

論文の内容の要旨

論文題目 嗅細胞における嗅覚受容体遺伝子の単一発現機構

氏名 中谷 洋子

ヒトやマウスにおいて嗅覚受容体 (Olfactory receptor; OR) 遺伝子は 1000 種類に及ぶ多重遺伝子系をなしており、数個から数百個の OR 遺伝子を含むクラスターとしてほぼすべての染色体に散在している。OR 遺伝子は嗅上皮に数百万個存在する嗅神経細胞において発現し、各々の嗅細胞においてはただ一種類のみが、mono-allelic に発現している。嗅細胞の嗅球への軸索投射は糸球という構造をターゲットに行われ、約 2000 個ある糸球のうち特定の一対に投射する。従って嗅球上の各糸球は 1 種類の OR に対応しており、嗅上皮で OR 分子によって受容された匂いの化学情報は、嗅球においては活性化された糸球という情報に変換される。個々の匂い分子は複数の種類の OR 分子と異なる親和性で結合するので、匂い情報は嗅球上で、約一千対ある糸球を素子とした発火パターンとして二次元的に展開され、それを脳が識別すると考えられている。従って匂い認識においては、嗅細胞における OR 遺伝子の単一発現と、嗅細胞軸索の OR-instructed な投射がその要となっている。

本研究では OR 遺伝子の単一発現とその調節機構について、YAC トランスジェニックマウスにおける OR 発現系を用いて解析した。まず、同じ構造を持つ 2 つの OR トランスジーンを同一染色体上に並列に挿入し、相互排他的に発現することを確認した（図 1）。この相互排除は maternal / paternal、二つの allele 間の対立形質排除のモデルとして提唱されている allelic inactivation では説明がつかず、これとは別の新たなメカニズムによって、相同遺伝子の相互排除が保証されていると考えられる。

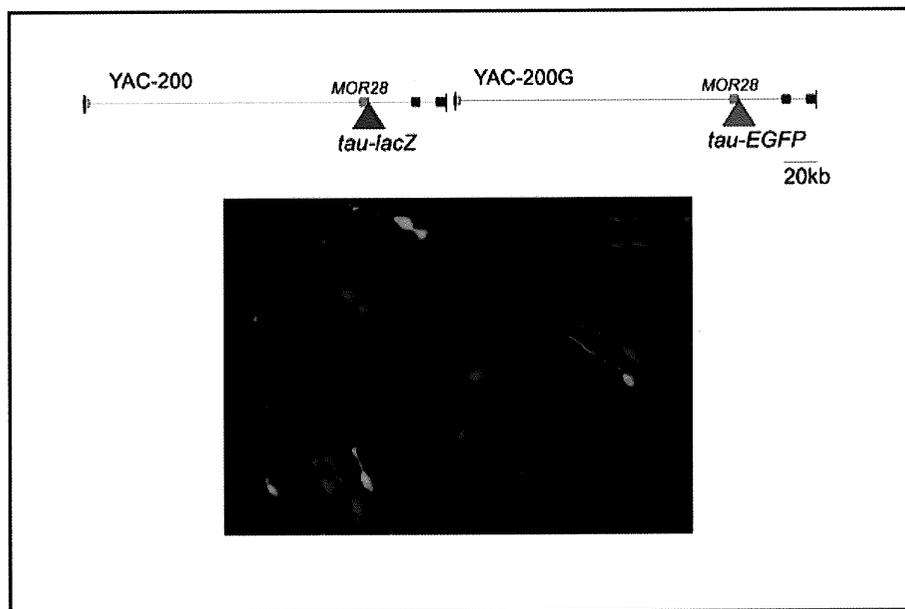


図 1. OR トランスジーン間の相互排他的発現

トランスジェニックマウス line E の嗅上皮における *lacZ* 標識、及び *EGFP* 標識のトランスジーン *MOR28* を検出した。トランスジーンとして導入した各コンストラクトは *MOR28* を *lacZ* (▲) あるいは *EGFP* (▲) で標識されている。トランスジェニックマウス line E は第 4 染色体の同一領域にトランスジーン (YAC-200 ; 5 コピー、YAC-200G ; 1 コピー) が存在する。

