

論文内容の要旨

論文題目 嗅覚受容体遺伝子の **mono-allelic** な発現と嗅細胞の軸索投射

氏名 石井智浩

哺乳類の嗅覚系では数十万種類の匂いが識別可能と言われ、これには一千種類に及ぶ嗅覚受容体多重遺伝子が対応している。個々の嗅細胞では、これら遺伝子群の中から一種類のみが選ばれ、かつ **mono-allelic** に発現している。また嗅球への軸索投射に際しては、発現する嗅覚受容体の種類に応じて、約二千個存在する糸球のうち **lateral** 側 **medial** 側、各々一対ずつを選んでターゲットとしている。本研究では嗅覚受容体遺伝子の相互排他的発現制御、及び嗅細胞の特異的な軸索投射のメカニズムを解明することを目的として、マウス嗅覚受容体遺伝子のノックインマウス及びトランスジェニックマウスを作製した。

嗅覚受容体遺伝子 *MOR28* の相互排他的発現

私は嗅覚受容体遺伝子 *MOR28* を発現している細胞で同時に **gap-GFP** を発現させ、*MOR28* 発現細胞を可視化することを試みた。**gap-GFP** 融合蛋白質は、カルモジュリン結合蛋白質 **GAP43** の N 末端 20 アミノ酸からなる膜移行シグナル配列と蛍光蛋白質 **GFP** とを融合させたものである。この蛋白質は効率よく軸索へ輸送されるので、神経細胞の軸索末端まで **GFP** の蛍光が観察される。ノックインの手法を用いて *IRES-gap-GFP* 構造を *MOR28* 遺伝子の 3'UTR に挿入、これにより *MOR28* 発現細胞を **GFP** 蛍光により可視化する事に成功した。次に、マイクロマニピュレーターを用いてこの **GFP** 発現細胞を単離し、RNA-DNA

FISH 法により *MOR28* が mono-allelic に発現していることを直接的に初めて証明した。具体的には G F P 発現細胞の核に、digoxigenin ラベルされた *MOR28* のイントロンプローブをハイブリダイズさせ、*MOR28* mRNA の前駆体を *in situ* で検出した。イントロンプローブは primary transcript とハイブリダイズするため、転写の行なわれてい

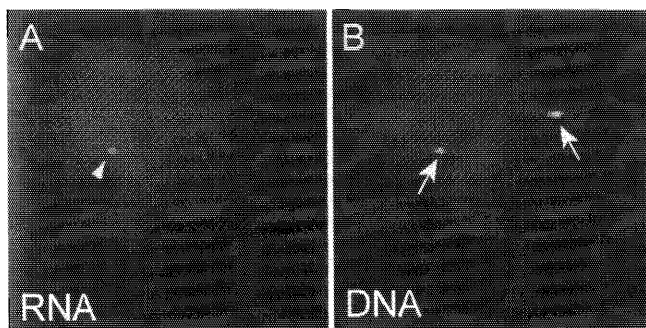


図1 *MOR28* の mono-allelic な発現

MOR28 発現細胞の核を用いて RNA-DNA FISH を行なった。核全体を可視化するためにサンプルは DAPI 染色した。

(A) RNA シグナルの検出 (矢尻)

(B) DNA シグナルの検出 (矢印)

る染色体部位を検出する。次にこの核に対し RNase 処理後 DNA 変性を行ない、*MOR28* 遺伝子領域約 10 kb をビオチンラベルしたプローブを用いてハイブリダイゼーションを行なった。これにより第 14 番染色体上の *MOR28* 部位を同定した。RNA のシグナルはローダミンと結合した 2 次抗体により赤で、DNA のシグナルは FITC の結合した avidin により緑で検出した。図 1 に示す様に、DNA-FISH による緑の 2 つのシグナルの内一方のみが RNA-FISH による赤の 1 つのシグナルと重なった。このことから *MOR28* 遺伝子が mono-allelic に発現していることが直接的に証明された。

次に、non-allelic な *MOR28* 同士についても、同様に相互排他的発現が見られるのかどうかを検証するため、*MOR28* を含む 460 kb の YAC クローンを用いたトランスジェニックマウスを作製し、先のノックインマウスと掛け合わせた。外来性 *MOR28* 遺伝子は *tau-lacZ* で標識されているため内在性の *MOR28* と区別して解析することができる。嗅上皮の切片を作製して、内在性

