

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成25年5月30日現在

機関番号：12608

研究種目：新学術領域研究（研究課題提案型）

研究期間：2009～2011

課題番号：21200010

研究課題名（和文） 水棲型嗅覚受容体が感知する新たな水溶性匂い分子の探索と生理機能の解明

研究課題名（英文） **Functional analysis of class I odorant receptors and their ligands**

研究代表者 廣田 順二 (Hirota Junji)

東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・准教授

研究者番号：60405339

## 研究成果の概要（和文）：

嗅覚は、動物の進化の過程で最も古くから存在し、生命維持のために必要な行動に直接関与する重要な感覚である。ヒトやマウスの嗅覚受容体（odorant receptor: OR）遺伝子は、系統発生的に Class I と Class II OR の2つのサブファミリーに分類される。Class I OR は魚類 OR に類似していることから、これまで進化の名残と考えられ、嗅覚研究の対象は主に Class II OR が中心となってきた。近年のゲノム解析の進展によって、Class I OR が魚類からヒトに至るほぼすべての脊椎動物で維持されていることなどが明らかとなり、何らかの重要な生理機能を持つことが示唆されている。本研究によって、陸棲哺乳動物唯一の水棲環境である羊水に、嗅神経細胞によって感知される匂い分子が存在することをマウス行動学実験、組織化学実験ならびに生理学実験によって明らかにした。また、マウス遺伝学的手法を用い、Class I OR 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。この成果は、Class I OR 発現制御領域の存在を実証した世界で初めての成功例であり、遺伝子発現制御の解明だけでなく、今後標的とする Class I OR 発現細胞を特異的に可視化することが可能となり、Class I OR のリガンド探索に有用なツールとなる。

## 研究成果の概要（英文）：

The vertebrate olfactory system recognizes millions of environmental chemicals and perceives them as odors. Olfactory sensory neurons, the primary sensory neurons in the olfactory system, initiate the perception process by detecting odorants, which interact with odorant receptors (ORs). ORs belong to the largest gene superfamily present in any genome analyzed so far. OR genes are classified into two classes. Class I ORs, which are fish-like and phylogenetically more ancient receptors bind aqueous odorant molecules. The other type is called class II ORs, which are specific to terrestrial animals seem to bind volatile odorant molecules. Although class I ORs in terrestrial mammals had been considered as a relic of evolution from fish to terrestrial, recent studies have demonstrated that intact and functional genes still remain, suggesting that class I ORs in terrestrial mammals might have important physiological functions. In this study, we investigated function of class I ORs in terrestrial mammals to identify aqueous odorous molecules. We focused on amniotic fluid (AF) as source for aqueous odorants. AF is maternal fluid in uterus protecting embryo that is the only aquatic environment for terrestrial mammals. We demonstrated that AF contains some aqueous odor molecules through mouse behavior analyses, histochemical and physiological studies. In addition, we established transgenic lines which enable to visualize class I OR transgene expression and OSN axonal projections, providing the first experimental evidence of a *cis*-acting element for a class I OR gene. This transgenic mice can be useful tool not only for screening ligands of class I OR but also for study on class I OR gene regulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2010年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2011年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
年度			0
年度			0
総計	23,800,000	7,140,000	30,940,000

研究分野：総合領域・生物科学

科研費の分科・細目：神経科学・生物科学・神経・筋肉生理学、機能生物化学

キーワード：視覚・聴覚

1. 研究開始当初の背景

嗅覚は、動物の進化の過程で最も古くから存在し、生命維持のために必要な行動に直接関与する重要な感覚である。匂い分子を感知する嗅覚受容体 (odorant receptor: OR) は、動物の進化の過程において、水棲から陸棲への生活環境の変化に伴って分子進化を遂げ、また社会環境の複雑化に対応するためにその遺伝子数を増加させてきた。動物にとっての嗅覚の重要性は、OR 遺伝子の数の多さにもうかがえる。OR 遺伝子はゲノム最大の遺伝子ファミリーを形成しており、マウスにおいてその総数は約 1400 個、実に全遺伝子の 5%にも及ぶ。

