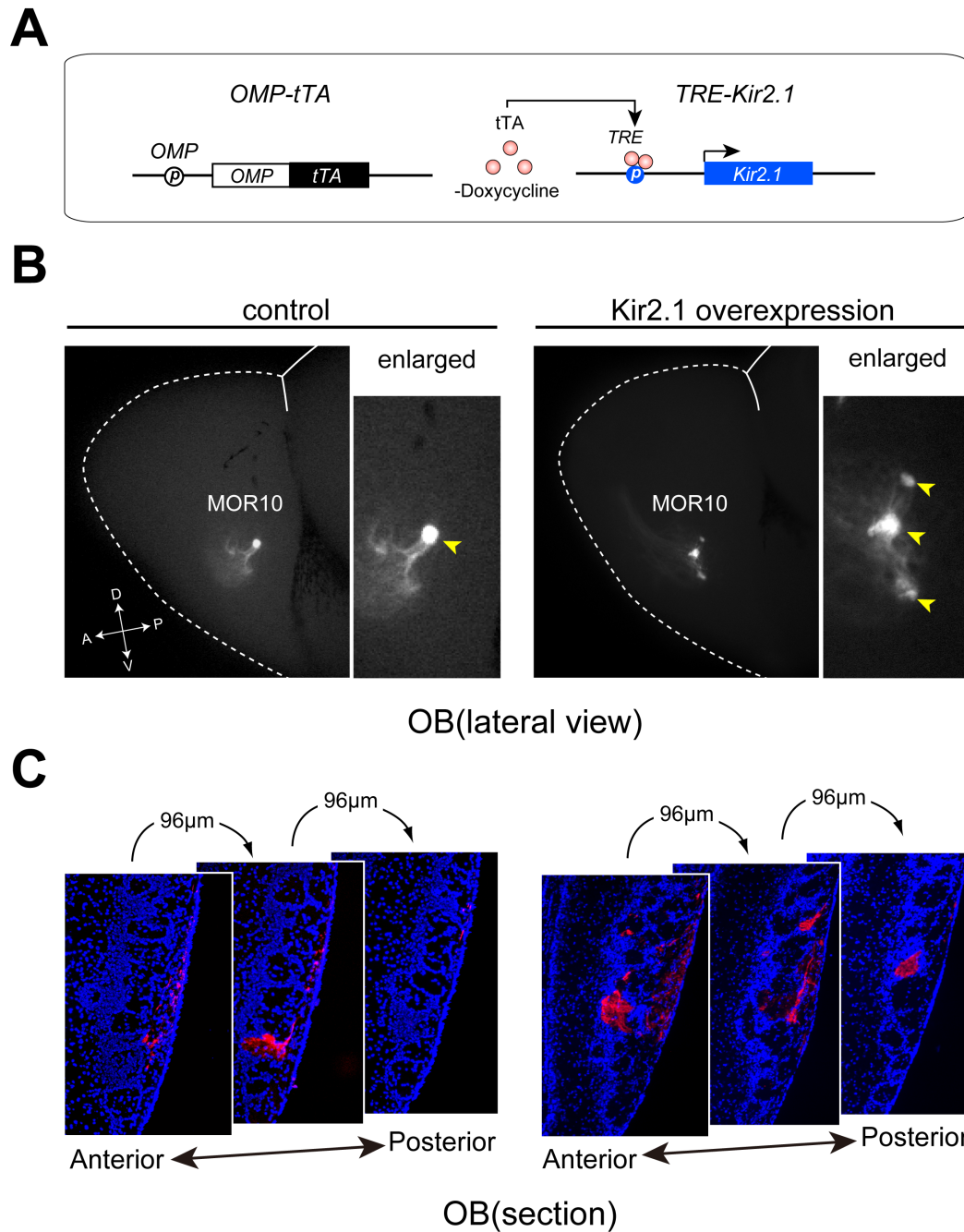


図 3-6 神経活動は軸索収斂に影響を与える

(A)遺伝学的に OSN の神経活動を阻害する為のコンストラクトの概略図。ドキシサイクリン非存在下において、OMP プロモーター制御下にある tTA の発現が誘導される。tTA が TRE 配列下流にある Kir2.1 の過剰発現を誘導する。このチャネルの過剰発現により OSN が過分極の状態になり、神経活動が阻害される。(B)および(C) MOR10 発現細胞の軸索投射を野生型及び Kir2.1 過剰発現マウスにおいて比較した。嗅球上の大まかな軸索投射位置は変わらないものの、軸索の収斂に影響が見られる。

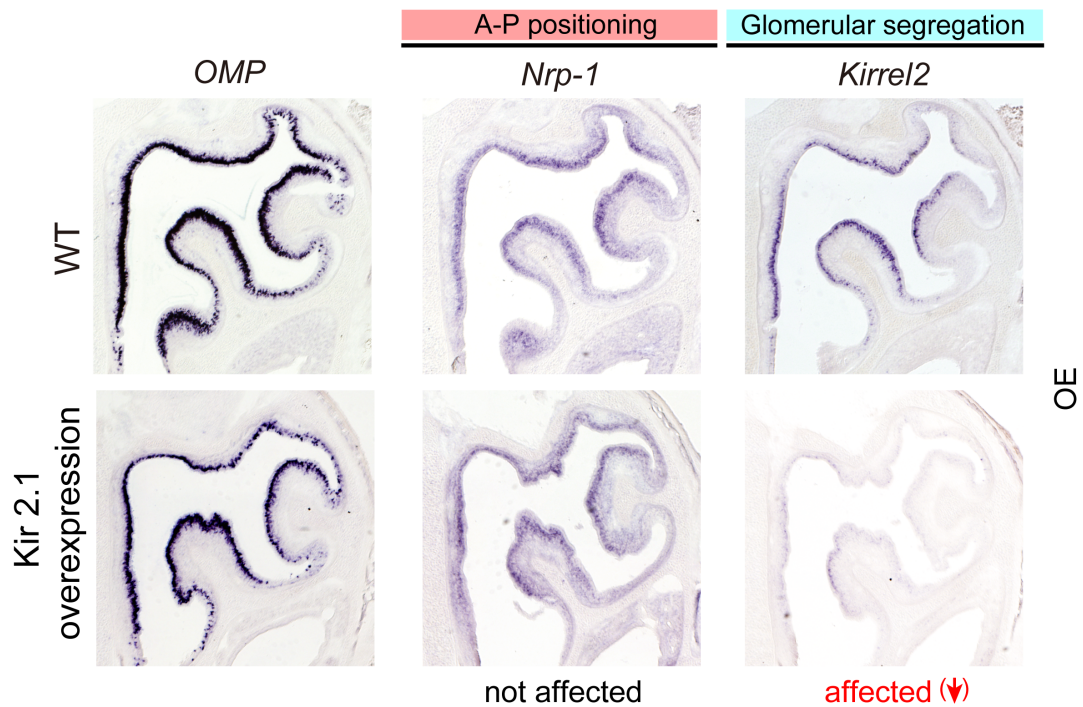


図 3-7 神経活動は糸球形成に機能する分子を制御する

生後 0 日目の野生型および Kir2.1 過剰発現マウスの嗅上皮について、ISH 法を用いて軸索ガイダンス分子 *Nrp1* および細胞接着分子 *Kirrel2* の発現を解析した。*Kirrel2* 発現量は、Kir2.1 過剰発現マウスにおいて、大幅に減少していた（右）。これとは対照的に、軸索ガイダンス分子 *Nrp1* の発現に顕著な変化は見られなかった（左）。この結果は、先に示した軸索投射の表現型と一致するものである。

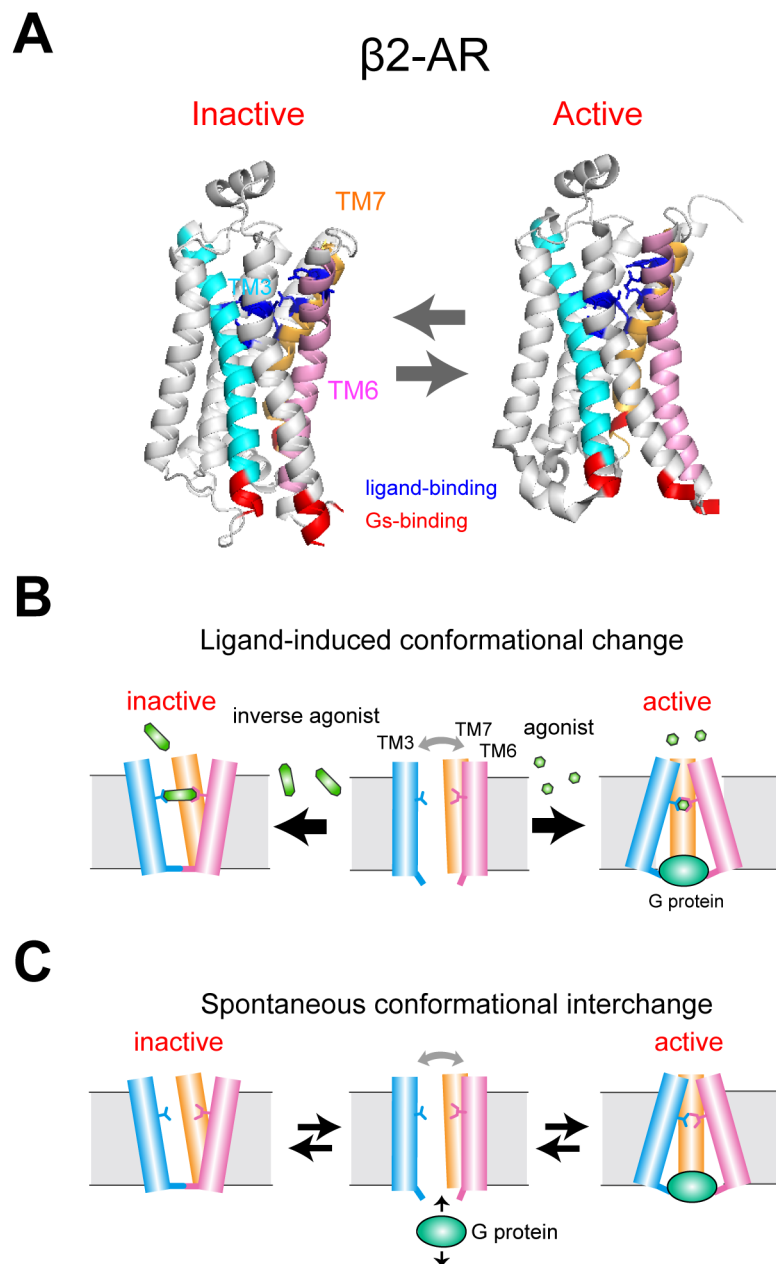


図 3-8 G タンパク質共役型受容体 (GPCR) はリガンドに依存しない基礎活性を有する

(A) GPCR は不活性型 (左) と活性型 (右) の二つのコンフォメーションを持つ。(図は Rasmussen et al.,2011 に改変を加えた) (B) 典型的な GPCR 活性型のモデル図。アゴニストが膜内領域に結合すると構造変換が起こり、受容体は活性型に安定化され、下流のシグナル伝達分子の活性化が起こる。(C) 受容体のリガンド非依存的な活性化による基礎活性発生モデル図。アゴニストの結合が無い状況においても、受容体は不活性型と活性型の両方をとる平衡状態にある。そのため、一定の割合で下流にシグナルを伝達する。

