公募研究：2003～2004年度

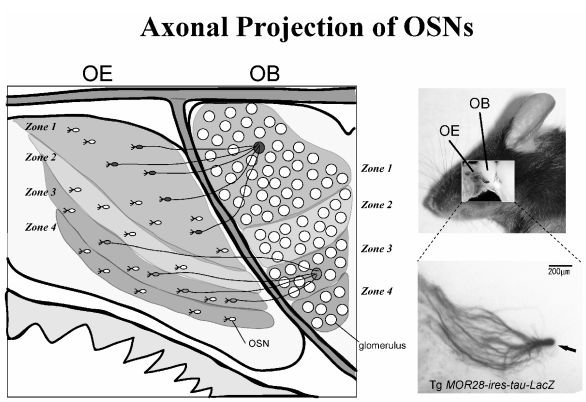
マウス嗅覚受容体多重遺伝子の転写調節領域の網羅的解析と単一発現の制御機構の解明

●西住　裕文　◆名川　文清　◆坪井　昭夫

東京大学大学院理学系研究科

〈研究の目的と進め方〉

我々哺乳類は、数十万種以上の匂いを識別できるといわれている。この多様な識別に重要な機能を果たしているのが、千種類にも及ぶ嗅覚受容体(odorant receptor: OR)多重遺伝子である。匂い分子の受容を理解するためには、個々の嗅細胞におけるOR多重遺伝子の単一発現の仕組みと、発現するORの種類による嗅細胞の嗅球への軸索投射の分子機構の解明が不可欠である。本研究では前者の、OR多重遺伝子の単一発現の仕組みに関して取り組む。まず約千種のOR遺伝子の転写開始点を同定し、ゲノム情報よりプロモーター領域を予測する。多数のプロモーター領域の配列を比較することにより、OR遺伝子の単一発現を制御する配列を抽出出来ると考えられる。また、見出された重要な配列を欠失したり変異を導入することにより、複数のOR遺伝子が一つの嗅細胞で発現するようになるか、トランスジェニックマウスの系を用いて検証していく。



〈研究開始時の研究計画〉

1）OR遺伝子の嗅上皮上での発現パターンの網羅的解析

従来の研究から、嗅上皮上にはOR遺伝子の発現様式によって規定される4つのゾーンが存在し、その4つのゾーンに対応して、嗅球上にも4つのゾーンがあると一般的に受け入れられている。しかしこの結果は、数十種類のOR遺伝子の発現様式を元に下に過ぎない。マウスゲノム解読が終了し、千種類以上のマウスOR遺伝子の全貌が明らかになった今、改めて嗅上皮上でのOR遺伝子の発現様式を解析する必要があると考えた。そこでまず、塩基配列の相同性をもとに分類された約400のサブファミリーから、少なくとも一つのOR遺伝子を選び、嗅上皮上での発現様式を網羅的に解析する。

2）OR多重遺伝子プロモーターの網羅的な同定

ゲノム配列より、ORをコードする配列は決定されているが、5’-UTRを含め転写開始点まで判明しているOR遺伝子はほとんどない。東大医科研の菅野らと協力し、mRNAの5’末端に付加されるキャップ構造を利用した全長のcDNAを得る手法を用いて、マウスOR遺伝子の転写開始点を網羅的に同定する。その結果、千種余りのOR遺伝子のプロモーター領域が同定されることが期待される。千種余りのOR遺伝子のプロモーター領域の配列を、OR遺伝子の嗅上皮上での発現様式を含め様々な角度から比較することにより、OR遺伝子の発現制御に必要な配列を見出す。

