

論文の内容の要旨

論文題目 マウス嗅覚受容体遺伝子 MOR28 クラスターの解析

氏名 吉原 誠一

序

ヒト及びマウスの嗅覚系には、偽遺伝子を含め約千個の嗅覚受容体遺伝子が存在し、これらはクラスターをなしてほぼすべての染色体に見いだされる。個々の嗅神経細胞においては、これら遺伝子群の中から一種類の嗅覚受容体遺伝子が選ばれて mono-allelic に活性化される。また嗅細胞の嗅球への軸索投射に際しては発現している嗅覚受容体の種類に応じて嗅球の特定の位置（糸球）に投射がおこる。私は嗅覚受容体遺伝子の相互排他的発現調節および特定の糸球への軸索投射の関連を遺伝子の側から解明するため、マウス 14 番染色体に存在する嗅覚受容体遺伝子 MOR28 クラスターの解析を行った。さらに、私は、進化の過程で嗅覚受容体遺伝子がどのようにして現在のクラスターを形成したのかを明らかにするため、MOR28 クラスターおよびヒトゲノムにおける嗅覚受容体遺伝子のゲノム解析を行った。

結果

ゲノム解析から MOR28 クラスターには MOR28, 10, 83, 29A, 29B, 30 の 6 つの嗅覚受容体遺伝子が存在していることが明らかになった。この 6 つの遺伝子が嗅上皮上でどのような発現パターンを示すのかを調べるためにこれら 6 つの遺伝子をプローブにして嗅上皮に対して in situ hybridization を行った。その結果 MOR28, 10, 83 遺伝子は嗅上皮のゾーン 4 と呼ばれる領域で MOR29A, 29B, 30 遺伝子は嗅上皮のゾーン 1 でのみ発現が観察された。さらに同じゾーン 4 の領域で発現している互いに相同性のある 3 つの嗅覚受容体 MOR28, 10, 83 遺伝子について double labeled in situ hybridization を行った。その結果 MOR28, 10, 83 遺伝子は同一クラスターに存在し互いに高い相同性を有しているが相互排他的に発現することが明らかになった。

MOR28 クラスターのゲノム構造から嗅覚受容体遺伝子の発現制御領域を推定するために、嗅覚受容体遺伝子の周辺領域に遺伝子同士で相同性のある領域があるかを調べるために PIP 解析を行った。その結果、MOR28 と MOR10 遺伝子はコーディング領域だけでなく周辺領域においても高い相同性を示していた。周辺領域のなか

でも *MOR28* と *MOR10* 遺伝子のコーディング領域下流に存在する長さ 1kb の領域(DCR)は塩基配列レベルで 94%とコーディング領域よりも高い相同性を持っていた。この DCR は *MOR28* と *MOR10* 遺伝子の下流の他に 10 番染色体にもう 1ヶ所存在していることが明らかになった。6 つの嗅覚受容体遺伝子において *MOR28* と *MOR10* 遺伝子以外の組み合わせでは周辺領域において相同性のある領域は特に見つからなかった。

嗅覚受容体遺伝子クラスターにリンクして存在し嗅覚受容体遺伝子の発現制御もしくは嗅細胞の軸索投射に関与する遺伝子が存在するかを解析するために、direct cDNA selection 及び *MOR28* クラスターのゲノム配列を元にした遺伝子予測を行ったが *MOR28* クラスター内には6 つの嗅覚受容体遺伝子以外に遺伝子は見つからなかった。

次に嗅覚受容体遺伝子の発現制御領域の候補として核マトリックスに結合し遺伝子の転写活性の境界となっていると考えられている MAR(matrix attachment region)に注目した。*MOR28* クラスターのゲノム配列から MAR の部位の予測を行ったところ、6つの嗅覚受容体遺伝子それぞれの近傍に MAR の存在が予測された。そこで MAR の嗅覚受容体遺伝子の選択的発現制御における役割を明らかにするために、*MOR10* 遺伝子の近傍に予測された MAR 領域を欠失したコンストラクトを持つトランスジェニックマウスを作製した。解析の結果、MAR 領域を欠失したマウスでは *MOR28,10,83* 遺伝子は野生型と同様にそれぞれ相互排他的に発現していたが、*MOR10* と *MOR83* 遺伝子の発現細胞数が *MOR28* 遺伝子の発現細胞数に比べて低下していた。