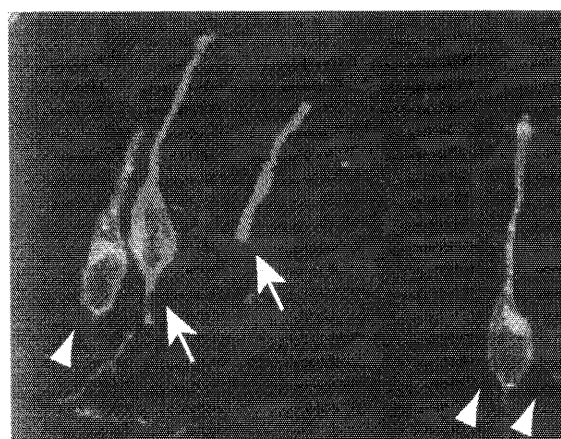


図2 内在性・外来性 *MOR28* の相互排他的発現

嗅上皮の蛍光染色像。外来性 *MOR28* 発現細胞は抗 β -gal 抗体で検出し (矢印)、内在性 *MOR28* 発現細胞は GFP の蛍光 (矢尻) で検出した。

MOR28 発現細胞を GFP の緑の蛍光で、外来性 *MOR28* 発現細胞を抗 β -galactosidase 抗体およびローダミン結合 2 次抗体により赤の蛍光で観察した (図 2)。その結果、*MOR28* を発

現する細胞のほとんどすべてが赤または緑、どちらか一方の蛍光で検出され、黄色に見える細胞は数千個以上調べた上でわずか4個だけであった。これらの結果から、*maternal/paternal*の関係にない同じ構造を持つ嗅覚受容体遺伝子の間にも相互排他的発現制御の働くことが判明した。

嗅覚受容体遺伝子の排他的発現制御を説明するため、これ迄、複数の転写因子の組み合わせにより特定の遺伝子が選択的に発現するというモデルが考えられてきた。しかし、今回得られた我々の結果はこの可能性を否定するものであり、トランスでない、シスに働く制御メカニズムを考える必要が出てくる。免疫系など他の多重遺伝子系の例から類推して、抗原受容体遺伝子のDNA組み換えや、トリパノゾーマの抗原性の変化に見られる遺伝子変換なども可能性として考えられるが、嗅覚系に独特の機構の存在する可能性もあり今後の進展が期待される。

嗅覚受容体遺伝子 *MOR28* 発現細胞の軸索投射

GFP 遺伝子で標識した内在性 *MOR28* と *lacZ* で標識した外来性 *MOR28* は、それぞれ 129/Sv(129) 系統と C57BL/6(B6) 系統由来である。この2つの系統の間では *MOR28* コーディング領域に5箇所の塩基置換があり、その内の1箇所がアミノ酸の変化を引き起こす。先の実験で、内在性2つの対立形質、更にトランスジーンとして導入された外来性 *MOR28* は、それぞれ異なる細胞で発現することが判明した。そこでこれら3種類の *MOR28* を発現する細胞の軸索投射を遺伝的多型や、標識遺伝子の有無などいくつかのパラメーターに注目しながら解析した。

まず父方と母方の *MOR28* を発現する細胞の軸索投射を区別して解析した。父方の allele を *GFP* 標識 *MOR28* に固定し、母方の allele に関して色々系統を変化させた。具体的には、母方の allele を B6 にした場合と 129 にした場合を比較した。*MOR28* プロブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションでは、輸送の関係上 *GFP* 標識の *MOR28* mRNA は軸索末端で検出さ

