

「生物の発生・分化・再生」

平成 13 年度採択研究代表者

坂野 仁

(東京大学大学院理学系研究科 教授)

「嗅覚系における神経回路形成と再生の分子機構」

1. 研究実施の概要

ヒトやマウスの嗅覚系では、全遺伝子の約2%を占める数百種類の嗅覚受容体 (odorant receptor: OR) 遺伝子により数十万種類の匂い分子が識別されている。匂い分子は、その官能基を介して複数の OR と異なる親和性で結合し、嗅球においてそれら受容体に対応する特定の糸球が結合の度合いに応じて異なる強さで発火し、その発火の二次元的パターン(匂い地図)によって微妙な匂いの違いを脳が識別していると考えられている。ヒトにおいて嗅神経細胞は、常時再生を繰り返しているという点で極めて例外的であるが、発生や再生の過程において、この匂い地図がどのように形成され、維持されるかは極めて興味深い。

マウスやヒトの OR 遺伝子系では、一つの嗅細胞で一種類の受容体遺伝子を一方の対立遺伝子からのみ選択的に発現するというユニークな発現様式が観察されている。また嗅細胞の嗅球への軸索投射は、発現される OR 分子によって規定され、OR 遺伝子、嗅細胞、投射先の間で成立する1:1:1の厳密な対応関係が嗅覚情報処理の基本になっていると考えられている。これまで当グループでは、マウス嗅覚受容体 *MOR28* 遺伝子クラスターに着目し、その基礎データを集めてきた。最近では、YAC ベクターを用いて、*lacZ* 遺伝子で標識した OR 遺伝子 *MOR28* を持つトランスジェニックマウスを作製し、その発現に成功した。また、ノックインとそれに対応する内在性の遺伝子との間で相互排他的発現を確認した。当グループではまた、嗅細胞の嗅球への軸索の投射に関しても、各 allele 毎に投射領域が確保されること、また隣接した糸球に投射する二種類の軸索の分離・収斂は、軸索伸長の過程ではなく糸球形成の際に生じるらしいことを確認した。

1991 年に OR 多重遺伝子系が報告されて以来、最近では線虫やショウジョウバエを用いた化学受容の研究や、マウスにおけるフェロモン受容体や味覚受容体の研究など、chemosensing の分野は大きく進展している。本研究課題では、当グループで確立した OR 遺伝子のトランスジェニック発現系を駆使し、この多重遺伝子系にみられる選択的遺伝子発現のメカニズムや、OR 分子の種類に規定されて生じる軸索投射について研究を進める。ここで扱う研究は、単に嗅覚系にとどまらず、神経再生や発生過程における神経回路形成のプロセスを理解する上でも極めて有用である。

2. 研究実施内容

当グループでは、マウス14番染色体にクラスターをなす3個の OR 遺伝子 *MOR28*, *MOR10* 及び

MOR83について、その発現細胞と軸索投射を解析した。その結果、これら遺伝子は嗅上皮のゾーン4で相互排他的に発現しており、嗅球切片の解析から、MOR28, MOR10 または MOR83 を発現する細胞は、各々の軸索を3つの近接した一連の糸球に投射していることが明らかとなった。これはOR遺伝子の染色体上での linkage と嗅球上における投射先の関連を解析した初めての報告で、このアプローチは今後、匂い地図形成の遺伝学的基礎を理解する上で有用であると思われる。

当グループでは次に、特定の OR 遺伝子を発現する均一な細胞集団を得る為、green fluorescent protein (GFP)の遺伝子をノックインの手法を用いて MOR28 遺伝子に導入し、緑の蛍光を発する嗅細胞の核を単離し、fluorescent *in situ* hybridization (FISH)法により MOR28 の遺伝子座と発現座の関係について解析した。その結果この遺伝子は、父方 (paternal) 或いは母方 (maternal) のどちらか一方からのみ mono-allelic に発現していることが示された。また、染色体上での発現位置と遺伝子座との間に差が認められないことから、発現に際して遺伝子の組み換えや遺伝子変換など DNA レベルでの大きな変化は生じていないらしいことが示唆された。

当グループではまた、マウス OR 遺伝子 MOR28 をトランスジーンとして導入し、染色体の同一部位に並んで挿入された複数の MOR28 遺伝子の間に発現の相互排他性のある事を見出した。これは、同じ調節領域を持つ同じ種類の OR 遺伝子同士が、non-allelic な状況においても相互排他的に発現されることを実験的に示した初めての例である。この様な発現様式は、これ迄免疫系の抗原受容体遺伝子以外には知られておらず、その発現機構の解明が待たれる。

当グループではまた、MOR28 トランスジーンを発現する嗅神経細胞と、対応する内在性遺伝子を発現する嗅細胞とは、同じ受容体タンパク質を産生するにも拘わらず、隣接した異なる糸球に投射すること、更に、二重標識した掛け合わせマウスの解析により、それぞれを発現する嗅細胞の軸索の選別・収束は pathfinding の過程ではなく、糸球構造の形成に伴って嗅球上で生じることを示した。今後は、OR 遺伝子の遺伝子多型、標識の種類及び有無など、軸索投射の位置特異性を規定するパラメーターになり得る要因について逐次検討していく。

本研究課題では今後も、多重標識した OR 遺伝子のトランスジェニック発現系を駆使して、発生及び再生過程における遺伝子の発現制御と軸索投射の解析を継続する。これら一連の研究は、発生・再生過程における神経細胞の軸索伸長、回路形成、投射の特異性を規定する分子機構など、神経系全般にかかわる基礎的問題の理解に大きく寄与するものと期待される。

3. 研究実施体制

坂野 仁 グループ

- ① 研究分担グループ長名(所属、役職):3サブグループを坂野 仁(東大・教授)が総括する
- ② 研究項目
 - サブグループ1:嗅覚受容体遺伝子の発現制御機構の解明
 - サブグループ2:嗅神経細胞の軸索投射機構の解明
 - サブグループ3:新生・再生時の嗅神経回路形成機構の解明

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表(平成13年11月以降)

- Kodama, M., Hayashi, R., Nishizumi, H., Nagawa, F., Takemori, T., and Sakano, H.: The PU.1 and NF-EM5 binding motifs in the Ig κ 3' enhancer are responsible for directing somatic hypermutations to the intrinsic hot spots in the transgenic V κ gene. *Internatl. Immunol.* **13**, 1415-1422 (2001).
- Nishizumi, H., Komiyama, T., Miyabayashi, T., Sakano, S., and Sakano, H.: BET, a novel neuronal transmembrane protein with multiple EGF-like motifs. *NeuroReport* **13** (2002).

(2) 特許出願

なし