MOR28,10,83 遺伝子発現細胞がその軸索を嗅球上のどの糸球に投射するのか、またそれら3つの投射先はお互いどのような位置関係を示すかを調べるためにマウス嗅球切片に対し *MOR28,10,83* 遺伝子をそれぞれプローブにして in situ hybridization を行った。その結果、同一クラスター上にタンデムに並んで存在し、互いに高い相同性を持っている *MOR28,10,83* 遺伝子発現細胞の軸索投射先は互いに近接して存在した。マウス2番染色体上のクラスターに存在する互いに高い相同性を持っている *A16,MOR18* の2つの遺伝子の発現細胞の投射先についても互いに近接していることが明らかになった。

嗅覚受容体遺伝子クラスターの形成機構を進化的に解析するために *MOR28* クラスターとヒトのオルソログである *MOR10* クラスター及びヒトゲノムにおいて互いに似た嗅覚受容体遺伝子 (90%以上の塩基配列の同一性を持つもの) の周辺領域についてゲノム解析を行った。*MOR28* クラスターにおいて *MOR28* と *MOR10* の対と *MOR29A* と *MOR29B* の対はコーディング領域において互いに高い相同性 (90%以上) を持っていた。解析の結果、進化の過程で 28 と 10 遺伝子はヒトとマウスが分岐した後にマウスにおいてのみ遺伝子重複によって生じたものであり、29A と 29B 遺伝子はヒトとマウスの分岐以前に存在していたが、コーディング領域で遺伝子変換が起こり配列の相同性が維持されていることが示唆された。一方ヒトゲノムにおいても高い相同性を持つ遺伝子対は 28 と 10 遺伝子のような遺伝子重複によって生じたと推測されるもの (ただし、ヒトゲノムにおいては同一クラスター内で重複したものと異なる染色体間で重複したと推測されるものの2つの場合が存在した。) と 29A と 29B 遺伝子のような遺伝子変換により配列の相同性が維持されていると推測されるものがそれぞれ複数見つかった。さらにヒトゲノムにおいて遺伝子重複が推測される嗅覚受容体遺伝子の高い相同性を持つ周辺領域の長さを測定したところ、異なる染色体間に存在する場合のほうが同一クラスター内に存在する場合よりも高い相同性を持つ周辺領域が長いことが明らかになった。

考察と展望

MOR28, MOR10, MOR83 遺伝子発現細胞及び *A16,MOR18* 遺伝子発現細胞の投射先の解析から同一クラスター上に存在し、互いに高い相同性を持っている嗅覚受容体遺伝子発現細胞の投射先は互いに近接して存在する傾向にあることが明らかになった。これら互いに相同性がある嗅覚受容体タンパクは似た構造の匂い分子を認識すると推定される。一方、嗅神経細胞の接続先である mitral cell の電気生理実験からは次のことが明らかになっている。介在神経を介した lateral inhibition によって隣り合った mitral cell 同士の似た構造の匂い分子に対する反応応答性の違いが糸球に入力する嗅神経細胞の反応応答性の違いよりも際立っていると考えられている。互いに高い相同性を持って

いる嗅覚受容体遺伝子発現細胞の投射先が近接することで lateral inhibition を介した似た構造の匂い分子の識別を可能にしていると考えられる。また、ヒトゲノムの解析で明らかになった遺伝子変換によってコーディング領域での高い相同性が維持されていると推定された嗅覚受容体遺伝子の対は非常に似た構造の匂い分子を認識し、2つの遺伝子発現細胞の投射先は近接していると推定される。この遺伝子対は非常に似た構造の匂い分子を識別するために進化の過程で遺伝子変換によってコーディング領域での高い相同性が積極的に維持されてきたと考えられる。