OR 遺伝子は、系統発生的に魚類由来の水棲型 OR (Class I OR) と陸棲動物特異的な陸棲型 OR (Class II OR) の2つのサブファミリーに分類される。Class I OR は魚類 OR に類似した OR として水溶性匂い分子を、Class II OR は陸棲脊椎動物特異的な OR として揮発性分子を受容すると考えられている。これまで陸棲哺乳動物における Class I OR は進化の名残と考えられてきたが、近年のゲノム解析の結果、長年の進化を経てもなお保存されてきた遺伝子であること、機能的タンパク質をコードしていることが明らかになった。このことは、Class I OR が陸棲哺乳動物においても何らかの重要な生理機能を担っていることを示唆している。

これまでの研究によって、2つのタイプの OR 遺伝子は異なる発現制御機構/経路を有していることが明らかになり、嗅神経細胞には水棲型 (Class I) と陸棲型 (Class II) の2つの細胞系譜が存在することが示されている (研究代表者 *PNAS* 2004, *Mol Cell Neurosci* 2005 & 2007)。つまり系統発生的観点だけでなく、遺伝学的観点からも、両者の生理機能および役割には明確な違いがあることが予想されるが、Class I OR が感知

する外部環境 (水溶性匂い分子) を含め、その生理機能ならびに Class I 嗅神経細胞の特性はあまり知られていない。

陸棲哺乳類は胎児期を羊水中で過ごす。ヒトの新生児は胎児期に嗅いだ羊水の匂いを記憶し、それをたよりに母親の乳頭を探索できることが知られている。また、齧歯類・ヤギ・ヒツジの母親においては、分娩時に嗅ぐ自身の羊水の匂いが仔の世話や識別といった母性行動を開始させるスイッチとして働くと考えられている。これらの研究結果に鑑みると、羊水中に新規な水溶性匂い分子が存在し、それを受容すると考えられる Class I OR が母・仔の行動の仲介機能を担っている可能性が示唆される。

2. 研究の目的

本研究課題では、水棲型 OR 遺伝子を発現する嗅神経細胞の特性と水棲型 OR が認識する外部環境を明らかにし、陸棲哺乳動物における水棲型 OR の生理機能を明らかにすることを目的とし、哺乳動物の唯一の水棲環境である羊水を対象として、未知の匂い分子の探索を行う。具体的には、まず羊水中にマウスに特異的に作用する匂い分子が存在するかどうかを行動学実験によって検証する。その後、水棲型 OR のリガンド分子探索のためのアッセイ系を確立し、哺乳動物の唯一の水棲環境である羊水等からのリガンド分子の単離・同定を試みる。またリガンドの作用点となる特定の水棲型 OR 遺伝子を発現する嗅神経細胞を可視化するための遺伝子改変マウスの作製をおこなう。この遺伝子改変マウスは、リガンド探索のツールとなるだけでなく、マウス遺伝学的手法と組み合わせることによって、水棲型 OR 嗅神経細胞系譜や OR 遺伝子発現機構の解析に有用となる

### 3. 研究の方法

#### (1) 羊水中の匂い成分に対するマウスの行動解析

妊娠 17.5 日の妊娠メスマウスを安楽死処置後に帝王切開し、注射針で羊水を採取した。羊水に対する匂い応答を個体レベルで検出するため、行動解析を行った。羊水 10  $\mu$ l を滴下したろ紙片に対するマウスの行動を観察し、コントロール (水 10  $\mu$ l の場合) と比較した。さらに、性差や出産経験による影響を検討した。また特異的な匂い応答を誘導する匂い候補分子を絞り込むために、羊水サンプルに対し、(1) 熱変性 (匂い分子がタンパク質性であるかの検討) (2) 揮発成分除去 (匂い分子が揮発性であるかの検討) の 2 種の処理を行い、同様の解析を行った。

#### (2) 羊水刺激に対する主嗅球における神経活動の検出

行動実験より、羊水中には何らかの水溶性匂い分子が含まれていると考えられた。嗅神経細胞は匂い分子を受容すると、その情報を投射先である主嗅球の特定の糸球体に伝達する。羊水に対する匂い応答を組織レベルで検出するため、主嗅球における神経活動マーカー Zif268 の免疫染色を行った。羊水を滴下したろ紙片をマウスに与え、Zif268 の発現ピークである 90 分後に灌流固定して主嗅球の組織切片を作製した。Zif268 を特異的に認識する 1 次抗体を結合させ、ビオチン化 2 次抗体とアビジン-ビオチン複合体によりシグナルを増幅して、ペルオキシダーゼと DAB の反応によって発色させた。羊水特異的に発火した糸球体の位置を測定し、糸球体地図を作成した。

