

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「生物の発生・分化・再生」  
研究課題  
「嗅覚系における神経回路形成と再生の分子機構」

## 研究終了報告書

研究期間 平成13年10月～平成19年3月

研究代表者：坂野 仁  
(東京大学大学院理学系研究科 教授)

# 1 研究実施の概要

## 1. 研究の背景

嗅神経細胞は、ヒトやマウスの神経系では例外的に、常時再生を繰り返す回路形成システムとして、広く注目を集めている。本研究課題では嗅覚系をモデルシステムに用いて、個々の神経細胞の個性、即ち neuronal identity がどのように獲得されるのか、更にその identity が軸索末端にどのように分子コード化されて回路形成が起こるのかについて解析した。

マウス嗅覚系の匂い受容体 (odorant receptor : OR) 遺伝子は、免疫系の抗原受容体遺伝子をしのぐ最大の多重遺伝子ファミリーを形成している。一方リガンドである匂い分子は数万種類とされ、個々の匂いは複数の匂い分子の組合せ及び量比によって規定されているので、匂い情報の種類はほぼ無限といってよい。この多様な匂い情報を一千余りの受容体遺伝子でどのように識別するのかが、この分野における大きな研究課題であった。嗅神経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、ちょうど 1,000 個の糸球を素子とする電光掲示板のように、匂いに応じて様々な発火のパターンが形成され、この二次元展開された odor map によって多様な匂いを脳が識別していると考えられている。

多様なリガンドを個々の細胞が識別する為には、免疫系のリンパ細胞にも見られる様に、一細胞あたり一種類の受容体というのが原則である。この様に stochastic に選択され、かつ mono-allelic に発現する OR の種類によって嗅細胞の個性が決定される訳であるが、この identity が軸索末端にどのように分子コード化されて、軸索の選別、収斂、シナプス形成が行われるのか、また、OR 分子によって instructive に誘導されるといわれる軸索の嗅球への投射がどのように行われているのか、などについては殆ど解明されていなかった。

## 2. 嗅覚受容体遺伝子の単一発現制御

当グループでは長年、OR 遺伝子の発現制御について研究を行ってきた。先ず、*lacZ* で標識した OR 遺伝子 *MOR28* をトランスジーンとしてマウスに導入し、内在性 *MOR28* をノックインの手法により *GFP* (green fluorescent protein) 遺伝子で標識した。これら 2 種類の *MOR28* の発現を同一個体内で解析したところ、外来性 *MOR28* トランスジーンと内在性の *MOR28* 遺伝子は同時に発現する事はなく、それぞれ異なる嗅細胞で相互排他的に発現していることが示された。同様の相互排除は、同一染色体に複数挿入された *MOR28* トランスジーンの間にも認められた。これら一連の実験により、同じ種類の OR 遺伝子が複数存在する場合でも、厳密に一つの allele のみが選択的に発現する事

が示された (*Nature Neurosci.* 3, 687-693, 2000)。我々は先ず、OR 遺伝子の単一発現を保障する制御機構について解析した。多重遺伝子群の中から、一つの遺伝子を mono-allelic に発現させるための制御機構は、どの様にして一つのプロモーターを活性化し、同時に残りの遺伝子の発現を抑えるかという、正と負、二つの制御に帰結される。この問題は長年、DNA 組み換えや遺伝子変換など遺伝子をエンハンサー領域に転座させるモデルによって説明出来るのではと考えられて来た。これら不可逆的遺伝子再構成の考え方は魅力的ではあったが、当グループによる嗅細胞染色体の RNA-FISH 解析によって否定され、その後、嗅細胞の核を用いたクローンマウスの作成によって最終的に排除される事となった。

当グループの芹沢らは受容体の単一発現が、OR 遺伝子の一つを選択して活性化する locus control region (LCR) による正の制御と、発現された OR 分子によって残りの OR 遺伝子の新たな活性化を阻止する負のフィードバック制御によって保障されている事を見出した (*Science* 302, 2088-2094, 2003)。この one neuron one receptor ルールの実態を解明した我々の論文は、*Science* 誌の Perspectives、*Nature* 誌の News Feature、*Cell* や *Neuron* 誌のミニレビューなど、各誌に取り上げられ、前後して開催された Cold Spring Harbor での Bunbury Conference や Gordon Research Conference 等、様々な国際学会でも注目を集めた。

### 3. 嗅覚系における神経回路形成の分子機構

この研究課題では、嗅神経細胞の軸索投射を嗅球の dorsal/ventral (D/V) 軸と anterior/posterior (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 *in situ* ハイブリダイゼーションを行ったところ、個々の OR 遺伝子にそれぞれ固有な発現ゾーンのある事が示された。更に Dil 色素の軸索を介した嗅球からのトレース実験により、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が明らかとなった (*J. Neurosci.* 25, 3486-3592, 2005)。ここで得られた知見は、嗅上皮を4つのゾーンに分けるといふこれ迄の考え方に修正を迫るものである。

次に A/P 軸に沿った軸索投射のパラメーターであるが、我々は G タンパク質を介して入力されるシグナルの強さがこのプロセスに関わる可能性について検討した。当グループの今井は、OR 分子において G タンパク質との共役に必要な部位 (DRY モチーフ) を変異させると、伸長してきた軸索が嗅球の糸球層手前で停止することを見出した。またこの表現型は未成熟嗅細胞に発現する G<sub>s</sub> の恒常活性型変異体によってレスキューされ、この G<sub>s</sub> 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 軸に沿って変化する事が示された。更に cAMP 依存的なリン酸化酵素 (PKA) や転写制御因子 CREB の活性変動も A/P 軸に沿った軸索投射に影響を与えた。これらの結果により、

cAMP のシグナルレベルが、嗅細胞の投射位置の決定に関与するという新しい可能性が示唆された (*Science*, 314, 657-661, 2006)。我々は、未成熟嗅細胞に存在する G<sub>s</sub> タンパク質が OR の種類に応じて異なる濃度の cAMP を産生し、これを cAMP 依存的 PKA が感知して、CREB などの転写調節因子を介し軸索投射分子の発現量を制御していると考えている。

更に軸索の収斂・選別であるが、これ迄、発現する OR が嗅細胞の軸索投射においてどのような役割を果たすのかについては、様々な憶測がなされて来た。例えば Axel や Mombaerts らは OR 分子そのものが投射の path-finding や軸索の選別に直接関与すると主張している。我々は、神経細胞の identity と軸索投射の基本原理解は嗅覚系に限らず神経系全般に適用されるべきとの立場から、Axel らのモデルには無理があると考えて来た。この問題に関して当グループの芹沢らは、OR の種類によって決定される嗅細胞の identity は、OR を介した神経活動に依存して転写量が決まる ephrinA/EphA などの反発分子と Kirrel2/Kirrel3 などの接着分子によって、軸索末端に分子コード化されていることを見出した (*Cell*, 127, 1057-1069, 2006)。これら軸索投射に関する我々の研究について反響は大きく、Gordon Research Conference や Cold Spring Harbor の meeting では驚きをもって迎えられた。論文に対しレフェリーは極めて enthusiastic で、The work described here is truly elegant and ground breaking and is highly suited for publication in *Cell* と推奨した。

#### 4. 研究の成果と意義

本研究では、匂い受容のメカニズムの基本原理解である 1 神経 - 1 受容体ルール及び 1 受容体 - 1 糸球ルールが分子レベルでどう機能しているかについて解明した。嗅細胞の identity を与える OR 遺伝子の単一発現については、LCR による正の制御と OR 分子による feedback 制御という新しい考え方を導入して、その実態を明らかにした。また嗅細胞の軸索の投射に関しては、OR 分子の種類に対応して発現される接着分子やガイダンス分子の転写量が、neuronal identity code として軸索末端に表現されるという画期的概念を提出した。

本研究の独創的な点としては、当グループによって新たに提唱された単一 OR 遺伝子発現の負の feedback 制御 (*Science* 302, 2088-2094, 2003)、及び神経の軸索末端に表現される neuronal identity code の考え方 (*Science*, 314, 657-661, 2006; *Cell*, 127, 1057-1069, 2006) を挙げることが出来る。本研究は、嗅細胞の個性がどのように獲得されそれが軸索末端にどう表現されるのか、という神経科学一般に敷衍できる重要な課題に対し一定の答えを与えたという意味で大きなインパクトを持つ。我々のモデルは、OR 分子そのものが軸索の選別や path-finding に関わっているとす Axcel や Mombaerts らの考えとは明確に一線を画しており、最近では視覚系の研究者など嗅覚系以外の神経科学分野からも広く注目を集めている。

## 2 研究構想及び実施体制

### (1) 研究構想

採択時に提出した「研究の基本構想」と「研究の内容」は次の通りである。

#### 1. 基本構想（採択時、2001年11月）

本研究では、高等生物の感覚受容、特に化学情報受容（chemo-sensing）を中心に、その情報処理の分子メカニズムの解明を目的とする。具体的には嗅覚受容体（odorant receptor: OR）遺伝子の選択的な発現を支える分子機構、並びに、発現される受容体に規定されて生じる軸索投射機構の解明を目指す。我々ヒトは、視覚・聴覚・味覚・嗅覚・触覚の五感を持ち、これらを通して外界からの情報を受容、処理して行動している。中でも、嗅覚系を介した化学情報の識別は、免疫機能の高揚及び精神安定効果、更には記憶の想起など、ヒトの健康や社会活動にも深く関わっている。

本研究で扱うケモセンシングは、昆虫のフェロモン受容の様に、遠く離れた場所から拡散してくる一分子の誘引物質をも正確に識別するという、驚くべき検出能力を備えている。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。免疫系では、遺伝子の組換えに伴う多様化によって無数の抗原に対応しているが、嗅覚系では全遺伝子の約4%を占める約一千種類のOR遺伝子により、数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嗅覚受容体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から微妙な匂いの違いを脳が識別すると考えられている。この匂い地図の形成は、one OR gene - one neuron - one projection site という、基本ルールによって支えられていることが最近の研究で明らかになってきた。

