

## マウス嗅覚システム構築に関わるゲノム情報の抽出

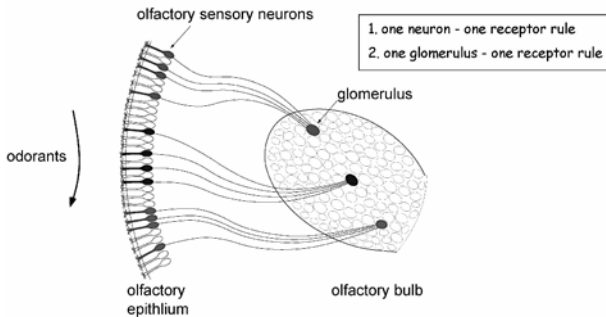
●西住 裕文 ◆坪井 昭夫  
 東京大学大学院理学系研究科

### <研究の目的と進め方>

ゲノムから様々な手段によって必要な情報を抽出し、システムを構築する生命には驚きを隠せない。本研究ではマウスの嗅覚系をモデルとして、嗅覚システムの構築に必要なゲノム情報の抽出に関して解析を行なっていく。

マウスの嗅覚システム構築には二つの原理、①個々の嗅細胞は約千種類に及ぶ嗅覚受容体 (odorant receptor: OR) 遺伝子群の中から一種類の OR 遺伝子を選択的に発現し、②発現する OR の種類に応じて、嗅球表面上に並ぶ約二千個の糸球と呼ばれる構造体のうち特定の糸球に対して軸索を投射することが知られている。

### Conversion of olfactory signals



この仕組みにより匂い分子の情報は、嗅上皮において嗅細胞に発現する OR によって受容され、嗅覚情報処理の一次投射先である嗅球において、活性化された糸球の位置という二次情報に変換されるのである。そこで我々は、嗅覚システムの構築に必要な遺伝情報をゲノムから抽出する機構を理解するために、1) OR 遺伝子の単一発現の分子メカニズムと、2) 特定の OR を発現する嗅神経細胞において発現する様々な遺伝子の発現プロファイルを解析し、細胞個性を明らかにしていく。マウス嗅覚系において、個々の嗅細胞が千種類以上存在する OR 遺伝子から一種類のみを、相互排他的かつ mono-allelic に発現する機構には、LCR を介した多段階的な発現制御や、染色体を跨いだ発現制御モデルなどが報告されており、これからもまだ新たな遺伝情報デコードのシステムが見出される可能性がある。また、発現する OR の種類に応じて嗅細胞で発現する一連の遺伝子が決まることに関しては、OR 分子のどのような違いが細胞内へのシグナルの違いとなって種々の遺伝子発現を制御しているのかほとんど未知であり、この分野からも新しい遺伝情報抽出の原理が発見される事が期待される。

### <研究開始時の研究計画>

初年度は、OR 遺伝子の単一発現を保障する分子機構を解明するために、正及び負の発現調節機構について研究を進める。

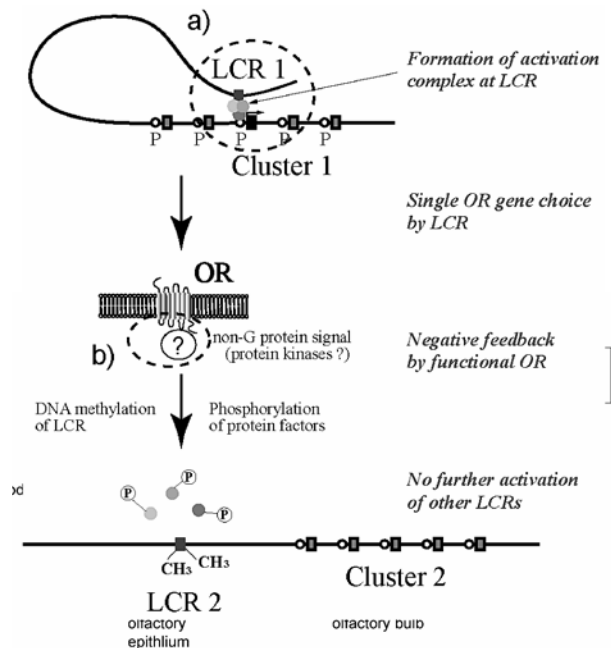
#### a) LCR に形成される転写活性化複合体の解析 (正の発現制御)

