

論文の内容の要旨

論文題目 マウス嗅覚受容体遺伝子の相互排他的発現

氏 名 芹澤 尚

はじめに

嗅覚受容体 (odorant receptor: OR) をコードする遺伝子は1991年、BuckとAxelらによってラットにおいて同定された。この遺伝子系は哺乳類では1,000種類に及ぶ多重遺伝子からなっており、様々な染色体上にクラスターをなして存在している。OR 遺伝子をプローブとした *in situ* hybridizationにより、げっ歯類の嗅上皮は4つのゾーンに分けられ、各OR 遺伝子はこれら4つのゾーンのいずれか一つで発現している。また様々な状況証拠から、各々の嗅神経細胞で発現されるOR 遺伝子の種類はおそらく1種類で、2つある対立遺伝子のどちらか一方のみが発現されていると考えられている。

また嗅球への投射に際しては、同じ種類の嗅覚受容体を発現する嗅神経細胞は、約2,000個ある糸球のうち特定の2対に対して軸索を収束させている。したがって、嗅上皮において受容される匂いの化学情報は、嗅球において糸球の場所によって規定される二次元的位置情報に変換されることができると考えることができる。

本研究では、OR 遺伝子の発現調節、及び、嗅神経の軸索投射機構を解明するため、*MOR28* クラスター (*MOR28*, *MOR10*, および *MOR83* を含むマウスのOR 遺伝子クラスター) を含む460kbの染色体領域をYACベクターに導入し、これを含むトランスジェニックマウスを作製、その発現に成功した。

結果

1 トランスジェニックマウスにおける嗅覚受容体遺伝子の発現

これまで試みられた嗅覚受容体のトランスジェニック実験には、単一の OR 遺伝子を含む比較的短い DNA 領域が用いられ、いずれもその発現に成功していない。私は、OR 遺伝子の発現にはクラスターレベルの制御機構が存在すると考え、*MOR28* を含む 460kb の DNA を YAC ベクターを用いてマウスに導入した (YAC-460)。本研究ではまた、YAC-460 の上流及び下流領域を削った、長さの短いコンストラクト (YAC-200、YAC-180、YAC-90) を持つトランスジェニックマウスも平行して解析した。いずれの場合にも、トランスジーンを発現を容易に検出する為、*MOR28* を *IRES* (internal ribosomal entry site) と共に *tau-lacZ* で標識してある (図 1)。トランスジェニックマウスから嗅上皮及び嗅球を取り出し、全体を X-gal で染色したところ、嗅上皮で青色に染まる嗅神経細胞が認められ、その軸索は嗅球上の特定の糸球に投射していることが観察された (図 2)。YAC-460 については独立に 4 つのラインが得られ、全てにおいてトランスジーンが発現が認められた。YAC-200 を含むマウスについては 6 系統全てで発現が認められ、YAC-180 では、10 系統中 4 ラインにおいて極めて低いレベルの発現が観察された。YAC-180 の残りのラインと YAC-90 については全く発現が認められなかった。これらの発現結果から、YAC-200 には *MOR28* の発現に必要な一応の制御領域はすべて含まれること、YAC-200 には存在するが YAC-180 には含まれない *MOR28* の上流領域に重要な発現制御領域の有ることが示唆された。

図 1

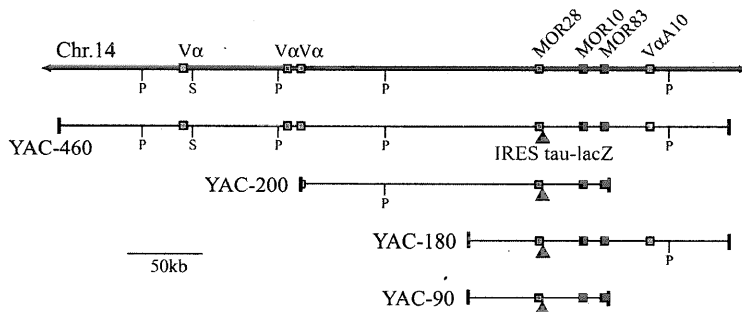


図 1 : マウスゲノムライブラリーより単離された 460kb の YAC クローン (YAC-460) 上の *MOR28* 遺伝子 3' 非翻訳領域を *IRES-tau-lacZ* (▲) で標識した。YAC-200、YAC-180、及び YAC-90 は標識された YAC-460 の上流及び下流域を削り、作製した。YAC クローン上には 3 種類のマウス嗅覚受容体遺伝子、*MOR28*、*MOR10*、及び *MOR83*、が含まれる。制限酵素切断位置、P (PmeI) 及び S (Sse8387I) を示す。

図 2

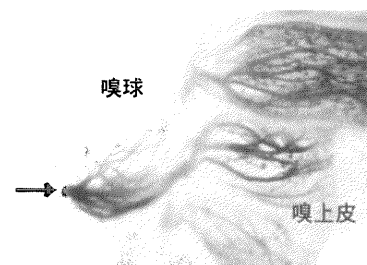


図 2 : X-gal 染色を行った嗅上皮及び嗅球側面。外来性 *MOR28* を発現する嗅神経細胞及びその軸索は青く染まって観察される。発現細胞の嗅球上の特定の糸球への軸索投射が観察された (矢印)。