ここに提案する嗅覚系の研究は、基礎研究としての発展性のみならず、応用面での可能性も多岐にわたり、その将来性も極めて高い。嗅覚・味覚系による化学情報の識別は、線虫における走化性から高等生物の生存に欠かせない摂食行動や、有害物質に対する忌避行動、フェロモンを介した生殖、更には記憶の想起など、人の健康や精神活動にも深く関わり、医療や薬品分野への応用が期待される。また、これら化学情報受容は極めて鋭敏で、この超高感度なセンシングが、一体何によって支えられているのかを研究することは、将来バイオセンサーの開発と応用にも役立つと期待される。

## 2. 研究の内容（採択時、2001年11月）

### 1) 嗅覚受容体遺伝子の相互排他的発現制御

最近、当グループにおいて、*MOR28* 遺伝子の転写開始点上流 100 kb の領域に、相同性の高い 2 kb の領域が同定された。興味深いことに、この相同性領域を欠失させたトランスジェニックマウスでは、*MOR28*, *MOR10*, *MOR83*, *MOR29* 遺伝子の発現が同時に消失した。この観察は、OR 遺伝子の発現が遺伝子クラスターのレベルで制御されており、一つの OR 遺伝子が選択される前に、一つのクラスターが choice されることを示唆している。本研究ではこの相同領域に含まれる制御配列を特定すると共に、これに結合する制御因子を単離することを目指す。また、クラスター選択の相互排他性を確保するため、OR 分子が何らかの形で、遺伝子活性化複合体の形成に feedback inhibitor として働く可能性も考慮されなければならない。このモデルにおいては、一旦活性化複合体が上記の相同領域に形成されれば、そのクラスターに属する複数の OR 遺伝子の内の一つのみが stochastic に相互作用する事になり、一つの OR 遺伝子の選択的活性化が保障されることになる。本研究ではこのような複合体の同定と、転写制御領域との interaction の検定を試みる。

### 2) 嗅覚受容体の領域特異的な発現の解析

嗅上皮には四つのゾーンが存在し、個々の OR 遺伝子はこれらゾーンの中のいずれか一つに限定して発現している。このゾーン特異的な発現は、嗅細胞の嗅球へのゾーン特異的な軸索投射に極めて重要な役割を持つ。我々は、当グループで作製されたトランスジェニックマウスにおいて、*MOR29* 遺伝子の嗅上皮での発現がゾーン特異的ではないことを見出した。この遺伝子は本来ゾーン1に限定して発現するが、トランスジェニックでは下流の DNA 領域が欠失している為、すべてのゾーンで発現する様になったと推測される。本研究では、*MOR29* トランスジェニックのゾーン特異的な発現を回復させる制御領域を、DNA 付加により順次絞り込み、その抑制性シスエレメントを変異解析により同定する。

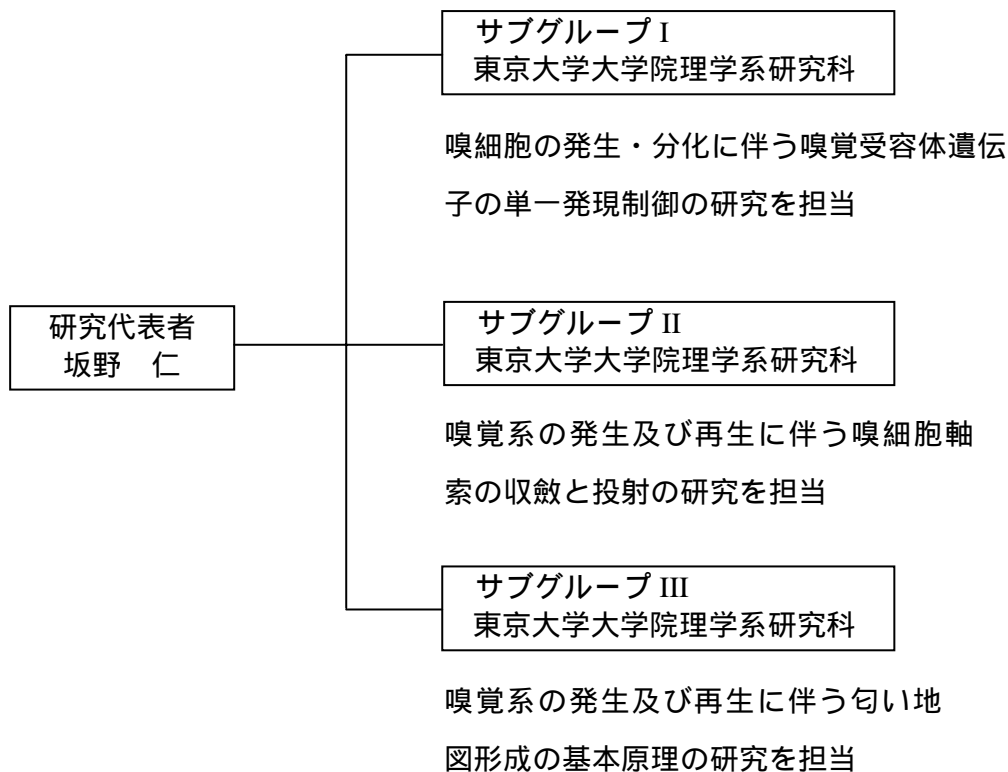
### 3) 嗅神経細胞の嗅球における位置特異的な軸索投射

本研究では、同じ種類の OR 分子を発現する嗅細胞が、何を指標に嗅球上に約一千存在する糸球の中から特定の投射先を見つけて軸索を投射するのか、というもう一つの重要な課題に取り組む。これ迄の研究から、ヒトやマウスの嗅細胞の軸索投射には、発現する OR 分子の種類に依存して軸索の収斂が生じる機構と、嗅上皮のゾーンから対応する嗅球上のゾーンへ投射を行う OR 非依存型の機構が存在すると言われている。最近、*Drosophila* においても OR 遺伝子の解析が進んでいるが、ハエの系では OR 分子の発現が投射に必要なではない。本研究では、高等動物に見られる OR 分子依存型の投射機構の解明を目指すとともに、ゾーンからゾーンへと軸索を投射させる非依存型の機

能についても明らかにする。

役割分担については、次項(2)サブグループⅠの研究課題を主として芹沢、宮道、西住が、サブグループⅡの課題を今井、芹沢、竹内、宮道が、サブグループⅢの課題を坪井、小早川(高)、小早川(令子)が担当した。

## (2) 実施体制



### 3. 研究実施内容及び成果

#### (1) 研究の実施内容と成果

ヒトやマウスは外界からの様々な情報を五感を介して識別し行動している。その中で嗅覚・味覚など化学情報の受容、すなわち chemo-sensing の能力は線虫から哺乳類に至るまで一般的に備わっており、生存に不可欠な求餌、毒物や天敵に対する忌避、フェロモンを介した性識別や生殖行動などで中心的役割を果たす。特に嗅神経細胞(嗅細胞)は、哺乳類の神経系としては珍しく、常時再生を繰り返す投射システムとして、神経回路の形成や再生の研究に有用な系を提供している。

ヒトやマウスの嗅覚受容体(odorant receptor : OR) 遺伝子は、免疫系の抗体遺伝子同様、1つの細胞で1種類の受容体遺伝子が、2つある対立遺伝子の一方からのみ発現するというきわめてユニークな発現様式をとっている(allelic exclusion)。また、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その位置が規定され、嗅球上の投射先である糸球構造(glomerulus)と OR の間には1:1の対応関係が成り立っている。したがって匂い情報が嗅上皮から入力されると、嗅球表面にはちょうど 1,000 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のパターンが形成され、この匂い地図によって匂いの種類と質を脳が識別すると考えられている(図1)。この匂い情報の2次元画像への変換は one neuron one receptor および、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が、本研究課題ではこれらルールの分子基盤の解明を目的として研究を行った。

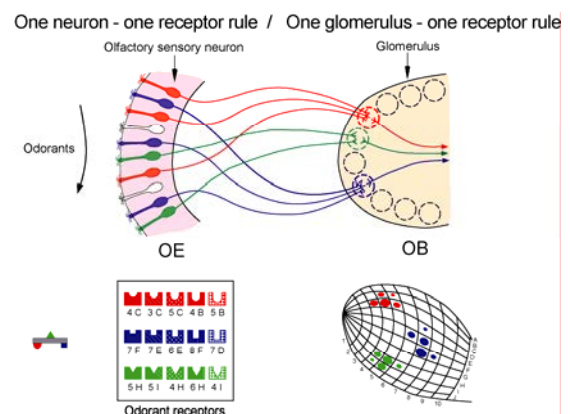


図1 マウス嗅覚系における匂い情報の変換

#### 1. OR 遺伝子の単一発現制御: One neuron one glomerulus ルール

匂い受容体(odorant receptor : OR)の遺伝子は、マウスの場合全ゲノムの4%以上を占め、免疫系の抗原受容体遺伝子の3%をしるぐ最大の多重遺伝子ファミリーを形成している。これ迄にヒトでは約850、マウスでは1500種類のOR遺伝子が同定されており、この内マウスでは約25%が、ヒトでは半数以上が偽遺伝子とされている。一方リガンドである匂い分子は数万種類有るとされ、匂い情報が複数の匂い分子もしくは構造決定基の組合せ及び量比によって規定されていることを考えると、匂いの種類はほぼ無限といってよい。多様なリガンドを個々の細胞が識別する為には、一細胞あたり一種類の受容体というのが原則となる。免疫系の場合、それぞれのリンパ球がつくる抗原受容体は



