

## 平成 16 年度科学研究費補助金 ( 基盤研究 ( S ) ) 研究状況報告書

ふりがな		さかのひとし					
研究代表者氏名		坂野 仁		所属研究機関・部局・職		東京大学・大学院理学系研究科生物化学専攻・教授	
研究課題名	和文	嗅覚受容体遺伝子の発現制御と軸索投射					
	英文	Odorant receptor gene expression and projection of olfactory sensory neurons					
研究経費		平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	総合計
16年度以降は内約額 金額単位：千円		27,400	25,800	17,200	8,600	8,600	87,600
研究組織 ( 研究代表者及び研究分担者 )							
氏名		所属研究機関・部局・職		現在の専門		役割分担 ( 研究実施計画に対する分担事項 )	
坂野 仁		東京大学・大学院理学系研究科・教授		分子神経科学		研究の全般を統括する	
<p>当初の研究目的 ( 交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。 )</p> <p>ヒトやマウスの嗅覚受容体(odorant receptor ; OR)多重遺伝子では、免疫系の抗原受容体遺伝子同様、1つの嗅神経細胞で1種類のOR遺伝子が、2つある対立形質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。</p> <p>また、嗅神経細胞の嗅球への軸索投射は、個々の嗅神経細胞が発現する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1,000個の糸球を素子とする電光掲示板のように、濃淡を含む発火のパターンが形成され、この“画像”によって匂いの種類を脳が識別すると考えられている。</p> <p>この匂い情報の2次元画像への変換は、1糸球・1受容体および1神経・1受容体という、2つの基本ルールによって支えられている。本研究課題では、1)個々の嗅神経細胞のリガンド特異性を決定する単一OR遺伝子発現の分子機構、即ちone neuron – one receptor ruleの分子基盤の解明、及び2)同種のOR分子を発現する嗅神経細胞の軸索が嗅球上で収斂し、特定の糸球に投射する、いわゆるone glomerulus – one receptor ruleの分子的基礎を明らかにすることを目指す。</p>							

これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

過去 2 年間の本研究課題における主な成果及び進捗状況は次の通りである。

ヒトやマウスの嗅覚系では、個々の嗅神経細胞は約 1,000 ある嗅覚受容体(OR)遺伝子のうち、たった 1 つを相互排他的に発現している。この 1 神経・1 受容体ルールは、嗅上皮で受容された匂い分子の結合シグナルが、嗅球上の特定の糸球に入力されて位置情報に変換される際、1 糸球・1 受容体ルールとともに、嗅神経回路形成の基本となっている。当研究グループでは、受容体の単一発現について、OR 遺伝子がランダムに 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障されていることを示した(*Science* **302**, 2088-2094, 2003)。

マウス OR 遺伝子は 40 余りのクラスターをなし、ほぼ全ての染色体に分散している。当グループでは、*MOR28* クラスターを、マウスに導入し、その発現を解析してきた。クラスター上流領域の塩基配列をヒトとマウスの間で比較した結果、*MOR28* 遺伝子から 75kb のところに約 2kb のホモロジー(H)が検出された。次に、この H 領域が下流に位置する OR 遺伝子の発現に必要なかどうかを検定するため、H を欠失させたコンストラクトを作製した。H 領域を欠失していないコントロールでは、クラスターに属するすべての遺伝子が正常に発現するのに対し、H 領域を欠失すると、いずれの OR 遺伝子の発現もみられなくなる。従ってこの H 領域は、下流に位置する複数の 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。

我々は、LCR に形成される転写活性化複合体が、1 つのプロモーターとしか相互作用できないということ想定すれば、なぜクラスター内で 1 つの OR 遺伝子しか活性化出来ないかを説明することが出来る考えた。しかし複数の LCR の間に活性化の排他性がなければ、早晚、別のクラスターが活性化され、OR の単一発現が崩れてしまう。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、*MOR28* のコーディング領域を全て欠失した、*del-MOR28* をトランスジーンとしてマウスに導入し、内在性の *MOR28* との共発現を調べた。ここでは、*del-MOR28* の発現を GFP の抗体を用いて緑に、一方、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免疫蛍光法により赤に染色した。嗅上皮の二重染色切片には、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。

OR 多重遺伝子系には多くの偽遺伝子が存在する。我々はこれら偽遺伝子のうちで、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変異型 OR 遺伝子に注目し、これら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。その結果、検定した全ての偽遺伝子が、他の OR 遺伝子との共発現を示した。これらのデータは、OR 遺伝子の発現産物、即ち OR 分子が、他の OR 遺伝子の新たな活性化を阻止する、フィードバック制御の可能性を示唆している。

