

研究課題別評価

1 研究課題名: 嗅神経回路の形成と再構築の分子機構

2 研究者氏名: 芹沢 尚

研究員: 黄 科 (研究期間: H14.5.15 ~ H15.11.14)

3 研究の狙い:

哺乳動物では、個々の嗅神経細胞は約 1000 種類ある嗅覚受容体(OR)遺伝子のうち1種類のみを選択的に発現する。一方、同じ種類の OR 遺伝子を発現する嗅神経細胞は嗅球表面上の片側半分に約 1000 個ある中から同じ特定の一つの系球に軸索を収斂させる。従って、どの種類の OR が匂い分子を受容したかという情報を、脳では嗅球表面上のどの組み合わせの系球が発火したかという位置情報(匂いマップ)として捉えている。本研究では、嗅球表面上に匂いマップが形成される際の2つの分子基盤、OR 遺伝子の単一発現制御 と 嗅神経細胞軸索投射のそれぞれの分子メカニズム について、我々が世界に先駆けて開発した YAC (yeast artificial chromosome) トランスジェニックマウスによる OR 遺伝子の発現系を駆使して、遺伝子構造の側からの解明を目指す。

4 研究成果:

(1) OR 遺伝子のシス制御領域の同定

嗅覚受容体 (OR) 遺伝子発現制御機構の解明を目指し、まず OR 遺伝子の1つである *MOR28* 遺伝子の制御領域の同定を試みた。*MOR28* 嗅覚受容体遺伝子クラスターを、YAC (yeast artificial chromosome) を用いてマウスに導入し、クラスター中の OR 遺伝子の発現を解析した。様々なコンストラクトが含む 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 40-150kb の領域内に、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、*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。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。また、H 領域を含む 2kb の DNA を、それ自体では発現しないコンストラクトの先端に継ぐと、OR トランスジーンが発現が回復した。興味深いことに、H 領域をより近傍に付加すると、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 遺伝子を発現する細胞の数が減少した。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、H 領域と OR 遺伝子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。これらの結果から、H 領域に形成される転写活性化複合体が、一つのプロモーターとしか相互作用出来ないために、クラスター内からは一つの OR 遺伝子しか活性化出来ないと考えた。

(2) OR 分子による負の制御

マウスでは約 1400 の OR 遺伝子があると言われている。これら遺伝子は約 40 のクラスターをなし、ほぼ全ての染色体に分散している。前節の通り、各クラスターから1つの OR 遺伝子しか発現されない理由として、シス制御領域(H 領域)のクラスター内での共有を考えた。それでは、各嗅神経細胞で別のクラスターから OR 遺伝子の発現が見られないのは何故か。我々は OR 遺伝子の発現産物が、他の OR 遺伝子あるいはクラスターの新たな活性化を阻害するというモデルを考えた。これを検証する為、*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*)。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ところ、共発現する細胞が高頻度に観察された。*MOR28* 遺伝子はどのような状況にあろうとも複数の allele を同時発現する事がないので、ここで得られた *del-MOR28* のデータは、コーディング領域の欠失によってその発現の排他性が失われる事を示唆するものである。我々は次に、*del-MOR28*発現細胞における、他の内在性 OR 遺伝子との共発現を検定した。その結果、コントロールとして用いた欠失のない外来性 *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 遺伝子を同時発現している事が確認された。これらの結果は、嗅覚受容体遺伝子の単一発現が、発現した OR 分子が残りの OR 遺伝子を新たに活性化することを阻止する負の制御によって保証されていることを示している。

