

## 論文内容の要旨

論文題目 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)

氏名 中嶋 藍

匂い・光・味といった外界の刺激情報は、神経細胞において多様な G タンパク質共役型受容体 (G-protein coupled receptor: GPCR) によって検出された後、精巧に組織された神経回路によって適切に処理され、様々な情動や行動を引き起こす。ヒトやマウスは GPCR である嗅覚受容体 (odorant receptor: OR) を用いて数十万種類もの匂い物質を識別している。嗅覚受容体は GPCR の中でも約半数を占める巨大なファミリーであり、特にマウスにおいては約一千種類もの OR 遺伝子が存在する。嗅上皮には約一千万個の嗅神経細胞

(olfactory sensory neuron: OSN) が存在するが、個々の OSN ではこのうち 1 種類のみが相互排他的かつ mono-allelic に発現され、限定された匂い分子を検出している。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対へと軸索末端を収斂させ、二次神経細胞と接続している (図 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のマップ (糸球マップ) に変換され、さらに高次の嗅皮質へと伝達される。

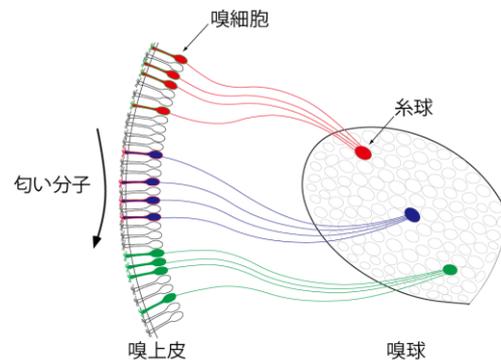


図 1 マウス嗅覚系の匂い情報変換

この OR 分子の種類に対応した脳の糸球マップは、遺伝的要因によって決定される軸索ガイダンス分子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さらなる精緻化を行うことで完成される。このうち、前者の大まかなトポグラフィックオーダーの決定は、少なくとも 2 段階の独立なプロセスにより達成されると考えられている。すなわち、(1) OSN の軸索が嗅球の背腹軸上の適切な位置に誘導される仕組み、(2) 同軸索が嗅球の前後軸上の適切な位置に誘導される仕組み、である。当研究室の先行研究により、嗅球背腹軸上の投射位置は発現される OR 分子の種類に依らず、OSN の細胞体の位置が重要なパラメーターとなっていることが判明している。嗅上皮における位置に従って発現量が規定される軸索ガイダンス分子群が、嗅球上の背腹軸に沿った糸球形成位置を規定する。一方、嗅球前後軸方向の軸索投射位置の規定は発現される OR 分子の種類に依存している。近年、OR 分子の種類は、下流に働くシグナル伝達を経て一群の軸索誘導分子 Neuropilin-1 (Nrp1) や Plexin-A1 (PlxnA1) の発現量へと変換され、これが軸索末端に提示される糸球地図形成に重要な役割を果たすことが明らかになってきた。しかし、約一千も存在する OR の種類の違いがどのようにして細胞内シグナルに反映され、軸索誘導分子の発現に反映されるのか、そのシグナルの起源が何であるのかは未解明の課題として残されていた。

糸球マップの形成を指令する OR のシグナルの由来としては、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、*Nrp1* や *PlxnA1* の発現制御に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。典型的な 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。しかしながら、近年 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) を有することが明らかとなってきた (図 2)。本研究では、このリガンドに依存しない OR の基礎活性によって糸球地図形成が制御されているという仮説の検証を試みた。