この負の制御は、残りの OR 遺伝子の新たな発現を阻止するためにトランスに働くものであるが、現在、OR 分子自身どのようにして抑制シグナルを発するのか、またターゲットとなる分子が何なのかなどについては、不明な点が多い。免疫系における抗体重鎖遺伝子の場合には、 $\mu$ 鎖分子が細胞表面に移送されると、それに Syk ファミリーのプロテインキナーゼが会合し、DNA 組み換えに必要なタンパク質因子をリン酸化して、さらなる遺伝子の再構成を抑えると言われている。嗅覚系においても、OR 分子によってリクルートされるプロテインキナーゼが、LCR に結合する転写活性化因子をリン酸化し、新たな OR クラスターの活性化を阻止しているのではないかと考えられる。OR 遺伝子の発現に、遺伝子変換や DNA 組み換えなど、遺伝子再構成の可能性が否定的になった現在、エピジェネティックな制御に、OR 遺伝子研究の中心が移りつつある。

以上述べたように、今回の当グループの実験結果により、OR にはこれまで知られていた 2 つの役割、すなわち匂い分子の受容と軸索投射位置の決定に加え、OR 遺伝子の新たな活性化の阻害という第 3 の役割が明らかとなった。本研究課題ではこれら 3 つの問題について、更に解析を進めていく。

特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

個々の嗅神経細胞が、いかにしてそのアイデンティティであるリガンド特異性を獲得するのは、嗅覚系の分子生物学にとって最大の課題の一つであった。免疫系の抗原受容体遺伝子の場合と同様、多数の類似遺伝子群の中から、たった一つを相互排他的かつ mono-allelic に発現する分子機構は、いかにして一つのプロモーターを活性化し、かつ、残りのプロモーターの活性化を抑制するかという、2つの連携した制御に帰結される。

この問題は、免疫系との共通性のゆえに、DNA 組み換えや遺伝子変換など、プロモーターを転写活性化部位に転座させるモデルによって説明出来ると考えられていた。この可能性は魅力的ではあったが、当グループによる嗅神経細胞染色体の RNA FISH 解析により 2001 年に否定的となり、最近では、嗅神経からのクローンマウスの作成によって、最終的に排除された。しかしながら、DNA の不可逆的变化の可能性がなくなったからといって、OR 遺伝子の単一発現制御の問題が解決された訳ではなく、嗅覚系に固有な制御機構の解明が期待されていた。最近当グループが発表した論文 (*Science* 302, 2088 - 2094, 2003) は、これに応えるものとして広く注目を集めた。我々が提唱した正及び負、2つの制御メカニズムのうち、正の制御である LCR による単一プロモーターの選択は、視覚系錐体細胞における緑と赤の光受容体遺伝子の相互排他的選択にそのプロトタイプが見られ、一方、OR 分子による負のフィードバック制御については、免疫系の allelic exclusion に同様の例が認められる。

嗅覚系における、one neuron – one receptor ルールに関しては、クローンマウスの報告と時期が前後した為、論文発表以来 12 月に *Science* 誌の Perspectives、3 月に *Nature* 誌の News Feature、12 月と 2 月に *Cell* 誌のミニレビューなど、各誌に取り上げられ注目を集めた。

研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文 (発表予定のものを記入することも可能。) の全著者名、論文名、学協会誌名、巻 (号)、最初と最後のページ、発表年 (西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。)

## 論文発表

1. 芹沢 尚、宮道和成、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。 *細胞工学* **23**, 460-467 (2004).
2. 芹沢 尚、宮道和成、坂野 仁：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).
3. 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).
4. 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).
5. 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).
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., 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).
8. 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).

## 学会発表

科学技術振興事業団「生物の発生・分化・再生」領域

第 2 回公開国際シンポジウム、東京都、2003 年 5 月 30, 31 日

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

第 26 回日本神経科学大会、名古屋市、2003 年 7 月 23 ~ 25 日

第 76 回日本生化学会大会、名古屋市、2003 年 10 月 15 ~ 18 日

第 26 回日本分子生物学会大会、神戸市、2003 年 12 月 10 ~ 13 日

Keystone Symposia Conference, Tahoe City, USA 2004 年 1 月 21 ~ 26 日

Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Axon Guidance and Neural Plasticity

Cold Spring Harbor, NY, USA, 2002 年 9 月 25 ~ 29 日、

第 25 回日本分子生物学会、横浜市、2002 年 12 月 11 ~ 14 日