

# “1 嗅神経-1 嗅覚受容体”を保証する分子機構

—嗅神経回路の形成と再構築の分子機構—

芹沢 尚

独立行政法人科学技術振興機構 さきがけ研究者



## 1. 私が知りたかったこと

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に約 1000 個ある中から同じ特定の糸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、脳ではどの位置の糸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、匂いマップが形成される際の 2 つの分子メカニズム、OR 遺伝子の単一発現制御 と 嗅神経細胞軸索投射のメカニズム の解明を目指した。

## 2. 研究の狙い

個々の嗅神経細胞がどの種類の匂い分子を受容するかは、各細胞がどの種類の嗅覚受容体(OR)を発現しているかに依存する。また、同じ種類の OR 遺伝子を発現する嗅神経細胞は同じ特定の糸球にその軸索を収斂させる。よって、各軸索の投射における性質は、各細胞がどの種類の OR を発現しているかに依存する。従って、嗅神経細胞の匂い受容および軸索投射における identity は、どの種類の OR 遺伝子を発現するかに依存している。本研究では、嗅神経細胞の identity を規定するメカニズムに、我々が世界に先駆けて開発した YAC 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、嗅覚受容体遺伝子構造の側から切り込む。

## 3. 結果

### シス制御領域による正の制御

マウス第 14 番染色体に位置する嗅覚受容体遺伝子クラスターの 1 つである 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

一中の OR 遺伝子の発現を解析した。様々なコンストラクトを含む DNA 領域とその発現パターンとの比較により、*MOR28* 遺伝子上流 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(Fig.1A)。

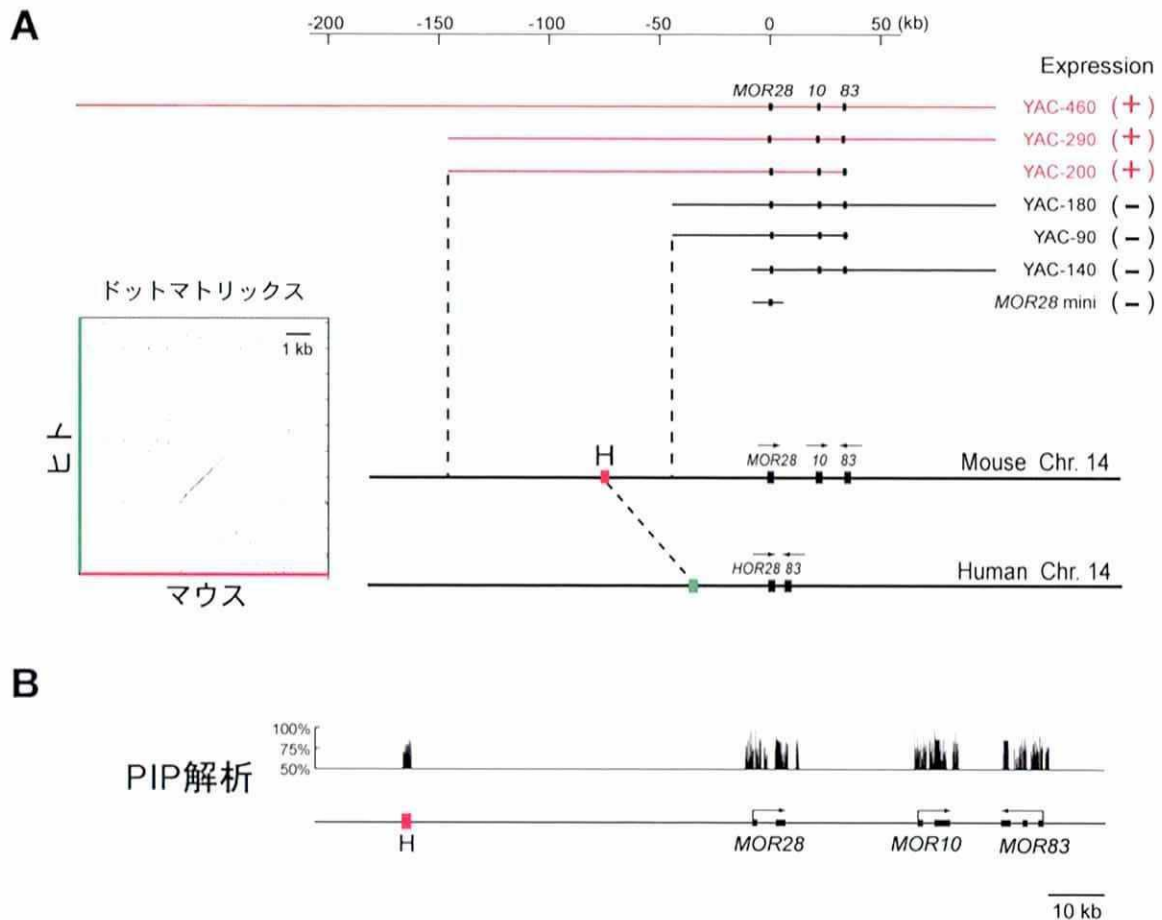


Figure 1

A: 様々な YAC コンストラクトの構造と、トランスジェニックマウスにおける発現パターンを比較することにより、*MOR28* クラスターの上流に制御領域のあることを予想した。

