

- 16) Naik, S.H., Metcalf, D., van Nieuwenhuijze, A., Wicks, I., Wu, L., O'Keeffe, M., & Shortman, K. (2006) *Nat. Immunol.*, 7, 663-671.
- 17) Onai, N., Obata-Onai, A., Schmid, M.A., Ohteki, T., Jarrossay, D., & Manz, M.A. (2007) Identification of clonogenic common Flt3⁺M-CSFR⁺ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat. Immunol.*, 8, 1207-1216.

小内 伸幸, 小内 亜矢, 樗木 俊聡
(秋田大学大学院医学系研究科生体防御学分野)

Developmental pathway of dendritic cell subsets

Nobuyuki Onai, Aya Obata-Onai, and Toshiaki Ohteki (Department of Immunology, Akita University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita-city, Akita 010-8543, Japan)

嗅覚受容体に依存した軸索投射の分子機構

1. はじめに

様々な高次機能を担う我々の脳は無数の神経細胞から成り立っている。個々の神経細胞はそれぞれ異なる入力を受け、異なる神経細胞へと出力する。しかしながら、無数の神経細胞の個性や神経接続特異性が、分子レベルでどのように保障されているかについてはほとんど分かっていないといつてよい。

そこで筆者らは、マウス嗅覚系をモデル系としてこの問題に取り組んでいる。嗅覚系では、1,000種類の嗅神経細胞の軸索が、1,000対の異なる糸球に投射するという、驚くべき複雑な投射様式が知られている。特筆すべき点は、嗅神経細胞の軸索投射には嗅覚受容体 (odorant receptor; OR) が重要な役割を果たす、ということである。このミニレビューでは、最近明らかになったOR依存的軸索投射の分子機構について述べるとともに、他の感覚系においても明らかになりつつある神経回路形成の新しいロジックについて論じてみたい。

2. マウス嗅覚系の軸索投射様式

マウスにおいて多様な匂い分子を受容するのは、約1,000種類存在するORである¹⁾。約1,000万個存在する嗅神経細胞は、おのおのが1,000種類のOR遺伝子の中か

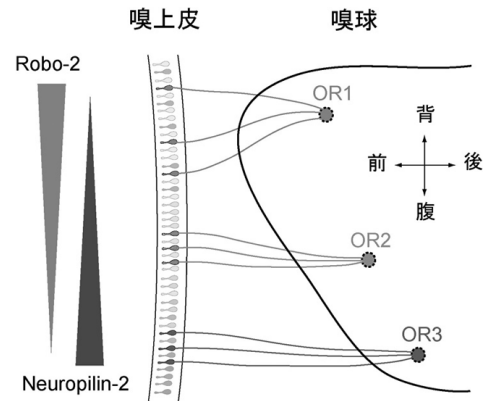


図1 嗅球背腹軸に沿った軸索投射位置決定⁴⁾
個々のOR遺伝子は嗅上皮上の特定の領域に局限して発現しており、嗅上皮上の背腹軸が嗅球上の投射位置の背腹軸に大まかに対応する。背腹軸方向の投射位置決定にはRobo-2やNeuropilin-2などが関与すると考えられている。

ら1種類のみを相互排他的に、かつ mono-allelic に発現している。これは1ニューロン-1受容体ルールとして知られている²⁾。また、嗅神経細胞の軸索は脳の嗅球へと投射するが、この際、同種のORを発現する嗅神経細胞の軸索は特定の糸球へと収斂し、二次神経細胞に接続する³⁾ (図1)。このようにして、嗅上皮上で1,000種類のORによって受容された匂いの情報は、嗅球上では1,000種類の糸球のどれが発火したか、という情報へと変換されることとなる。嗅球上では匂いの種類や濃度に応じて異なる種類の糸球が異なる組み合わせで発火することとなり、それが脳における匂い識別の基礎になっていると考えられる。

