

論文の内容の要旨

論文題目：嗅上皮でゾーン特異的に発現する中鎖アシル CoA シンセターゼ、O-MACS、の
単離と解析

氏 名：岡 雄一郎

哺乳類は数十万種類に及ぶ匂い物質を識別できるといわれている。匂い分子は鼻腔奥の嗅上皮に存在する嗅神経細胞で受容される。嗅神経細胞の樹状突起先端には 7 回膜貫通型の嗅覚受容体が発現しており、これが匂い分子を受容すると考えられている。嗅覚受容体をコードする遺伝子はマウスではおよそ 1000 種類に上るといわれ、ほぼ全ての染色体上にクラスターをなして存在している。個々の嗅神経細胞は約 1000 種類の遺伝子の中から、1 種類のみを mono-allelic に発現している。ここで、特定の嗅覚受容体遺伝子は、嗅上皮の 4 つに分けられる亜領域(ゾーン)の内の一つでのみ発現し、ゾーン内ではランダムに散在するといわれている。嗅神経細胞はその軸索を脳の最前部に位置する嗅球に投射し、投射先には糸球という構造体が形成されて 2 次ニューロンとシナプスを作っている。この際、同種の嗅覚受容体を発現する嗅神経細胞は定まった糸球にその軸索を集中させることが知られている。一般に、糸球の嗅球上での位置は、嗅上皮上で細胞体が位置するゾーンと対応す

る領域にある、即ち、嗅上皮から嗅球への投射には zone-to-zone の対応があると言われている。しかしながら、嗅上皮での嗅覚受容体遺伝子のゾーン特異的な発現や、嗅神経細胞の嗅球へのゾーン特異的な投射を規定する分子機構などについてはほとんど解明されていない。本研究では、ゾーンの持つ生物学的意味を明らかにする目的で、嗅上皮でゾーン特異的に発現する遺伝子群を探索した。

嗅上皮でゾーン特異的に発現する遺伝子を単離するため、ラットの嗅上皮の最も背内側の領域(ゾーン 1)と最も腹外側の領域(ゾーン 4)で発現する遺伝子を differential display (DD) 法で比較した。その結果、112 種類の候補遺伝子が得られ、その内訳は、ゾーン 1 で強いものが 37 種類、ゾーン 4 で強いものが 75 種類であった。これらをプローブに用いて、嗅上皮の組織切片に対して *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) を行ったところ、20 種類の遺伝子について領域特異的な発現が確認された。本研究では、これらの遺伝子のうち、ゾーン 1 で特異的に発現する新規遺伝子、*o-macs*、について詳細に解析した。

ラット *o-macs* 遺伝子は、580 アミノ酸からなるタンパク質をコードし、その推定アミノ酸配列はマウスの中鎖アシル CoA シンセターゼ (medium-chain acyl-CoA synthetase, MACS)・ファミリーの MACS1、SA、KS および KS 2 と 56-63%の相同性を示すが、マウスのアセチル CoA シンセターゼ・ファミリーのタンパク質とは 20-30%の低い相同性を示した。これらのタンパク質はすべて、アシル CoA シンセターゼ・ファミリーのタンパク質でよく保存されている AMP 結合モチーフを持っており、*o-macs* 遺伝子のコードするタンパク質はアシル CoA シンセターゼ・ファミリーのなかでも MACS ファミリーに属することが明らかとなった。また、*o-macs* 遺伝子はマウスゲノムでは第 7 番染色体の 7F1 領域にあり、この領域には *o-macs* を含む MACS ファミリーの遺伝子のすべてがタンデムに並んでいることが判明した。これら 5 つの MACS ファミリー遺伝子は、進化の過程で、遺伝子重複によって形成されたものと考えられる。

本研究では次に、*o-macs* 遺伝子の嗅上皮での発現を確認するために、ラットの嗅上皮組

織切片に対する ISH 解析を行った。その結果、*o-macs* 遺伝子の発現はゾーン 1 に限局しており、嗅覚受容体遺伝子とは異なり、嗅神経細胞層のみならず、支持細胞層、基底細胞層や lamina propria にも認められることが判明した。*o-macs* 以外の MACS ファミリーの遺伝子は主として肝臓と腎臓で発現するが、*o-macs* 遺伝子は嗅上皮でのみ特異的に発現しており、他の MACS ファミリー遺伝子の中で、嗅上皮に発現するものはない。

o-macs 遺伝子の胎生期における発現は極めて早い。ラットの胎生 11.5 日目においては、鼻腔の陥入はまだ始まっておらず、嗅上皮はまだ嗅原基として存在するが、*o-macs* 遺伝子の発現はすでにこの時期から認められ、嗅原基のマーカーとして用いた NeuroD 遺伝子の発現と比べると、背内側の領域に限局して発現していた。ラットにおいては嗅覚受容体遺伝子の発現は胎生 14 日目ごろから認められるので、嗅上皮のゾーンの決定は嗅覚受容体遺伝子の発現が始まる以前の、嗅原基の段階ですでに起こっているものと思われる。

O-MACS タンパク質の細胞内での機能を解析する目的で、エピトープタグ付の O-MACS タンパク質を精製し、そのアシル CoA シンセターゼ活性を測定した。その結果、O-MACS タンパク質は炭素鎖長 6 から 12 までの脂肪酸に反応することが示された。次に、O-MACS タンパク質の細胞内局在を調べたところ、O-MACS タンパク質はミトコンドリアに局在することが判明した。O-MACS と反応性を示す脂肪酸をラットに匂い分子として与えると、ゾーン 1 に位置する糸球を活性化することが報告されているので、O-MACS の嗅上皮に匂い分子として取り込まれた脂肪酸のプロセッシングに関与する可能性が考えられる。

o-macs の他に本研究で得られた約 20 種類の興味深い候補遺伝子の中には、OSN の軸索投射に関与し得る細胞接着因子や、OSN の機能を modulate すると考えられる神経ペプチド、また、毒物の代謝や、脂肪酸の代謝に関わる酵素などをコードする遺伝子が含まれている。今回解析した *o-macs* を含め、これらゾーン特異的に発現する遺伝子の解析は、嗅上皮に見られるゾーン構造の生物学的重要性の理解や、発生過程におけるゾーン決定の機構解明につながるものと期待される。