#### (3) 羊水に対する嗅神経細胞応答の測定

羊水による匂い刺激に対するマウスの行動解析ならびに主嗅球の神経応答の結果、羊水中には嗅神経細胞によって受容される水溶性匂い分子が存在することが示唆された。このことを直接証明するために、カルシウムイメージングを用いて嗅神経細胞応答のアクセス系の確立を行った。

まず class I OR を発現する嗅神経細胞が存在する嗅上皮の背側領域を摘出した。これを  $Ca^{2+}$  free 緩衝液に浸漬後、トリプシン、トリプシンインヒビター、DNase I の順で酵素処理を加えた。更に BSA 入り DMEM 中で組織片をメスで切り分けた。これをセルストレイナーで濾し、細胞懸濁液を調製した。 $Ca^{2+}$  蛍光指示薬 fura 2-AM を細胞内に導入し、ポリ-D-リジンコートしたスライドガラスの上に滴下し、嗅神経細胞を定着させ、測定用サンプルとしカルシウムイメージングを行った。

#### (4) Class I OR 発現嗅神経細胞を可視化するトランスジェニックマウスの作製

羊水中匂い成分に反応する嗅神経細胞から single cell RT-PCR によって発現する OR 遺伝子を同定し、さらに同定した OR 遺伝子を発現する嗅神経細胞を特異的にラベルすることができれば、リガンドの同定に極めて有用なツールとなる。つまり特定の Class I OR 遺伝子発現細胞を EGFP の蛍光でラベルできるトランスジェニックマウス作製が必要となる。しかしながら、これまで Class I OR の遺伝子発現制御領域の同定を含め、それに成功した例はない。これは Class I OR 多重遺伝子が染色体上に 3 Mb にもおよぶ単一の巨大遺伝子クラスターを形成していることによるものと考えられる。そこで本研究では、新たな DNA クローニングツールである枯草菌ゲノム (BGM) ベクターシステムをマウス遺伝学的手法に適用し、Class I OR を EGFP の蛍光で可視化できるトランスジェニックマウスの作製をおこなった。標的遺伝子は、最も魚類の OR に近い MOR42-3 を対象とした。

### 4. 研究成果

#### (1) 羊水中の匂い成分に対するマウスの行動解析結果

交尾未経験成熟メスのみが、ろ紙片に積極的に接近し、スニフingする行動を示した (図 1)。このことから、羊水中には交尾未経験成熟メスを引きつける何らかの匂い分子が含まれることが明らかとなった。さらに、熱変性サンプルと揮発成分除去サンプルに対する接近回数は、有意な差はないものの、未処理羊水よりも減少する傾向がみられた (図 2)。したがって、羊水特異的行動を誘導する成分として、タンパク質性成分と揮発性成分双方が関与していると考えられた。

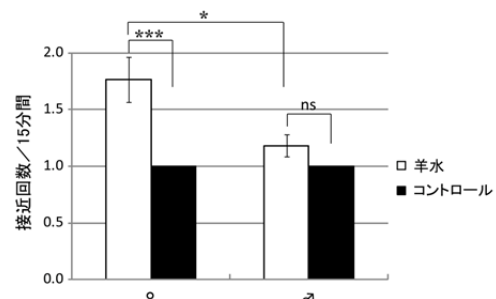


図 1. 羊水特異的応答の検出 (性差の検討)