3. 嗅球背腹軸に沿った軸索投射位置決定

それでは、1,000種類の嗅神経細胞と1,000対の糸球の対応付けはどのように決まっているのだろうか。投射位置決定のロジックは嗅球背腹軸と前後軸とで大きく異なる。まずは背腹軸に沿った軸索投射位置決定の分子機構について解説したい。

以前から、ORは嗅上皮上で偏りをもって発現していることが知られていた。あるORはより背側のストライプ状のゾーンで発現し、またあるORはより腹側のゾーンに分布する。最近、多くのOR遺伝子について嗅上皮上での発現分布が詳細に解析され、その結果、個々のORはそれぞれ固有のストライプ状発現領域をもっており、それらが背側から腹側にかけ、互いに重なり合いながら分布している

ことが判明した⁴⁾。更に、遺伝子マーカーや逆行性色素を用いた染色の解析から、嗅上皮背腹軸上の嗅神経細胞の位置情報が、嗅球背腹軸に沿った軸索投射位置とよく相関することが見出された⁴⁾。従って、嗅上皮上で背腹軸に沿って勾配をなして発現している軸索ガイダンス分子が、嗅球背腹軸に沿って軸索投射位置を規定している、と考えられている (図 1)。

実際、嗅上皮上では Robo-2 が背側から腹側にかけて高低の勾配をなして発現しており⁵⁾、Neuropilin-2 はこれとちょうど逆の勾配をなして分布している⁶⁾。Robo-2 およびそのリガンド Slit-1 のノックアウトマウスにおいては、嗅球背腹軸に沿った軸索投射位置決定に異常が見られることが報告されている⁵⁾。

4. 嗅球前後軸に沿った軸索投射位置決定

一方、投射位置の前後軸に関しては、嗅上皮上の位置情報との相関は見出されていない。前後軸に関しては発現する嗅覚受容体の種類⁷⁾および発現量⁸⁾が影響を与えることが示唆されている。

軸索投射における OR の関与は、1996 年に Mombaerts らによって初めて報告された³⁾。OR 遺伝子 *P2* のコーディング領域を別の OR 遺伝子 *M12* に置き換えると、軸索は本来の *P2* とも *M12* とも異なる位置へと投射する。また、*M71* という OR のタンパク質レベルでの発現量を人為的に下げると、投射先が変化することが観察されている⁸⁾。これらの観察から、OR は軸索投射において指令的な役割 (instructive role) を果たすと考えられてきたが、その具体的な分子メカニズムについては長年の間不明であった。

筆者らは OR に依存した軸索投射の分子機構を解明するため、まず、シグナル伝達機構に注目して研究を行った。OR は匂い分子を検出する際には G_{olf} と呼ばれる三量体 G タンパク質と共役することが知られているが、 G_{olf} のノックアウトマウスにおいては軸索投射の異常は報告されていない。そこで筆者は、他の G タンパク質が関与する可能性について調べるため、G タンパク質と共役できない変異型の OR を作製し、軸索投射への影響について調べた⁹⁾。

野生型の OR, I7(WT), および G タンパク質との共役に必須な DRY モチーフを改変した OR, I7(RDY) のそれぞれを発現するトランスジェニックマウスを作製し、その軸索投射について解析した。ちなみに、OR 遺伝子は mono-allelic に発現制御されている (すなわち同一のプロモーター配列を有していても単一の allele しか活性化されない) ため、トランスジーンは常に 1 コピーのみが発現し、

また内在性 OR 遺伝子も共発現しない。

その結果、I7(WT) 発現細胞は特定の 1 対の糸球へと軸索を収斂させるのに対して、I7(RDY) 発現細胞の軸索は、嗅球前方に留まっており、二次神経細胞とのシナプス形成に至らないことが判明した⁹⁾ (図 2a 中央)。この結果は、OR が G タンパク質を介して軸索投射の制御を行っていることを強く示唆している。