一方のアレルから発現する一種類のみであり、この現象は古くから対立形質排除 (allelic exclusion) として知られている。リンパ球での単一受容体発現は、V(D)J 組み換えに伴いプロモーターとエンハンサーが近傍に持ち寄られるという正の制御と、発現産物である受容体分子が、更なる組み換えを阻止する負の制御によって保障されている。嗅覚系においては、父方と母方の対立形質に限らず同じ種類の OR 遺伝子であっても、外から導入したトランスジーンと内在性の遺伝子、更にはトランスジーン同士の間にも厳密な発現の相互排除のある事が、我々の実験によって示された。それでは一体どのような制御機構によって、嗅覚系における 1 細胞・1 受容体の原則が保障されているのだろうか。本研究課題では先ず、嗅細胞の neuronal identity 確立の基礎となる、OR 遺伝子の単一発現制御について解析した。

### 1. OR 遺伝子単一発現の正の制御

機能の似た複数の類似遺伝子の中から特定の一つを相互排他的に発現するメカニズムとして、これ迄に DNA 組み換え、遺伝子変換 (gene conversion)、ローカス制御領域 (LCR) による制御が知られている。それでは OR 遺伝子の単一発現には、どのような制御機構が働いているのだろうか。

遺伝子再構成の可能性の検討: OR 遺伝子の発見以来、人々を魅了してきたのは遺伝子の再構成を伴うメカニズム、即ち DNA 組み換えと遺伝子変換である。これらの可能性を検定するには、特定の OR 遺伝子を発現するモノクローナルな細胞株が必要であるが、残念ながら OSN にはライン化された細胞は存在しない。本研究で我々は、マウス OR 遺伝子 *MOR28* を *GFP* で標識したノックインマウスを作成し、蛍光を指標にその発現細胞を単離、その核を用いて二段階の FISH 解析 (fluorescent *in situ* hybridization) を行った (図2)。初めに、染色体 DNA に変性を施さない RNA FISH を、次に *MOR28* プロブの標識を変えて、DNA を変性させる DNA FISH を行った。DNA FISH は染色体上の遺伝子座を検出する為に行われるもので、父方と母方の染色体に一ヶ所ずつ、計二ヶ所に緑の蛍光が検出された。

一方 RNA FISH では、染色体 DNA を変性していない為、プロブは遺伝子にはハイブリダイズせず、そこから転写されつつある mRNA を検出する。興味深い事に、この RNA FISH で検出された赤の蛍光シグナルは一ヶ所で、二つある DNA FISH の緑のシグナルの一方と重なった。この結果は、OR 遺伝子に対立遺伝子の一方から mono-allelic に発現している事を示すのみならず、その発現に遺伝子変換などによる遺伝子の転座がない事を示すものである。その後この OR 遺伝

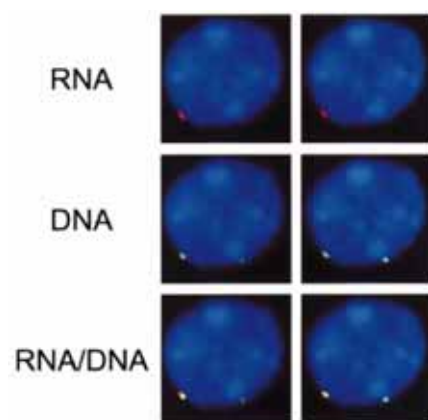


図2 MOR28 遺伝子の mono-allelic な発現  
MOR28 遺伝子を発現する嗅神経細胞をノックインマウスより単離し、核内のMOR28のDNA(緑の点)および転写されたRNA(赤い点)の位置を解析した。片方の遺伝子座でのみMOR28遺伝子の転写が生じていた。

子の転座の可能性は、嗅細胞の核を用いて作製されたクローンマウスの解析により最終的に排除された。

OR 遺伝子クラスターにおける LCR の同定: 当グループでは、第 14 番染色体に位置する *MOR28* クラスターを、yeast artificial chromosome (YAC) を用いてマウスに導入し、その発現を解析した。このクラスターには *MOR28* を先頭に少なくとも 7 つの OR 遺伝子が連なっている。トランスジーンとして導入された様々な YAC コンストラクトの DNA 領域とその発現パターンの比較により、*MOR28* 遺伝子の上流に、このクラスターの発現を正に制御するシスエレメントの含まれることが示唆された。このような制御領域は進化的に保存されている事が多いので、我々は *MOR28* クラスターの上流領域の塩基配列をヒトとマウスの間で比較した。その結果、*MOR28* から 75kb のところに約 2kb のホモロジー (H) 領域が検出された。次に、この H 領域が OR 遺伝子の発現制御に必要なかどうかを検定する為、H を欠失させた YAC コンストラクトを作成した。その結果、H 領域を欠失していないコントロールでは、下流の OR 遺伝子が正常に発現されるのに対し、H 領域を欠失させるといずれの OR 遺伝子の発現も見られなくなることが判明した。従ってこの H 領域は、複数の OR 遺伝子を一括して制御する LCR であることが示唆された。これ迄に解析した幾つかの YAC コンストラクトの内、上流領域を大きく削ったものでは、OR トランスジーンが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、これら上流欠失型のコンストラクトに継いで、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。興味深いことに、H 領域がクラスターのより近傍に付加された場合、先頭に位置する *MOR28* の選択頻度が異常に高まり、それと拮抗する形で、下流の OR 遺伝子が発現する細胞の数が減少する事が見出された。H の位置を移動させる事によって生じる OR 遺伝子の選択頻度の変化は、LCR とプロモーター間の距離に依存する両者の相互作用の効率の変化を反映したものと考えられる。当グループではゼブラフィッシュでマウスの H 領域が機能する事を利用して必要配列の絞り込みを行った。その結果、2 つのホメオドメイン配列など既知のシス配列を複数含む 124bp の DNA セグメントがエンハンサーとして機能する事が示された。我々は H 領域に含まれるこれらシス配列に様々なタンパク因子が結合して複合体を形成し、それが近傍のクロマチン構造を変化させたり、下流のプロモーターを活性化したりすると考えている。グロビンの遺伝子系など他の LCR に見られる様に、H 領域に形成される活性化複合体とプロモーターとの物理的相互作用が一つのプロモーター、結果的には一つの OR 遺伝子の活性化を保障しているものと思われる。

## 2. OR 分子を介した負のフィードバック制御

前節では、OR クラスターをシスに制御する H 領域が、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述べた。このプロセスは LCR が一つの OR プロモーターのみを stochastic に選択するものであり、言い方を替えれば、最初に相互作用したプロモーターが LCR をトラップする事を意味する。しかし早晩、別のクラスターの LCR が活性化され、その支配下にある OR 遺伝子が新たに発現することになる。従って、OR の偽遺伝子が選択された場合には遺伝子活性化の試みは継続される必要があるが、機能的 OR 分子が発現された場合には、他の OR クラスターの活性化の試みは直ちに中止されなければならない。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フィードバック機能があるのではないかと考え、次のような欠失実験を行った。

コーディング領域を欠失した OR トランスジーン の共発現: OR 遺伝子の発現産物が、他の OR 遺伝子の新たな活性化を阻害するかどうかを検証する為、我々は *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 (*del-MOR28*) を作成した。この遺伝子は、プロモーターを含む 5 側や 3 側の非翻訳領域はそのままなので、欠失のないトランスジーン (*Tg MOR28*) 同様、正常に選択されて活性化を受け、*IRES* を介して挿入されている標識遺伝子 (*GFP*) を発現することが出来る。我々は先ず、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。実際には *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ーブを用いて赤で検出した。嗅上皮切片の 2 枚の染色写真を重ね合わせると、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。我々は更に、*del-MOR28* 発現細胞における様々な内在性 OR 遺伝子との共発現を *in situ* ハイブリダイゼーションにより検定した。その結果、コントロールとして用いた欠失のない *Tg MOR28* との共発現は、いずれの OR 遺伝子の場合にも認められなかったが、*del-MOR28* を発現する細胞では、その殆どが、いずれかの内在性 OR 遺伝子の同時発現を許容している事が示された。

フレームシフト型 OR 偽遺伝子の共発現: 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 25%、ヒトでは半数以上を占めるといわれている。その多くがコーディング領域に翻訳フレームのずれや欠失、あるいは同時に停止コドンを含み、mRNA に転写されても機能的 OR 分子が発現されることはない。我々は mRNA には転写されるが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 3 つの変異型 OR 遺伝子に注目し、このような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 (*ECFP* で標識) を用いた。その結果、検定した 3 つのフレームシフト型偽遺伝子全てが、*MOR28* ミニジーンとの共発現を示した。コントロールに用いた機能的 OR 遺伝子が発現する細胞 (赤に染色) は、ミニジーンを発現する緑の細胞が非常に多いにもかかわらず、黄色の共発現は示さず赤のみであった。

これらのデータは、OR 遺伝子の発現産物が、他の OR 遺伝子の二次発現を阻止するインヒビターになっているというフィードバック制御の考えを支持している。

### 3. 単一 OR 遺伝子発現に関する他のモデルとの比較

以上述べた様に、当グループでは LCR による正の制御と OR による負の制御によって、OR 遺伝子の単一発現が達成されると考えている(図3)。但し他のグループからは別のモデルが提出されていたので、これらについて考察する。

LCR とプロモーター:OR 遺伝子をトランスジーンとして発現させる場合、*MOR28* クラスターを例に、我々は LCR を含む長大な DNA 領域が必要である事を示した。一方、Reed や Mombaerts などはプロモーター領域を含む数 kb 程度のミニジーンで十分な発現が得られ、相互排他性や発現領域特異性

なども正常であると報告した。これは OR 遺伝子の発現制御における short vs. long range のパラドックスと言われ、2つの対立するモデルとして議論されてきた。我々は、OR 遺伝子の活性化に関わる正の制御には LCR とプロモーター領域の協調が必要であり、OR のミニジーンが LCR なしで発現するというのは、トランスジーンが挿入された染色体部位にエンハンサーまたは LCR 様のシスエレメントがあったという事で説明が付くと考えている。