ろ紙片への接近回数を、コントロールの値で標準化した。成熟メスが特異的に引きつけられた。n = 16, \*P < 0.05, \*\*\*P < 0.0005

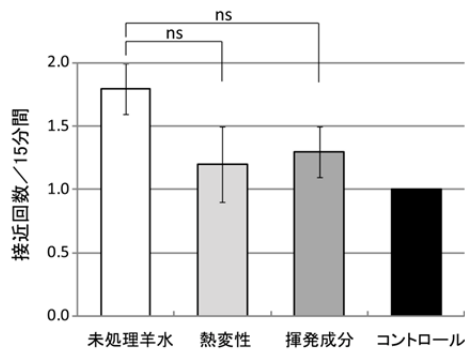


図2. 熱変性・揮発成分除去サンプルへの応答  
熱変性・揮発成分除去サンプルでは、未処理羊水に比して特異的な行動が減少する傾向がみられた。  
n = 16

### (2) 羊水刺激に対する主嗅球における神経活動の検出

主嗅球の背側 - 内側領域 ( $D_1$  領域) の糸球体が羊水特異的に発火し、性差は見られなかった (図3)。 $D_1$  領域は水棲型 OR 発現嗅神経細胞の投射先であるため (Kobayaka et al., 2007)、羊水中の匂い分子が水棲型 OR によって受容されている可能性が示唆された。また、性差が見られなかったことから、一次中枢までの匂い応答は性別によらず同様に起こり、より中枢の神経回路に何らかの性差があるために、行動の性差が発現したと考えられる。一方、熱変性サンプルでは、 $D_1$  領域の糸球体を発火させるものの、Zif268 陽性の糸球体数と細胞数が減少していた。

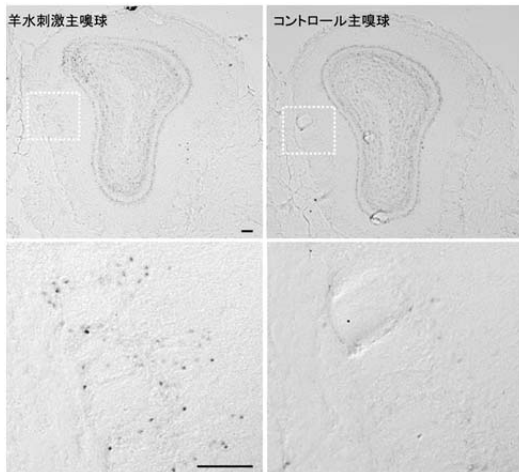


図3. 主嗅球の羊水特異的な糸球体発火  
 $D_1$  領域が特異的に発火していた。Scale bar: 100  $\mu$  m.

### (3) 羊水に対する嗅神経細胞応答の測定

羊水刺激による嗅神経細胞応答を測定した結果、ほとんどの嗅神経細胞は羊水に対する応答を示さなかったが、ごく一部の細胞が応答を示した。125 個の高濃度 KCl 応答性嗅神経細胞に羊水を導入したところ、3 個の嗅神経細胞が羊水に応答を示した。羊水に対

する応答が、羊水特異的であるかを調べるために羊水の希釈率を変化させると、希釈率に依存した応答が観測できた (図4)。

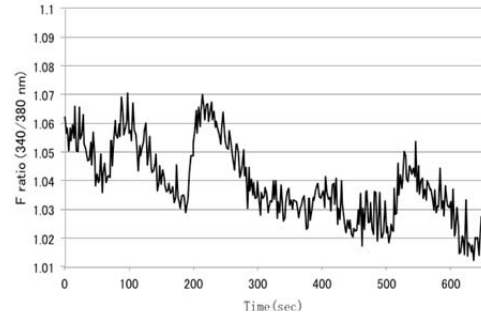


図4. 希釈率を変化させた羊水に対する嗅神経細胞の応答 (上) 測定した嗅神経細胞の写真 矢印は羊水に反応した細胞を示す。(右) 嗅神経細胞の羊水に対する応答 縦軸は各励起光における蛍光強度比、横軸は時間を示す。

### (4) Class I OR 発現嗅神経細胞を可視化するトランスジェニックマウスの作製

本研究では BGM ベクターシステムを用いて、マウス Class I OR 遺伝子クラスターを含む巨大 DNA 断片の様々な改変操作を行い、トランスジェニックマウスの作製を行い、MOR42-3 発現細胞の可視化をおこなった。一連の操作を通して、BGM ベクターが新たな巨大 DNA 断片操作ツールとして有用であること実証した。作製した Tg-250SB トランスジェニックマウスではレポーター遺伝子の発現が確認でき、一方で Tg-110SB マウスでは確認できなかった。したがって、BAC2-Tg はそのマウスゲノム領域内に MOR42-3 の発現制御領域を保持していることが実験的に世界で