B: ヒトとマウスの塩基配列の比較により、*MOR28* から 75kb 上流に 2kb のホモロジー(H)領域を同定した。PIP(percent identity plot)解析によって、H 領域が *MOR28* 上流に唯一存在する保存配列であることが示された。

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(Fig1A,B)。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(Fig. 2A)。また、H 領域

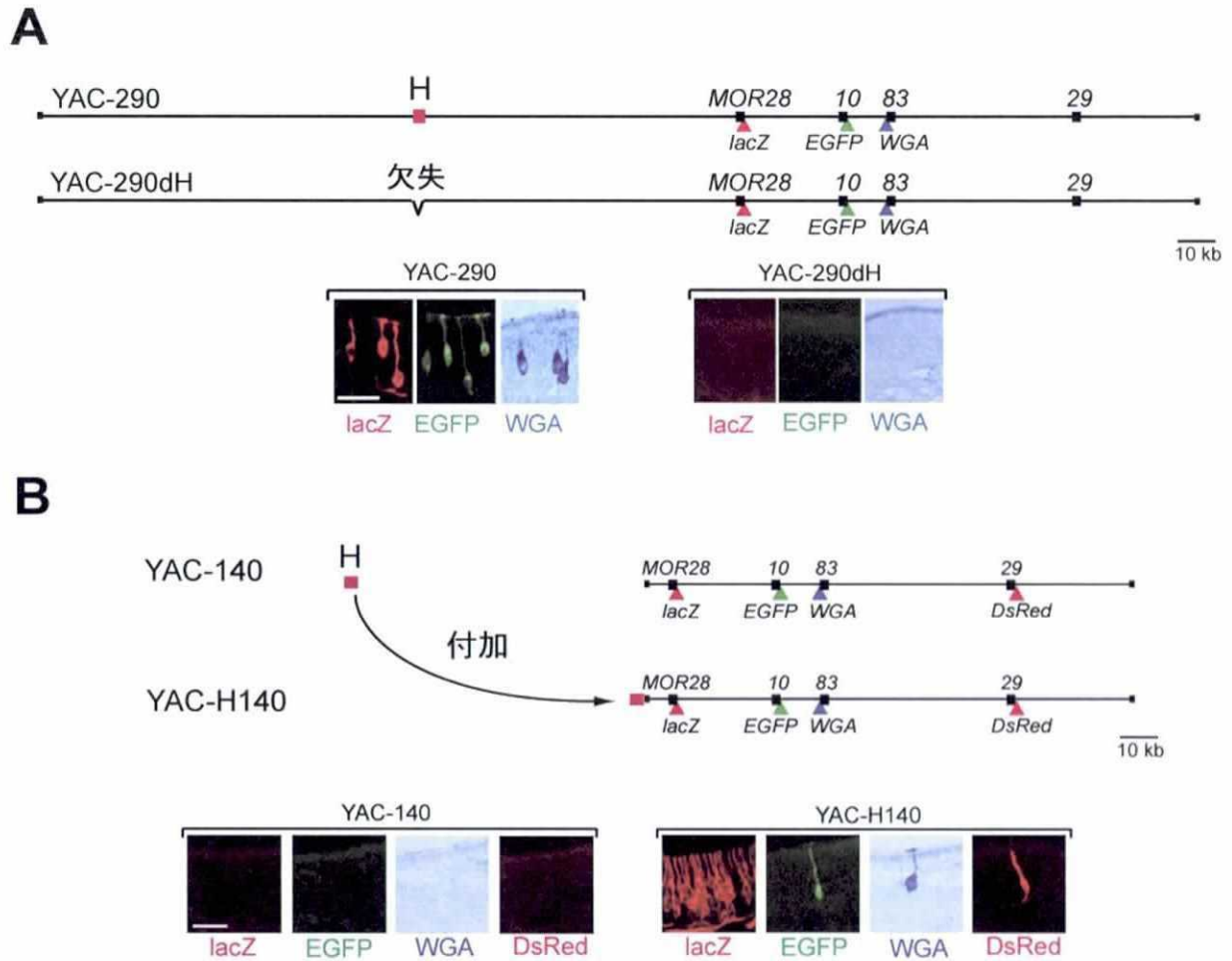


Figure 2

A: H 領域を欠損させることにより、これが MOR28 クラスターの発現をコントロールするシス制御領域であることが判明した。H の欠損により、クラスター中の OR 遺伝子の発現がすべて消失する。