マウス H 領域内シスエレメントの配列に結合する DNA 結合タンパク質の単離を目指す。会合するタンパク質因子を酵母 one hybrid 法や免疫共沈法を用いて同定し、LCR に形成される転写

活性化複合体の構成分子を明らかにする。更に 3C (chromosome conformation capture) 解析によって LCR 複合体と相互作用するプロモーター部位の同定を試みる。これまでの実験から、ホメオドメイン転写因子群が、コア H 領域に結合し得ることを見出している。

#### b) OR 遺伝子の単一発現機構 (負の発現制御)

当研究室では最近、OR 分子の変異体で G タンパクと会合しなくなった DRY モチーフ変異を持つ OR でも、OR の単一発現を維持出来る事が示され (*Science*, 314, 657-661, 2006)、これ迄想定されていた、G タンパク質 → ACIII → cAMP とは異なるシグナル経路の関与が示唆される。OR 分子など 7 回膜貫通型受容体から入力されるシグナルで G タンパク質を介するもの以外に、β-Arrestin を介したシグナルが広く知られている。そこでトランスジェニックマウスを用いて、嗅細胞に dominant negative 型の β-Arrestin を発現させ、β-Arrestin を介したシグナル経路をブロックした場合に、OR 遺伝子の単一発現が維持出来なくなるかどうかについて検討を始めている。



### <研究期間の成果>

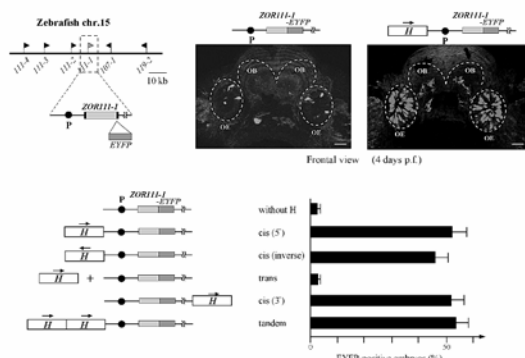
2005年度

マウス OR 遺伝子の、個々の嗅神経細胞での単一発現制御機構を解明するために、数百種類の OR 遺伝子のプロモーター配列を網羅的に決定した。さらに、個々の OR 遺伝子の嗅上皮上での発現パターンを指標にプロモーター配列を比較し、領域特異的な発現制御を担うと考えられる DNA 配列を見出した。更には、嗅上皮上での OR 遺伝子の発現の偏りが、嗅神経細胞の嗅球への背腹

軸方向の軸索投射先決定に重要なファクターであることを明らかにした。また、トランスジェニックマウスを用いた発現系により、*MOR28* 遺伝子クラスターに OR 遺伝子の発現に必要なヒトとマウスの間で配列が保存されたホモロジー (*H*) 領域を見出した。この *H* 領域は、そこに形成されると思われる chromatin remodeling 複合体が各 OR 遺伝子のプロモーターと相互作用することにより、OR 遺伝子の選択と活性化の制御に関与していると考えられる。しかし、こうして得られてきた OR 遺伝子の発現を制御し得る複数の DNA 領域が、実際に生体内で機能しているか検証するには、多数のトランスジェニックマウスを作製する必要があり、時間・労力・費用の面から実施は容易でなかった。

そこで、このゼブラフィッシュのトランスジェニックコンストラクトにマウス *MOR28* クラスターの *H* 領域を付加し、その効果を調べたところ、GFP を発現する魚の個体数および嗅細胞数が著しく増加した。