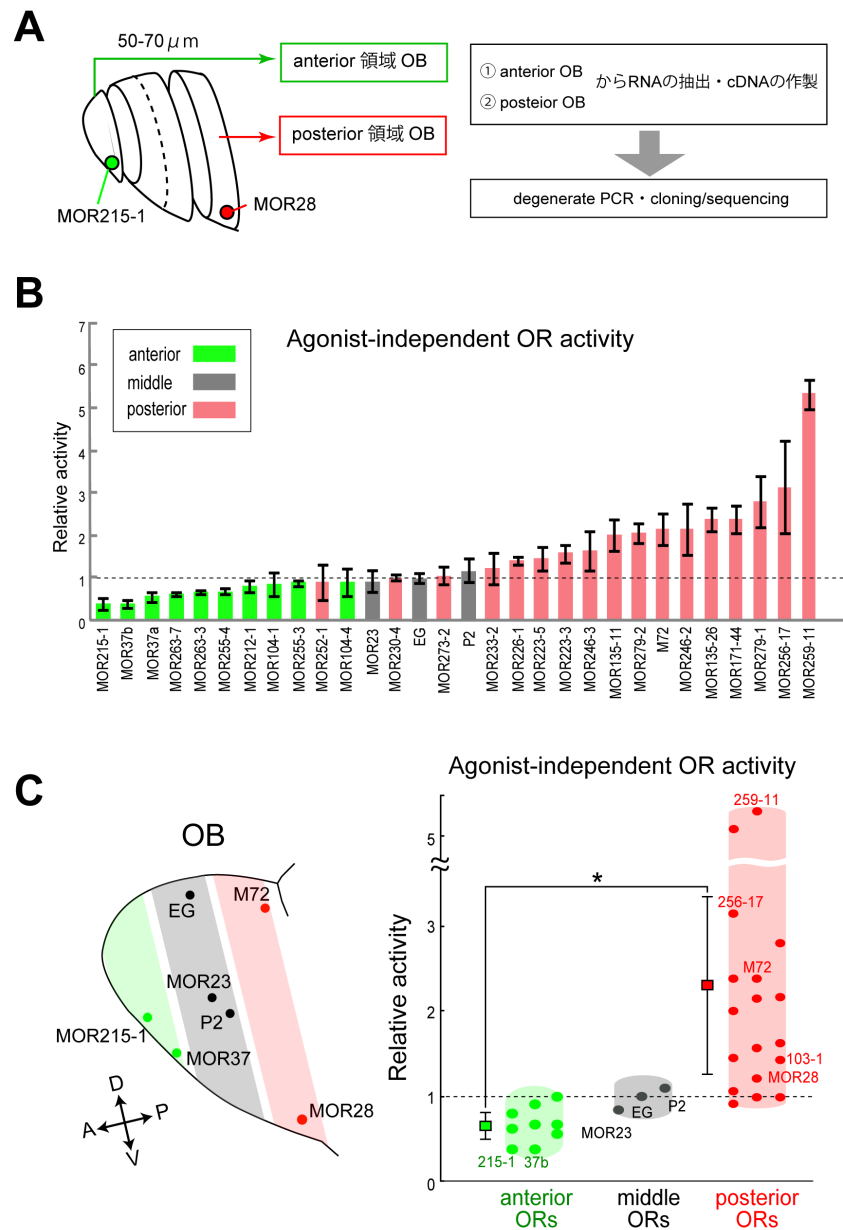
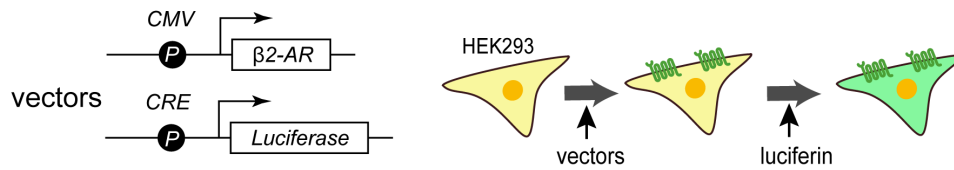


図 3-9 内在性 OR の基礎活性

(A) 2 週齢のマウスを用い、左図のように anterior から posterior にかけて 50-70 μ m 厚の coronal 連続切片を作製し、縮重 PCR を行った (B) 30 種類の内在性 OR についてリガンド非存在下の活性を測定した。嗅球 anterior (緑)、middle (灰)、posterior (赤) 領域に投射する OR のリガンド非依存的な活性をルシフェラーゼアッセイのシステムを用いて測定した。MOR-EG の活性を 1 として標準化した。(C) 相対的な活性をプロットした。エラーバーはそれぞれ anterior ORs 及び posterior ORs の活性値の SEM を示す。(Mann-Whitney U test=186.00; *p=0.05)

A



B

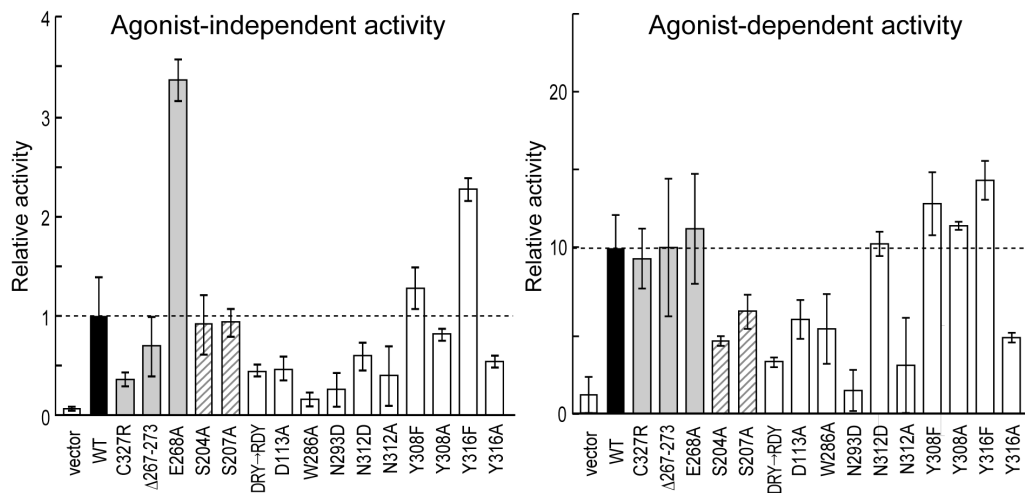
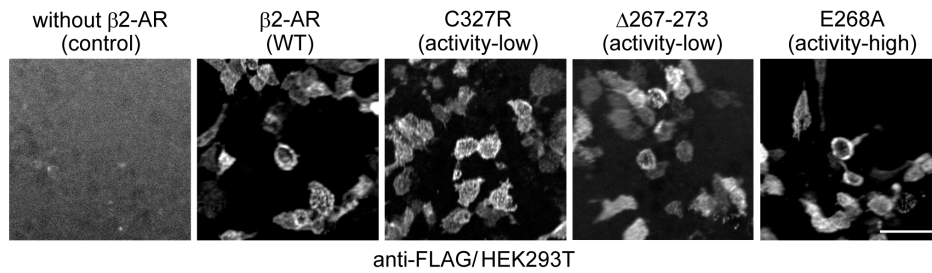


図 3-10 リガンド非依存的な基礎活性レベルが変化する変異型 $\beta 2$ -AR のスクリーニング

(A) 膜貫通領域に位置するリガンド結合残基あるいは細胞質内領域の残基を置換あるいは欠損させた変異型 $\beta 2$ -AR を作製した。CMV プロモーター制御下で野生型あるいは変異型 $\beta 2$ -AR を発現させるプラスミド、cAMP responsive element (CRE) 制御下で Luciferase を発現するレポータープラスミドの双方を HEK293 細胞にトランスフェクトした。このシステムにより、リガンド依存的/非依存的な cAMP 産生量が cAMP 依存的に上昇するルシフェラーゼの活性により定量できる。(B) 野生型および変異型 $\beta 2$ -AR についてリガンド非存在下、存在下の活性をルシフェラーゼアッセイのシステムを用いて測定した。野生型 $\beta 2$ -AR 活性の基礎活性を 1 として標準化した相対的活性を示す。エラーバーはそれぞれの活性値の SD を示す。

A



B

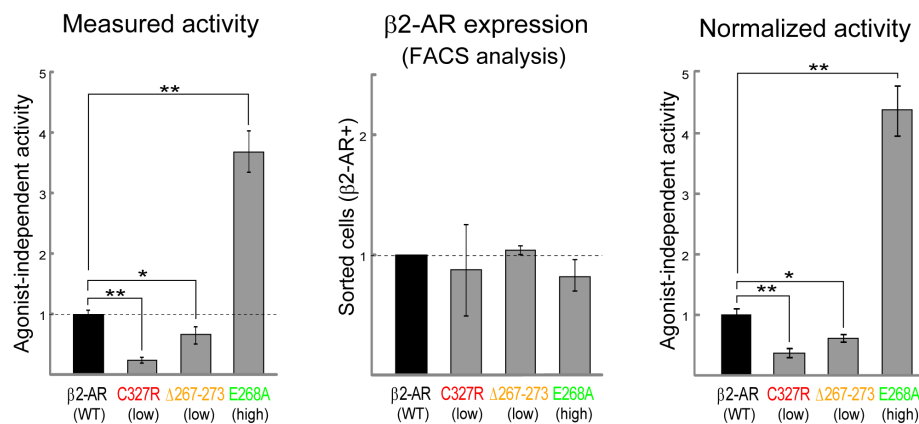


図 3-11 変異型 β 2-AR の膜発現

(A) 特に基礎活性のみに変化が見られた変異型レセプターについて、培養細胞上での膜発現量を調べた。齊藤らの方法に従い、細胞を固定・permialize なしに抗 FLAG 抗体を用いて染色した。Vector のみをトランスフェクトした細胞ではシグナルは検出されなかったが、野生型あるいは変異型 β 2-AR を発現させた細胞ではシグナルが検出され、コンストラクト間での発現量の差は殆ど無かった。(B) 基礎活性の標準化。野生型あるいは変異型 β 2-AR を発現させた培養細胞を FACS により解析し、受容体タンパク質の膜発現量を定量化した。基礎活性の測定値 (左) を膜発現量(中)によって標準化し、コンストラクト間での活性の違いをグラフ化した (右)。グラフ化するに当たっては、野生型 β 2-AR の活性を 1 とした相対的な活性/発現量を示した。グラフ中のエラーバーは SD を示す (n=8)。* $p<0.01$, ** $p<0.001$ (Student's t-test)。

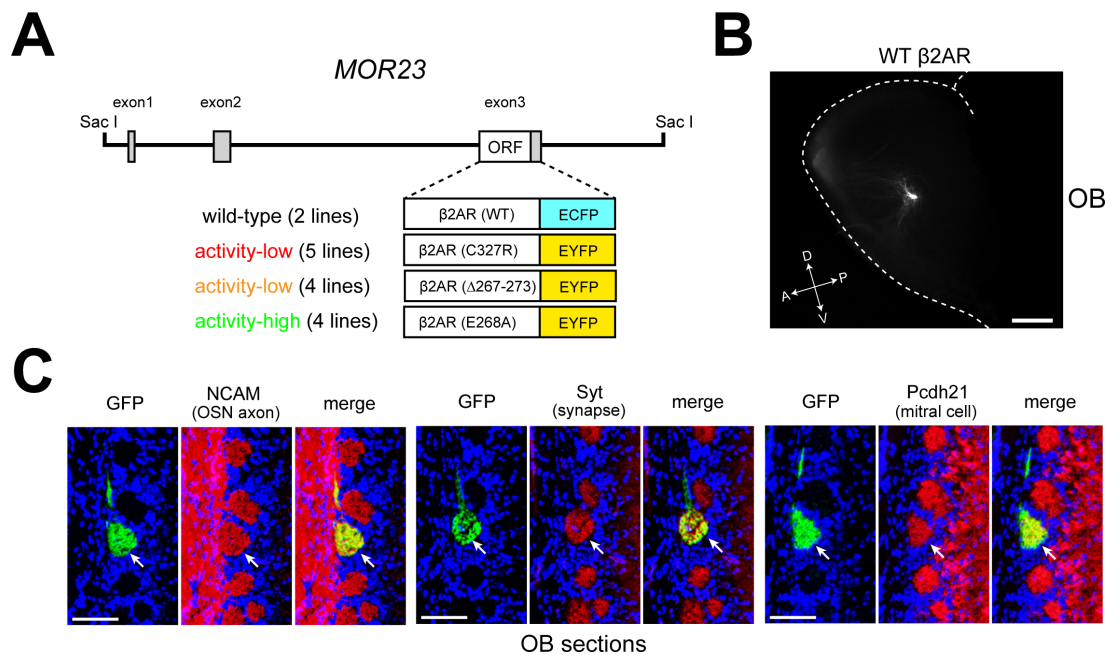


図 3-12 β2-AR 依存的な OSN の軸索投射

(A) OR プロモーター下流からβ2-AR を発現するトランスジェニックマウス作製のためのミニジーンコンストラクトを模式的に示す。OSN において OR の代わりにβ2-AR を発現させるため、*MOR23* 発現カセットを用いた。*MOR23* のコーディング領域を野生型あるいは変異型 β2-AR のコーディング配列で置換した。トランスジーンを発現する OSN の軸索を可視化するため、コーディング領域下流に *IRES-gapC/YFP* 配列を挿入した。(B) *pMOR23-β2-AR* (wild-type) マウスの嗅球のホールマウント蛍光画像。β2-AR を発現する OSN の軸索が投射する糸球体は嗅球 medial 側のほぼ中心に観察される。(C) *pMOR23-β2-AR* (wild-type) マウスの嗅球切片を抗 GFP 抗体と各種のマーカーとなるタンパクに対する抗体を用いて染色した。NCAM (OSN 軸索のマーカー)、synaptotagmin (Syt, シナプスマーカー) 及び Pcdh21 (僧帽細胞のマーカー)。(B) におけるスケールバーは 500 μm、(C) においては 100 μm。