負の制御と負の選択:一つの機能的 OR 遺伝子の活性化のあと、単一 OR の発現を維持する為には、残りの OR 遺伝子の発現を抑止するメカニズムが併せて必要である。我々は OR 分子自身による負のフィードバック制御を提唱しているが、Mombaerts らは負の選択(淘汰)という別の仮説を出している。彼等によれば、各嗅細胞における OR 遺伝子の活性化はポアソン分布に従い、活性化した遺伝子の数について1のものが最大になる様に設定すると、0が 37%、1が 37%、2が 18%・・・という割合になり、その内0のものは機能を持たず、2以上のものも identity の混乱が生じて排除されるのだという。もし複数個の OR 遺伝子が発現した場合、投射に混乱が生じて生き残れず、それが積極的排除メカニズムとして機能しているというのなら、同種 OR 遺伝子の複数アレルが同時に発現しても良いはずである。我々はすでに、*lacZ* と *GFP* とで別々に標識した同じ *MOR28* トランスジーンが、決して同時発現しない事を示している。

対立形質の排除と不活化:負の制御に関するもう一つの論点は Chess と Axel らの言う OR 遺伝子の

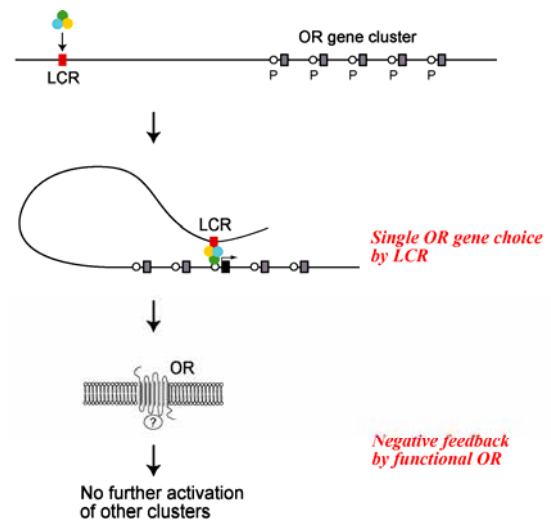


図3 マウス嗅覚系における1神経-1受容体ルール制御

対立形質不活化 (allelic inactivation) である。彼等は非同調的 DNA 複製によって、OR 遺伝子の一方のアレルが不活化していると報告している。このような現象は IL-4 などリンホカインの遺伝子にも認められているので、観察自体に疑念を持つ人は少ないが、これが OR 遺伝子の相互排他的発現に積極的に寄与しているかどうかについては異論が多い。免疫系の抗原受容体遺伝子の場合、対立形質排除 (allelic exclusion) を演出する為に何か積極的な不活化メカニズムがあるのではないかと多くの人が考えていた。しかしながら、対立形質排除は一方のアレルの積極的な不活化によるのではなく、競合的遺伝子活性化の結果であるという事になっている。我々は、嗅覚系の場合にも対立形質不活化が OR 遺伝子の発現制御に積極的に関与しているとは考えていない。免疫系の場合と同様、父方と母方、両方の染色体で OR 遺伝子の活性化が試みられ、ひとたび機能的 OR 遺伝子が発現されれば直ちにその試みは停止され、活性化されたものが偽遺伝子であれば試みは継続される、と考えるのが妥当な様に思われる。簡単に言えば、偽遺伝子も含め 1500 の OR 遺伝子の中から一つを選ぶのも、双方のアレル 3000 の中から一つを選ぶのも、システムにとっては大差ないということなのであろう。

## II. OR の種類に依存した軸索投射: one glomerulus one receptor ルール

次に本研究課題では、もう一つの基本ルールである one glomerulus one receptor、即ち OR によって指令的に生じる軸索収斂及び投射位置の決定について解析した。嗅細胞は約一千万個存在し、発現する OR の種類は約一千種類あるので、軸索が嗅球に投射する際、一千万本の軸索は OR の種類に従って一万本ずつ一千束に仕分けられ、かつ一千番地ある投射先の一つを特定しなければならない (図4)。この投射位置の決定 (axonal targeting) と軸索の選別 (axon sorting) には、これ迄、OR 分子そのものが直接関与すると考えられて来た。即ち OR 分子は鼻腔における匂いリガンドの嗅ぎ分けのみならず、嗅球での投射位置の嗅ぎ分けも行うというのである。更に軸索の収斂に関しては、同じ OR 分子同士の homophilic な相互作用が同じ種類の軸索の確認に寄与しているとされてきた。しかしながら嗅覚系のみが軸索投射の際、嗅覚受容体の様な特異性の高い分子を使うと考えるのは不自然であり、より一般性の高い投射の論理が求められた。我々は、神経回路形

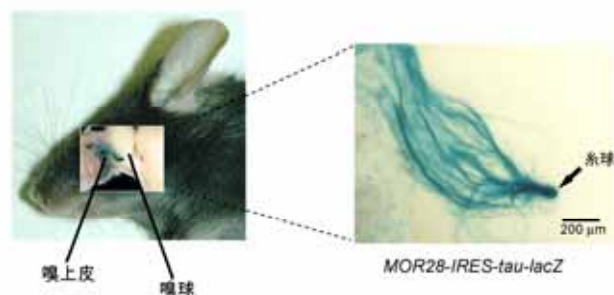


図4 MOR28発現嗅細胞の軸索投射の様子

MOR28遺伝子の下流にIRES-tau-lacZを挿入して、MOR28発現嗅細胞の軸索投射が観察出来るトランスジェニックマウスを作成した。軸索が嗅球上で収斂して、糸球を形成する様子が分かる。

成において軸索末端に表現される神経細胞の identity が、様々な投射分子の量と組み合わせによって分子コード化されているのではないかと考え、個々の OR 分子に相関して固有な発現パターンを示す遺伝子の探索を行った。本研究課題では嗅細胞軸索の嗅球への投射を、D/V (dorsal/ventral) 軸のパラメーター、A/P (anterior/posterior) 軸のパラメーター、軸索の選別・収斂の3つに分けて解析した。

#### 1. D/V 軸に沿った投射位置の決定

これ迄、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つのゾーン内で均一に発現すると言われてきた。更に嗅球上にも対応する投射ゾーンがあり、D/V 軸に沿った投射位置の決定には spatial な情報が重要な役割を果たすと考えられてきた。但し Axel や Buck によって10年前に行われた実験ではサンプル数も少なく、最近では彼等のゾーンの定義に合致しない例が報告され、見直しが必要とされていた。

嗅上皮における嗅細胞の位置と発現する OR: 我々は OR に固有な嗅上皮での発現ゾーンについて再検討する為、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。その結果、魚類の OR に相同性の高いクラス I OR 遺伝子はゾーン1内で均一に発現しているものの、揮発性リガンドに対して新たに進化したと思われるクラス II OR 遺伝子についてはかなり状況が異なる事が判明した。即ち、クラス II 遺伝子の発現領域はこれ迄の4つのゾーンに必ずしも符合しないのである。言い換えれば、個々の OR は嗅上皮の dorsomedial/ventrolateral (DM/VL) 軸に沿ってそれぞれに固有な限定された発現領域を持ち、それらは互いに重複して分布している事が判明した。

嗅細胞の位置と軸索の投射位置: 次に我々は、これら OR の嗅上皮における発現領域とそこに分布する嗅細胞の嗅球における軸索投射先の関連を調べるため、Dil を用いて嗅細胞軸索の逆行輸送染色を行った。具体的には嗅球を後方から少しずつそぎ落として様々な切断面をつくり、特定の糸球の切り口に色素を置いて軸索を介した逆行輸送をさせ、嗅上皮にある細胞体を染め出すのである。その結果、嗅球上での糸球の配置とそこに投射してくる嗅細胞の嗅上皮における位置との間には、嗅球の D/V 軸に沿って強い相関のある事が判明した。即ち、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と考えられる。

位置情報を規定する投射因子: 我々は投射誘導分子の濃度勾配を想定し、嗅上皮に分布する候補分子の探索を行った。その結果、Neuropilin-2 (npr-2) や Robo などが嗅上皮で濃度勾配を示す候補因子として同定された。現在、これら分子を特定の OR と共に発現させ、発現嗅細胞の軸索投射が D/V 軸に沿って移動するかどうかを解析している。我々はまた、嗅上皮に於ける嗅細胞の位置

情報が、OR 遺伝子の選択をどう規定しているのかについて、発生過程における細胞分化の lineage 制御の観点から考察した。本研究で得られた知見は、個々の OR 遺伝子にそれぞれ固有な発現領域のある事を示したのみならず、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ランダムに起こるのではなく、嗅細胞の嗅上皮での位置にかなり強く拘束される可能性を示唆している。

## 2. A/P 軸に沿った投射位置の決定

D/V 軸に沿った投射とは異なり嗅球の A/P 軸に沿った軸索投射については、OR 分子がより緊密にパラメーターとして関与していると考えられて来た。我々は G タンパク質を介して入力されるシグナルの強さがこのプロセスに関わる可能性について検討した。

cAMPシグナルによって表現されるORのidentity:これ迄いくつかのグループにより、G<sub>olf</sub>やCNG-A2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ほぼ正常に起こることから、ORを介した匂い刺激が嗅細胞の初期投射に関与する可能性は少ないとされてきた。我々のグループでは、OR分子に於いてGタンパク質の活性化に必要な部位(DRYモチーフ)を変異させると、嗅球に伸長してきた軸索が糸球層手前の神経層で停止する事、またこの表現型はG<sub>olf</sub>に近縁のGタンパク質、G<sub>s</sub>の恒常活性型変異体によってレスキューされる事を見出した。更に興味深いことに、G<sub>s</sub>、PKA、CREBなど、cAMPを介したシグナル経路に関与する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軸に沿って変化することが示された。これらの観察はORの種類という嗅細胞のidentityが、G<sub>s</sub>タンパク質を介してcAMPのレベルというパラメーターに変換され、最終的には、ガイダンス分子の発現量を規定する事により軸索投射を制御している可能性を示している(図5)。

cAMPシグナルによって制御される軸索誘導分子:我々は、cAMPの下流に位置するシグナル制御因子やそれによって発現が支配される投射分子の解析を行った。例えば、cAMP依存的に働くリン酸化酵素PKAや転写制御因子CREBのdominant-negative及びconstitutively-activeな変異遺伝子を特定のOR遺伝子にIRESを介して継ぎ、それらの嗅細胞の投射に与える影響について解析し、更にcAMPのシグナル強度によって転写量が変わる軸索投射因子のスクリーニングを行った。DRYモチーフをRDYに変えた変異型ORを発現する嗅細胞では殆どシグナルが入らず軸索投射が行えないので、野生型ORを発現する嗅細胞との間で遺伝子の