嗅上皮切片に対して、*lacZ* 発現細胞は抗 *lacZ* 抗体を用いた免疫染色により赤色に、*EGFP* 発現細胞は *EGFP* の蛍光により緑色に検出された。写真は 2 種の標識マーカーの検出画像を重ね合わせたものである。両トランスジーンを共発現する嗅細胞は黄色に共染色されると予想されるが、現在のところ全く観察されていない。このことから、同一染色体上に並んで存在する同一構造を持つ二つの OR トランスジーンが相互排他的に発現することが示された。

OR 遺伝子の単一発現機構には、一つの遺伝子が選択される活性化過程と、残りの遺伝

子を発現させないための抑制的な調節機構を想定する必要がある。本研究により、発現の為の正の調節には、OR 遺伝子クラスターが一定の頻度で任意に活性化され、活性化されたクラスターにおいて1つの遺伝子が選発現する過程の存在することが示唆されている。

次に、1つの OR 遺伝子が発現された後、他の OR 遺伝子の選択を抑制する負の制御機構を検討するため、OR 遺伝子のコーディング領域を欠失したトランスジーンやフレームシフト変異を持つ OR 偽遺伝子を用いて、これら変異遺伝子が他の OR 遺伝子と共発現するかどうかを検討した (図 2, 3)。その結果、OR タンパク質が OR 遺伝子の新たな選択に対し抑制的な制御機能を担うことが示された。

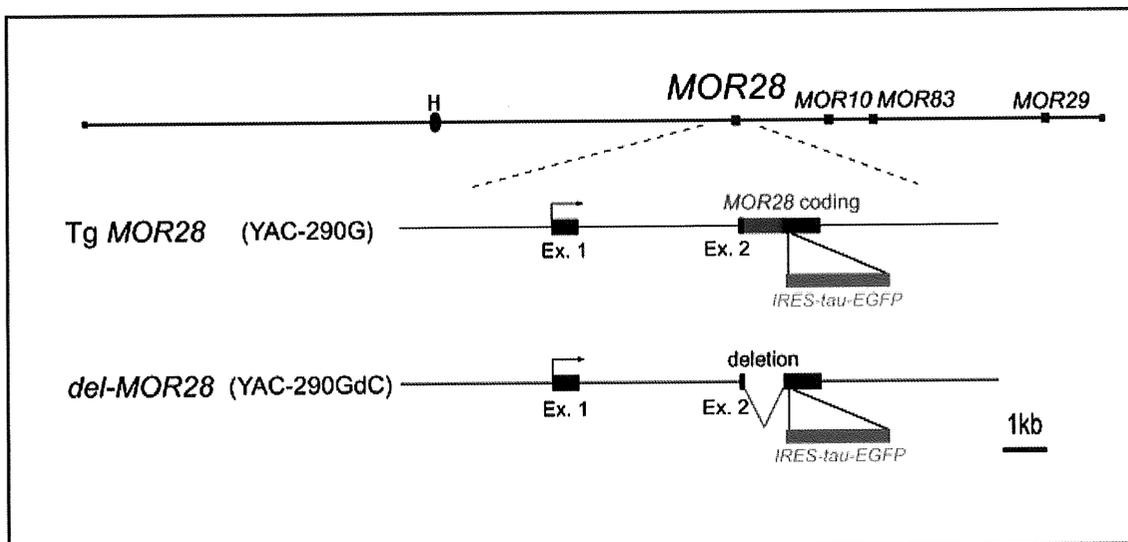


図 2 コーディング領域を欠失した MOR28 (*del-MOR28*) を持つトランスジェニックマウスの作製

del-MOR28 の DNA 構造を示す。YAC-290G コンストラクトは MOR28 をトランスジーンとして発現するために十分な領域を含むことがすでに確かめられている。YAC-290GdC コンストラクトは YAC-290G コンストラクトから MOR28 遺伝子のコーディング領域である exon 2 を欠失させて作製した。MOR28 は IRES-tau-EGFP によって標識されているため、*del-MOR28* 調節領域を活性化した嗅細胞においては標識タンパク質 EGFP が発現されるが、OR タンパク質は発現されない。

