

「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して重要である。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)。

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”の違いによって新たな匂い情報が識別されていると考えられている。この匂い情報の二次元変換は one neuron – one receptor ルールに加え、one glomerulus – one receptor という、もう一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、この 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、*J. Neurosci.* 誌 (**25**, 3586, 2005) 及び *Eur. J. Neurosci.* 誌 (**13**, 1436, 2006) に発表した。これに対して軸索の収斂及び嗅球の anterior/posterior (A/P) 軸に沿った投射位置の決定に関しては、OR 分子がより instructive に働くと考えられており、嗅細胞の identity である OR の種類が軸索末端にどのような分子コードとして表現されているのかについて、以上の様に解析を行った。

2. 研究実施内容

① 研究の目的

本年度の研究では、個々の嗅細胞の neuronal identity を決定する OR の種類が、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主な目的とした。

② 方法と結果

当グループでは昨年度に引き続き、嗅細胞軸索の嗅球への投射の問題を、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：我々は以前、OR 分子に於ける一アミノ酸残基の違いですらそれを発現する嗅細胞の identity に影響を与え、軸索の投射領域が分かれる事を報告した (*Genes to Cells*, 6, 71, 2001)。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でしょうか。この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 領域を接続し、その選択頻度を極端に高めるトランスジェニックマウスを作成した。その嗅上皮から 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、MOR28 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出された (投稿中)。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作成し軸索の収斂と投射に対する影響を解析した。通常、嗅細胞集団の全体について gain-of-function の解析を行った場合、例え表現型が出たとしても internal control がとれないので結果の判定が難しい。当グループでは、嗅細胞集団の一部のみに遺伝子操作を加えるモザイク解析を試みた。ここでは OR 遺伝子の1つである MOR28 のプロモーターに LCR である H 領域を付加して、検定する遺伝子の発現頻度を飛躍的に高める我々独自のシステムを利用した。この発現系では MOR28 のプロモーターに対して他の OR 分子のフィードバック制御が働くので、トランスジーンを発現しない細胞集団が約半数作り出される。我々はこのシステムを使って複数の接着分子や反発因子が OR の種類に依存した軸索の選別に関与している事を示した。

D/V 軸に沿った投射位置の決定：当グループでは昨年度に引き続き、様々な OR 遺伝子のプローブを用いて嗅上皮切片の *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。これまで、嗅上皮は OR の発現パターンによって4つのゾーンに分けられ、各 OR 遺伝子はこれら4つの内どれか1つのゾーンで均一に発現すると考えられて来た。我々の解析により、魚類の OR に相似性の高い OR 遺伝子 (クラス I) はゾーン I に限局して発現するものの、揮発性リガンドに対して進化した OR 遺伝子 (クラス II) についてはかなり事情が異なっていることが判明した。即ち、クラス II OR 遺伝子の発現領域は、これまでの4つのゾーンに必ずしも符号しないのである。言い換えれば、個々の OR は嗅上皮の DM/VL 軸に祖ってそれぞれに固有な発現領域を持ち、それらは互いに連続的かつ重複して分布している。次にこれら

OR の嗅上皮における発現領域と嗅球における投射領域との対応関係を調べるため、DiI を用いて嗅細胞軸索の逆行輸送染色を行ったところ、D/V 軸に沿って強い相関のある事が判明した。ここで得られた知見は、嗅細胞における OR 遺伝子の選択がこれまで考えられていたほどランダムに起こるものではなく、嗅細胞の嗅上皮における位置情報（例えば *neuropilin2* の濃度勾配など）にかなり強く拘束される可能性を示唆している。

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 や CNG チャンネル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) を変異させると糸球形成が阻害される事、また Golf 類似の G タンパク質で、幼若嗅細胞に特異的に発現する Gs の活性を変動させると嗅細胞の軸索投射位置が A/P 軸に沿って移動する事を見出した (投稿中)。これらの観察は OR の種類という嗅細胞の identity が、Gs によって cAMP 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を規定している可能性を示唆している。現在このシグナルの下流にあるタンパク質リン酸化酵素や転写調節因子、更にはそれらの支配を受ける軸索投射因子について解析を進めている。

③ 研究の結論

当グループの研究により、嗅細胞の identity がどのように決定され、それが軸索投射にどう反映されるのかという、嗅覚研究の中心的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、先年、LCR による正の制御を、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ついては、OR 分子の種類に依存して決定される細胞接着分子及び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を明らかにした。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、この位置情報を介して 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。また嗅球の A/P 軸に沿った軸索投射については、OR を介して入力されるシグナルが G タンパク質によって cAMP の量に変換され、これをパラメーターとして投射位置の決定がなされている事が示唆された。

以上述べた様に当グループの研究によって、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、それぞれの観点から理解出来る様になって来た。

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、教授）

②研究項目：

- サブグループⅠ : 嗅細胞の発生・分化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 : 嗅覚系の発生及び再生に伴う嗅細胞軸索の収斂と投射
サブグループⅢ : 嗅覚系の発生及び再生に伴う匂い地図形成の基本原理

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

- Miyamichi, K., Serizawa, S., Kimura, H.M., and Sakano, H.: Continuous and overlapping expression domains of odorant receptor genes in the olfactory epithelium determine the dorsal/ventral positioning of glomeruli in the olfactory bulb. *J. Neurosci.* **25**, 3486-3592 (2005).
- Tsuboi, A., Miyazaki, T., Imai, T., and Sakano, H.: Olfactory sensory neurons expressing class I odorant receptors converge their axons on an antero-dorsal domain of the olfactory bulb in mouse. *European Journal of Neuroscience*, **13**, 1436-1444, 2006.

(2) 特許出願

H17 年度出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 1 件)