B: MOR28 クラスターの上流を大きく欠いたコンストラクトを導入したマウスでは、いずれの OR トランスジーンも発現しない(YAC-140)。これに H 領域を付加すると、これらトランスジーンが発現がすべて回復する(YAC-H140)。

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(Fig. 2B)。興味深いことに、H 領域がより近傍に付加された YAC-H140 では、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した(Fig. 2B)。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。

## 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*) (Fig. 3A)。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。ここでは *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)。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(Fig. 3B)。*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 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 遺伝子を同時発現している事が確認された(Fig. 3C)。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。

### Figure 3

A: *MOR28* トランスジーンのコディング領域を欠失したコンストラクト。トランスジーンを選択し、活性化した細胞を検出するため、エクソン 2 の下流に IRES を挟んで *EGFP* を挿入してある。

B: 欠失型トランスジーン *del-MOR28* が内在性 *MOR28* 遺伝子と共発現するかどうかを調べるため、*MOR28* コディング領域をプローブとした *in situ* hybridization (赤)、また *del-MOR28* の発現を GFP 抗体を用いて(緑)検出した。

C: 欠失型 *del-MOR28* との共発現が、他の内在性 OR 遺伝子(230-1,244-2, 248-2, 246-2)にも観察されるかどうかを様々なコーディングプローブを用いて検出した。