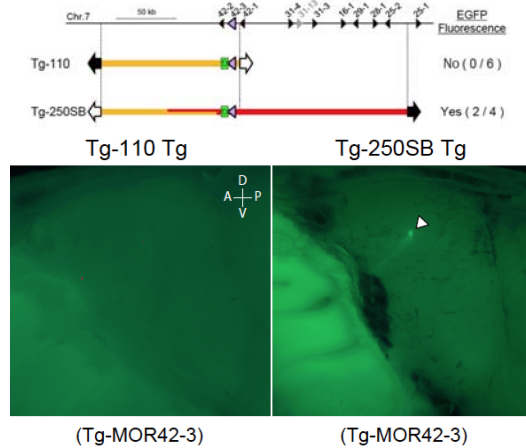


図5. MOR42-3 トランスジェニックマウス  
(上) 作製したトランスジェニック Tg-110 と Tg250SB の構造と EGFP レポーター遺伝子の発現解析結果。  
(下) 嗅上皮および嗅球における EGFP の蛍光像。Tg-110 では EGFP の蛍光は観察されなかったが、Tg250SB では、嗅上皮ならびに嗅球において MOR42-3 トランスジェニックの発現に伴う蛍光が観察された。

初めて証明することができた (図 5)。今後さらなる解析により、Class I OR 遺伝子の発現制御領域の同定、制御機構の解明への発展が期待できる。また本マウスがリガンド探索のために用いることができるかを検証するために、このトランスジェニックマウスから嗅神経細胞の初代培養を行い、カルシウムイメージングによるリガンド探索を行い、セバシン酸ほか複数の匂い分子がこの MOR42-3 のリガンドとなることを明らかにした。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Tetsuo Iwata, Shinya Kaneko, Yuh Shiwa, Takayuki Enomoto, Hirofumi Yoshikawa and Junji Hirota, *Bacillus subtilis* genome vector-based complete manipulation and reconstruction of genomic DNA for mouse transgenesis, *BMC Genomics*, 査読有, vol. 14, 2013 (in press)  
DOI: 10.1186/1471-2164-14-300

[学会発表] (計 9 件)

- ① 岩田哲郎、金子真也、廣田順二、枯草菌ゲノムベクターシステムを用いた嗅覚受容体遺伝子の発現制御領域の解析、第 35 回日本味と匂学会大会、2012 年 10 月 6 日、大阪大学 (吹田市)
- ② 岩田哲郎、金子真也、廣田順二、合成ゲノムベクターを用いたマウス遺伝子改変、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 25 日、京都女子大学 (京都市)
- ③ 岩田哲郎、金子真也、廣田順二、Generation of transgenic mouse using the *Bacillus subtilis* genome vector、第 34 回分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
- ④ 鶴野絢子、岡村圭、廣田順二、水棲型嗅覚受容体の機能解析と新たな水溶性匂い分子の探索、日本味と匂学会第 45 回大会、2011 年 10 月 6 日、石川県立音楽堂 (金沢市)
- ⑤ 廣田順二、嗅覚受容体遺伝子発現制御と嗅神経細胞分化の分子機構に関する研究、日本味と匂学会第 45 回大会、2011 年 10 月 6 日、石川県立音楽堂 (金沢市)

- ⑥ 金子真也、岩田哲郎、廣田順二、ゲノムベクターを用いたマウス遺伝子改変操作への適用、第 83 回日本遺伝学会、2011 年 9 月 22 日、京都大学 (京都市) 会第 45 回大会、2011 年 10 月 6 日、石川県立音楽堂 (金沢市)
- ⑦ 榎本孝幸、西田秀史、應本真、木南凌、松本一朗、廣田順二、Function of Bcl11b in the differentiation of olfactory sensory neurons、日本神経科学学会大会第 46 回大会、2011 年 9 月 19 日、名古屋国際会議場 (名古屋市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.hirota.bio.titech.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣田 順二 (Hirota Junji)

東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・准教授

研究者番号 : 60405339