

「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

マウス嗅覚系において個々の嗅神経細胞（嗅細胞）は、約1,200種類ある匂い受容体（OR:odorant receptor）遺伝子のうちたった一つを相互排他的に、かつ二つある対立形質のうち一方からのみ発現している。この1 neuron – 1 receptorルールは、匂い情報の嗅球における二次元変換の基礎となっている。当グループではトランスジェニックマウスを用いて、この単一受容体発現がH領域と呼ばれるlocus control region (LCR)による正の制御と、嗅覚受容体分子による負のフィードバック制御によって維持されている事を示した (*Science*, **302**, 2088, 2003, *Trends in Genetics*, **20**, 648, 2004)。

本年度当グループでは、もう一つの研究課題であるOR指令的に生じる軸索の投射、即ち投射に於けるOR分子の役割について解析した。嗅細胞軸索の嗅球への投射について当グループでは、dorsal/ventral (D/V) 軸に関しては、嗅上皮における嗅細胞の位置情報がその主要なパラメーターとなっている事を見出し、最近 *J. Neurosci.* 誌 (**25**, 3586, 2005) に発表した。これに対して嗅球のanterior/posterior (A/P) 軸に関しては、OR分子が何らかの形でinstructiveに働いていると考えられていた。当グループでは、嗅細胞のidentityであるORの種類が軸索末端でどのような情報にrepresentされているのかについて解析を進め、one neuron – one receptorと並ぶもう一つのルール、one glomerulus – one receptorの実態の解明を試みた。その結果、A/P軸に沿った投射位置については、ORとカップルするGタンパク質を介したシグナルの強度が支配的役割を果たし、同種軸索の収斂には、ORの種類に強く連動して発現する一群の細胞接着/軸索投射分子の発現量が深く関わっている事が判明した（いずれも現在投稿中）。

2. 研究実施内容

①研究の目的

嗅細胞の嗅球への軸索投射は、個々の細胞が発現する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。したがって、嗅球表面にはちょうど1,200個の糸球を素子とする電光掲示板のように、濃淡を含む糸球の発火パターンが形成され、こうした“画像”によって匂いの種類を脳が識別してい

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one neuron – one receptor及び、one glomerulus – one receptorという、2つの基本ルールによって支えられている。本年度当グループでは、個々の嗅細胞のidentityを決定するOR遺伝子の単一発現が、同種のOR分子を発現する嗅細胞の軸索の収斂と糸球形成にどのように関わるのか、即ちORがinstructiveに働く軸索投射の実態の解明を目的とした。

②方法と結果

当グループでは嗅細胞の嗅球への投射を、軸索の収斂、D/V軸のパラメーター、A/P軸のパラメーター、の3つに分けて解析した。

OR分子の種類に依存した軸索の収斂：まず、同じ種類のOR分子を発現する嗅細胞の軸索収斂であるが、我々はOR分子に於ける一アミノ酸残基の違いですら軸索の収斂に影響を与え投射領域を分けるという興味深い知見を得ている。ではこの一アミノ酸残基の差というidentityの違いが軸索収斂の過程にどう反映しているのか。このような問題にアプローチするには特定のOR分子を発現する均一な細胞集団を得る事が不可欠となるが、残念ながら今のところ嗅神経の細胞株は存在しない。当グループではMOR28受容体のミニジーンにH領域を接続させ、その選択頻度を数百倍高めたトランスジェニックマウスを作成した。このマウスの嗅上皮からmRNAを調製し、野生型マウスをコントロールに発現遺伝子のプロフィールを比較したところ、各OR遺伝子に固有な発現量を示す複数種類の細胞接着及び軸索ガイダンス因子の遺伝子が見つかった。これら遺伝子はOR分子を介して入力される神経活動に依存してその発現量が決まっており、その発現レベルの組み合わせがOR分子の種類、即ち嗅細胞のidentityを表している様に思われる。これら遺伝子の投射における機能を解析するため、その発現レベルを操作したトランスジェニックマウスを遺伝子毎に順次作成して軸索の収斂と投射を解析し、上記モデルを検証している。