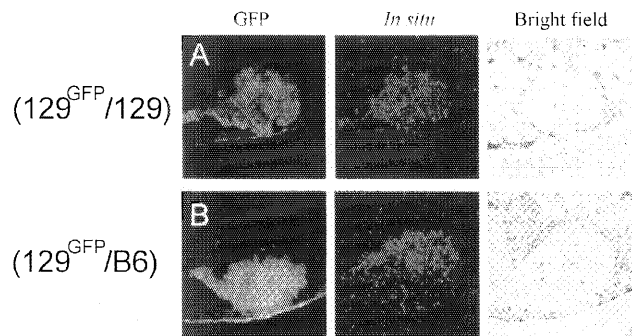


図3 2つの対立形質に対する軸索投射先の同一糸球内での分離

父方 *MOR28* 発現細胞の投射先は *GFP* 蛍光 (左) で、母方 *MOR28* 発現細胞の投射先は *in situ* ハイブリダイゼーション (中央) で検出した。右側の写真は neutral red 染色した嗅球切片の明視野像。(A) (129^{GFP}/129) マウス (B) (129^{GFP}/B6) マウス

れないので、ここでは主として標識されていない母方 allele の投射先を検出する。図 3 に示す様に、嗅球の連続切片を用いて、*in situ* ハイブリダイゼーションと GFP の蛍光により *MOR28* 発現細胞の投射先を allele 毎に可視化した。GFP 蛍光で観察される父方と *in situ* ハイブリダイゼーションで検出される母方の投射先は、(129^{GFP}/129) の組み合わせのマウスにおいては、多少の分離は見られるもののかなりの部分重なって検出された (図 3 A)。一方、(129^{GFP}/B6) の組み合わせのマウスでは同一糸球内ではあるが明瞭に投射領域が分離した (図 3 B)。以上のことから、内在性 allele を発現する細胞に着目した場合、父方母方それぞれの投射先は、遺伝的多型により同一糸球内においてその投射領域が分離することが初めて判明した。

次に外来性 *MOR28* と内在性 *MOR28* を発現する細胞の投射先について解析した。X-gal 染色により青く検出された外来性 *MOR28* の軸索と緑の蛍光で可視化された内在性 *MOR28* の軸索は近傍ではあるが別々の糸球

に投射した (図 4 A)。 *MOR28* の 2 つの内在性 allele をヘテロ (129^{GFP}/B6) からホモ (129^{GFP}/129^{GFP}) にした場合、内在性 *MOR28* に対する糸球は外来性 *MOR28* の糸球から 300-400 μm (糸球 4-5 個分に相当) 離れた位置に形成された (図 4 B)。更に、遺伝的多型や標識遺伝子の影響など何が投射のパラメーターになる

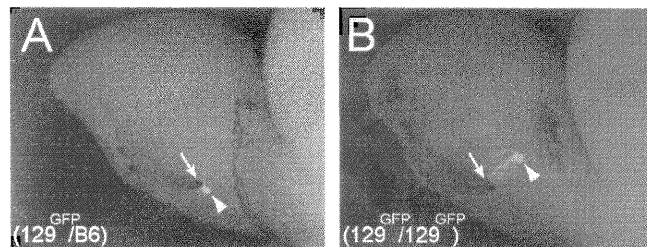


図 4 *MOR28* 発現嗅細胞の軸索投射先

外来性 *MOR28* の投射先 (矢印) を X-gal で青色に染色し、内在性 *MOR28* の投射先 (矢尻) を GFP 蛍光で検出した。図は嗅球を側面から見たものである。

(A) (129^{GFP}/B6) マウス (B) (129^{GFP}/129^{GFP}) マウス

かを調べるため、内在性 *MOR28* について様々な組み合わせを設定しその投射先を検定した。これらの実験から、嗅覚受容体遺伝子によって規定される嗅細胞の軸索投射が、染色体上の位置や遺伝的多型、標識遺伝子の有無や種類によって影響を受けることが明らかになった。

今日ある高等動物の嗅覚系は、遺伝子重複を繰り返し受容体遺伝子プールの拡大と突然変異の蓄積によって、におい識別のレパートリーを拡大してきた。その際嗅覚受容体遺伝子に変異が導入された場合、受容体のリガンド特異性や結合能の変化する事は十分予想される。遺伝子重複により倍加した受容体遺伝子のうち、一方のリガンド特異性が変化すると、嗅覚系は 2 つの受容体からのシグナルを別々に処理する必要が生じる。本研究で観察された様々な遺伝的要因による投射先の分離は、嗅覚系が allele 毎に異なる軸索投射先を用意する潜在能力を保持していることを示唆するものとして極めて興味深い。