

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008~2010

課題番号：20500280

研究課題名 (和文) 嗅覚受容体遺伝子の単一発現制御と嗅神経回路形成の分子機構

研究課題名 (英文) Molecular basis of mouse olfactory system

研究代表者

西住 裕文 (NISHIZUMI HIROFUMI)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：30292832

研究成果の概要 (和文)：

マウス嗅覚系において、個々の嗅神経細胞が 1400 種類以上存在する嗅覚受容体 (odorant receptor: OR) 多重遺伝子から 1 種類のみを、相互排他的に選択して発現する分子機構について研究を行った。OR 遺伝子の一つを選択して活性化する遺伝子座制御領域を介した正の制御と、発現した OR 分子が残りの 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の両面から研究を進め、OR 遺伝子の単一発現を保障する機構の一端を解明した。

研究成果の概要 (英文)：

In the mouse olfactory system, each olfactory sensory neuron expresses only one functioned odorant receptor (OR) gene in a mutually exclusive and mono-allelic manner. In this study, we analyzed how single OR gene is chosen by one of locus control regions and what kind of signals via a functional OR molecule suppress the expression of additional OR genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：神経科学 ・ 分子・細胞神経科学

キーワード：嗅覚受容体、遺伝子発現、神経回路形成、軸索投射、遺伝子改変マウス

## 1. 研究開始当初の背景

マウス嗅覚系において、匂い分子を受容する嗅覚受容体 (odorant receptor: OR) は 1400 種類以上存在するが、個々の嗅神経細胞ではそのうちの一種類のみを、相互排他的かつ mono-allelic に発現している。嗅神経細胞はどの OR が発現するかによってその神経個性が規定され、軸索を嗅球上のどこに投射し糸球体構造を形成すれば良いかが決定される仕組みになっており、OR 遺伝子の発現制御を明らかにすることは、単に遺伝子の活性化機

構を理解するに止まらず、嗅神経回路形成の理解にも重要である。

## 2. 研究の目的

本研究では、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、発現した OR 分子が残りの 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の両面から研究を進め、OR 遺伝子の単一発現が保障される機構 (図 1) の解明を目指す。また同時に、OR 遺伝子の厳密な発現

制御が破綻した時に、嗅神経回路形成がどのような影響を受け、マウスの匂いに対する行動に変化が生じるかについても研究を進める。

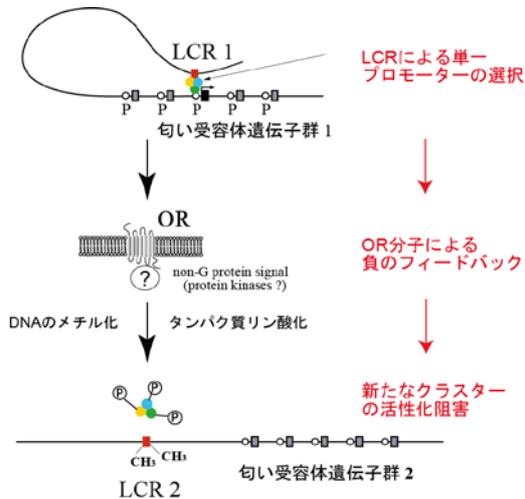


図1 嗅覚受容体遺伝子の単一発現制御の分子機構モデル

### 3. 研究の方法

#### (1) LCR に形成される転写活性化複合体の解析

当グループでは、OR 遺伝子系の LCR の最初の例として MOR28 クラスターにヒトとマウスの間で配列の保存された H 領域 (homology region) を同定した。またゼブラフィッシュの発現系を用いた実験により、当初 2 kb とされた H 領域を最小 124 bp まで絞り込む事に成功した。そしてトランスジェニックマウスの系により、124 bp のコア H 領域がマウスにおいてもトランスジーンの高頻度発現誘導に充分である事を確認した。更に我々は、この 124 bp のコア H 領域内で、OR 遺伝子の発現活性化に必要なシスエレメントを解析した結果、二つの homeobox 転写因子結合配列と、一つの O/E 様結合配列を見出した。これらに会合するタンパク因子を yeast two hybrid 法や免疫共沈法を用いて同定し、LCR に形成される転写活性化複合体の構成分子を明らかにする。更に、LCR に会合するタンパク因子を欠失したマウスを作製し、OR 遺伝子の発現への影響について解析を行う。

#### (2) OR 遺伝子の負の発現制御の実体解明

負のフィードバックシグナルが G タンパク質の活性化とは関係がなく、また OR 特異的なものでもないというこれまでの知見から、今回我々は、様々な種類の 7 回膜貫通型受容体と相互作用する  $\beta$ -Arrestin に着目し、そのフィードバック機構への関与について検討した。OR 分子は多種類存在し、 $\beta$ -Arrestin と相互作用する部位についての知見は今のところ得られていない。そこで 7 回膜貫通型受容