そこで次に、下流の G タンパク質の恒常活性化型変異体を共発現させることでシグナルをレスキューする実験を行った。 G_{olf} 以外に軸索投射に関与しうる G タンパク質としては、投射の初期に発現している G_s が有力な候補として考えられたので、I7(RDY) と恒常活性化型 G_s (caG_s) を共発現させるトランスジェニックマウスを作製した。その結果、驚くべきことに I7(RDY) + caG_s 発現細胞の軸索は 1 対の糸球へと正常に収斂することが判明した⁹⁾ (図 2a 右)。 G_s の下流分子として知られるプロテインキナーゼ A (PKA) および転写因子 cAMP response element binding protein (CREB) についても、恒常活性化型の変異体を I7(RDY) と共発現させる実験を行ったところ、少なくとも部分的にはレスキューが見られることが判明した⁹⁾。これらの結果は、OR 依存的な軸索投射に cAMP シグナルが関与することを示しているのみならず、OR の受容体としての機能は投射位置の規定には必要ないことを示している。それでは、軸索投射位置の特異性は cAMP シグナルのどのような性質によって規定されるのであろうか？

筆者らは、cAMP シグナルの「強さ」が投射位置を規定する上で重要なパラメータになっているのではないかと考え、それを検証する実験を行った。野生型 OR, I7(WT) 発現細胞において caG_s ないしはドミナントネガティブ型 PKA (dnPKA) を共発現させ、cAMP シグナルを増減させた。その結果、 caG_s を共発現させた際には投射先は後方にシフトしたのに対して、dnPKA を共発現させた場合には投射先は前方にシフトすることが判明した⁹⁾ (図 2b)。更には、異なる OR を発現するヘテロ細胞集団に大過剰の caG_s を発現させた場合、それらの軸索は 1 箇所の糸球に収斂することが判明した⁹⁾。以上の結果は、cAMP シグナルの「強さ」が投射位置決定の上で主要なパラメータになっていることを示唆している。

cAMP シグナルの「強さ」に依存した軸索投射位置決定には下流の転写制御が重要な役割を果たすと考えられる。cAMP シグナルによって正に転写制御されている軸索ガイダンス分子 Neuropilin-1 は、嗅神経細胞の軸索末端において前後軸に沿った勾配をなして分布している⁹⁾。嗅神経細