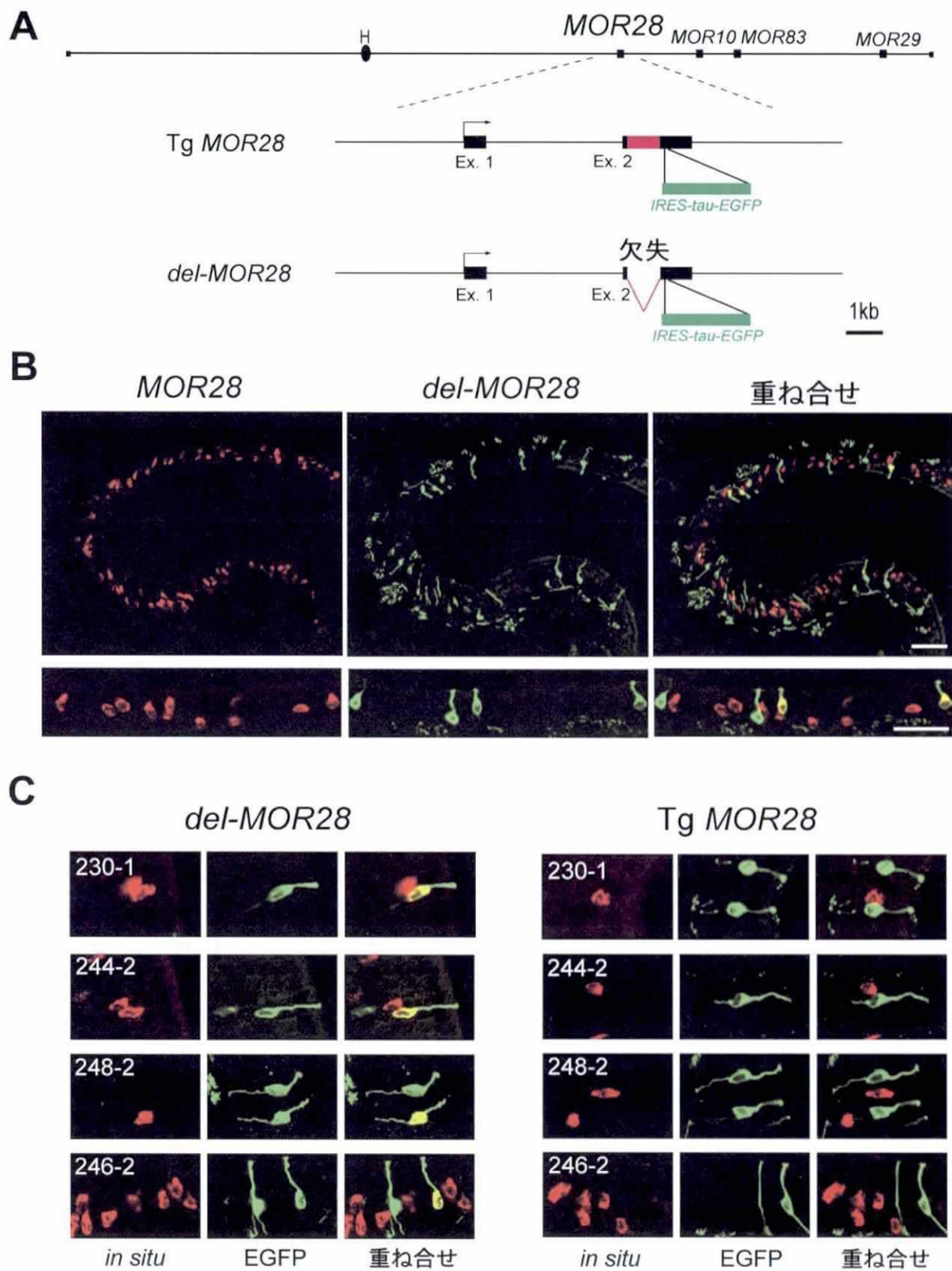


Figure 3

## 4. 考 察

本研究の結果から、嗅覚受容体の単一発現に関して、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が示された(Fig. 4)。Stochastic な OR 遺伝子の選択からどのように嗅神経細胞の投射先が規定されるのだろうか。今後、嗅神経細胞の軸索投射における嗅覚受容体の果たす役割を解明していく必要がある。

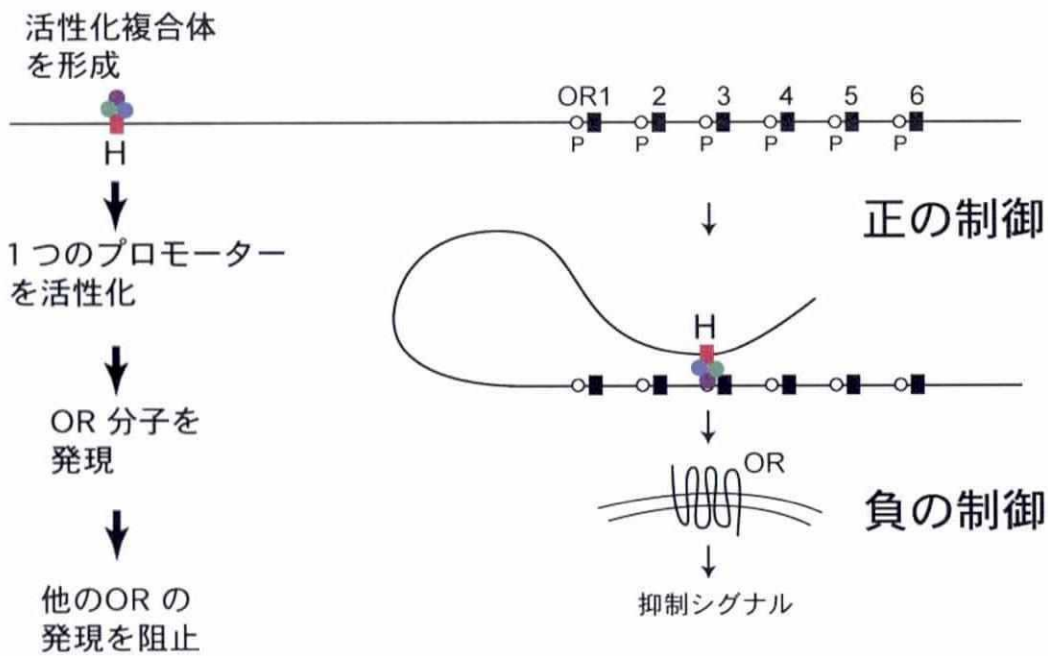


Figure 4

Figure 4

H 領域には転写活性化複合体が形成されると予想され、これがその制御下にある複数のプロモーター(P)の1つと会合して、1つの OR 遺伝子をランダムに選択する(正の制御)。ただし OR クラスターは複数あるので、ひとたび最初の OR 遺伝子が発現した場合、他の OR クラスターの活性化を阻止する必要がある。OR 分子が何らかの抑制シグナルを出している可能性が高い(負の制御)。

## 参考文献

S. Serizawa, K. Miyamichi, H. Sakano

Negative feedback regulation ensures one neuron-one receptor rule in the mouse olfactory system. *Chemical Senses*, in press.

S. Serizawa, K. Miyamichi, H. Sakano

One neuron-one receptor rule in the mouse olfactory system. *Trends in Genetics*, 20 (12): 648-653, 2004

S. Serizawa, K. Miyamichi, H. Nakatani, M. Suzuki, M. Saito, Y. Yoshihara, H. Sakano

Negative feedback regulation ensures the one receptor-one olfactory neuron rule in mouse. *Science* 302: 2088-2094, 2003

H. Nakatani, S. Serizawa, M. Nakajima, T. Imai, H. Sakano

Developmental elimination of ectopic projection sites for the transgenic OR gene that has lost zone specificity in the olfactory epithelium. *European Journal of Neuroscience* 18: 2425-2432, 2003