

「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

高等動物の嗅覚系は、多様な分子構造を受容体多重遺伝子を用いて識別するという点で、免疫系の抗原認識に類似している。マウス嗅覚系では約一千種類のodorant receptor (OR) 遺伝子によって、数十万種類の匂い分子が受容され、それらの組合せから成る無数の匂いが識別されている。ヒトやマウスのOR多重遺伝子では、一つの嗅神経細胞で一種類のORが一方のalleleからのみ発現するという極めてユニークな発現様式を採っている。また、嗅神経細胞の嗅球への軸索投射は、個々の嗅神経細胞が発現するOR分子の種類によって規定され、嗅球上の投射先である糸球構造とORの間には1:1の対応関係が成り立っている。従って嗅球表面には、丁度1,000個の糸球を素子とする電光掲示板の様に、匂いに応じて様々な発火のパターンが形成され、この“画像”によって匂いの種類を脳が識別すると考えられている。この匂い情報の二次元画像への変換は、1神経・1受容体という、OR遺伝子の単一発現によって支えられている。

本研究では、この嗅覚受容体多重遺伝子に見られる mono-allelic な遺伝子選択のメカニズムと、それにより規定される軸索投射の分子機構を明らかにしつつ、嗅覚系における神経回路形成のプロセスの解明を目指す。

2. 研究実施内容

1) LCR による OR 遺伝子単一発現の為の正の制御

マウスOR遺伝子は約50のクラスターをなし、ほぼ全ての染色体に分散している。当グループでは、*MOR28*クラスターを、yeast artificial chromosome (YAC) を用いてマウスに導入し、その発現を解析してきた。クラスター上流領域の塩基配列をヒトとマウスの間で比較した結果、*MOR28*から75kbのところ約2kbのホモロジー (H) が検出された。次に、このH領域が下流に位置するOR遺伝子の発現に必要かどうかを検定する為、YAC-290を基に、Hを欠失させたコンストラクトを作成した(YAC-290dH)。その結果、H領域を欠失していないコントロールでは、これら3つの遺伝子が正常に発現されるのに対し、H領域を欠失するといずれのOR遺伝子の発現も見られなくなった。

YACコンストラクトの内、YAC-140など上流領域を大きく欠いたものでは、ORトランスジ

ーンの発現は一切見られない。そこで我々は、H領域を含む2kbのDNAを、YAC-140の先端に継いで、ORトランスジーンが発現が回復するかどうかを調べた。その結果、Hを付加したコンストラクトでは、OR遺伝子の発現が認められた。従ってこのH領域は、下流に位置する複数のOR遺伝子を一括して制御するlocus control region (LCR)であると考えられる。

ここに述べた嗅覚のLCRは、約50あるOR遺伝子クラスターのstochasticな活性化に必要であるのみならず、活性化されたクラスターの中から一種類のORだけを相互排他的に発現させる正の制御にも関与している。即ち、LCRに形成される転写活性化複合体が、クラスター内に存在する複数のプロモーターの内、ランダムに、しかし一つだけと相互作用すると仮定すれば、OR遺伝子のクラスター内での単一発現が説明出来る。

2) OR 分子による負のフィードバック制御

ORクラスターをシスに制御するLCRが、その支配下にある遺伝子メンバーの中から、いかに一つを選んで活性化するかについては上記の通りである。しかし複数のLCRの間に活性化の排他性がなければ、早晚、別のクラスターが活性化されて、ORの単一発現が崩れてしまう。我々はOR分子そのものに、他のOR遺伝子の新たな活性化を阻止する機能があるのではないかと考え、*MOR28*のコーディング領域を全て欠失した、変異型コンストラクトを作成した (*del-MOR28*)。この遺伝子は、プロモーターはそのままなので、欠失のない野生型トランスジーン (Tg *MOR28*) 同様、正常に選択されて活性化を受け標識遺伝子 (*GFP*) を発現する。我々は欠失型 *del-MOR28* をトランスジーンとして導入し、内在性の *MOR28* との共発現の有無を調べた。この実験では *del-MOR28* の発現を *GFP* の抗体を用いて緑に染色し、同時に、内在性 *MOR28* の発現をコーディング領域のプロンプを用いて検出した (赤に染色)。その結果、嗅上皮切片の二重染色写真には、共発現によると思われる黄色の細胞が高頻度に観察された。

OR 多重遺伝子系には多くの偽遺伝子が存在し、マウスでは約 20%、ヒトでは半数近くを占めるといわれている。我々はこれら偽遺伝子の内で、フレームシフトによる停止コドンの出現で、短いペプチドしか翻訳されない変異型 OR 遺伝子に注目し、これら偽遺伝子を選択した嗅神経細胞が、他の OR 遺伝子との共発現を許容しているかどうかについて検定した。共発現を調べる為のパートナー遺伝子としては、発現頻度の極めて高い、H 領域を付加した *MOR28* のミニジーンを用いた。その結果、検定したすべての偽遺伝子が、*MOR28* ミニジーンとの共発現を示した。これらのデータは、OR 遺伝子の発現産物が、他の OR 遺伝子の新たな発現を阻止するというフィードバックモデルを支持している。

以上述べたように、長年懸案であった 1 嗅神経・1 受容体ルールを支える分子機構は、LCR による正の制御と OR 分子による負の制御によって説明される事となった。

3. 研究実施体制

坂野 仁グループ

- ① 研究分担グループ長：坂野 仁 (東京大学大学院理学系研究科、教授)
- ② 研究項目：3 サブグループを坂野 仁が総括する

サブグループ 1 : 嗅細胞の分化に伴う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 : 嗅覚系の発生に伴うにおい地図形成の基本原理の解明

サブグループ 3 : 新生・再生時における嗅神経軸索投射の分子機構の解明

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- Oka, Y., Kobayakawa, K., Nishizumi, H., Miyamichi, K., Hirose, S., Tsuboi, A., and Sakano, H.: O-MACS, a novel member of the medium-chain acyl-CoA synthetase family, specifically expressed in the olfactory epithelium in a zone-specific manner. *Eur. J. Biochem.* **270**, 1995-2004 (2003).
- Nakatani, H., Serizawa, S., Nakajima, M., Imai, T., and Sakano, H.: Developmental elimination of ectopic projection sites for the transgenic OR gene that has lost the zone specificity in the olfactory epithelium. *Eur. J. Neurosci.* **18**, 2425-2432 (2003).
- Serizawa, S., Miyamichi, K., Nakatani, H., Suzuki, M., Saito, M., Yoshihara, Y., and Sakano, H.: Negative feedback regulation ensures one receptor - one olfactory neuron rule in mouse. *Science* **302**, 2088-2094 (2003).

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：0件（研究期間累積件数：0件）