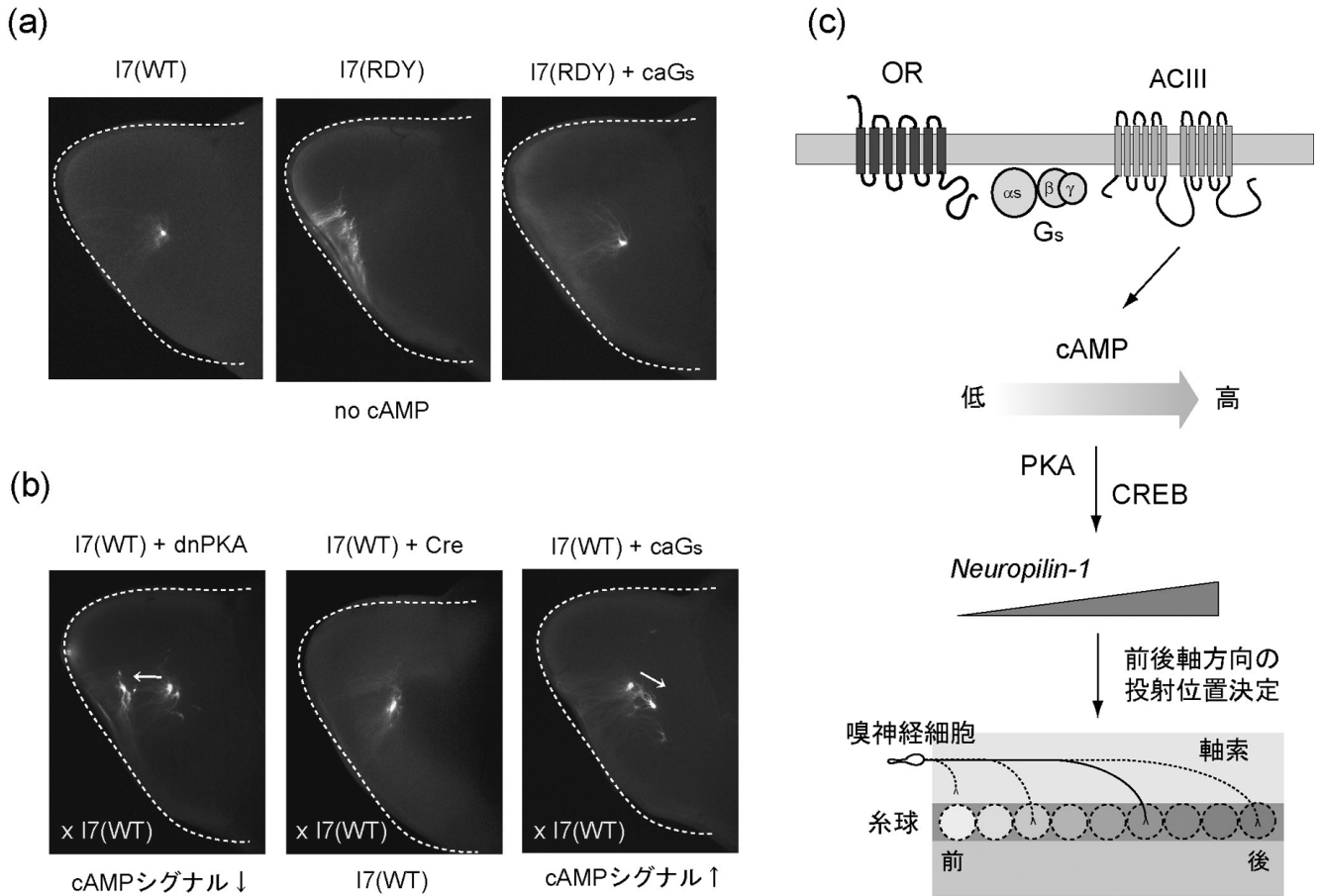


図2 嗅球前後軸に沿った軸索投射位置決定⁹⁾

(a) 野生型嗅覚受容体 I7 の DRY モチーフを RDY に改変した変異体 I7 (RDY) を発現する嗅神経細胞の軸索は、正常に収斂せず、嗅球前方に留まる。この形質は、恒常活性化型 G_s (caGs) を共発現させることによってレスキューされる。

(b) I7 (WT) に caGs を共発現させて cAMP シグナルを強くすると軸索投射先は後方にシフトし、逆にドミナントネガティブ型 PKA を共発現させて cAMP シグナルを弱くすると軸索投射先は前方にシフトする。

(c) cAMP シグナルを介した軸索投射位置の制御。幼若な嗅神経細胞では、個々の OR はそれぞれ固有のレベルの cAMP シグナルを産生しており、そのシグナルのレベルに応じて軸索投射位置が決まる。cAMP シグナルは、軸索ガイダンス分子の転写制御を介して投射位置を規定する。

胞における主要なアデニル酸シクラーゼである ACIII のノックアウトマウスにおいては、Neuropilin-1 の発現がなくなり、軸索投射位置が前後軸に沿って大きく乱れる。Neuropilin-1 のリガンドである反発性因子 Sema3A のノックアウトマウスにおいても同様のフェノタイプが報告されている。

このように、OR は従来考えられてきたように軸索末端で直接ガイダンス分子や接着分子として機能するわけではなく^{7,8)}、別の軸索ガイダンス分子群の転写制御を介して間接的に軸索投射の制御を行っていることが明らかとなった⁹⁾ (図 2c)。

5. 神経活動依存的な軸索の収斂機構

以上に述べたように、背腹軸方向の投射位置決定は位置情報によって規定された Robo-2 や Neuropilin-2 等の発現レベルによって決まり、前後軸方向の投射位置は OR/cAMP シグナルによって規定された Neuropilin-1 等の発現レベルによって決まる。しかしながら、これら二つのパラメータだけでは、ローカルな投射位置決定を厳密に行うには不十分であると考えられる。