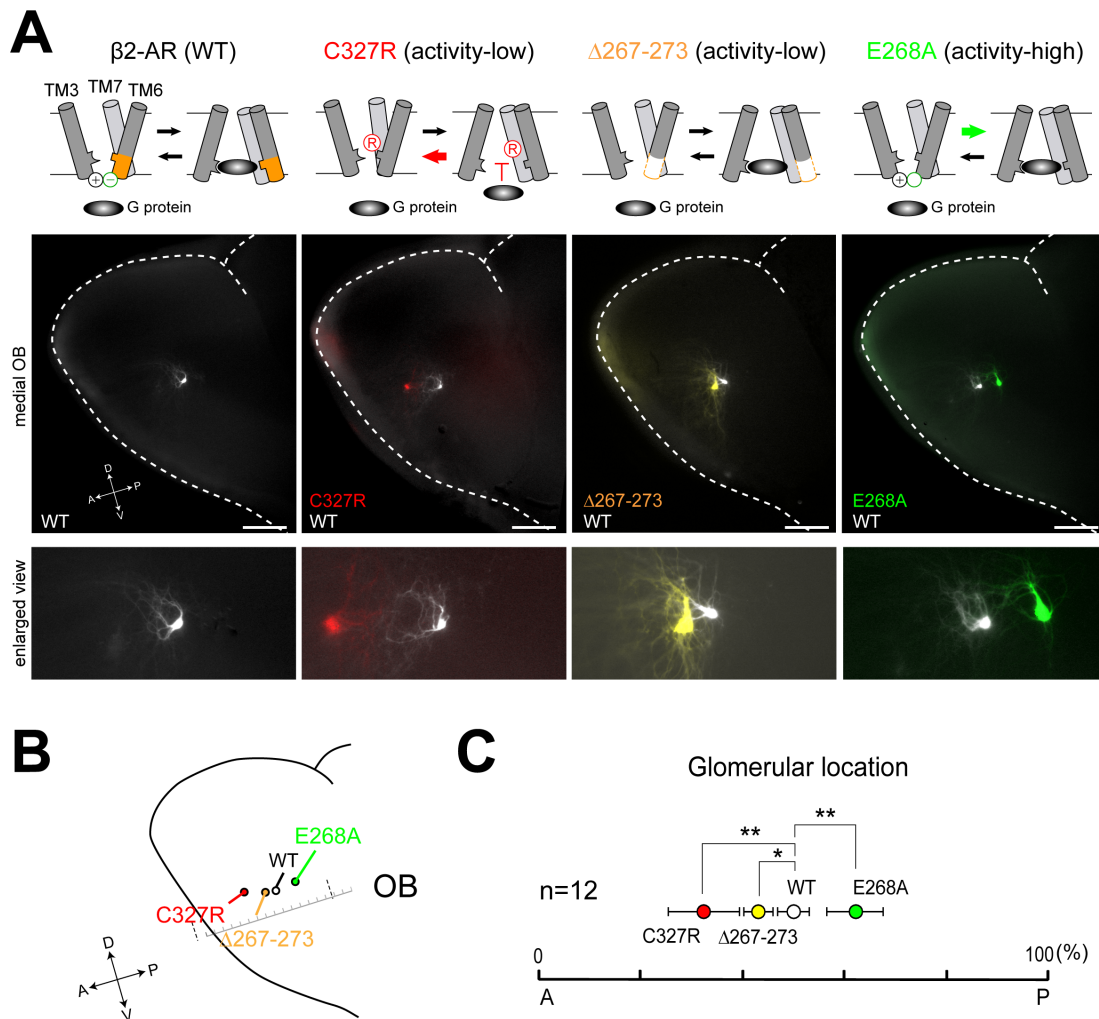


図 3-13 $\beta 2$ -AR の basal activity が嗅球の前後軸に沿った糸球形成位置を制御する

(A)野生型及び basal activity を変化させた $\beta 2$ -AR 発現 OSN の軸索投射. *MOR23* のコーディング領域を $\beta 2$ -AR 遺伝子のコーディング領域と置換したトランスジェニックマウスを作製した. *MOR23* プロモーター下流から野生型 $\beta 2$ -AR を発現する OSN は、嗅球のほぼ中央に糸球を形成する. C327R (red)、 $\Delta 267$ -273 (orange)及び E268A (green)を発現する OSN の糸球形成位置は、それぞれ嗅球のより前方あるいは後方にシフトした. 変異型 $\beta 2$ -AR の投射先を解析するにあたっては、同一個体において野生型 $\beta 2$ -AR の投射先(white)をインターナルコントロールとして解析した. (C) 嗅球 medial 側における前後軸に沿った軸索投射位置の変化を模式的に示す. n = 16 (WT), n = 8 (C327R, $\Delta 267$ -273, E268A). スケールバーは 500 μ m.

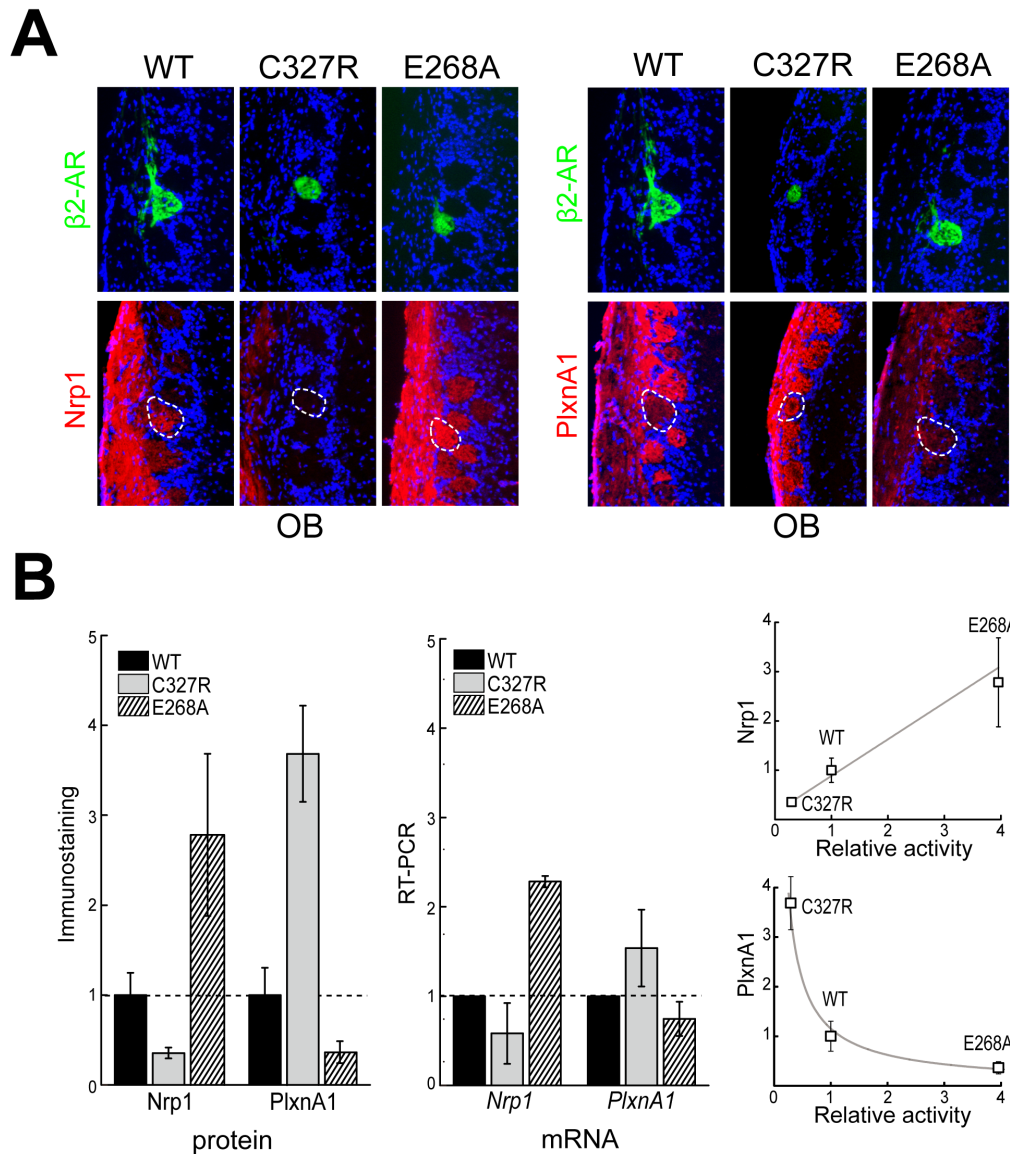


図 3-14 レセプターの **basal activity** は軸索投射位置を規定する Nrp1 及び PlxnA1 の発現量を制御する

(A) $\beta 2$ -AR 発現細胞の投射先は抗 GFP 抗体により同定した。連続切片を抗 Nrp1 あるいは抗 PlxnA1 抗体を用い、免疫染色を行った。C327R 変異体では Nrp1 発現量が減少し、PlxnA1 発現量が上昇した。これに対し、恒常活性型の変異体である E268A 発現細胞においては Nrp1 発現量が大幅に上昇し、PlxnA1 の発現が減少していることが観察された。右に野生型と変異型 $\beta 2$ -AR 発現細胞における Nrp1 及び PlxnA1 の相対的シグナル強度をグラフ化した。いずれも野生型 $\beta 2$ -AR 発現細胞におけるシグナル強度が 1 となるように標準化した。 * $p < 0.01$ (student's t-test)。

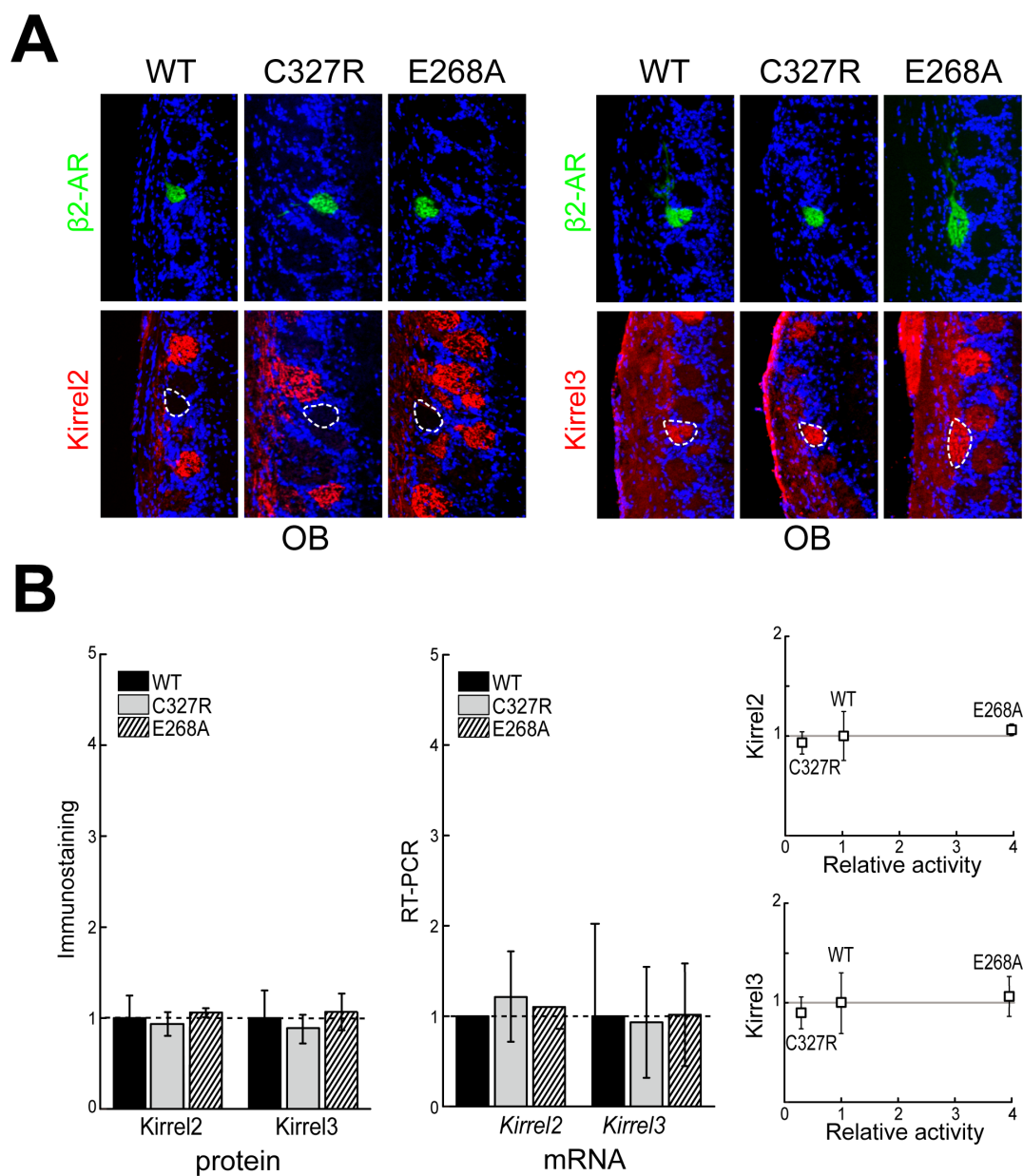


図 3-15 レセプターの basal activity は Kirrel2 及び Kirrel3 の発現量には影響しない

(A) $\beta 2$ -AR の basal activity 変異体は Kirrel2 及び Kirrel3 の発現量に影響しない。 $\beta 2$ -AR 発現細胞の投射先は抗 GFP 抗体により同定し、隣接する切片を抗 Kirrel2 あるいは抗 Kirrel3 抗体を用いて免疫染色した。Kirrel2/Kirrel3 の発現量は、野生型と変異型 $\beta 2$ -AR を発現する OSN の間で有意な差が見られなかった。右に野生型と変異型 $\beta 2$ -AR 発現細胞における Kirrel2 及び Kirrel3 の相対的シグナル強度をグラフ化した。いずれも野生型 $\beta 2$ -AR 発現細胞におけるシグナル強度が 1 となるように標準