〈研究期間の成果〉

1）クラスI OR遺伝子の発現と軸索投射

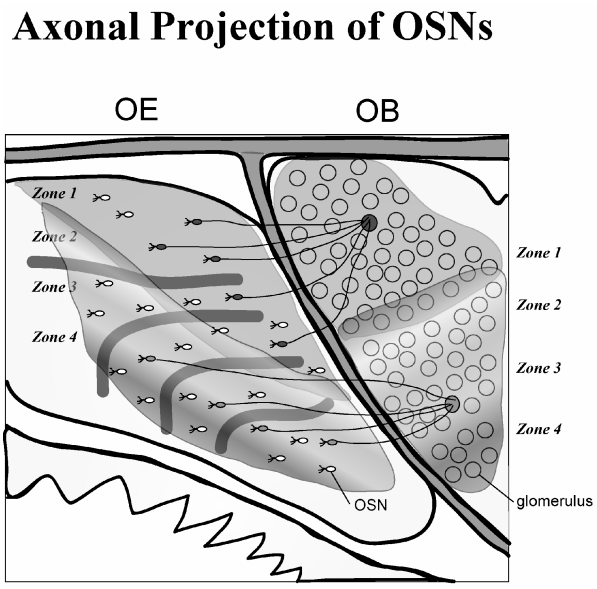
ORは分子系統樹において二つのクラスに分類される。一つは水溶性のリガンドを受容する魚類のORと相同性を示すクラスIで、もう一つは、陸生動物に特有なクラスIIである。クラスI ORを発現する嗅細胞の嗅上皮における分布及び嗅球への軸索投射について解析した。その結果、クラスI ORを発現する嗅細胞は、全て嗅上皮の最も背内側部(ゾーン1)に一様に、しかし限局して分布し、各々のクラスI ORに関して発現分布に相違のないことが判明した。これは下に述べるクラスII OR遺伝子発現細胞の分布様式(ゾーン１～４の間で、ある程度の幅を持って互いに重なり合いながら発現している)とは対照的であり、嗅上皮ゾーン1における嗅細胞の位置情報や、ORの相違というidentityが投射にどう反映されているのか興味深い。一方、クラスI ORを発現する嗅細胞の投射先は嗅球の外側・前部に集中し、Hana3A細胞株を用いたリガンド検索から、多くのクラスI ORが脂肪族カルボン酸に反応することも判明した。以上の結果からクラスI ORは、機能的にも進化的にも、また投射先の観点から見ても、クラスII ORとは一線を画した受容体システムである事が示唆された。

2）クラスII OR遺伝子の発現と軸索投射

マウス嗅上皮由来の全長cDNAライブラリーをもとに、5’-race法により約二百種のOR遺伝子の5’-UTR決定し、転写開始点を同定した。その結果、複数の転写開始点を持つものや、alternative splicingも多数観察され、複雑な発現制御機構があると予想される。このOR特異的な5’-UTRのDNA配列を利用し、以下の成果をあげることが出来た。

従来の研究から、ORの発現様式によって規定される嗅上皮上の4つのゾーンに対応して、嗅球上にも4つのゾーンがあると一般的に受け入れられてきた。我々は、ゾーン4特異的な数多くのOR遺伝子の嗅上皮上での発現領域についてin situ hybridization法による体系的な解析を行った。その結果、これらOR遺伝子はこれまで言われてきたようにゾーン内全域に分散して発現しているのではなく、特定の領域に偏りをもって発現していることが明らかとなった。次に各ORの嗅上皮上での発現の偏りが、嗅球上のOSNの軸索の投射先にどう連関しているかを解析する為、個々の糸球をレーザーマイクロダイセクション法により切り出し、mRNAを抽出して逆転写させた後、OR特異的なプライマー(5’-UTR領域内)を用いたPCRにより、その糸球がどのOR遺伝子のターゲットとなっているかを検討した。因みに、ORのmRNAは微量ながら軸索

を通して糸球にまで輸送されるので、嗅球上の各糸球に存在するOR mRNAを同定することによって、各OR遺伝子の投射先を特定することができる。今回の解析により、ゾーン4内の嗅細胞は嗅上皮上での限局したOR遺伝子の発現領域に対応して、その軸索を嗅球上のゾーン4内の限られた領域に投射していることが明らかとなり、嗅細胞の軸索投射に関してこれ迄考えられていたゾーン対ゾーンの対応について、一部再検討する必要のあることが示唆された。