ローカルな軸索投射制御には神経活動が重要な役割を果たすことが示唆されていた。例えば、匂い刺激を活動電位

刺激に変換する主要なイオンチャンネル CNGA2 のノックアウトマウスや、遺伝学的手法によって神経活動を抑えたトランスジェニックマウスでは軸索の収斂が起こりにくくなることが報告されている。この神経活動依存的な軸索収斂に関して、最近新しいメカニズムが報告された¹⁰⁾ (図 3)。

嗅神経細胞において、OR によって制御される神経活動は、様々な細胞表面分子の発現を制御している。神経活動の高い細胞では Kirrel2, EphA5 といった分子が発現しており、神経活動の低い細胞では Kirrel3, ephrin-A5 などの分子が発現している¹⁰⁾。Kirrel2, Kirrel3 はともにホモフィリックな細胞接着分子であり、その結果同種の軸索の収斂

を促す。一方, ephrin-A5 と EphA5 は反発性相互作用を介して異種軸索の選別を促すと考えられる。この結果, 神経活動の高低によって軸索が選り分けられることになる。このモデルは神経活動依存的な軸索収斂が軸索間相互作用のみで説明できるという点で興味深い。

神経活動は、軸索投射が完了した後のいわゆるリファインメントにおいても重要な役割を果たす。嗅神経細胞は、軸索投射のエラーの結果、しばしば異所的なサテライト糸球を形成するが、これらの糸球はやがて消滅する。異所的糸球の消去には神経活動が必要であることが報告されている¹¹⁾。