化された。

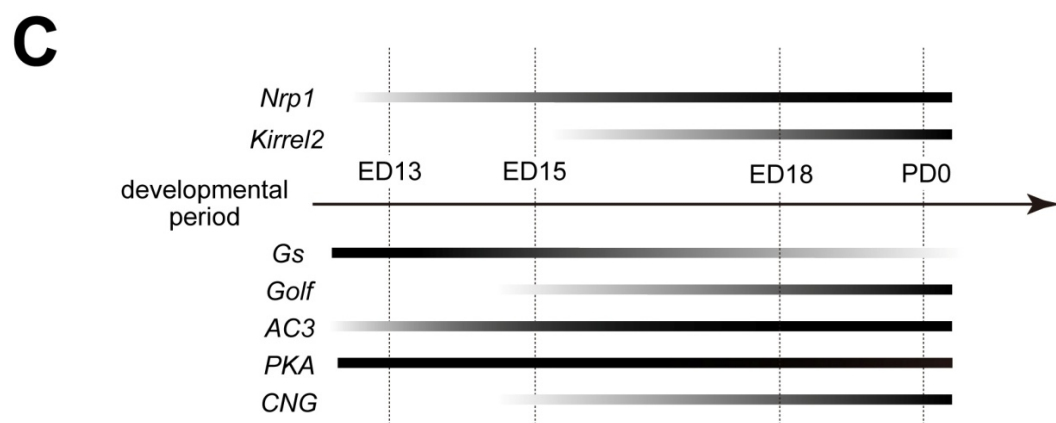
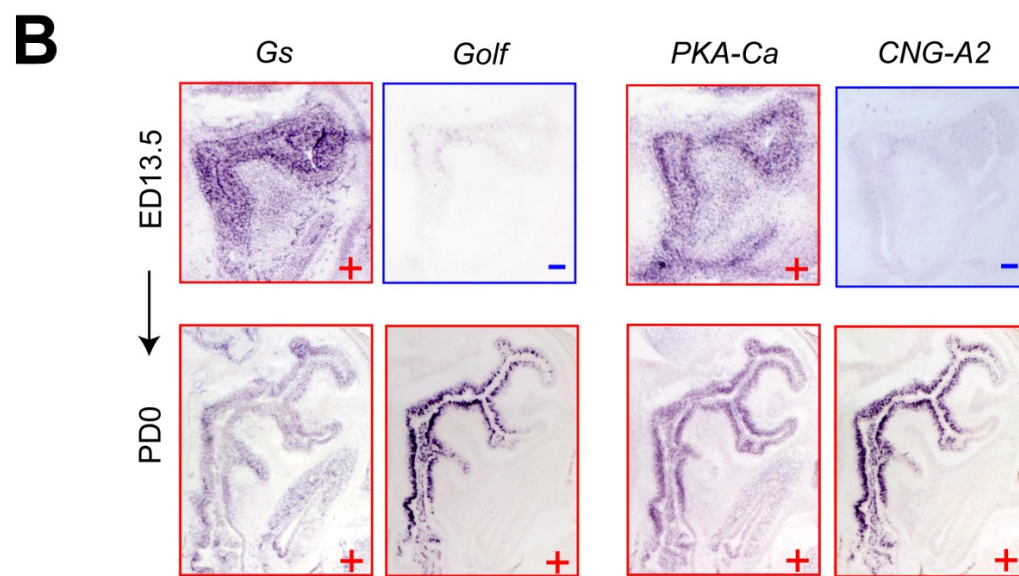
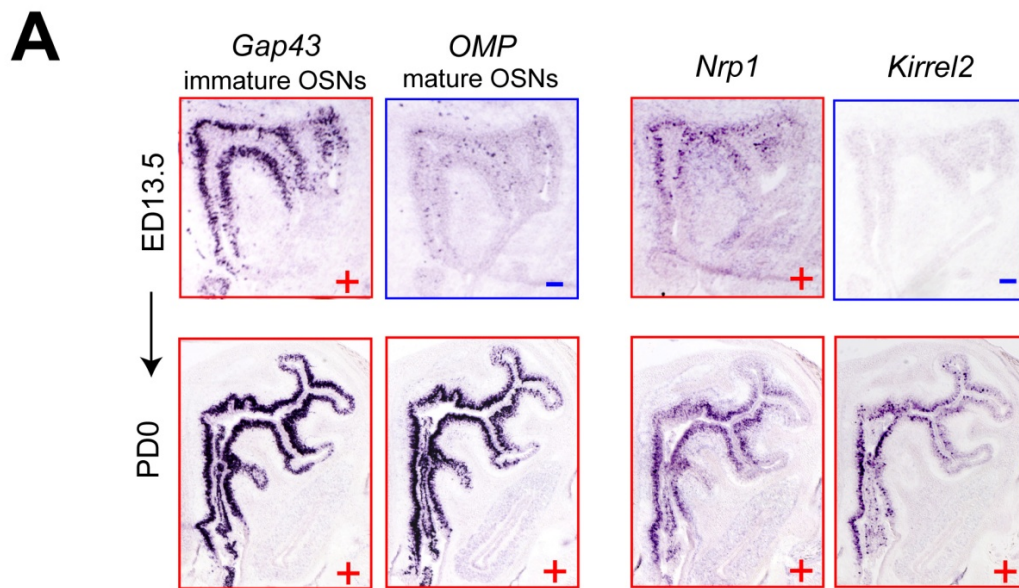
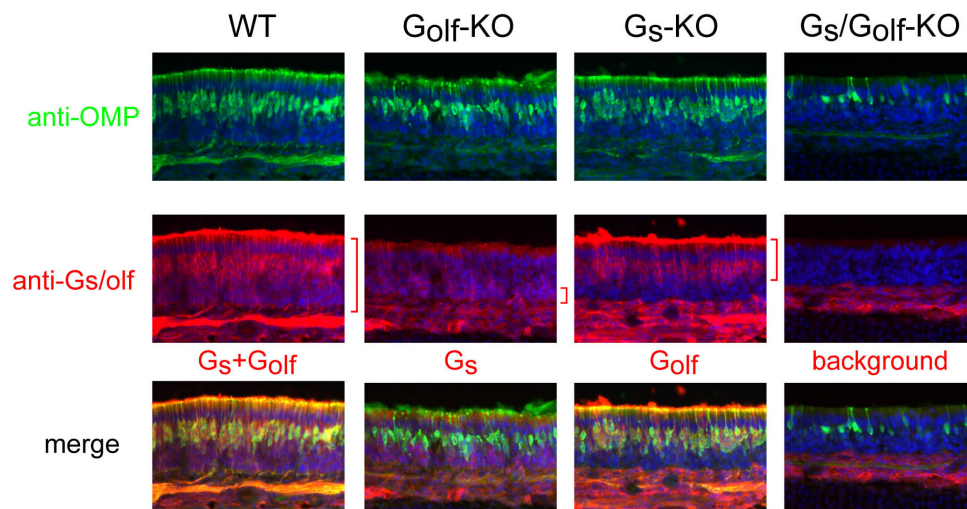


図 3-16 OSN の発生段階における軸索ガイダンス分子およびシグナル伝達分子の発現制御.

(A) 各ガイダンス/細胞接着分子の発現開始時期を、ED13.5, ED16.5, P0 の各段階における OE の coronal 切片に対し *In situ* hybridization を行い解析した. *Gap43* 及び *OMP* はそれぞれ immature な段階にある OSN と mature な段階にある OSN を示す指標として用いた. *Nrp1* のシグナルは OMP 陽性な細胞がほとんど検出されない ED13.5 の段階ですでに検出される. 一方、軸索の分離に関わる *Kirrel2* のシグナルは胎児期の早い段階では検出されず、P0 において検出される. 図中の+は遺伝子の発現が検出されること; -は遺伝子の発現が検出されないことを示す. (B) シグナル伝達分子の発生段階における制御. cAMP シグナルに関与するコンポーネントである *G_s*, *G_{olf}*, *PKA-Cα*, 及び *CNG-A2* の発現を特異的なプローブを用い発生段階を追って解析した. *G_s* 及び *PKA-Cα* のシグナルは ED13.5 の段階で検出される. 一方、*G_{olf}* 及び *CNG-A2* のシグナルは胎児期の早い段階では検出されず、P0 において検出される. (C) 軸索ガイダンス分子およびシグナル伝達分子発現開始時期の概略. *Nrp1* の発現時期と *G_s*, *PKA-Cα* の発現時期はほぼ重なっており, *Kirrel2* 分子の発現時期は *G_{olf}* 及び *CNG-A2* のそれと重なっている.

A



B

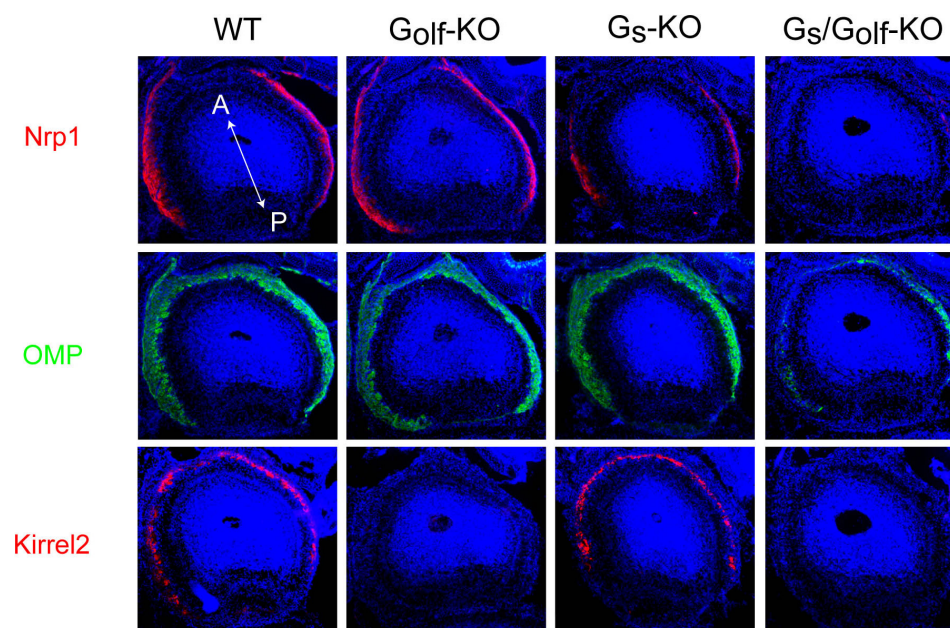
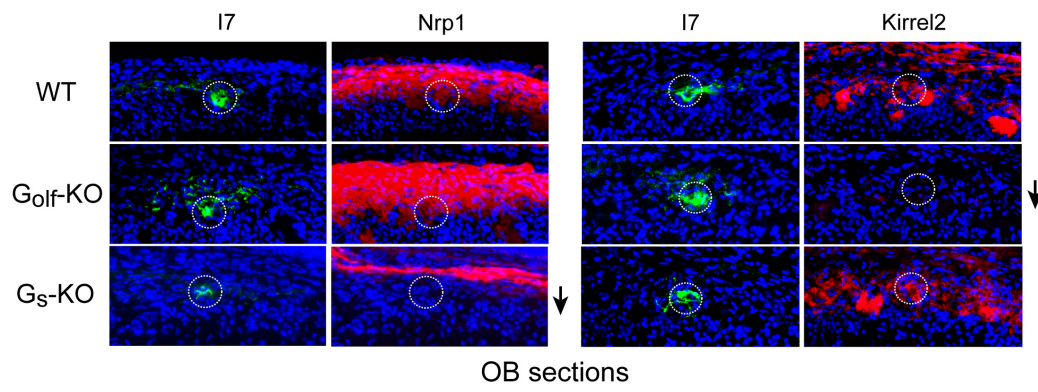


図 3-17 G タンパク質ノックアウトマウスの解析.