(3) 単一 OR のセミモノクローナル発現マウス

OR 分子依存的な嗅神経細胞軸索投射の解明に取り組むにあたり、これまで同じ OR 分子を発現する細胞集団(すなわち軸索投射に関して同じ性質を持つ集団)を得ることが困難であることが研究を進める上でのネックとなっていた。我々は *MOR28* クラスターのシス制御領域である H 領域を *MOR28* 遺伝子プロモーター近傍に持ち寄ると *MOR28* 遺伝子の発現頻度が上昇することを見出したが、これを利用し、嗅上皮の 1/4 の領域で 90%以上の嗅神経細胞が *MOR28* 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスの作製に成功した。このトランスジーンは *MOR28* 遺伝子の近傍領域 13kb からなるミニジーンに H 領域を付加したもの(*H-MOR28*トランスジーン)である。このマウスでは *MOR28*トランスジーンが他の内在性 OR 遺伝子と相互排他的に発現しており、同じ *MOR28* 分子をセミモノクローナルに発現する細胞集団を簡便に得ることが出来る。このトランスジェニックマウスと内在性 *MOR28* 遺伝子が *EGFP* レポーター遺伝子により標識されたノックインマウスを掛け合わせた上で内在性 *MOR28* 遺伝子発現細胞の投射の様子を観察すると、一つの糸球に収斂することなく *H-MOR28*トランスジーンの導入により出現した複数の糸球に分散して投射していることが判明した。この結果は、*H-MOR28*トランスジーンの導入により出現した *MOR28* 遺伝子のセミモノクローナル嗅神経細胞集団は投射の性質に関してもほぼ均一であると考えられることができる。この単一 OR のセミモノクローナル発現系は今後嗅覚の研究を進める上で強力なツールとなることが期待出来る。実際に、セミモノクローナルな嗅神経細胞集団とヘテロな集団の間で転写産物を比較することで、複数の軸索ガイダンス様分子のクローニングに成功している。

5 自己評価:

当初、OR 遺伝子発現制御機構と嗅神経細胞軸索投射機構の解明という2つの大きな目標があった。OR 遺伝子の単一発現機構に関しては、OR 遺伝子が stochastic に1つ選択されて活性化する正の制御と、発現された OR 分子が残りの OR 遺伝子が新たに活性化することを阻止する負の制御によって保証されていることを提唱することが出来た。研究前は全く未解明だった OR 遺伝子発現機構の大枠を世界に先駆けて解明出来たこと、また今後の更なる詳細な解明に向けて方向性を示すことが出来、満足のいく結果を得ることが出来た。一方、嗅神経細胞軸索投射機構に関しては分子機構の解明に至らなかったことは反省すべき点である。現在、stochastic な OR 遺伝子の選択からどの様に嗅神経細胞の投射先が規定されるのかという問題に取り組んでいる。この重要問題を解くにあたり本研究で開発した OR 分子のセミモノクローナル発現系が大きく役立つと確信している。

6 研究総括の見解:

対象としている嗅覚分野は競争が激しくなっている。遺伝発現のメカニズムの解明はフエーム領域として把握されるようになった。そうした現時点で、好適な実験系の樹立に成功した本研究の新たな展開を期待する。発表論文数は少ないが質は高い。なお、グループメンバーの統括には十分注意し、工夫していただきたい。ハイランクの研究者への成長の要件である。

7 主な論文等:

論文・総説

1. Serizawa S, Miyamichi K, Nakatani H, Suzuki M, Saito M, Yoshihara Y, Sakano H.
Negative feedback regulation ensures the one receptor-one olfactory neuron rule in mouse.
Science 302: 2088-2094, 2003.
2. Nakatani H, Serizawa S, Nakajima M, Imai T, Sakano H.
Developmental elimination of ectopic projection sites for the transgenic OR gene that has lost zone specificity in the olfactory epithelium.
Eur. J. Neurosci. 18: 2425-2432, 2003.
3. Serizawa S, Miyamichi K, Sakano H.
One neuron-one receptor rule in the mouse olfactory system.
Trends Genet. 20: 648-653, 2004.
4. 芹沢尚, 宮道和成, 坂野仁
マウス嗅覚系における1神経 - 1受容体ルールを支える分子機構
細胞工学。23: 460-467, 2004.
5. 芹沢尚, 宮道和成, 坂野仁
マウス嗅覚系における1神経 - 1受容体ルール
実験医学。22: 860-864, 2004.
6. 芹沢尚, 宮道和成, 坂野仁
嗅覚受容体遺伝子の単一発現制御 対立形質排除の実態に迫る
蛋白質核酸酵素。49: 1403-1412, 2004.

招待講演

1. 芹沢尚, 宮道和成, 坂野仁
Semi-monoclonal expression of the odorant receptor transgene,
日本発生生物学会第37回大会、名古屋、2004年6月
2. 芹沢尚
嗅覚受容体の種類が嗅球上の位置に変換されるメカニズム
第1回 Neuroscience Frontier Research Conference、宮崎、2004年9月
3. 芹沢尚
嗅覚の仕組みの分子メカニズム
ISS 産業科学システムズ ブレインセンター セミナー、東京、2005年3月