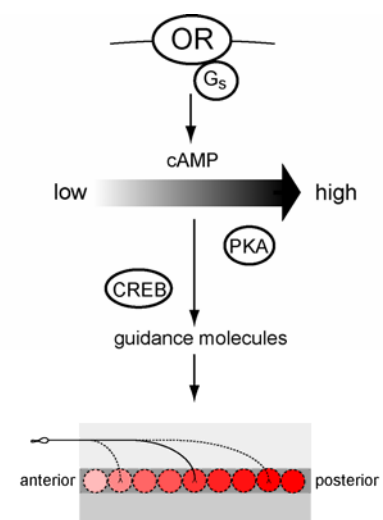


図5 cAMPのシグナルの強度が、嗅細胞軸索のA/P軸方向の投射位置を規定するORのidentityは、Gタンパク質を介してOR毎に異なるレベルのcAMPシグナルに変換され、これがcAMP依存的キナーゼPKAや転写因子CREBを経て、軸索誘導因子の発現量を調節する。

転写プロフィールに差が出ることを想定した。これら2種類の嗅細胞で遺伝子の発現パターンをマイクロアレーや single-cell RT-PCR によって比較することにより、軸索投射・シナプス形成に關与する遺伝子の探索を試みた。その結果、Neuropilin-1 (Nrp-1)など、CNG チャンネル非依存的に発現し嗅球上の糸球において AP 軸に沿った濃度勾配を示す候補分子を複数種類同定した。これら遺伝子については、現在トランスジェニックマウスを用いた gain-of-function のモザイク解析を行っている。

### 3. OR 分子の種類に依存した軸索の選別・収斂

次に、投射途中の軸索同士は、どの様にして自らの発現する OR の種類を基準に他の軸索との同一性、即ち自己・非自己を識別しているのだろうか。我々は以前、OR 分子に於ける一アミノ酸残基の違いが軸索の収斂・選別に影響を与え糸球構造を分けうることを見出している。ではこの一アミノ酸残基の差という嗅細胞の identity の違いが軸索収斂にどう影響しているのだろうか。

嗅細胞の identity と軸索選別: この問題にアプローチするには特定の OR を発現する均一な細胞集団を必要とするが、残念ながら嗅神経のモノクローナルな細胞株は存在しない。我々は特定の OR のミニジーン (*MOR28*) に前述の H 領域をつなげ、その選択頻度を百倍以上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では、場所によって殆ど全ての嗅細胞が、トランスジーンとして導入した *MOR28* 遺伝子を発現する。このマウスの嗅上皮から mRNA を調製し、遺伝子の発現プロフィールを野生型マウスのそれと比較したところ、OR の種類に固有な転写量を示す Kirrel2/Kirrel3 や ephrinA5/EphA5 など複数ペアの細胞接着及び反発分子のある事を見出した(図6)。興味深い事にこれら因子の発現レベルは、*MOR28* 遺伝子と同じクラスターに属し相同性も極めて高くその投射位置も近い

*MOR83* の発現細胞では *MOR28* 発現細胞とは逆になっていた。ここで見出された接着因子の遺伝子は、OR 分子を介して入力される神経活性に依存してその転写量が決まっており、軸索末端におけるこれら分子の組み合わせが、発現する OR 分子の種類、即ち嗅細胞の identity を表現していると考えられる。

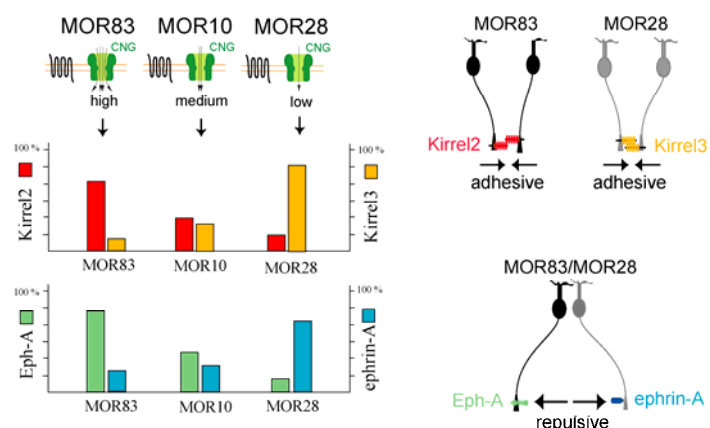


図6 OR特異的かつ神経活動に依存して起こる嗅神経軸索の選別  
ORを介した神経活動に依存して転写量が規定される細胞接着分子の組み合わせによって、軸索末端は嗅球上で選別され収斂する。



Gain-of-function のモザイク解析: 嗅細胞集団の全体について投射因子の変異解析を行う場合、例えノックアウトマウスなどで表現型が出たとしても internal control が無いとその解釈が難しい。従って本研究では、嗅細胞集団の一部に遺伝子操作を加えるモザイク解析を行った。我々のシステムでは 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、遺伝子の選択頻度を飛躍的に高めた H-トランスジーン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 OR 分子のフィードバック制御が働くので、導入した遺伝子を発現しない細胞集団が全体の約半数作り出される。これは、たまたま内在性の OR 遺伝子が先に発現した場合、トランスジーンのプロモーターにフィードバック阻害が働くためである。我々は、このモザイクシステムを使って軸索選別因子の gain-of-function の解析を行った。その結果、Kirrel2/Kirrel3 などの接着因子、ephrinA5/EphA5 などの反発因子はその発現量を増加させると、通常 OR 毎に 1 個形成される糸球が duplicate する事が示された。我々はこれら接着・反発因子の発現プロフィールが、OR 分子の identity として軸索末端に表現され、軸索の選別に関与していると考えている。

### III. 嗅球に形成される匂い地図と二次投射

嗅上皮で受容された匂い分子の OR に対する結合シグナルは、嗅球上では特定の糸球を発火させるという位置情報に変換される。この一次投射で二次元展開された匂い情報は、次に嗅球から嗅皮質へと伝えられ、嗅皮質ニューロンへ入力される(図7)。本研究課題では、嗅球の各領野が持つ匂い識別における役割の違いについて解析し、嗅球から嗅皮質へと匂い情報が伝達される際、嗅皮質でどのように情報が統合され編集を受けるのかについて考察した。

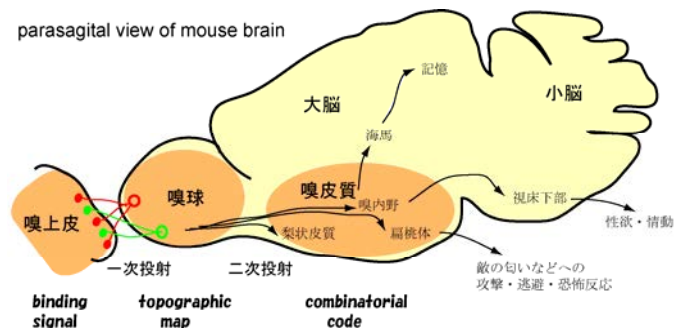


図7 マウス嗅覚系における匂い情報の変換

匂い分子は、嗅上皮(OE)に存在する500万以上の嗅細胞によって約千種類の嗅覚受容体を介して受容される。OEで受容された匂い分子情報は、電気信号として嗅細胞の軸索を伝わり、嗅球(OB)上に千対ある糸球に入力し、それらの発火パターンという二次元情報に変換される。その後匂い情報は、OBの二次神経である僧帽/房飾細胞を介して嗅皮質(OC)にある神経細胞に統合され、最終的には記憶や情動反応などに結びつく。

#### 1. ゾーン I に投射領域を持つ OR 遺伝子

ヒトやマウスの OR 分子は系統学的に2つのクラスに分けられる。クラス I 受容体は俗に魚類タイプと呼ばれ、その多くが水溶性リガンドを認識するのに対し、クラス II 受容体は主に揮発性リガンドを受容するので陸生動物に進化してから獲得されたと考えられている。我々はクラス I に属する OR 遺伝

子の発現と投射を、嗅上皮と嗅球切片の *in situ* hybridization を行うことにより解析した。

クラス I 遺伝子の構成とそのゾーン I 特異的発現: クラス I に属する OR 遺伝子は 150 個以上存在し、それらはすべてマウス染色体 7 番の E2 部位に一つの巨大クラスターをなして存在している。我々はこの領域の塩基配列を解析し、遺伝子の linkage を確定した。その結果、クラス I 遺伝子は約 30 の偽遺伝子を含め 155 が同定され、これらは約 3 Mbp の領域にすべて収まる事が判明した。これら遺伝子の嗅上皮における発現を調べたところ、殆どすべてがゾーン I 領域内に均一に発現している事が示された。言い換えれば、クラス I 遺伝子に関しては嗅上皮での発現領域にお互い差が無い事が明らかとなった。これは各 OR 毎に固有な発現ゾーンを持つクラス II 遺伝子とは対照的である。

クラス I 遺伝子を発現する嗅細胞の投射先: クラス I 受容体は進化学的にも機能的にもクラス II とは独立して扱われている為、その嗅球での投射領域が注目されていた。我々は 36 のクラス I サブファミリーからそれぞれを代表するプローブを作製し、これを <sup>33</sup>P 標識して嗅球切片に対する *in situ* hybridization を行った。その結果、これら全てのクラス I 遺伝子が嗅球の頂上部、即ち背側前方 (antero-dorsal 領域) に集中して投射先 (糸球) を持つ事が明らかとなった。クラス II に属する OR については、嗅上皮における発現領域がそれぞれ異なり、その違いが D/V 軸に沿った嗅球での投射位置の違いとなっている。これに対し、クラス I に属する OR がすべてゾーン I 内に均一に発現しているのは、それらの投射先が嗅球背側の頂稜部に位置している事と関連があるのかもしれない。