体の中で解析が進んでいて、 $\beta$ -Arrestin と相互作用する部位も判明している  $\beta$ 2-Adrenergic receptor ( $\beta$ 2AR) を利用した。具体的には、OR 遺伝子の代わりに、野生型  $\beta$ 2AR、あるいは、 $\beta$ -Arrestin シグナルを遮断する変異型  $\beta$ 2AR を、OR 遺伝子のプロモーター制御下で発現させる遺伝子操作マウスを作製し、解析を行う。

#### (3) OR 遺伝子の発現異常が嗅神経回路形成に及ぼす影響の解析

コア H 配列をマウス OR 遺伝子のプロモーター近傍に付加した遺伝子組み換えマウスを作製したところ、その OR 遺伝子が発現する嗅神経細胞の数が著しく上昇し、発現する嗅神経細胞の嗅上皮上での位置も広がった。その結果、本来なら嗅球上で 1-2 個形成されるはずの糸球体が、非常に沢山形成された (図 2)。そこで、一次神経 (嗅神経細胞) に関しては、個々の糸球体に軸索を投射してきている嗅細胞は嗅上皮上のどこに位置しているかについて、また二次神経 (mitral/tufted 細胞) に関しては、野性型と比較しながら、二次神経が糸球体に樹状突起を投射する様子を詳細に観察する。

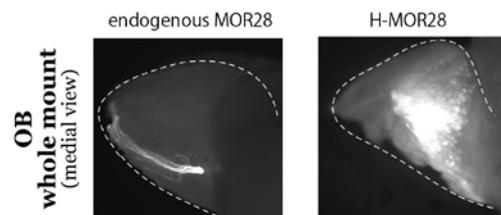


図2 MOR28を発現する嗅神経細胞の軸索投射の様子 LCRを付加する事により MOR28を発現する細胞数を増やすと多数の糸球を形成した。

### 4. 研究成果

#### (1) マウス H 領域内シスエレメントに結合する転写因子の単離

酵母 one hybrid 法を用いて、嗅上皮由来の cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、ホメオドメイン転写因子である Lhx2、Barx1、Dlx3、Dlx5、Emx2 が単離された。これらの因子は、異なった結合強度で、コア H 配列内に存在する 2 箇所のホメオドメイン結合配列に会合する事が、コア H 配列への変異導入実験から明らかとなった。

マウス H 領域に結合し得ることが判明した転写因子 Emx2 の、OR 遺伝子発現における寄与を、Emx2 欠損マウスを用いて解析した。その結果、OR 遺伝子の種類によって、発現する嗅細胞数が減少するもの、増加するもの、変化しないものに分かれる事が判明した。Emx2 は OR 遺伝子の発現を正にも負にも制御する事が示された。

## (2) OR 遺伝子の負の発現制御の実体解明

一旦機能的な OR タンパク質が発現すると、負のフィードバックシグナルにより、他の OR 遺伝子の発現が抑えられる機構が存在すると考えられている。負のフィードバックシグナルが  $\beta$ -Arrestin を介したものと想定し、 $\beta$ -Arrestin シグナルを抑えた場合に、OR 遺伝子の発現に与える影響を解析した。OR 遺伝子のプロモーターの制御下で、野生型  $\beta$ 2AR、あるいは  $\beta$ -Arrestin シグナルのみ抑制される変異型  $\beta$ 2AR を発現するトランスジェニックマウスを作製した。その結果、野生型  $\beta$ 2AR を発現する嗅神経細胞はその軸索を収斂させ糸球を形成するのに対し、変異型  $\beta$ 2AR を発現する嗅神経細胞の軸索は収斂せずに分散し、複数の糸球へ投射することが判明した(図3)。これは変異型  $\beta$ 2AR を発現する嗅神経細胞では、他の内在性 OR が共発現しており、その種類に応じて異なる複数の糸球へ投射することに起因していると考えられる。

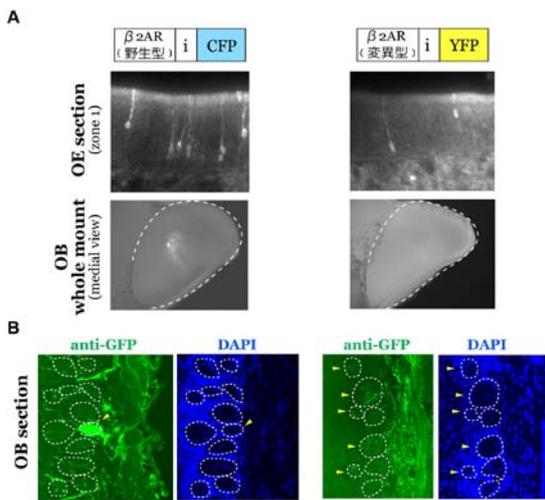


図3  $\beta$ 2ARを用いた負のフィードバックシグナルの解析  
ORの代わりに野生型あるいは変異型 $\beta$ 2ARをOR遺伝子プロモーター制御下で嗅細胞に発現させ、遺伝子の単一発現制御が保証されるかを調べた。