(A) G タンパク質欠失マウスにおける Gs/Golf タンパク質の局在. 新生児期 (PD0) の嗅上皮切片について Gs と Golf との間で保存された C 末端領域を認識する抗体を用いて免疫染色を行った. 抗 OMP 抗体の染色により嗅上皮 apical layer に存在する成熟 OSN を示す. Golf-KO マウスにおいては, Gs/Golf のシグナルが basal layer にのみ検出され、OMP シグナルとは重ならない. これに対して, Gs-KO マウスにおいては, Gs/Golf シグナルが OMP 陽性な apical layer に限局される. Gs/Golf-KO マウスにおいては、背側領域における Gs/Golf シグナルが完全に消失することから、この領域の stimulatory G タンパク質が欠失していることが示唆される. (B) G タンパク質を欠失したマウスの OSN における Nrp1 および Kirrel2 の発現 (PD0). 嗅球切片を抗 Nrp1, Kirrel2, OMP 抗体を用いて免疫染色を行い、各タンパクの発現レベルを調べた. Golf-KO マウスにおいては, Kirrel2 のシグナルは消失したが, Nrp1 のシグナルレベルは影響を受けなかった. 一方, Gs-KO マウスにおいては, Kirrel2 の発現レベルは野生型マウスと同程度であったが, Nrp1 の発現量は減少していた. Gs-KO において残存していた Nrp1 のシグナルは Gs/Golf-KO マウスにおいては完全に消失した. このことから, Gs と Golf が一部互いを補償して機能していると考えられる. A, anterior; P, posterior.

A



B

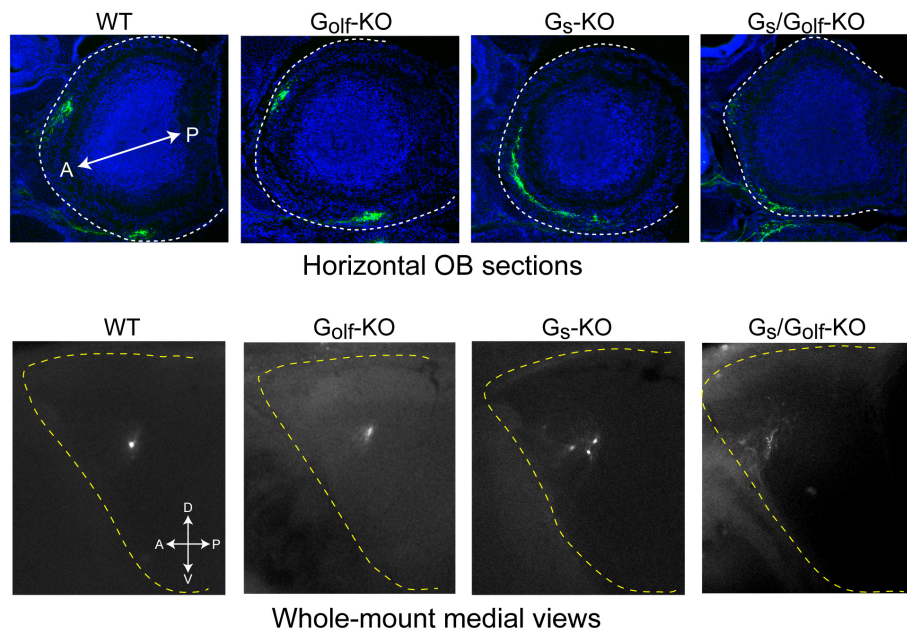
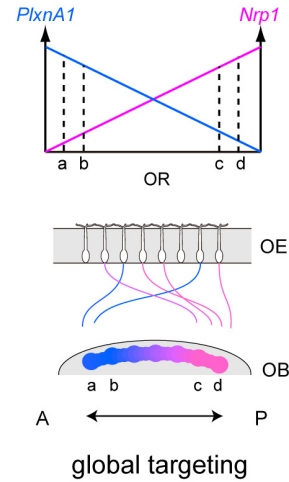
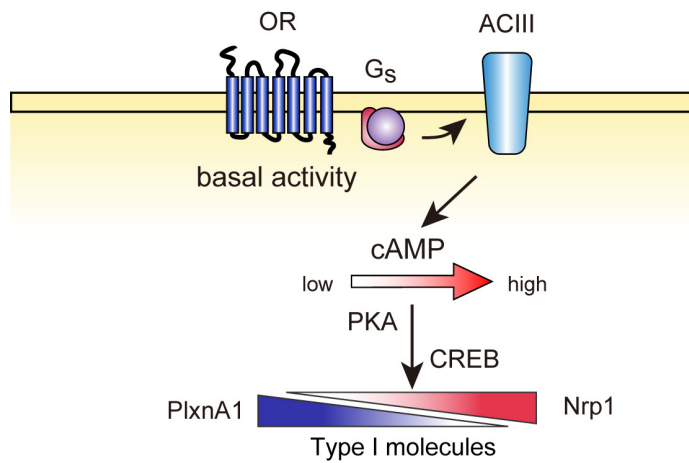


図 3-18 (A) Gs/Golf 遺伝子の欠失は糸球マップ形成に異なる影響を及ぼす。

Gs-KO 及び Golf-KO マウス(PD0)の嗅球切片を、抗 Nrp1 あるいは 抗 Kirrel2 抗体により免疫染色した。rat I7-CFP 発現細胞 (緑)の糸球について発現を解析した。Gs-KO マウスにおいては、Nrp1 の発現が減少した。一方、Kirrel2 の発現は変化しなかった。これに対して、Golf-KO マウスにおいては、Kirrel2 発現が顕著に減少し、Nrp1 の発現には影響が見られなかった。(B) (上) PD0 における嗅球の水平切片を抗 GFP 抗体を用いて免疫染色し、ラット I7 発現細胞の投射の様子を可視化した。(下) PD3 における G タンパク質 KO マウスの嗅球のホルマウント像 (medial 側)。ラット I7 発現細胞の軸索を ECFP の蛍光により観察した。破線は嗅球の輪郭を示す。Golf-KO マウスにおいては、軸索の大まかな投射位置には大きな変化は観察されなかった。これに対して Gs-KO マウスでは、CFP 陽性の軸索が形成する糸球様の構造が嗅球の anterior 領域にクラスター状に散在している様子が観察された。さらに、Gs/Golf をともに欠失したマウスにおいては、CFP 陽性の軸索は特定の糸球構造へと収斂することなく嗅球前方にとどまっている様子が観察された。A, anterior; P, posterior; D, dorsal; V, ventral.

Immature OSNs



Mature OSNs

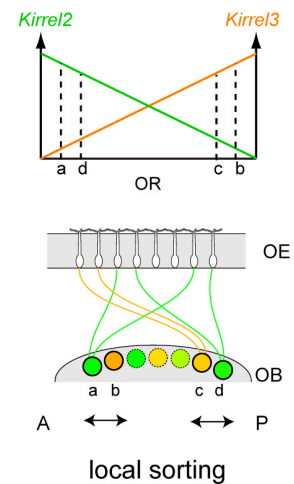
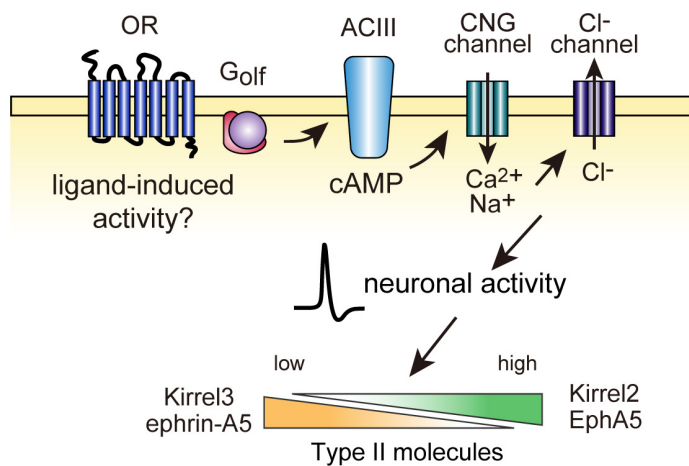


図 3-19 糸球地図形成の段階的な制御のモデル。(左) 未成熟な OSN においては、各 OR に由来する basal activity が stimulatory G protein、ACIII を介して、固有なレベルの cAMP シグナルに変換される。cAMP シグナルの強度が Nrp1 及び PlxnA1 の発現を介して嗅球の前後軸に沿った軸索投射位置を規定する。(右) 成熟段階にある OSN においては、OR の種類によって規定される神経活動が Kirrel2/Kirrel3 を初めとした軸索末端の収斂あるいは分離に機能する分子の発現を規定し、糸球地図を精緻化する。

第 4 章

考察

嗅覚受容体の基礎活性が糸球地図形成において果たす役割

G タンパク質共役型受容体はヒトでは約 800 種類存在し、匂い、味、光といった外界の刺激や、ホルモン、神経伝達物質といった内因性の刺激を受容するセンサーとして細胞内に情報を伝達している。これまで、GPCR はそのセンサーとしての役割から、細胞外の刺激物質による活性化と、それによって引き起こされる生命現象を中心として研究が進められてきた。しかしながら、近年の研究から GPCR は外界の刺激がない状況においても低いレベルの活性である基礎活性を持つことが明らかとなり、その生理学的意義の解明に注目が集まっていた。

本研究において、一連の変異型 β 2-AR を用いた実験から、初期投射において嗅細胞の軸索投射を指令するシグナルの実体がレセプターの basal activity であることが明らかとなった。また、basal activity のレベルが軸索末端に提示される Nrp1、PlxnA1 の発現といった分子コードを規定することが示された (図 3-19)。

これらの知見は、発現する OR の種類によってユニークなレベルの basal activity が決まり、その強度がユニークなレベルの軸索ガイダンス分子の発現量へと変換され、軸索末端に提示されるというモデルを支持している。個々の OSN はこのガイダンス分子の発現レベルにしたがってその軸索を嗅球のどこへ到達させるかを規定し、嗅覚受容体に依存した神経回路形成が達成されるものと考えられる。また OSN の developmental stage 後期に発現し、マップの精緻化に関わる分子群は basal activity の影響を受けなかったことから、これらの分子の発現を担う OR のシグナルの起源が別に存在すると考えられる (図3-15)。受容体のどのような特性がマップ精緻化の過程に影響するのか、その実体を明らかにすることは今後の重要な課題である。

OR の配列の多様性が basal activity のレベルに寄与する可能性

本研究においては、OSN の軸索投射が受容体の basal activity によって指令されることを明らかとした。では、互いに相同性を保ちつつ多様性に富む OR ファミリーにおいて、固有かつ多様なレベルの basal activity はどの様にして生み出されるのだろうか。

これに関連する実験結果として、実際に相同性が高い GPCR においても著しく異なるレベルの basal activity を示すという例が挙げられる。 $\beta 2$ -アドレナリン受容体は $\beta 1$ -アドレナリン受容体に比較して basal activity が高く、またドーパミン D5 受容体の basal activity はドーパミン D1 受容体のそれと比較して有意に高いことがそれぞれ報告されている (Tiberi and Caron, 1995)。互いにアミノ酸配列の似通った受容体ファミリーにおいて、このような活性の違いを生み出すにあたっては、受容体の細胞質内ループ領域及びカルボキシル末端領域が重要な役割を担うと言われている。この領域は GPCR と G_{us} タンパク質の相互作用に関わると考えられており、実際に D5 受容体と D1 受容体の配列の多様性はこの領域に集中している (Demchyshyn et al., 2000)。

OR 分子に関しては、網羅的解析から、アミノ酸配列の多様性が 3 番目、4 番目、5 番目の膜貫通領域及びカルボキシル末端の領域において顕著であることが明らかとなっている (Zhang and Firestein., 2002)。受容体と匂い分子の結合の特異性に関わると言われている膜貫通領域に加え G タンパクとの相互作用に関与すると考えられる領域において配列の多様性を示すという知見を踏まえると、このようなアミノ酸配列の多様性に従って個々の受容体分子がそれぞれにユニークなレベルの basal activity を有する可能性は高いと考えられる。

OR の発現量が basal activity のレベルに寄与する可能性

また、受容体そのもののアミノ酸配列の多様性に加えて、OSN における受容体タン

パク質発現量が basal activity の違いを生み出すパラメーターの一つとなっている可能性も考えられる。これを支持する観察として、OR 分子の発現量が軸索投射に及ぼす影響を検証した実験が挙げられる。Feinstein らはジーンターゲティングの手法を用いて internal ribosomal entry site (IRES) 配列を OR 遺伝子 M71 コーディング領域の上流に挿入し、M71 タンパクの発現量を減少させることを試みた (Feinstein et al., 2004)。IRES 下流からのメッセンジャーRNA の翻訳能は低いため、この改変された M71 アリールを選択した場合の M71 タンパク質の発現量は、内在性 M71 アリールの場合と比較して約 10 分の 1 に低下すると考えられる。低レベルの M71 タンパクを発現する OSN は内在性の M71 発現細胞の投射先とは別に、嗅球のより前方にユニークな投射先を形成する。この知見は、受容体そのもののアミノ酸配列の違いに加えて、OSN における受容体タンパク質の発現量が *in vivo* において basal activity の違いを生み出すパラメーターの一つとして機能している可能性を示唆している。各 OR プロモーターの強さ、あるいは OR タンパク質の安定性が細胞におけるタンパク量を規定する要因となりうるものと考えられる。