〈国内外での成果の位置づけ〉

網羅的にOR遺伝子の嗅上皮上での発現様式を解析し得た結果は、広く受け入れられていた嗅上皮の 4 つのゾーンという定義に、再考を促す重要なものであった。また、OR遺伝子プロモーターを網羅的に解析した本研究に類似するものは、国内では見かけない。外国のグループからは、出揃ったヒト、マウス、ラットなどのゲノム情報を比較し、OR遺伝子の進化等に関する報告や、特定のOR遺伝子クラスター内で、転写調節領域を解析している報告がある。しかし我々の研究は、遺伝子情報解析のみならず、OR遺伝子の単一発現制御や嗅神経回路形成まで加味し、情報をフル活用しようとしている点で他と一線を画している。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

げっ歯類のOR遺伝子は千種以上存在し、それらの転写調節領域をすべて網羅的に解析することは容易ではなかった。これまでに二百種類以上のOR遺伝子の5’-UTRを決定したが、複数の転写開始点を持つものや、alternative splicingも多数観察され、複雑な発現制御機構があることが示唆された。また、マウスの系統間でpolymorphismも多数存在し、系統ごとにpseudo geneであるOR遺伝子が異なることも判ってきた。このように情報が多く、本研究期間内でデータを十分整理し切れなかった。

〈今後の課題〉

既に二百種類以上のOR遺伝子の転写開始点を決定した。これまでに得たOR遺伝子のプロモーター配列を比較検討した結果、嗅細胞特異的な遺伝子の発現を制御する転写因子O/Eの結合配列および嗅細胞の発生・分化に必須のホメオボックス転写因子Lhx2の結合配列をほとんどすべてのプロモーター配列内に見出した。今後は嗅上皮上での発現様式を指標の一つとしてプロモーター配列を分類し比較することによって、似た発現様式を示すOR遺伝子のプロモーター配列間に共通するDNA配列(転写因子結合配列）を見出す必要がある。更に、見出した重要な配列に関しては、欠失や変異の導入を行い、トランスジェニックマウスの系を用いてOR遺伝子の発現に与える影響に関して解析を行う必要もある。また分子レベルでは、見出した重要な配列に既知の転写因子が結合する場合には、その転写因子の嗅上皮での発現様式をin situ hybridization法により解析を行う。一方、結合可能な転写因子が未知の場合には、酵母one-hybrid法を用いて、その配列に結合する転写調節因子を探索する。

こうした研究を通じ、嗅細胞が如何にして嗅上皮上での自分の位置情報を受け取り、それに従って限られたOR遺伝子の中から単一のOR遺伝子を発現して、identityを確立しているかという重要な命題を明らかに出来ると期待される。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

１）論文

1. 601300256
Tsuboi, A., Miyazaki, T., Imai, T., Sakano, H. Olfactory sensory neurons expressing class I odorant receptors converge their axons on an antero-dorsal domain of the olfactory bulb in the mouse. Eur. J. Neurosci. (2006) in press

2. 0409091624
Nagawa, F., Hirose, S., Nishizumi, H., Nishihara, T., and Sakano, H. Joining mutants of RAG1 and RAG2 that demonstrate impaired interactions with the coding-end DNA. J. Biol. Chem. 279, 38360-38368 (2004).

3. 0402031639
Nishihara, T., Nagawa, F., Nishizumi, H., Kodama, M., Hirose, S., Hayashi, R., and Sakano, H. In vitro processing of the 3'-overhanging DNA in the post-cleavage complex involved in V(D)J joining. Mol. Cell Biol. 24, 3692-3702 (2004).

4. 0401191721
Hirose S, Nishizumi H, Sakano H. Pub, a novel PU.1 binding protein, regulates the transcriptional activity of PU.1. Biochem Biophys Res Commun. 2003, 311, 351-360.