2 内在性と外来性の *MOR28* 遺伝子は相互排他的に発現する

トランスジーンとして導入された外来性 *MOR28* の発現を内在性のそれと区別して検出するため、内在性 *MOR28* が *gap-GFP* で標識されたノックインマウスを、先のトランスジェニックマウスとかけあわせ、同一組織中で外来性と内在性、2種類の *MOR28* 遺伝子の発現と投射を解析した。*gap-GFP* の産物は膜輸送シグナルペプチド GAP43 と GFP の融合タンパク質であり、緑の蛍光によりその発現を検出出来る。一方、*tau-lacZ* で標識した外来性 *MOR28* の発現は、抗 β -gal 抗体を用いた抗体染色により赤の蛍光で検出した。このかけあわせマウスを解析したところ、外来性 *MOR28* (赤) と内在性 *MOR28* (緑) はともに嗅上皮のゾーン 4 で発現するが、その発現細胞は赤あるいは緑いずれかの蛍光を発し、両者を同時に発現する細胞は極めて稀であることが確認された。これらの結果は、外来性 *MOR28* と内在性 *MOR28* とは制御領域も含め基本的には同じ遺伝子構造をもつにもかかわらず、その発現に際してはそれぞれが独立の OR 遺伝子としてふるまうことを示している。

3 相互排他的発現は複数導入されたトランスジーン間にも認められる

次にトランスジーン同士の発現における相互排他性を調べるため、YAC-200 をもとに標識を違えた2種類のコンストラクトを作製した。一つは *MOR28* を *tau-lacZ* で標識し (YAC-200)、もう一つは *MOR28* を *tau-GFP* で標識 (YAC-200G) してある。これら両者を同時にマウス受精卵に導入しトランスジェニックマウスを作製、4つのラインを得、その内 E と F、2 つについて更に詳しい解析を行った。FISH 解析や Southern hybridization の結果から、YAC-200 と YAC-200G の両コンストラクトは同じ染色体の同じ領域に並んで挿入されていることが確認された。次に嗅上皮においてその発現を調べたところ、トランスジーン *MOR28* を発現する嗅細胞は赤または緑いずれか一方の蛍光を発し、黄色に発色するものは認められなかった。このことは、同時に導入された複数の外来性 *MOR28* の間にも相互排他的発現制御のみられることを示すものである。ちなみにライン E マウスについては、3751 個の赤色細胞と 2061 個の緑色細胞に対し、黄色の細胞はひとつも検出されなかった。

4 トランスジーン *MOR28* を発現する嗅神経細胞の投射先

上に述べたように、外来性 *MOR28* と内在性 *MOR28* とは各々別の細胞集団で発現することが判明したので、次に我々はそれぞれの発現細胞の軸索投射について解析した。*lacZ* で標識した YAC-460 トランスジーンと *GFP* で標識した内在性 *MOR28* を持つかけあわせマウスから嗅球を取り出しその全体を蛍光染色したところ、赤の蛍光 (抗 β -gal 抗体) を発する軸索と緑の蛍光 (*GFP*) を発する軸索は近傍ではあるが別々の糸球に投射することが判明した。

考察

本研究では YAC トランスジェニックマウスの系を用いて、マウス嗅覚受容体遺伝子 *MOR28* の発現制御とその投射先について解析した。YAC-460 と YAC-200 をトランスジーンとして用いた場合、外来性 *MOR28* の発現が嗅上皮上のゾーン 4 で相互排他的に見られ、さらにその発現細胞は特定の糸球に投射する事が判明した。これらの結果は、YAC-200 の DNA 領域に *MOR28* の正常な発現と投射に必要な制御領域が、一応一通り含まれている事を示している。今回我々は、*lacZ* と *GFP*、2 種類の標識遺伝子を用いて、外来性及び内在性の *MOR28* 遺伝子が相互排他的に発現されることを示した。同様な発現調節は、同じ染色体部位に導入された複数の外来性 *MOR28* 間にも観察された。では、この様な相互排他的発現を保障する制御機構とはどのようなものであろうか。これ迄嗅覚受容体遺伝子の選択的発現を、各 OR 遺伝子に特異的な複数の転写因子の組み合わせで説明しようとする立場もあったが、今回の我々の結果はこれを明確に否定するものである。この trans-acting モデルに従えば、転写因子を一分子と仮定しない限り、同じ制御領域を持つ複数の *MOR28* 遺伝子は同一細胞で共発現されなければならない。今回の研究により、全く同じ構造を持つ non-allelic な OR 遺伝子の間にも、相互排他的発現制御の働くことが明らかとなったが、この様な調節機構は極めて特殊であり、これ迄に抗原受容体遺伝子で報告されているのみである。

今回明らかにされた OR 遺伝子の相互排他的発現は、嗅覚系が進化してくる過程において極めて重要な役割を果たしたと考えられる。嗅覚系は遺伝子重複と変異を繰り返すことで遺伝子プールを拡大してきたと推測されるが、それと同時に軸索投射先である糸球の数も増大しなければならない。重複によって生じた新たな嗅覚受容体遺伝子に、リガンド特異性を変え得る様な変異が生じた場合、この変異に呼応して投射の位置も新たに用意される必要がある。しかし、嗅細胞の軸索投射に嗅覚受容体自身が何らかの形で関わっているという最近の報告を踏まえれば、遺伝子の重複と変異に対応して投射先の数が増加したことも充分説明可能である。但しこの際、新しく重複によって出来た遺伝子が、もとの遺伝子と相互排他的に発現されなければ、遺伝子に対応して生じる投射先の特定という原則に混乱の生じることになる。一方、個々の OR 遺伝子の相互排他的発現が保障されていれば、これら重複によって作り出された遺伝子は独立に変異を重ねることが可能となり、遺伝子のレパートリーと投射先の拡大が平行して行われることになる。