OR タンパク質・シグナル伝達分子の細胞内局在の違いが糸球マップ形成に寄与する可能性

今回の論文では、軸索ガイダンス分子群 (Neuropilin-1 および Plexin-A1) と細胞接着分子群 (Kirrel2 および Kirrel3) という全く異なる発現パターンを示す二種類の分子群の発現を OR 分子が cAMP という共通のセカンドメッセンジャーを用いながらも別々に制御しうる機構の一つとして、各分子群が嗅細胞の異なる発生時期に制御されているという可能性を検討した。このような時間的な制御に加え、細胞内における OR タンパク分子の局在の違いも機能分子群の発現に影響を与えている可能性が考えられる。

Lomvardas らのグループは、嗅細胞の未成熟な時期において、細胞表面ではなく小胞

体に局在する OR がシグナルの起源となって、他の OR 遺伝子の発現を抑制することが単一 OR 遺伝子発現を達成する主要な機構であるとのモデルを提示している (Lyons et al., 2013)。同時に、同グループでは細胞の成熟と共に OR が小胞体から膜表面に移行することを主張している (Dalton et al., 2013)。これらの報告を踏まえると、実際に内在性の OR については、嗅細胞内の分画によりシグナルを分離している可能性も考慮する必要がある。今回実験に用いた $\beta 2$ -AR の場合、野生型においても変異型においても膜発現は効率的に行われていたが、OR タンパクの *in vitro* における効率的な膜発現には、シャペロン分子が必要であることが示されている (Saito et al., 2004)。嗅細胞のどの細胞内分画に存在する OR タンパクがシグナルの起源として重要であるかを知るためには、今後シャペロン分子である *RTPI* や *REEP* をノックアウトしたマウスや、膜発現効率を変化させた受容体をトランスジーンとして持つマウスにおいて、軸索投射にどのような影響が見られるかを検証する必要がある。

段階的な糸球地図形成の意義

これまで神経回路形成は、主として視覚系を中心としてその機構の研究が進められてきた。網膜から視蓋への投射においても、遺伝的要因によって決定される軸索ガイダンス分子 Eph/ephrin の濃度勾配を用いて初期の大まかなトポグラフィックオーダーが決定されたのち、神経活動が神経地図の更なる精緻化に寄与するというモデルが提唱されている (Chen and Flanagan., 2007)。本研究では、2 種類の異なる G タンパク質のノックアウトマウスと、機能遺伝子群の発現時期の解析から、嗅覚系における糸球マップ形成も視覚系と同様に段階的に形成されることを見出した。異なる二つの感覚系において共通して見られることから、神経地図形成の段階的な制御は、他の脳領域にも広く神経系一般に適用できる重要な機構であると期待される。

OR 下流のシグナル伝達分子の違いが軸索ガイダンス分子・細胞接着分子の発現パターンに与える影響

CNG ノックアウトマウス、および 2 種類の G タンパク質のノックアウトマウスの解析から、軸索ガイダンス分子と細胞接着分子の制御には、OR シグナルの下流で異なるシグナル伝達分子が関わっていることが示唆された。特に、 G_s と G_{olf} は、互いにアミノ酸配列の相同性が高いことから、二種類の遺伝子が存在する意義がこれまで殆ど解明されてこなかった。今井らはこれら二つのタンパクにおいて OR シグナルの読み取りの感度が大きく異なっており、軸索ガイダンス分子と細胞接着分子の発現パターンの違いに寄与する可能性があることを主張している (Nakashima et al., 2013)。この可能性は、今後 G_s と G_{olf} の互いの遺伝子のコーディング領域を置換することによって検証しうると期待される。

今回の研究は、GPCR の中でも約半数を占める嗅覚受容体ファミリーに着目し、その糸球地図形成に果たす役割を明らかにすることを試みた。第一章および第二章の一連の実験から、嗅覚受容体は異なる発生段階で異なるシグナルを用いて軸索ガイダンス分子、細胞接着分子を制御することで嗅球上の神経回路形成を指令していると考えられる。また、特に嗅細胞の発生初期においては、個々の嗅覚受容体が生み出す基礎活性が軸索ガイダンス分子 Neuropilin-1 および Plexin-A1 の発現を介して嗅球前後軸に沿った軸索投射を指令するというモデルが考えられる。GPCR の基礎活性が生理学的機能を持つという本研究の成果、モデルは、神経回路構築のメカニズムの一端というだけでなく、今後 GPCR を標的としたその他の研究分野に応用されることが期待される。

材料と方法

1. 変異マウスの作出

本研究において作製した変異マウスについて以下に列挙する。

MOR215-1-EGFP および MOR103-1→215-1-EGFP ノックインマウスの作製 (第2章)

ノックインマウスの作製は、CDB 変異マウス開発ユニットの協力を得て行った。

MOR215-1 遺伝子座を含む BAC ゲノム DNA 断片は C57BL/6 の BAC クローン (RP24-73D4, BACPAC Resources Center) より酵素処理およびスクロース濃度勾配遠心にて分離した。ターゲティングベクター作製にあたり、分離された DNA 断片を DT-A/loxP/PGK-Neo-pA/loxP プラスミド (理研 CDB から分与していただいた、<http://www.cdb.riken.jp/arg/cassette.html>) にサブクロニングした。

MOR215-1-EGFP マウスのコンストラクトについては、MOR215-1 翻訳終結点直下に Sal I 切断部位を導入し、IRES tau-EGFP 配列 (Ishii et al., 2000) を挿入した。

MOR103-1→MOR215-1-EGFP マウスの作製については、リコンビナント PCR により MOR215-1 コーディング領域を MOR103-1 コーディング領域に置換し、下流に IRES tau-EGFP 配列を挿入した。これらターゲティングベクターを AscI により直鎖化し、TT2 ES 細胞 (Yagi et al., 1993) に electroporation により導入し相同組み換え体 ES クローンを得た。これらの ES クローンを CD-1 の 8 細胞期胚にインジェクションし、キメラマウスを得た。各系統の F1 マウスを EIIa-Cre トランスジェニックマウス (Jackson Laboratory) と掛け合わせることで、ネオマイシン耐性遺伝子カセットを除去した。

H-Cre トランスジェニックマウスの作製 (第2章)

H-Cre トランスジェニックマウスは、竹内ら (Takeuchi et al., 2010) によって作製された。コンストラクトの作製にあたっては、芹澤らの作製した H-Kirrel2 (Serizawa et al., 2006) コンストラクトの Kirrel2 コーディング領域を Cre リコンビナーゼ遺伝子の コーディング領域で置換した。

Kirrel2 コンディショナルノックアウトマウスの作製 (第2章)

Kirrel2 コンディショナルノックアウトマウスの作製は、ターゲティングベクター作製

段階より CDB 変異マウス開発ユニットの協力を得て行った。

pMOR23- β 2-AR トランスジェニックマウス (Tg pMOR23- β 2-AR)の作製 (第 3 章)

β 2-AR を OSN において発現させるためのトランスジェニックコンストラクトを作製するため、MOR23 ミニジーンカセット (Imai et al., 2006) を用いた。930bp の MOR23 コーディング領域を野生型あるいは変異型 β 2-AR のコーディング領域で置換した。このトランスジーンを選択し発現する嗅細胞の投射を可視化するため、 β 2-AR コーディング領域直下に *IRE5-gapECFP* あるいは *IRE5-gapEYFP* 配列を含む Sac II 断片を挿入した。野生型 human β 2-AR は全長 cDNA を含むプラスミド (Duke 大、R. J. Lefkowitz 教授より提供頂いた) を鋳型としてクローニングした。また変異型 β 2-AR は PCR 法によって野生型 β 2-AR に点変異あるいは部分的な欠失を導入し、作製した。クローニング後目的の変異配列が正しく挿入されたことは、配列解析により確認した。

これらコンストラクトを BssHII によって消化し、スクロース密度勾配遠心によってベクター部分の分離および DNA の精製を行い、マウス受精卵 (C57BL/6) に導入してトランスジェニックマウスを作製した。

Adenylyl cyclase TypeIII の欠損マウス (Trinh and Storm, 2003) はワシントン大学 Daniel. R. Storm 教授との共同研究のもと、また OMP-TTA マウスおよび pTeto-Kir2.1 マウスはストワーズ研究所 C. Ron Yu 博士との共同研究のもと解析を行った。また cyclic nucleotide gated channel α 2 subunit 欠損マウス (Brunet et al., 1996) は Jackson Laboratory より購入し解析した。

2. 組織化学と観察

組織切片の作製 (第 2 章および第 3 章)

マウスは麻酔下に 4 % パラホルムアルデヒド・PBS にて還流固定し、嗅組織を摘出した。嗅球の組織切片作製にあたっては、摘出後 O.C.T compound (Sakura Finetek) に包埋した。嗅上皮は 4 % パラホルムアルデヒドで一晩固定した後、0.5 M EDTA (pH 8.0)・PBS、30 % スクロース・PBS にてそれぞれ一晩処理し、包埋した。凍結切片の作

製にあたってはクライオスタット (Leica) を用い、目的に応じて 10-20 μm の切片を製作した。

免疫染色 (第 2 章および第 3 章)

本論文において組織染色のために用いた抗体 (一次抗体、二次抗体) を以下に列挙する。

一次抗体

- rabbit antibodies against EGFP (1/1000)(Molecular Probes)
- goat antibodies against EGFP (1/1000)(Molecular Probes)
- mouse antibody against EGFP (1/1000)(Molecular Probes)
- rabbit antibodies against Kirrel2 (1/2000)
- rabbit antibodies against Kirrel3 (1/2000)
- mouse antibody against NCAM (1/700)(Sigma)
- goat antibodies against Neuropilin-1 (1/500)(R&D)
- goat antibodies against OMP (1/1000) (Wako)
- guinea pig antibodies against Pcdh21 (1/2000)
- rabbit antibodies against Plexin-A1 (1/500)
- mouse antibody against synaptotagmin (1/500)(Millipore)
- rabbit antibody against MOR256-17 (1/10000)

抗 Kirrel2 抗体及び抗 Pcdh 抗体は竹内らが作製したものを使用した(Takeuchi et al., 2010)。抗 Plexin-A1 抗体は国立精神・神経医療研究センター神経研究所 須藤文和博士より、抗 Kirrel3 抗体は関西医科大学 上野博夫教授より、また抗 256-17 抗体は Hohenheim 大学 Heintz Breer 教授より提供して頂いた。

二次抗体

- AlexaFluor 555 conjugated rabbit secondary anti-goat IgG antibodies (Molecular Probes) (1/200)
- Alexa Fluor 555 conjugated donkey secondary anti-rabbit IgG antibodies (Molecular Probes) (1/200)
- Alexa Fluor 555 conjugated donkey secondary anti-rat IgG antibodies (Molecular

Probes) (1/200)

- Alexa Fluor 488 conjugated goat secondary anti-rabbit IgG antibodies (Molecular Probes) (1/200)

- Alexa Fluor 488 conjugated goat secondary anti-mouse IgG antibodies (Molecular Probes) (1/200)

- biotin conjugated secondary anti-guinea pig IgG antibody (vector) (1/200)

組織切片は風乾した後、PBS で 5 分×3 回洗浄した。組織切片は 5% スキムミルク・PBST にて 1 時間の blocking を行い、1% スキムミルク・PBST 中にて適当な濃度に希釈した一次抗体をのせ、室温で一晩放置した。PBST にて 5 分×3 回洗浄し、PBS 中に希釈した二次抗体 (1:400) を作用させ、2 時間放置し、PBS にて 5 分×3 回洗浄した。観察にあたっては切片を PermaFluor (Diagnostic Biosystems) で封入した。OR 抗体あるいは Kirrel2/Kirrel3 の抗体染色を行う場合には、ABC kit (Vector) を用いシグナル増幅を行った。Kirrel2 に関しては、抗原賦活化のため、10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) の中で 120 °C、10 分間のオートクレーブ処理を行った。組織切片は風乾、洗浄後に 0.5 % H₂O₂-PBS で処理し、内在性ペルオキシダーゼを失活させた。Avidin/Biotin Blocking kit (Vector) にて内在性の biotin の blocking を行い、5 % の適当な血清を含む PBST にて希釈した一次抗体を作用させて一晩放置した。PBST にて 3 回洗浄し、biotin-conjugated secondary antibody (1:200 in PBST) を作用させて 1 時間放置した。PBS にて 3 回洗浄し、ABC 液 (1:100 A, 1:100 B in PBS, Vector) にて 30 分処理した後、再び PBS で 3 回洗浄した。最後に Amplification buffer (PerkinElmer) 中に希釈した TSA-Cy3 (PerkinElmer, 1:100) を 10 分間反応させて発色を行い、PBS で 3 回洗浄して PermaFluor (PerkinElmer) で封入した。

in situ hybridization (ISH) 法

①プローブの作製

目的遺伝子を検出するプローブの作製にあたっては、以下のように各遺伝子の配列を調製した。各遺伝子のコーディング領域または 3' 非翻訳領域を嗅上皮に由来する cDNA, あるいはマウスのゲノム DNA を鋳型として PCR 法で増幅した。PCR 産物を pGEM-T