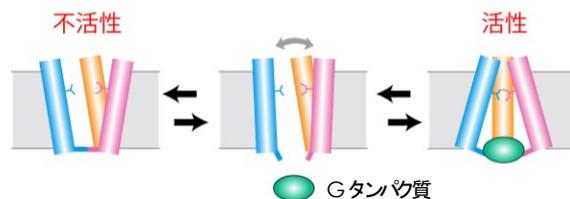


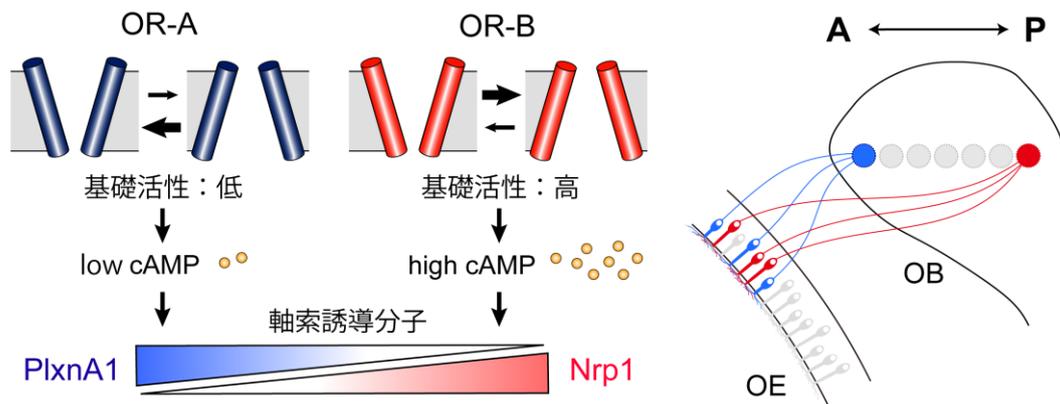
図 2 リガンド非依存的な GPCR の活性化

このためには、実際に OSN において OR 分子の基礎活性のレベルを変化させた場合の軸索投射にいかなる影響が現れるのかを観察することが必須である。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まだまだ少なく、また相同遺伝子が一千種類と多様であることなどから、OR 配列中で基礎活性に関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 は最も機能解析が進められている GPCR であり、基礎活性のレベルを変化させる変異型レセプターが複数同定されている。さらに、OR プロモーター下流から発現させると OR と同様にふるまい、OSN の軸索投射を制御することができる。これらの利点を利用し、トランスジェニックマウスの系を用いて OSN において野生型及び変異型  $\beta 2$ -AR を発現させ、その軸索が投射する糸球の形成位置を比較することで基礎活性に影響を与える一連の変異が OSN の軸索投射に及ぼす影響について検証した。その結果、基礎活性の低い変異型レセプターに対応する糸球体は野生型と比較して嗅球の前方に、基礎活性の高い変異型レセプターに対応する糸球体はより後方に観察された。このことから、嗅球の前後軸に沿った嗅細胞の軸索投射位置が、GPCR のリガンドに依存しない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。また投射先の変化とともに、Nrp1、PlxnA1 の発現量も基礎活性レベルに応じて変動したことから、OR 分子はそれぞれ固有なレベルの基礎活性を持ち、それが軸索ガイダンス分子の転写量へと変換されることで投射の制御が行われているというモデルが支持された (図 3)。

更に、実際に OR の基礎活性が嗅神経細胞の軸索投射先と対応しているかどうかを確認するため、嗅球の前・中・後部に軸索を投射する OSN で発現する OR についてそれぞれの基礎活性を測定した。in vitro において測定された OR のリガンド非依存的な活性の値と嗅球上の軸索投射領域との対応関係を検証したところ、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 の基礎活性は高いという傾向が見られた。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。

本研究から、GPCR に属する OR が外部刺激に依存しない基礎活性によって嗅神経回路の構築を制御している事が明らかとなった。ヒトを含む高等動物の複雑な脳機能は、一千億個もの神経細胞が発生の過程で自身の細胞個性に従って互いにシナプスを形成し、精巧な神経回路網を構築することにより支えられている。従って、神経細胞の個性がどのようにして規定され、特異的な回路構築を達成するのか、その機構の解明は神経発生学における一大テーマとなっている。今回の研究成果は、マウス嗅覚系をモデルとした神経細胞の個

性獲得の機構として他の神経系にも敷衍出来る可能性があるものと期待される。加えて、本研究は従来外部刺激に対する検出器としての機能にのみ注目されてきた GPCR が、リガンドに依存しない基礎活性によって生理学的機能を果たす事を示した最初の例であり、GPCR の研究分野に新しい切り口を与え得ると予想される。



**図3 嗅覚受容体の基礎活性が嗅神経細胞の軸索投射位置を規定する**

個々の OR は各々ユニークなレベルの基礎活性を持ち、その強度に従って軸索ガイダンス分子の発現量が制御され、これらの分子が軸索末端に提示される（左）。発生の過程において、個々の OSN は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（右）。