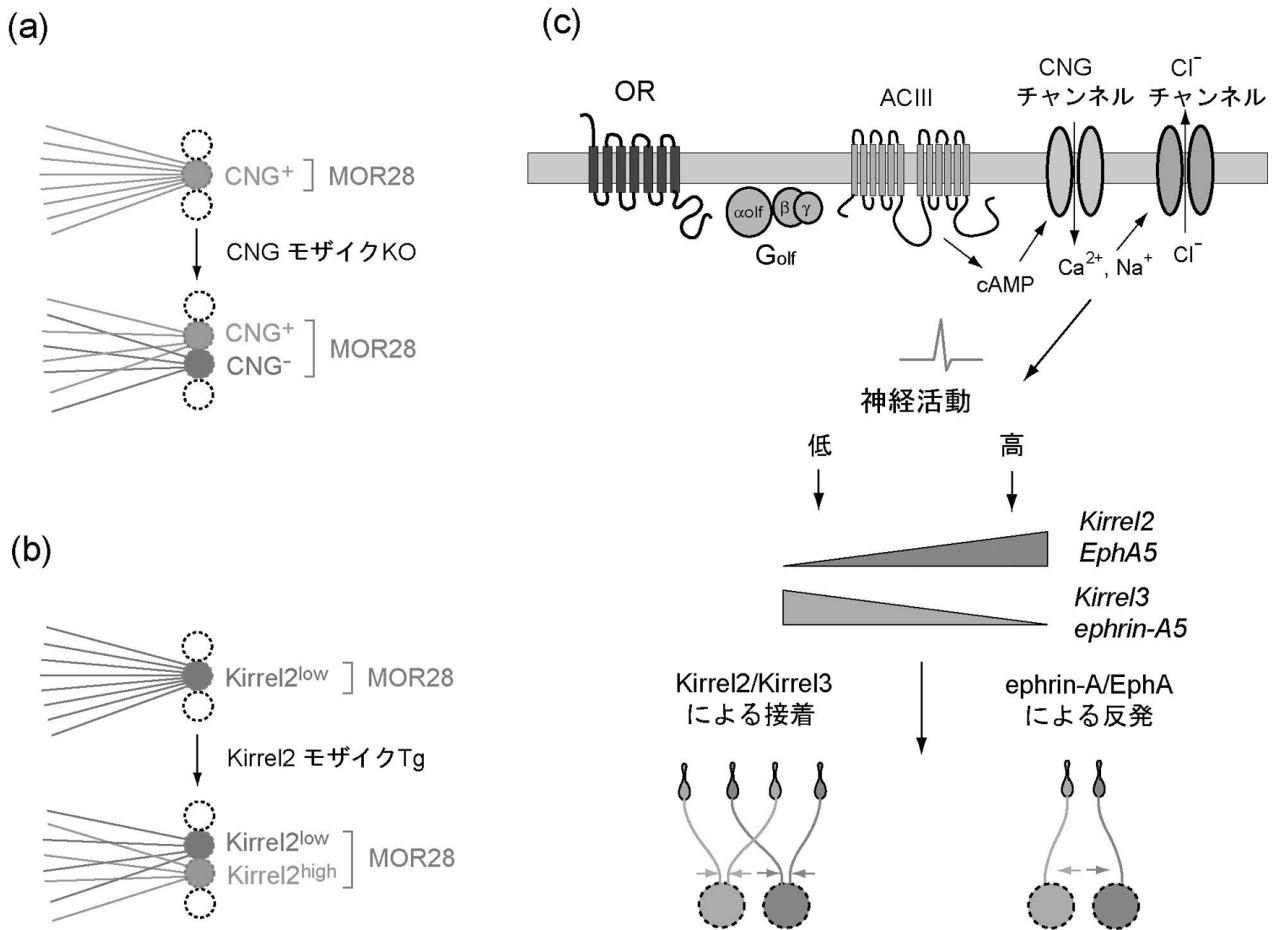


図 3 神経活動依存的な嗅神経細胞軸索の収斂・選別¹⁰⁾

(a) CNG チャンネルのモザイク解析. CNGA2 は X 染色体上に存在するため, X 染色体のランダムな不活化を利用して, CNG⁺/CNG⁻ という 2 種類の嗅神経細胞が混在するモザイクマウスを作製することができる。このマウスにおいては, これら 2 種類の軸索投射先は分離する。

(b) Kirrel2 のモザイク解析. トランスジェニックマウスの系を用いて, 神経活動依存的に発現する細胞接着因子 Kirrel2 をモザイクに発現させると, Kirrel2 の発現レベルに応じて軸索投射先が分離する。

(c) 神経活動依存的な軸索の収斂・選別. OR の種類および神経活動のレベルに応じて様々な細胞接着・反発性分子の遺伝子発現が制御されている。その結果, 同種の軸索は束ねられ, 異種の軸索は選り分けられる。

6. 中枢神経系の回路形成における末梢入力役割

OR の数が 50 程度しかないショウジョウバエの嗅覚系では、OR 遺伝子の発現制御も軸索投射も、ともに決定論的な遺伝的プログラムによって制御されている。これに対し、OR が 1,000 種類存在するマウス嗅覚系では、OR 遺伝子の発現は stochastic (確率的) に決まり、神経接続の特異性は OR から入力されるシグナル (cAMP/PKA シグナルおよび神経活動) の強さに応じてフレキシブルに決まっている。

最近、嗅覚系以外でも、末梢入力に依存して神経接続の特異性が規定される例が報告されてきている。例えば、運動神経の樹状突起が脊髄において正しい感覚神経と接続するためには、ターゲットの筋肉から逆行性に入力されるシグナルが重要であることが知られている¹²⁾。また、体性感覚を担う三叉神経が中枢に投射するための位置情報は、末梢で勾配をもって分布している BMP4 によって入力され、嗅覚系と同様、シグナルの「強さ」が位置情報を規定することが報告されている¹³⁾。

こうしてみると、末梢由来のシグナルがより中枢への神経接続を制御している例は嗅覚系に限らないことが分かる。これまで、末梢由来の神経活動がより中枢の回路形成・成熟を可塑的に制御することは知られていたが、最近の研究により、神経活動以外にも末梢のシグナルがより中枢の回路形成を制御する機構があるということが明らかになりつつある。