ベクター (Promega) にクローニングし、配列解析により目的の領域が含まれていることを確認した。適当な制限酵素によってプラスミドを直鎖化し、RNA labeling kit (Roche) を用い、プロトコルに従って digoxigenin (Dig) あるいは fluoescien (Flu) で標識されたアンチセンスプローブを作製した。

②Hybridization

組織切片を封乾した後、4 %パラホルムアルデヒド-PBS で 4℃、20 分間固定した。PBS で 5 分間洗浄し、Proteinase K (Roche) を溶解した Tris-EDTA (pH 8.0) で 37℃、15 分処理し、再び 4 %パラホルムアルデヒド-PBS で 15 分固定した。PBS で 5 分洗浄した後、0.5 % H₂O₂-PBS で 20 分間処理した。この過程は NBT-BCIP で発色させる際には省略した。PBS で 5 分洗浄した後、0.25 % 無水酢酸-0.1 M トリエタノールアミン (pH 7.0) 溶液中で 20 分間アセチル化を行った。PBS で 5 分洗浄し、風乾させた後、hybridization buffer [50 % formamide (Sigma)、10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、200 µg/ml Yeast tRNA (Ambion)、10 % dextran sulfate、1×Denhalt (Sigma)、600 mM NaCl、0.25 %SDS] 中に希釈した RNA プローブを滴下し、パラフィルムでシールして 51℃で 15 時間以上反応させた。

③洗浄と検出

5×SSC 中でシールをはがし、2×SSC-50 % formamide (Nakarai Tesque)、2×SSC、0.2×SSC の順に 65 °C で 20 分間ずつ洗浄した。つづいて 1 % blocking reagent (Roche) で一時間 blocking を行った。

可視光で観察する実験においては、組織切片を DIG I buffer [100 mM Tris-HCl(pH 7.5), 150 mM NaCl] にて 1:1000 に希釈した alkaline-phosphatase-conjugated anti-DIG antibody (Roche) で一時間処理し、DIG I buffer で 3 回、DIG III buffer で一回洗浄した。発色液は DIG III buffer [100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl] 1ml につき、4.5 µl の nitro blue tetrazolium (NBT: Roche) および 3.5 µl の 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate toluidinium (BCIP: Roche) を添加して作製し、反応させた。発色後の組織切片は正立顕微鏡 (Olympus AX70) を用いて観察した。

Double ISH 法を行う場合には、hybridization の際に DIG プローブと Flu プローブを混合して用いた。洗浄と blocking の後、blocking buffer にて希釈した

alkaline-phosphatase-conjugated anti-DIG antibody (Roche; 1:1000)、horseradish peroxidase (HRP) -conjugated anti-Flu antibody (PerkinElmer; 1:200) で一時間処理した。Wash buffer [100 mM マレイン酸 pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.3 % Tween-20] で洗浄し、TSA-Biotin (PerkinElmer; 1:100) で 10 分間反応させた。洗浄後、staining buffer [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂] にてリンスした。発色は staining buffer で希釈した streptavidin-conjugated AlexaFluor488 (Molecular Probes; 1:200) および HNPP/FastRed (Roche) を用い、製品プロトコルに従い反応させた。

3. *in vitro* におけるレセプター活性の測定

嗅球切片からの OR 遺伝子のクローニング (第 3 章)

2 週令のマウスから、嗅球を摘出し、クライオスタット (Leica) により 150 μ m の切片を作製し、さらにレーザーマイクロダイセクション装置 (Leica Laser Microdissection System; Leica) を用いて嗅球前方側及び後方側の糸球層をそれぞれ切り出した。この切片から RNeasy Kit (QIAGEN) を用いて RNA の抽出を行った。OR 遺伝子のクローニングにあたっては、縮重プライマー対

First PCR は Upstream primer: 5'-ACYMYMRYCTSCAYRHNCBAGTGA-3'及び

Downstream primer: 5'-TKYYTVRBRCYRTARATRADNGGRTT-3'、

Second PCR は Upstream primer: 5'-GCSTWTGAYMGNTWYGTKGCNATNTG-3'及び

Downstream primer:

5'-GGATAATACGACTCACTATAGGBRCYRTARATRADNGGRTT-3'

を用い (Yang and Marchand, 2002)、PCR を行った。

PCR 断片を pGEM-T ベクターにクローニングした後、挿入された OR 遺伝子を配列解析により同定した。

発現ベクターの構築 (第 3 章)

HEK293T 細胞における発現ベクターとしては、pME18S を用い、野生型 human β 2-AR および変異型 β 2-AR、OR 遺伝子をクローニングした。なお、後の細胞膜表面における

レセプタータンパク質の定量化のため、レセプターN末端に FLAG タグおよび Rho タグを導入した。

Live-cell-staining (第3章)

培養細胞膜表面における各レセプターの発現を可視化するため、常法にしたがって Live-cell-staining を行った。ポリ-D-リジンコート(Sigma)したガラスボトムディッシュ (Matsunami) に細胞を播き、一日後に各レセプターを発現するベクターをトランスフェクトした。細胞の染色操作はすべて氷上で行い、用いる試薬もすべて氷上で冷却した。トランスフェクションから 20-30 時間ののち、培地を取り除き、staining buffer [15 mM アジ化ナトリウム、1 mM HEPES、10 %FBS in MEM (Gibco)] にて 500 倍に希釈した抗 FLAG 抗体 (Sigma) あるいは 200 倍希釈した抗 Rhodopsin 抗体 (Millipore) を細胞上に載せ、4℃で一時間放置した。反応後 wash buffer [15 mM アジ化ナトリウム、1 mM HEPES in HBSS (Gibco)] にて 5 分間、3 回洗浄した。洗浄ののち、staining buffer で 200 倍に希釈した二次抗体 (Alexa Fluor 555 conjugated donkey secondary anti-mouse IgG antibodies, Molecular Probes) を載せ、4℃にて一時間放置した。発色ののち、1 %パラホルムアルデヒド-PBS で固定を行い、さらなる洗浄を行ってから Permafluor (PerkinElmer) にて封入した。

ルシフェラーゼアッセイ (第3章)

β2-AR あるいは嗅覚受容体の活性を CRE 依存的に発現するホタルルシフェラーゼの活性により測定した。同時に、恒常的に活性化された SV40 プロモーター下流から発現されるウミシイタケルシフェラーゼを細胞生存率およびトランスフェクション効率を比較するためのインターナルコントロールとして用いた。ホタルルシフェラーゼおよびウミシイタケルシフェラーゼの活性は、Dual-Glo Luciferase assay system (Promega) を使い、メーカーのプロトコルに従って測定した。

ポリ-D-リジン (Sigma, 1 mg/ml in DDW に調整) でコートした 96 穴アッセイ用プレート (PerkinElmer) に培地 [1 mM HEPES (Gibco)、10 % FBS in MEM (Gibco)] にサスペンドした細胞を播き、37℃ 5 % CO₂ インキュベーターで培養した。翌日、各レセプター、RTP1、CRE-Luc および SV40-RL をトランスフェクションした。トランスフ

エクシオンから 18-20 時間後、培地を 293 Chemically Defined Medium (293CD without serum, Gibco) で置換し(50 μ l /ウェル)、30 分間インキュベートした。リガンドによる刺激を与える場合には 293CD に希釈したリガンド溶液に、basal activity を測定する場合には何も添加しない 293CD に置換し (25 μ l /ウェル)、3-4 時間インキュベートした。インキュベート後、活性測定のために各ウェル 20 μ l の Dual-Glo Luciferase buffer を添加し、10-30 分後に測定を行った。さらにウミシイタケルシフェラーゼの活性を測定するため、各ウェル 18 μ l の Stop-and-Glo buffer を添加し、10-30 分後に測定を行った。ルシフェラーゼ活性の測定にあたっては TriStar LB941 (BERTHOLD) を用いた。

4. その他

naris occlusion (第 3 章)

生後 5 日のマウスの左側鼻孔をはんだごてを用いて焼き、閉塞した。通常的环境下にて飼育後、2 週齢にて解剖して嗅上皮切片を作製し、各遺伝子の発現を ISH 法にて解析した。解剖の際には鼻孔が閉じていることを確認した。

signal の測定 (第 2 章及び第 3 章)

嗅球ホルマウントの観察にあたっては、4 % パラホルムアルデヒド-PBS にて還流固定したマウスから摘出した嗅球をカバーガラス上に載せ、撮影を行った。蛍光画像は冷却 CCD カメラ蛍光顕微鏡 C4742-95-12ERG (浜松ホトニクス) を搭載した Model IX70 (Olympus) を用いて撮影した。明視野の画像を取得する際には Olympus Optical AX70 を用いた。シグナルの定量化にあたっては、同一条件下で撮影した蛍光染色強度を Scion Image (Scion Corp.)により測定した。統計的な解析を行う際には、Excel 2003 (Microsoft) を用いた。

Fluorescent Cell Sort Analysis (第 3 章)

①HEK293 細胞表面におけるレセプタータンパク質の定量

HEK293 細胞にトランスフェクションを行ってから 24 時間後、培養上清を取り除いて Washing solution (2 %FBS, 15 mMNaN₃ in PBS、氷上で冷却しておく) で洗浄し、上清

を吸引した後 Cellstripper (Mediatech) 1 ml を加えて細胞をプレートから分離した。細胞懸濁液に Washing solution 1 ml を加えた後 セルストレーナー (Falcon) に通し、細胞の凝集塊を取り除いた。Washing solution 100 μ l にて 200 倍に希釈した抗 FLAG 抗体 (Sigma) を細胞懸濁液に加え、4 $^{\circ}$ C で一時間静置した。反応後、Washing solution 2 ml を添加し、4 $^{\circ}$ C、3 分間、200 g の条件で遠心し上清を取り除く操作を 3 回行い、過剰な一次抗体を洗浄した。洗浄後、Washing solution にて 100 倍に希釈した PE-conjugated anti-mouse IgG 抗体 100 μ l で細胞を懸濁し、4 $^{\circ}$ C に一時間静置した。反応終了後、Washing solution 2 ml を添加し、4 $^{\circ}$ C、3 分間、200 g の条件で遠心し上清を取り除く操作を 3 回行い、最終的に 500 μ l の Washing solution に懸濁したサンプルについて FACS を行った。FACS にかける直前に 7-AAD 0.5 μ l を添加し、死細胞を標識した。

① β 2-AR 発現嗅細胞の分離

生後 10 日の Tg pMOR23- β 2-AR から嗅上皮を摘出し、500 μ l Ca^{2+} free Ringer's solution [138 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 2 mM sodium pyruvate, 9.4 mM glucose, 2 mM EGTA, 5 mM HEPES] 中で破碎後、100 ml Dispase/Collagenase solution [44 U/ml Dispase (Invitrogen), 1000 U/ml Collagenase type II (Invitrogen)] 及び 5 μ l DNase I solution (10 mg/ml, Roche) を加え、37 $^{\circ}$ C にて 30 分間静置し嗅細胞の分離を行った。反応後セルストレーナー (メッシュサイズ: 40 μ m, BD Falcon) に通して凝集塊を取り除き、4 $^{\circ}$ C、1000 rpm で 5 分間遠心し反応上清を捨てた。さらに 2 回細胞を Ca^{2+} free Ringer's solution に再懸濁したのち、4 $^{\circ}$ C、1000rpm で 5 分間遠心し上清を除く操作を行って酵素を取り除き、0.1 % BSA , DNase I solution を含む Ca^{2+} Ringers's solution 500-1000 μ l (1×10^6 cell 程度/ml となるよう調節を行う) に懸濁し FACS 解析を行った。

mRNA の定量化 (第 3 章)

生後 10 日のマウスより嗅上皮を摘出し、RNeasy Kit (QIAGEN) を用いて全 RNA を抽出した。RNA サンプルを鋳型とし SuperScript III First-Strand Synthesis Kit (Invitrogen) を用いて逆転写を行い、得た cDNA について Real-Time PCR による定量解析を行った。PCR 反応には Light Cycler Taqman Master (Roche) 及び Light Cycler II (Roche)を用いた。プライマー対及び Taqman Probe の組み合わせは Universal Probe

Library 及び日本遺伝子研究所で設計を行った。各遺伝子の定量化にあたって用いたプライマー、Taqman Probe を以下に示す。

NCAM, 5'-AGGGCAAGGCTGCTTTCT-3' and 5'-CCCCATCATGGTTTGGAGT-3';
TaqMan probe, 5'-GGAGGAAG-3';

Nrp1, 5'-CCACACACAGTGGGCTTG-3' and 5'-GGTCCAGCTGTAGGTGCTTC-3',
TaqMan probe, 5'-CTGGGCTG-3';

PlxnA1, 5'-CGCCAAGTACAAGGACGAG-3' and 5'-CTGCCTTCGAGCCTGTTC-3';
TaqMan probe, 5'-TGGCTCTG-3';

Kirrel2 probe, 5'-ATCCACTTGGGCCGTAGA-3' and 5'-AGAGAGGTGGCTGCAGATG-3';
TaqMan probe, 5'-TGTGGCTG-3';

Kirrel3 probe, 5'-AACTGCACACCCAAGTTGC-3' and
5'-CTTCTGGAGGCCAAGCTCT-3' ; TaqMan probe, 5' -GCTGAGGA-3'.