嗅球におけるクラス I 投射領域の持つ機能: 我々の研究によって、クラス I 遺伝子を発現する嗅細胞の投射先は、嗅球のいわゆるゾーン I の中でも更に前方背側に局在している事が判明した。これ迄のイメージングの実験によりこの領域に存在する糸球は脂肪酸やアルコール、更にはアルデヒド類を検出する事が知られている。この領域における糸球と匂いリガンドとの対応は今後更に数を増やして検討する必要があるが、すでに森憲作らのグループによって指摘されている様に、嗅球上の糸球地図は、リガンドの化学的性質や匂いの質 (好ましい匂いか、忌避すべき匂いかなど) によっていくつかの分野に分けられる様に思われる。

## 2. ゾーン特異的欠失マウスにおける匂い識別

嗅球から嗅皮質への二次投射において、一次投射によって糸球に集約された匂い情報は、嗅球の出力ニューロンである僧帽 (mitral) / 房飾 (tufted) 細胞を介して嗅皮質へと伝達される (図 7)。嗅皮質においては、僧帽細胞の軸索は枝分かれして複数の嗅皮質神経 (cortical neuron) へと接続し、一つの cortical neuron は複数の僧帽細胞からの入力を受けると考えられている。実際最近になって、2 種類の匂い情報が同時に入力される時にのみ発火する cortical neuron の存在が報告された。このように、嗅球上で糸球という 1,000 対の素子に集約された匂い情報は、嗅皮質において

combinatorial code として少なくとも  $10^6$  の情報に編集統合されることになる。

ゾーン特異的嗅細胞除去マウス:我々は、嗅球において二次元展開された匂い情報が、二次投射の段階でどの様に combinatorial code 化しているのかについて解析を試みた。まず、一次投射の結果として嗅球上に形成された系球地図が、二次投射に際してどのような意味と役割を持つのかについて検討した。本研究課題では、嗅上皮の特定の領域に一過的にジフテリア毒素を発現するマウスを用いて嗅細胞をゾーン特異的に除去し、系球地図形成にどのような影響が出るかについて調べた。ゾーン1除去マウスの嗅上皮では、ゾーン1嗅細胞の死滅後、非ゾーン1の特異性を持つ嗅細胞がゾーン1領域に移入するようになり、最終的にはゾーン1領域は非ゾーン1嗅細胞によって占有される事が示された。一方、対応する嗅球のゾーン1は嗅細胞の投射を受けず系球形成のない空白領域となった。但しこの空白領域にも僧帽細胞は検出されるので、二次ニューロンのゾーン1特異性は嗅細胞の一次投射とは独立に、予め決められている。また、嗅細胞に与えられる嗅上皮における位置情報は分化の初期段階で既に嗅細胞に刷り込まれて居り、軸索投射は嗅細胞が辿り着いた移入後の位置には影響されない事が示された。

ゾーン特異的嗅細胞除去マウスの匂い識別:ヒトやマウスにおいて匂い情報は情動と密接に関連している。解剖学的にも嗅球からの匂い情報が情動反応に重要である大脳辺縁系の扁桃体へと直接伝達されていることから、他の感覚系に比べて入力によって誘起される情動反応を解析するのに適した系である。我々は、野生型マウスが嫌う 2-methyl butiric acid (2-MBA) や天敵であるキツネの尿の成分 TMT を用いて忌避実験を行った。これら分子は嗅球のゾーン1と非ゾーン1に存在する異なる系球を共に発火させるが、ゾーン1除去マウスではゾーン1領域の系球が欠失しているので、非ゾーン1領域の系球のみでこれらの匂いを検出する。興味深いことに、野生型マウスは 2-MBA や TMT を忌避するのに対し、ゾーン1除去マウスではこれら分子に対し興味を示すものの嫌悪感を表さないことが観察された。嗅皮質に入力される二次ニューロンからの情報が、ゾーン1特異的除去マウスで異なっているかどうかについて、現在、2-MAB や TMT を嗅がせた後、cortical neuron における *c-fos* の発現を指標に解析している。

ゾーン特異的除去マウスにおける二次投射:嗅球上で系球という素子に集約された匂い情報は、嗅皮質において様々な組み合わせで combinatorial code 化されることが示唆されている。現在のところ、僧帽細胞と cortical neuron の接続の特異性がどの様に決定され識別されているのかについては不明であるが、一次ニューロンである嗅細胞の特異性が僧帽細胞の identity を何らかの形で規定している可能性が考えられる。我々によって行われたゾーン特異的嗅細胞除去マウスの行動解析により、嗅球のゾーン1領域は匂い物質の本能的識別に、非ゾーン1領域は微妙な匂いの違いを区別するのに必要である事が示唆された。興味深いことに、我々の作製したゾーン特異的除去マウスでは、

嗅皮質のもつ層構造のうち特定の層に縮退が見られた。我々は今後、嗅球の領野と嗅皮質の層構造との対応、更にはその機能的役割を明らかにし、嗅覚系をモデルに、入力する情報の統合と出力する情報の分配という、中枢神経系における情報編集のメカニズムを解明していく予定である。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

OR 遺伝子の発見以来、OR で規定される嗅細胞の neuronal identity がどのように獲得され、それが軸索の収斂・投射にどう反映されるのかは長い間の課題であった。嗅細胞の個性獲得のプロセスである one neuron one receptor ルールについては、LCR による正の制御と OR 分子による負のフィードバック制御の考え方を導入する事により、一応の説明がついた。一方、OR の種類を基礎にした嗅細胞の軸索の選別に関しては、OR 分子の種類に連動して activity 依存的に決まる細胞接着分子の発現量と組み合わせが、分子コードとして軸索末端に表現されることが示された。次に、嗅球の D/V 軸に沿った投射位置の決定については、嗅細胞の嗅上皮における位置情報がパラメーターとして働き、これを介して間接的に、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判明した。また嗅球の A/P 軸に沿った軸索投射については、G タンパク質を介した cAMP のシグナルが軸索誘導分子の発現を制御することにより投射位置を規定していることが示された。

以上述べた様に、本研究により嗅細胞の軸索末端に表現される OR 分子の identity の実態が明らかとなり、この neuronal identity code の軸索投射に果たす役割が、投射の D/V 軸、A/P 軸、軸索の選別などの観点から理解される様になってきた。本研究ではまた、他の感覚系で報告されている様な、activity に依存しない発生過程で生じる大まかなシステムの構築に続いて、生後 activity に依存する refinement のプロセスのある事が嗅覚系でも明らかにされた。その意味で、最初全く異なると思われていた嗅覚系と視覚系が、関与する投射因子も含め極めて相似性が高く、共通の logics を用いて回路形成を行っている事が示された。但し嗅覚系では、神経活動に依存した後半のプロセスが、糸球体を素子とする非連続的 (discrete) マップを形成するのに重要な役割を果たしている。一方、前半の神経活動非依存的なプロセスは、視覚系の場合に見られる様な、軸索誘導分子の濃度勾配を用いた連続的 (continuous) マップ形成と見る事が出来る。嗅覚系ではこの大まかな連続マップが、ローカルに生じる軸索の選別・収斂を通して糸球体を形成する事により、不連続マップ化されて糸球地図を完成すると考えられる。

なお本研究の波及効果であるが、ここで得られた嗅覚系の一次投射に関する研究成果は中枢神経系における回路形成という脳科学の最重要課題の理解に重要なヒントを与えるという意味でその意義は大きい。更に二次投射に関する研究は、入力される情報の統合と分配、即ち情報の editing という脳の高次機能の理解に道を拓くものとして今後の展開が期待される。これら神経回路構築の研究はシステムバイオロジーとしてこれから大きな進展が見込まれ、脳における情報の演算の logics が解明されれば、それらの情報科学への還元も大いに期待出来る。また臨床応用の観点からみても、ヒトやマウスの嗅覚系の研究は再生医学に大きな可能性を含んでいる。冒頭にも述べた様に、嗅細胞はヒトにおいて極めて例外的に常時再生を

繰り返す神経細胞であり、これを用いた神経再生因子や神経幹細胞の研究は注目を集め始めている。これらの研究は既に脊髄損傷の治療や、打撲等によって引き起こされる嗅細胞軸索の切断、即ち異嗅症の解明にその応用が試みられており、今後の進展が期待される。

## 4 研究参加者

研究実施機関名：東京大学・大学院理学系研究科

氏名	所属	役職(身分)	担当する研究項目	研究参加期間			
				開始		修了	
				年	月	年	月
坂野仁	東京大学 大学院理学系研究科	教授	研究全般を統括	13	12	19	3
名川文清	同上	講師	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及び嗅覚系の発生及び再生に伴う匂い地図形成の基本原則	13	12	19	3
西住裕文	同上	助手	同上	13	12	19	3
芹沢尚	同上	CREST 研究員	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及び嗅覚系の発生及び再生に伴う嗅細胞軸索の収斂と投射	13	12	19	3
西原忠	同上	CREST 研究補助員	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	14	4	19	3
坪井昭夫	同上	奈良県立医科大学に中途転出	嗅覚系の発生及び再生に伴う嗅細胞軸索の収斂と投射及び嗅覚系の発生及び再生に伴う匂い地図形成の基本原則	13	12	18	4
小早川高	同上	CREST 研究員	同上	13	12	19	3
小早川令子	同上	CREST 研究補助員	同上	13	12	19	3
竹内春樹	同上	大学院生 D1	嗅覚系の発生及び再生に伴う嗅細胞軸索の収斂と投射	16	4	19	3
岸下奈津子	同上	大学院生 M2	同上	17	4	19	3
今井猛	同上	CREST 研究員	嗅覚系の発生及び再生に伴う匂い地図形成の基本原則	14	4	19	3
熊坂耕平	同上	大学院生 M2	同上	17	4	19	3
井上展子	同上	大学院生 M1	同上	18	4	19	3
中嶋藍	同上	大学院生 M1	同上	18	4	19	3
井ノ口霞	同上	大学院生 M1	同上	18	4	19	3
森田実	同上	研究補助員	研究補助全般	16	4	19	3
坪川時子	同上	技術員	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及び嗅覚系の発生及び再生に伴う嗅細胞軸索の収斂と投射	17	4	19	3
木村道子	同上	チーム事務員	事務全般	13	12	19	3
以下、離籍者							
岡雄一郎		大学院生博士課程修了	新生・再生時における嗅神経軸索投射の分子機構の解明	13	12	16	9