YAC-290GdC コンストラクトを持つトランスジェニックマウスにおいて *del-MOR28* 発現細胞の嗅上皮における分布 (細胞密度、局在) を調べた結果、内在性 MOR28 および野生型の外来性 MOR28 と同様であることが確認された。

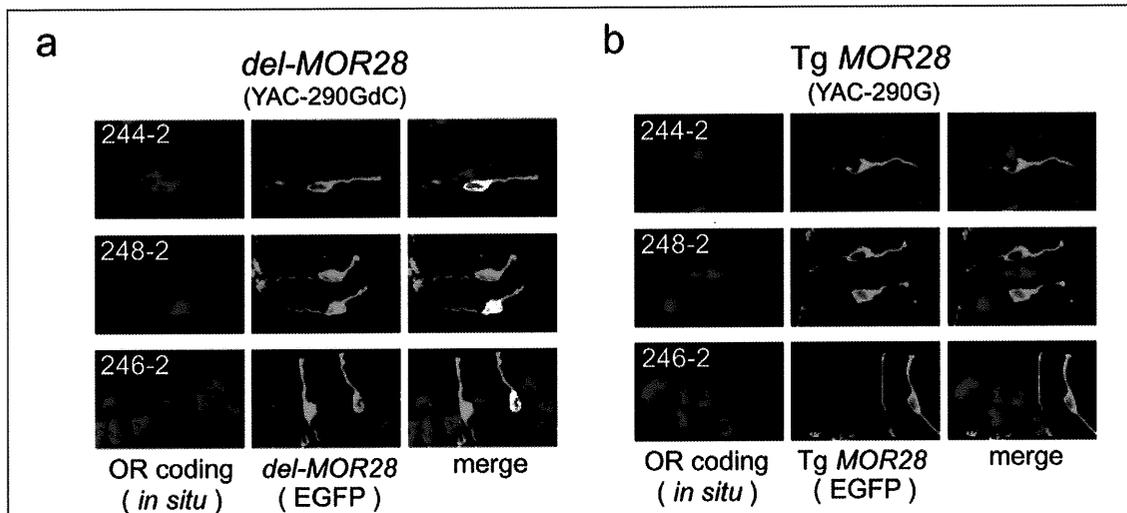


図 3 *del-MOR28* トランスジーンは種々の内在性の OR 遺伝子と共発現した

(a) YAC-290GdC マウスの嗅上皮切片において種々の内在性 OR 遺伝子の発現を *in situ* hybridization 法によって検出した (赤い嗅細胞)。さらに同一切片上に於ける *del-MOR28* の発現を抗 EGFP 抗体を用いた免疫染色によって検出した (緑の嗅細胞)。2 枚の写真の重ね合わせ (merge) によって黄色く染色された嗅細胞は共発現細胞を表す。3 種の内在性 OR 遺伝子(244-2, 248-2, 及び 246-2)の例を示した。(b)平行して YAC-290G マウスの嗅上皮切片における野生型 Tg *MOR28* と内在性 OR 遺伝子との共発現を調べた。現時点において解析したどのプローブにおいても共発現細胞は見つかっていない。

del-MOR28 発現細胞においては他の種類の OR 遺伝子との共発現が観察された。このことは OR 遺伝子産物がさらなる OR 遺伝子の発現を抑制する機能を持つことを意味している。さらに、OR 遺伝子産物のうち転写産物、あるいは翻訳産物のいずれがその機能を担うのかを検証した。翻訳が途中で止まることが想定される OR 偽遺伝子発現細胞においては他の OR 遺伝子との共発現がおこることが観察された。以上より、OR 蛋白質がさらなる OR 遺伝子の発現を抑制する negative feedback 機能を持つことが示唆された。

以上の結果をふまえ、OR 遺伝子の単一発現の機構として、stochastic な OR 遺伝子クラスターの活性化とクラスター内における 1 つの遺伝子の選択過程、及びその結果産生される OR タンパク質による選択抑制過程からなる 2 段階調節モデルを提唱する。