これらの軸索誘導遺伝子の発現レベルは、NCAM 遺伝子の発現量によって標準化した。
また、FACS によって分離した嗅細胞について mRNA の定量を行う際は、RNeasy Plus
Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA 抽出を行い、cDNA を作製した。

参考文献リスト

Ballesteros, J. A., Jensen, A. D., Liapakis, G., Rasmussen, S. G., Shi, L., Gether, U., and Javitch, J. A. (2001). Activation of the β 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6. *J. Biol. Chem.* 276, 29171-29177.

Belluscio, L., Gold, G. H., Nemes, A., and Axel, R. (1998). Mice deficient in G_{olf} are anosmic. *Neuron* 20, 69-81.

Bond, R. A., and Ijzerman, A. P. (2006). Recent developments in constitutive receptor activity and inverse agonism, and their potential for GPCR drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 92-96.

Buck, L., and Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65, 175-187.

Chen, M., Gavrilova, O., Liu, J., Xie, T., Deng, C., Nguyen, A. T., Nackers, L. M., Lorenzo, J., Shen, L., and Weinstein, L. S. (2005). Alternative *Gnas* gene products have opposite effects on glucose and lipid metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102, 7386-7391.

Chen, Y., and Flanagan, J. G. (2006). Follow your nose: axon pathfinding in olfactory map formation. *Cell* 127, 881-884.

Chesler, A. T., Zou, D. J., Le Pichon, C. E., Peterlin, Z. A., Matthews, G. A., Pei, X., Miller, M. C., and Firestein, S. (2007). A G protein/cAMP signal cascade is required for axonal convergence into olfactory glomeruli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 104, 1039-1044.

Chess, A., Simon, I., Cedar, H., and Axel, R. (1994). Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell* 78, 823-834.

Col, J. A., Matsuo, T., Storm, D. R., and Rodriguez, I. (2007). Adenylyl cyclase-dependent axonal targeting in the olfactory system. *Development* 134,

2481-2489.

Dalton, RP., Lyons, DB., Lomvardas, S. (2013). Co-Opting the Unfolded Protein Response to Elicit Olfactory Receptor Feedback. *Cell* 155, 321-332.

Feinstein, P., Bozza, T., Rodriguez, I., Vassalli, A., and Mombaerts, P. (2004). Axon guidance of mouse olfactory sensory neurons by odorant receptors and the $\beta 2$ adrenergic receptor. *Cell* 117, 833-846.

Godfrey, PA., Malnic, B., and Buck, LB. (2004). The mouse olfactory receptor gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(7), 2156-2161.

Imai, T., Suzuki, M., and Sakano, H. (2006). Odorant receptor-derived cAMP signals direct axonal targeting. *Science* 314, 657-661.

Imai, T., Yamazaki, T., Kobayakawa, R., Kobayakawa, K., Abe, T., Suzuki, M., and Sakano, H. (2009). Pre-target axon sorting establishes the neural map topography. *Science* 325, 585-590.

Ishii, I., Serizawa, S., Kohda, A., Nakatani, H., Shiroishi, T., Okumura, K., Iwakura, Y., Nagawa, F., Tsuboi, A., and Sakano, H. (2001). Monoallelic expression of the odorant receptor gene and axonal projection of olfactory sensory neurons. *Genes Cells* 6, 71-78.

Kato, A., Katada, S., and Touhara, K. (2008). Amino acids involved in conformational dynamics and G protein coupling of an odorant receptor: targeting gain-of-function mutation. *J. Neurochem.* 107, 1261-1270.

Kobayakawa, K., Kobayakawa, R., Matsumoto, H., Oka, Y., Imai, T., Ikawa, M., Okabe, M., Ikeda, T., Itohara, S., Kikusui, T., Mori, K., and Sakano, H. (2007). Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb. *Nature* 450, 503-508.

Kobilka, B. K., and Deupi, X. (2007). Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 397-406.

Lin, D.M., Wang, F., Lowe, G., Gold, G.H., Axel, R., Ngai, J., and Brunet, L. (2000).

Formation of precise connections in the olfactory bulb occurs in the absence of odorant-evoked neuronal activity. *Neuron* 26, 69-80.

Luo, L., and Flanagan, J. G. (2007). Development of continuous and discrete neural maps. *Neuron* 56, 284-300.

Lyons, DB., Allen, WE., Goh, T., Tsai, L., Barnea G., Lomvardas, S. (2013). An epigenetic trap stabilizes singular olfactory receptor expression. *Cell* 154, 325-336.

Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., and Buck, LB. (1999). Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 96, 713-723.

Miyamichi, K., Serizawa, S., Kimura, H. M., and Sakano, H. (2005). Continuous and overlapping expression domains of odorant receptor genes in the olfactory epithelium determine the dorsal/ventral positioning of glomeruli in the olfactory bulb. *J. Neurosci.* 25, 3586-3592.

Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S. K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J., and Axel, R. (1996). Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87, 675-686.

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. (2013). Agonist-Independent GPCR Activity Regulates Anterior-Posterior Targeting of Olfactory Sensory Neurons. *Cell* 154, 1314-1325.

Nakatani, H., Serizawa, S., Nakajima, M., Imai, T., and Sakano, H. (2003). Developmental elimination of ectopic projection sites for the transgenic OR gene that has lost zone specificity in the olfactory epithelium. *Eur. J. Neurosci.* 18, 2425-2432.

O'Dowd, B. F., Hnatowich, M., Regan, J. W., Leader, W. M., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1988). Site-directed mutagenesis of the cytoplasmic domains of the human β 2-adrenergic receptor. Localization of regions involved in G protein-receptor coupling. *J. Biol. Chem.* 263, 15985-15992.

Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Fung, J. J., Pardon, E., Casarosa, P., Chae, P. S.,

Devree, B. T., Rosenbaum, D. M., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Schnapp, A., Konetzki, I., Sunahara, R. K., Gellman, S. H., Pautsch, A., Steyaert, J., Weis, W. I., and Kobilka, B. K. (2011a). Structure of a nanobody-stabilized active state of the $\beta 2$ adrenoceptor. *Nature* **469**, 175-180.

Rasmussen, S. G., DeVree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Chae, P. S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J. M., Shah, S. T., Lyons, J. A., Caffrey, M., Gellman, S. H., Steyaert, J., Skiniotis, G., Weis, W. I., Sunahara, R. K., and Kobilka, B. K. (2011b). Crystal structure of the $\beta 2$ adrenergic receptor- G_s protein complex. *Nature* **477**, 549-555.

Ressler, K. J., Sullivan, S. L., and Buck, L. B. (1994). Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell* **79**, 1245-1255.

Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G., and Kobilka, B. K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **459**, 356-363.

Saito, H., Kubota, M., Roberts, R. W., Chi, Q., and Matsunami, H. (2004). RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors. *Cell* **119**, 679-691.

Saito, H., Chi, Q., Zhuang, H., Matsunami, H., and Mainland, J. D. (2009). Odor coding by a Mammalian receptor repertoire. *Sci. Signal.* **2**, ra9.

Savarese, T. M., and Fraser, C. M. (1992). In vitro mutagenesis and the search for structure-function relationships among G protein-coupled receptors. *Biochem. J.* **283** (Pt 1), 1-19.

Serizawa, S., Miyamichi, K., Nakatani, H., Suzuki, M., Saito, M., Yoshihara, Y., and Sakano, H. (2003). Negative feedback regulation ensures the one receptor-one olfactory neuron rule in mouse. *Science* **302**, 2088-2094.

Serizawa, S., Miyamichi, K., Takeuchi, H., Yamagishi, Y., Suzuki, M., and Sakano, H. (2006). A neuronal identity code for the odorant receptor-specific and activity-dependent axon sorting. *Cell* **127**, 1057-1069.

Singer, M.S., Hughes, T.E., Shepherd, G.M. (1998). Identification of olfactory receptor mRNA sequences from the rat olfactory bulb glomerular layer. *Neuroreport*. 9, 3745-3748.

Takeuchi, H., Inokuchi, K., Aoki, M., Suto, F., Tsuboi, A., Matsuda, I., Suzuki, M., Aiba, A., Serizawa, S., Yoshihara, Y., Fujisawa, H., and Sakano, H. (2010). Sequential arrival and graded secretion of Semaphorin 3F by olfactory neuron axons specify map topography at the bulb. *Cell* 141, 1056-1067.

Tsuboi, A., Imai, T., Kato, H. K., Matsumoto, H., Igarashi, K. M., Suzuki, M., Mori, K., and Sakano, H. (2011). Two highly homologous mouse odorant receptors encoded by tandemly-linked MOR29A and MOR29B genes respond differently to phenyl ethers. *Eur J. Neurosci*. 33, 205-213.

Vassar, R., Chao, S. K., Sitcheran, R., Nunez, J. M., Vosshall, L. B., and Axel, R. (1994). Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell* 79, 981-991.

Vassart, G., and Costagliola, S. (2011). G protein-coupled receptors: mutations and endocrine diseases. *Nat. Rev. Endocrinol*. 7, 362-372.

Wang, F., Nemes, A., Mendelsohn, M., and Axel, R. (1998). Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map. *Cell* 93, 47-60.

Wong, S. T., Trinh, K., Hacker, B., Chan, G. C., Lowe, G., Gaggar, A., Xia, Z., Gold, G. H., and Storm, D. R. (2000). Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice. *Neuron* 27, 487-497.

Yagi, T., Tokunaga, T., Furuta, Y., Nada, S., Yoshida, M., Tsukada, T., Saga, Y., Takeda, N., Ikawa, Y., and Aizawa, S. (1993). A novel ES cell line, TT2, with high germline-differentiating potency. *Anal. Biochem*. 214, 70-76.

Yang, M., Marchand, J.E., (2002). A sensitive technique to clone low abundance receptor transcripts from microdissected tissue punches. *Brain Res. Brain Res. Protoc. Apr*;9(2), 134-146.

Yu, C. R., Power, J., Barnea, G., O'Donnell, S., Brown, H. E., Osborne, J., Axel, R., and Gogos, J. A. (2004). Spontaneous neural activity is required for the establishment and maintenance of the olfactory sensory map. *Neuron* 42, 553-566.

Yu, S., Yu, D., Lee, E., Eckhaus, M., Lee, R., Corria, Z., Accili, D., Westphal, H., and Weinstein, L. S. (1998). Variable and tissue-specific hormone resistance in heterotrimeric G_s protein α -subunit (G_s α) knockout mice is due to tissue-specific imprinting of the g_s α gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95, 8715-8720.

Zhang, X., and Firestein, S. (2002). The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nat. Neurosci.* 5, 124-133.

Zheng, C., Feinstein, P., Bozza, T., Rodriguez, I., and Mombaerts, P. (2000). Peripheral olfactory projections are differentially affected in mice deficient in a cyclic nucleotide-gated channel subunit. *Neuron* 26, 81-91.

Zhuang, H., and Matsunami, H. (2008). Evaluating cell-surface expression and measuring activation of mammalian odorant receptors in heterologous cells. *Nat. Protoc.* 3, 1402-1413.

謝辞

本研究を行うにあたってお世話になった方々を以下に記載し、お礼を申し上げます。本研究の全般において多大なる御指導と御協力を賜りました東京大学理学系研究科 竹内春樹博士に深く感謝いたします。本論文に記載した *MOR215-1-ires-tauGFP* マウス、*MOR103-1→215-1-ires-tauCFP* マウスの作製にあたっては、CDB 変異マウス開発ユニットの清成寛博士および阿部高也博士の御協力を賜りました。第 2 章に記載した抗 I7 抗体は理化学研究所 吉原良浩博士より、抗 256-17 抗体は Hohenheim 大学 Heinz Breer 教授より提供していただきました。第 1-2 章に記載した抗 Plexin-A1 抗体、抗 Neuropilin-1 抗体は独立行政法人国立精神・神経医療研究センター 須藤文和博士より分与して頂きました。第 3 章に記載した AC III ノックアウトマウスは Washington 大学 Daniel R Storm 教授より、OMP-TTA マウス及び TRE-Kir2.1 マウスは Stowers 研究所 C Ron Yu 博士より提供していただいたものです。いずれも解析の機会を賜り、本研究を大きく前進させていただいたことに感謝します。

本研究を進めるにあたって坂野研究室の皆さんに建設的な意見をいただいたことに深く感謝しております。特に芹澤尚博士には本論文第 2 章部分を進めるにあたり多大なるご指導を賜りました。

最後に、常に大局的な視野から研究の方向性についてご指導いただいた坂野仁教授に心より感謝申し上げます。