中谷洋子		大学院生博士課程 修了	嗅覚系の発生に伴うにおい地図形成の 基本原理の解明	13	12	15	10
広瀬哲史		大学院生博士課程 修了	新生・再生時における嗅神経軸索投射 の分子機構の解明	13	12	17	3
宮道和成		大学院生博士課程 修了	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及び嗅覚系の発 生及び再生に伴う嗅細胞軸索の収斂と 投射	14	4	18	3
加藤紘之		大学院生修士課程 修了	嗅覚系の発生に伴うにおい地図形成の 基本原理の解明	14	4	16	3
木村紘子		大学院生修士課程 修了	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	14	4	16	3
宮崎隆明		大学院生修士課程 修了	嗅覚系の発生に伴うにおい地図形成の 基本原理の解明	15	4	17	3
中島美保		大学院生修士課程 修了	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	15	4	16	3
後藤博志		大学院生 M1 中退	新生・再生時における嗅神経軸索投射 の分子機構の解明	15	4	16	3
菊池かの子		大学院生修士課程 修了	嗅覚系の発生に伴うにおい地図形成の 基本原理の解明	16	4	17	3

## 5 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Linda B. Buck (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Professor)	CREST 第二回公開国際 シンポジウムにて講演	東京大学大学院理学系研究科	平成 15 年 5 月 29 日 ~ 6 月 3 日



## 6 成果発表等

### (1) 原著論文発表(国際誌 20 件)

1. Ishii, T., Serizawa, S., Kohda, A., Nakatani, H., Shiroishi, T., Okumura, K., Iwakura, Y., Nagawa, F., Tsuboi, A., and Sakano, H.: Monoallelic expression of the odourant receptor gene and axonal projection of olfactory sensory neurons. *Genes to Cells* 6, 71-78, (2001).
2. Sengoku, S., Ishii, T., Serizawa, S., Nakatani, H., Nagawa, F., Tsuboi, A., and Sakano, H.: Axonal projection of olfactory sensory neurons during the developmental and regeneration processes. *NeuroReport* 12, 1061-1066 (2001).
3. Kodama, M., Hayashi, R., Nishizumi, H., Nagawa, F., Takemori, T., and Sakano, H.: The PU.1 and NF-EM5 binding motifs in the Ig $\gamma$  3' enhancer are responsible for directing somatic hypermutations to the intrinsic hot spots in the transgenic V $\gamma$  gene. *Internatl. Immunol.* 13, 1415-1422 (2001).
4. Nishizumi, H., Komiyama, T., Miyabayashi, T., Sakano, S., and Sakano, H.: BET, a novel neuronal transmembrane protein with multiple EGF-like motifs. *NeuroReport* 13, 909-915 (2002).
5. Nagawa, F., Yoshihara, S., Tsuboi, A., Serizawa, S., Itoh, K., and Sakano, H.: Genomic analysis of the murine odorant receptor *MOR28* cluster: A possible role of gene conversion in maintaining the olfactory map. *Gene* 292, 73-80 (2002).
6. Kobayakawa, K., Hayashi, R., Morita, K., Miyamichi, K., Oka, Y., Tsuboi, A., and Sakano, H.: Stomatin-related olfactory protein, SRO, specifically expressed in the murine olfactory sensory neurons. *J. Neurosci.* 22, 5931-5937 (2002).
7. Nagawa, F., Kodama, M., Nishihara, T., Ishiguro, K., and Sakano, H.: Footprint analysis of recombination signal sequences in the 12/23 synaptic complex of V(D)J recombination. *Mol. Cell. Biol.* 22, 7217-7225 (2002).
8. 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).
9. 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).

10. 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).
11. Hirose, S., Nishizumi, H., and Sakano, H.: Pub, a novel PU.1 binding protein, regulates the transcriptional activity of PU.1. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 311, 351-360 (2003).
12. 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).
13. 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).
14. Serizawa, S., Miyamichi, K., and Sakano, H.: One neuron - one receptor rule in the mouse olfactory system. *Trends in Genetics* 20, 648-653 (2004).
15. 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).
16. 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).
17. 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 the mouse. *Eur. J. Neurosci.* 23, 1436-1444 (2006).
18. Imai, T., Suzuki, M., and Sakano, H.: Odorant receptor-derived cAMP signals direct axonal targeting. *Science* 314, 657-661 (2006).
19. Serizawa, S., Miyamichi, K., Takeuchi, H., Yamagishi, Y., Suzuki, M., and Sakano, H.: A neuronal identity code for the odorant receptor-specific and activity-dependent axon sorting. *Cell* 127, 1057-1069 (2006).
20. Nagawa, F., Kishishita, N., Shimizu, K., Hirose, S., Miyoshi, M., Nezu, J., Nishimura, T., Nishizumi, H., Takahashi, Y., Hasimoto, S., Takeuchi, M., Miyajima, A., Takemori, T., Otsuka, A.J., and Sakano, H.: Antigen receptor genes of the agnathan lamprey are assembled by a process involving copy choice. *Nature Immunol.* 8, 206-213 (2007)

(2) その他の著作物 邦文総説など多数

(3) 学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

招待講演(国内会議11件、国際会議9件)

坂野 仁:嗅覚受容体の発現制御、第24回日本分子生物学会、横浜、2001年12月10日

坂野 仁:感覚受容の分子メカニズム、千里ライフサイエンスシンポジウム、豊中市、2003年6月6日

坂野 仁:Regulation of odorant receptor gene expression. 第26回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、2003年7月23-25日

坂野 仁:マウス嗅覚受容体遺伝子の発現制御と嗅神経細胞の軸索投射、第26回日本分子生物学会大会、神戸市、2003年12月10-13日

坂野 仁:嗅覚系における1神経・1受容体ルールを支える分子機構、国立遺伝学研究所シンポジウム、三島、2004年4月9日

坂野 仁:Negative feedback regulation ensures the one receptor one neuron rule in the mouse olfactory system, Satellite Conference to AchemS XXVI, Florida, USA, April 21, 2004.

坂野 仁:多重遺伝子による多様性の識別、東京大学分子細胞学研究所シンポジウム、東京、2004年4月30日

坂野 仁:Negative feedback regulation ensures the one receptor one neuron rule in the mouse olfactory system, Joint Conference of the 14<sup>th</sup> International Symposium on Olfaction and Taste and the 38<sup>th</sup> Japanese Symposium on Taste and Smell, Kyoto, July 6-7, 2004.

坂野 仁:Odorant receptor gene choice and projections of olfactory sensory neurons in mouse, A Scientific Symposium Honoring Susumu Tonegawa in Celebration of His 65<sup>th</sup> Birthday "From Molecular Biology to Immunology to Neuroscience", Cambridge, MA, USA, December 4, 2004.

坂野 仁:Negative feedback regulation ensures the one neuron one receptor rule in the mouse olfactory system, 第27回日本分子生物学会年会、神戸、2004年12月8-11日

坂野 仁:嗅覚受容体遺伝子と匂い情報の二次元変換。第6回アロマ・サイエンス・フォーラム 2005、アルカディア市ヶ谷、東京、2005年9月2日

坂野 仁: 嗅細胞の個性獲得と軸索投射、日本味と匂学会第 39 回大会シンポジウム、岩手県民会館、盛岡、2005 年 9 月 28 日

Sakano, H.: LCR and gene choice in the mouse olfactory system. The 2<sup>nd</sup> International Symposium on “DECODE systems for biological responses”, Univ. of Tokyo, Tokyo, September 28-29, 2005.

Sakano, H.: Neuronal identity and projection of olfactory sensory neurons in the mouse. International Symposium on “Evolution and biological function of seven trans-membrane receptors”, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, October 17-19, 2005.

坂野 仁: Sense of smell in humans, 2005 年ユネスコ大学生交流プログラムシンポジウム、東京大学、東京、2005 年 11 月 9 日

Sakano, H.: Transgenic analysis of the mouse olfactory system. Monterotondo Mouse Biology Meeting. Monterotondo, Italy, April 19 and 20, 2006.

坂野 仁: 嗅覚受容体遺伝子の単一発現と嗅神経細胞の軸索投射、第 20 回モロシヌス研究会、熱海、2006 年 6 月 15-16 日.

坂野 仁: Neuronal identity and axonal projection of olfactory sensory neurons in mouse. 第 29 回日本神経科学大会シンポジウム、京都、2006 年 7 月 19-21 日.

坂野 仁: 嗅覚受容体の種類に依存した嗅神経細胞の軸索投射、第 18 回高遠・分子細胞生物学シンポジウム、長野、2006 年 8 月 24-25 日.

Sakano, H.: Identity and projection of olfactory sensory neurons in the mouse. Keystone Symposia. Snowbird, UT, USA. January 21-25, 2007.

Sakano, H.: Neuronal identity code for the projection of olfactory sensory neurons in the mouse. UK-APDBN Joint Meeting. RIKEN CDB, Kobe, February, 8-10, 2007.