D/V軸に沿った投射位置の決定：当グループでは、嗅細胞の軸索投射を、嗅球のD/V軸とA/P軸に分けて考察した。様々なOR遺伝子のプローブを用いて嗅上皮切片のハイブリダイゼーションを行ったところ、嗅細胞の嗅上皮での位置がその軸索投射に於けるD/V軸のパラメーターになっている事を見出した。このD/V軸に沿った投射位置の決定は、意外な事に、嗅細胞で発現するOR分子の種類に依存しない。現在、嗅細胞の嗅上皮に於ける位置情報がその軸索の嗅球に於ける投射位置の決定にどう反映されているのかについて解明を試みている。ここで得られた知見は、これ迄AxelやBuckらのグループによって提唱されていた嗅上皮を4つのゾーンに分けるという考え方に修正を迫るものであり、個々のOR遺伝子にそれぞれ固有な発現ゾーンのある事を示している。これらの結果はまた、嗅細胞に於けるOR遺伝子の選択が、これ迄考えられていた程stochasticなものではなく、嗅細胞の嗅上皮に於ける位置にかなり強く拘束されるものである事を示唆している。

A/P軸に沿った投射位置の決定：次にA/P軸に沿った軸索投射のパラメーターの決定であるが。当グループでは神経活動がこのプロセスに深く関わっている事を見出した。これ迄いくつかのグループにより、Golf、ACIII、OCNCIのノックアウトが行われ、これらマウスにおいて嗅細胞の軸索投射が正常に起こることから、神経活動が嗅細胞の軸索投射に関わる

可能性は低いとされてきた。当グループでは、OR分子に於いてGタンパク質を活性化するのに必要な部位（DRYモチーフ）を変異させると軸索投射が嗅球上で停止する事、またGolf以外のGタンパク質で、幼若嗅細胞に特異的に発現するGタンパク質の活性を変動させると嗅細胞の軸索投射位置がA/P軸に沿って前後する事等を見出した。これらの観察はORの種類という嗅細胞のidentityが、上記のGタンパク質を介した神経活動のレベルというパラメーターに変換され、A/P軸に沿った軸索の投射に関与している事を示唆している。

③研究の結論

当グループの研究により、嗅細胞のidentityがどの様に決定され維持され、それが軸索投射にどう反映されるのかという、嗅覚研究の永年の課題によりやく道筋がついてきた。嗅細胞のidentityを決定するOR遺伝子の単一発現については、昨年度すでに、OR分子による他のOR遺伝子に対するnegative feedback制御という考え方を提唱した。嗅細胞の軸索の収斂には、OR分子の種類に依存して決定される細胞接着分子／軸索ガイダンス分子の発現量や発現プロファイルが支配的に関わっている事が最近明らかとなり、間接的な形でOR分子のidentityが軸索末端に表現されている事が示された。一方、軸索投射に於ける嗅細胞のidentityであるが、嗅球のD/V軸に沿った投射位置の決定には、嗅細胞の嗅上皮での位置がパラメーターとして働き、それが同時にOR遺伝子の選択の幅を限定している事が判明した。即ち嗅細胞の嗅上皮に於ける位置を介して、OR分子の種類とD/V軸に沿った投射位置が関連付けられている事が示されたのである。また嗅球のA/P軸に沿った軸索投射については、ORの関与はより直接的で、ORを介して入力される固有なレベルの神経活動がその位置を決定している事が示唆された。

以上述べた様に、嗅細胞の軸索投射に於けるOR分子の関与が、軸索の収斂、投射のD/V軸、A/P軸、それぞれのレベルで明らかになりつつある。

3. 研究実施体制

坂野 仁グループ

① 研究分担グループ長：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I：嗅細胞の分化、再生に伴う嗅覚受容体遺伝子の単一発現制御

サブグループII：嗅覚系の発生、再生に伴う匂い地図の形成とその基本原理

サブグループIII：新生・再生時における嗅神経回路形成とシグナル依存性

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

- Nishihara, T., Nagawa, F., Nishizumi, H., Kodama, M., Hirose, S., Hayashi, R., and Sakano, H.: *In vitro* processing of the 3'-overhanged DNA in the post-cleavage complex of V(D)J joining. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 3692-3702 (2004).

- Nagawa, F., Hirose, S., Nishizumi, H., Nishihara, T., and Sakano, H.: Joining mutants of RAG1 and RAG2 that demonstrate impaired interactions with the coding-end DNA. *J. Biol. Chem.* **279**, 38360–38368 (2004).
- Serizawa, S., Miyamichi, K., and Sakano, H.: One neuron - one receptor rule in the mouse olfactory system. *Trends in Genetis* **20**, 648–653 (2004).
- Serizawa, S., Miyamichi, K., and Sakano, H.: Negative feedback regulation ensures the one neuron - one receptor rule in the mouse olfactory system. *Chem. Senses*, **30**, 99–100 (2005).

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：0件（CREST研究期間累積件数：1件）