決定論的な遺伝的プログラムではなく、末梢由来のシグナルに依存した機構で神経回路を形成するのは、進化的にもメリットがあると考えられる。例えば、嗅覚系においては、OR 遺伝子が遺伝子重複によって新たに生じると、それだけで新たな投射先が作られ、新たな匂いの識別が可能となる。興味深いことに、最近、視覚系でもこれとよく似た報告がなされた¹⁴⁾。ヒトを含めた霊長類の一部は赤緑青を識別できる 3 色型色覚をもつが、それ以外のほとんどの哺乳類は 2 色型色覚である。第 3 の錐体視物質は遺伝子重複の結果獲得されたと考えられているが、3 色を識別する脳内の神経回路がどのように生じたのかに関してはこれまで不明であった。最近、Nathans らのグループが、マウスにおいて人為的に第 3 の錐体視物質を発現する錐体細胞を作り出したところ、それらのマウスはそれだけで 3 色を識別できることが判明した¹⁴⁾。この結果は、末梢の錐体細胞

からの入力だけで脳内に新たな色覚を司る神経回路が形成され得ることを示している。

このように、我々がモデル系として用いている嗅覚系の研究は、ヒトの脳が発生的および進化的な観点からどのように形作られたのか、という未解明の重要な課題に対しても興味深い示唆を与えてくれる¹⁵⁾。

- 1) Buck, L. & Axel, R. (1991) *Cell*, 65, 175–187.
- 2) Serizawa, S., Miyamichi, K., & Sakano, H. (2004) *Trends Genet.*, 20, 648–653.
- 3) Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S.K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J., & Axel, R. (1996) *Cell*, 87, 675–686.
- 4) Miyamichi, K., Serizawa, S., Kimura, H.M., & Sakano, H. (2005) *J. Neurosci.*, 25, 3586–3592.
- 5) Cho, J.H., Lepine, M., Andrews, W., Parnavelas, J., & Cloutier, J.F. (2007) *J. Neurosci.*, 27, 9094–9104.
- 6) Norlin, E.M., Alenius, M., Gussing, F., Fagglund, M., Vedin, V., & Bohm, S. (2001) *Mol. Cell. Neurosci.*, 18, 283–295.
- 7) Wang, F., Nemes, A., Mendelsohn, M., & Axel, R. (1998) *Cell*, 93, 47–60.
- 8) Feinstein, P., Bozza, T., Rodriguez, I., Vassalli, A., & Mombaerts, P. (2004) *Cell*, 117, 833–846.
- 9) Imai, T., Suzuki, M., & Sakano, H. (2006) *Science*, 314, 657–661.
- 10) Serizawa, S., Miyamichi, K., Takeuchi, H., Yamagishi, Y., Suzuki, M., & Sakano, H. (2006) *Cell*, 127, 1057–1069.
- 11) Zou, D.J., Feinstein, P., Rivers, A.L., Mathews, G.A., Kim, A., Greer, C.A., Mombaerts, P., & Firestein, S. (2004) *Science*, 304, 1976–1979.
- 12) Hippenmeyer, S., Kramer, I., & Arber, S. (2004) *Trends Neurosci.*, 27, 482–488.
- 13) Hodge, L.K., Klassen, M.P., Han, B.X., Yiu, G., Hurrell, J., Howell, A., Rousseau, G., Lemaigre, F., Tessier-Lavigne, M., & Wang, F. (2007) *Neuron*, 55, 572–586.
- 14) Jacobs, G.H., Williams, G.A., Cahill, H., & Nathans, J. (2007) *Science*, 315, 1723–1725.
- 15) Imai, T. & Sakano, H. (2007) *Curr. Opin. Neurobiol.*, Oct 10; (10.1016/j.conb.2007.08.002)

今井 猛, 坂野 仁

(東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻)

Molecular mechanisms of odorant receptor-instructed axonal projection

Takeshi Imai and Hitoshi Sakano (Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo, 2-11-16 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0032, Japan)