口頭発表(国内会議 10 件、国際会議 6 件)

名川 文清: Footprint analysis of recombination signal sequences in the 12/23 synaptic complex of V(D)J recombination、第 25 回日本分子生物学会、横浜、2002 年 12 月 11-14 日

西原 忠: V(D)J 組み換えにおけるコーディング末端の 3 プロセッシング、同上

小早川 高: Stomatin related olfactory protein, SRO, is found in the olfactory signaling complex in olfactory cilia membrane、第 26 回日本神経科学大会、2003 年 7 月 23-25 日、名古屋国際会議場

西住 裕文: Identification of odorant receptor mRNA molecules in individual glomeruli、同上

西住 裕文:嗅覚受容体遺伝子をパラメーターとした匂い地図の構成、第 26 回日本分子生物学会大会、神戸市、2003 年 12 月 10-13 日

今井 猛:嗅覚受容体は匂い認識・軸索投射・単一遺伝子発現を異なるシグナル伝達機構で制御している、同上

Miyamichi, K.:A *cis*-acting DNA region that activates the cluster of the murine olfactory receptor genes. Keystone Symposia Conference, Tahoe City, USA, January 21-26, 2004.

後藤 博志:Expression of the zebrafish odorant receptors and projection of olfactory sensory neurons、第 77 回日本生化学会大会、横浜、2004 年 10 月 13-16 日

西住 裕文:嗅覚受容体遺伝子の嗅上皮における領域特異的発現制御、第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、2004 年 12 月 8-11 日

Serizawa, S.: Semi-monoclonal expression of the odorant receptor transgene. AChems Annual Meeting 2005, AChemS XXVII. Sarasota, USA, April 13-17, 2005.

Serizawa, S.: Neuronal identity and axonal projection of olfactory sensory neurons in mouse. The 4<sup>th</sup> International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms for Taste and Olfactory Perception. Kyushu University, Fukuoka, November 4, 2005.

Serizawa, S., Miyamichi, K., Takeuchi, H., Yamagishi, Y., and Sakano, H.: Odorant receptor-instructed axonal fasciculation of mouse olfactory sensory neurons. 2006 Gordon Research Conferences on Molecular & Cellular Neurobiology, Hong Kong, June 11-16, 2006.

今井 猛:Glomerular map formation in the mouse olfactory system. 第 4 回国際シンポジウム「味覚嗅覚の分子機構」、福岡、2006 年 7 月 11-13 日.

芹沢 尚:How is olfactory receptor-dependent axonal wiring conducted? 第 29 回日本神経科学大会シンポジウム、京都、2006 年 7 月 19-21 日.

Imai, T.: Signaling and odorant receptor-instructed axonal projection. 2006 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Axon Guidance & Neural Plasticity. Cold Spring Harbor, NY, USA. September 13-17, 2006.

Kobayakawa, K., Kobayakawa, R., Mori, K., and Sakano, H.: Clomerular formation and odor perception in the Zonel- and class II - depleted mutant mice. 2007 Key stone Symposium on Chemical Senses: From Genes to Perception. Snowbird, Utah, USA. January 21 ~ 25, 2007.

ポスター発表(国内会議27件、国際会議14件)

西住 裕文: BET, a novel neuronal transmembrane protein with multiple EGF-like motifs. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Axon Guidance and Neural Plasticity, Cold Spring Harbor, NY, September 25-29, 2002.

芹沢 尚: A *cis*-acting DNA element that regulates the expression of the entire MOR28 gene cluster. 同上

小早川 高: YACトランスジェニックマウスにおける嗅覚受容体遺伝子のゾーン特異的発現制御、同上

中谷 洋子: 嗅細胞の繊毛に局在するstomatin-related olfactory protein SRO、同上

坪井 昭夫: Genomic analysis of the murine odorant receptor MOR28 cluster: a possible role of gene conversion in maintaining the olfactory map. 第 25 回日本分子生物学会、横浜、2002 年 12 月 11-14 日

西住 裕文: マイクロダイセクション法を用いた糸球と嗅覚受容体の対応付け、同上

小早川 高: Stomatin-related olfactory protein, SRO, specifically expressed in the murine olfactory sensory neurons、同上

林 令子: V(D)J 組み換え酵素 RAG1 と基質 DNA の共結晶化、同上

岡 雄一郎: 嗅上皮でゾーン特異的に発現する新規遺伝子 *Z1A*、同上

宮道 和成: A *cis*-acting DNA element that regulates the expression of the entire MOR28 OR gene cluster、同上

今井 猛: 嗅覚系で発現する様々な3量体 G タンパク質、同上

中谷 洋子: Zonal regulation of the olfactory receptor genes in the YAC transgenic mouse、同上

小早川 高: Stomatin related olfactory protein, SRO, is found in the olfactory signaling complex in olfactory cilia membrane、第 26 回日本神経科学大会、2003 年 7 月 23-25 日、名古屋国際会議場

中谷 洋子: Developmental elimination of ectopic projection sites for the transgenic OR gene that has lost the zone specificity in the olfactory epithelium、同上

西住 裕文: Identification of odorant receptor mRNA molecules in individual glomeruli、同上

宮道 和成:A novel *cis*-acting DNA element that regulates the odorant receptor gene cluster、同上

小早川 高:Stomatin related olfactory protein, SRO, is involved in the olfactory signaling、第 76 回日本生化学会大会、名古屋市、2003 年 10 月 15-18 日

今井 猛:Heterotrimeric G-proteins expressed in the mouse olfactory system、同上

西住 裕文:嗅覚受容体遺伝子をパラメーターとした匂い地図の構成、第 26 回日本分子生物学会大会、神戸市、2003 年 12 月 10-13 日

今井 猛:嗅覚受容体は匂い認識・軸索投射・単一遺伝子発現を異なるシグナル伝達機構で制御している、同上

木村 紘子:嗅覚受容体遺伝子の単一発現制御、同上

小早川 高:Stomatin related olfactory protein, SRO, plays crucial roles in formation and modulation of olfactory signaling complex、Joint Conference of the 14<sup>th</sup> International Symposium on Olfaction and Taste and the 38<sup>th</sup> Japanese Symposium on Taste and Smell、京都、2004 年 7 月 6-7 日

岡 雄一郎:O-MACS, a novel member of the medium-chain acyl-CoA synthetase family, specifically expressed in the olfactory epithelium in a zone-specific manner、同上

西住 裕文:Expression of the odorant receptor genes and projection of olfactory sensory neurons in zebrafish、同上

宮道 和成:Dorso-vental arrangement of glomeruli is defined by overlapping expression zones of odorant receptors、同上

坪井 昭夫:Sub-areal expression of the murine odorant receptor genes in the conventional zone of the olfactory epithelium and its correlation to the projection sites on the olfactory bulb、同上

小早川 高:Stomatin related olfactory protein, SRO, plays crucial roles in localization of the mouse olfactory signaling complex、第 77 回日本生化学会大会、横浜、2004 年 10 月 13-16 日

西原 忠:*In vitro* processing of the 3'-overhanging DNA in the postcleavage complex involved in V(D)J joining、同上

宮崎 隆明:Regulation of zone-specific odorant receptor gene expression in the mouse olfactory epithelium、同上

- 広瀬 哲史: Impaired interactions of mutant RAG proteins with the coding-end DNA in V(D)J recombination, 同上
- 後藤 博志: Expression of the zebrafish odorant receptors and projection of olfactory sensory neurons, 同上
- 坪井 昭夫: 嗅覚受容体特異的に嗅細胞の軸索投射位置を規定する因子、第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、2004 年 12 月 8-11 日
- 中島 美保: フェロモン受容体のげっ歯類における種特異性の解析、同上
- 西住 裕文: 嗅覚受容体遺伝子の嗅上皮における領域特異的発現制御、同上
- Miyamichi, K.: The dorsal/ventral axis of an odor map and odorant receptor gene expression in the mouse olfactory epithelia. 2005 Keystone Symposia Conference, Keystone, USA, March 31-April 4, 2005.
- 小早川 高: Axonal projection of olfactory sensory neurons in the zone 1-depleted mice. 第 28 回日本神経科学大会。パシフィコ横浜、横浜、2005 年 7 月 26-28 日
- 坪井 昭夫: Expression of the mouse class I odorant receptors in the olfactory epithelium and the glomerular map on the olfactory bulb. 同上
- Imai, T.: Glomerular map formation in the mouse olfactory system. CDB Symposium 2006 on "Logic of Development: New Strategies and Concepts". 理化学研究所発生・再生科学総合研究センター、神戸、2006 年 4 月 10-12 日.
- Serizawa, S.: Odorant receptor-instructed axonal fasciculation of mouse olfactory sensory neurons. 2006 Gordon Research Conferences on Molecular & Cellular Neurobiology, Hong Kong, June 11-16, 2006.
- Imai, T. and Sakano, H.: Odorant receptor-derived cAMP signals direct axonal targeting. 2007 Keystone symposium on Chemical Senses: From Genes to Perception. Snowbird, Utah, USA. January 21 ~ 25, 2007.
- Takeuchi, H., Serizawa, S., Miyamichi, K., Yamagishi, Y., and Sakano, H.: Activity-dependent and odorant receptor-correlated expression of cell adhesion molecules that regulate axonal fasciculation of olfactory sensory neurons. Ibid.



#### (4) 特許出願

国内出願 (1件)

発明の名称： 嗅神経細胞特異的タンパク質

発明者： 小早川 高、坂野 仁、林 令子、坪井 昭夫

出願人： 科学技術振興事業団

出願日： 平成 14 年 5 月 2 日

出願番号： 特願 2002-130392

海外出願 (0 件)

#### (5) 受賞等

受賞

新聞報道

その他

#### (6) その他特記事項

なし

## 7 研究期間中の主な活動

なし

## 8 結び

研究目標は予想を超えて十分に達成され、その結果は国際的に高く評価されている。残念ながら研究助成の終了に伴い、研究チームのメンバーの離散や作製した遺伝子組み換えマウスの維持の問題など、助成の中断や切り替えに伴う様々なトラブルが生じている。従って、今後何らかの形で切れ目の生じないスムーズな助成継続の手立てが講じられる事を強く希望する。



東京大学大学院理学系研究科 生物化学専攻 坂野研究室