続いて、OR 遺伝子の発現を負に制御するフィードバックシグナルにおいて、 $\beta$ -Arrestin が関与するか、ノックアウトマウスを作製し解析した。*in situ* ハイブリダイゼーション法により、嗅神経細胞では  $\beta$ -Arrestin1 と  $\beta$ -Arrestin2 が発現する事が確かめられた。そこでまず、個々の単独欠損マウスにおける OR 遺伝子の発現を調べたが、発現異常は認められなかった。ノックアウトマウスにおいて、 $\beta$ -Arrestin1 と  $\beta$ -Arrestin2 が互いの機能を相補している可能性が高い。OR 遺伝子の発現における  $\beta$ -Arrestin1/2 の機能を検討するには、二重欠損マウスを作製する必要がある。

今後、負のフィードバックシグナルへの  $\beta$ -Arrestin の関与が明らかになれば、さらにその下流のシグナルを追うことで、OR の単一

発現機構の全容を明らかにすることができると期待される。

## (3) OR 遺伝子の発現異常が嗅神経回路形成に及ぼす影響の解析

図2に示す様に、コアH配列をマウスOR遺伝子のプロモーター近傍に付加した遺伝子組み換えマウスを作製したところ、そのOR遺伝子が発現する嗅神経細胞数が著しく上昇し、本来なら嗅球上で1-2個形成されるはずの糸球体が、非常に沢山形成されることが示された。この遺伝子改変マウスは、調べた限りにおいて正常に生育・繁殖し、種々の匂いに対して野生型と同様の反応を示し、目立った行動異常は見出せなかった。

続いて嗅球における二次神経細胞(mitral細胞)の糸球体への接続についても解析を行った。通常個々のmitral細胞は、一本の主樹状突起をいずれかの糸球体に接続し、嗅神経細胞軸索と糸球内シナプスを形成している。図2に示したH-MOR28マウスのように、同一の性質を持つ糸球体が異所的に多数形成された場合、mitral細胞は樹状突起をどの様に接続するのかを調べた。具体的には、Thy1プロモーターによりGFPを発現するマウスで二次神経細胞を標識し、これを殆どの糸球で同一のORを発現するH-MOR28遺伝子改変マウスと交配し、二光子レーザー顕微鏡を駆使して一次神経と二次神経のシナプス形成を解析した(図4)。その結果、個々のmitral細胞は野生型と同様に、一本の主樹状突起を一つの糸球体に接続し、複数の糸球体に分枝して接続する例は見られなかった。今後は、このThy1-GFPマウスをCNG-A2欠損マウスや嗅球背側に嗅細胞軸索の入力がない $\Delta$ Dマウスなどと交配し、糸球内シナプス形成が嗅神経細胞の神経活動に依存するのか、一次神経からの入力無しで二次神経とのシナプス形成が遺伝的プログラムでどこ迄進むのかなどについて解析していく必要がある。

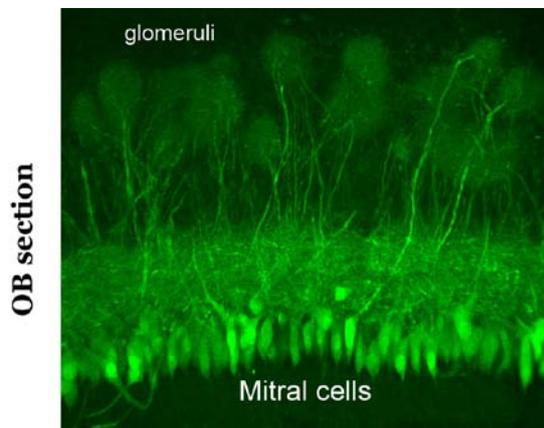


図4 二次ニューロンである僧帽細胞と糸球構造  
Thy1-GFPマウスの嗅球切片を、二光子レーザー顕微鏡を用いて三次元的に可視化して解析している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- ① Takahashi H, Yoshihara S, **Nishizumi H**, and Tsuboi A. Neuropilin-2 is required for the proper targeting of ventral glomeruli in the mouse olfactory bulb. *Molecular and Cellular Neuroscience* (2010) **44**, 233-245. 査読有
- ② Kishishita N, Matsuno T, Takahashi Y, Takaba H, **Nishizumi H**, and Nagawa F. Regulation of antigen-receptor gene assembly in hagfish. *EMBO Report* (2010) **11**, 126-132. 査読有

〔学会発表〕(計3件)

- ① **Nishizumi H**, Miyashita A, Inoue N, Sakano H. 「Synapse formation of OSN axons with M/T cell dendrites in mutant mice that have defects in glomerular map formation」 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, “Axon Guidance, Synaptic Plasticity & Regeneration”, 2010年9月23日(Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA)
- ② **西住裕文**、中山博文、坂野仁。「マウス嗅覚受容体遺伝子の単一発現制御」日本分子生物学会2009年12月10日(神奈川・パシフィコ横浜)
- ③ **西住裕文**、中山博文、海老原章記、坂野仁。「Odorant receptor gene choice in the mouse olfactory system」Neuroscience2008(第31回日本神経科学会大会)2008年7月9日(東京・東京国際フォーラム)(口頭発表)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西住 裕文 (NISHIZUMI HIROFUMI)  
東京大学・大学院理学系研究科・助教  
研究者番号：30292832

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者