### The *H* region enhances OR gene expression in zebrafish.



一連の解析の結果、1) 付加する *H* 領域の OR プロモーターに対する相対的方向は GFP の発現頻度の上昇に影響を与えないが、2) *H* 領域をタンデムに繋いでコピー数を増やすと GFP の発現頻度はさらに上昇すること、3) 当初 2 kb とされた *H* 領域は様々な欠失変異の解析の結果、最小 124 bp でも機能することなどが示された。ここで用いたゼブラフィッシュの発現系は、*H* 領域に含まれるシス配列の特定、更にはそれら変異体の解析に極めて効果的である。今回得られた結果は、マウスの *H* 領域がゼブラフィッシュの OR プロモーターにも作用することを示すと共に、ゼブラフィッシュの OR 遺伝子系にも同様のシス領域とそれを用いた制御機構のあることを示唆している。

### 2008～2009年度

#### a) マウス *H* 領域内シスエレメントの配列に結合する DNA 結合タンパク質の単離

マウス *H* 領域は 2.1 kb あるが、我々の研究から、エンハンサー活性を示すにはコアの 124 bp で十分である事が示されている (PNAS, 104, 20067-20072, 2007)。そこでこのコア *H* 配列に会合する DNA 結合因子を単離するために、酵母 one hybrid 法を用いた。嗅上皮由来の cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、ホメオドメイン転写因子である *Lhx2*、*Barx1*、*Dlx3*、*Dlx5*、*Emx2* が単離された。これらの因子は、異なった結合強度で、コア *H* 配列内に存在する 2 箇所のホメオドメイン結合配列に会合する事が、コア *H* 配列への変異導入実験から明らかとなった。*Lhx2* については、嗅細胞の分化のみならず、OR 遺伝子の発現に重要な転写因子である事がすでに報告されている。今後は、それぞれの転写因子の欠損マウス等を用いて、OR 遺伝子の発現が影響を受けるかを調べる。

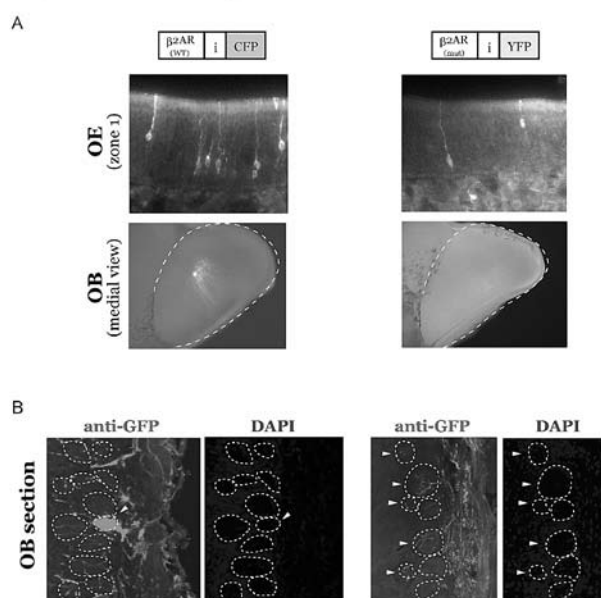
#### b) OR 遺伝子の負の発現制御の実体解明

一旦機能的な OR タンパク質が発現すると、負のフィードバックシグナルにより、他の OR 遺伝子の発現が抑えられる機構が存在すると考えられている。負のフィードバックシグナルが  $\beta$ -Arrestin を介したものと想定し、 $\beta$ -Arrestin シグナルを抑えた場合に、OR 遺伝子の発現に与える影響を解析した。

まず、特定の OR 遺伝子 (*r17*) を発現する嗅細胞でのみ、dominant negative 型の  $\beta$ -Arrestin が発現するようなトランスジェニックマウスを作製した。dominant negative 型の  $\beta$ -Arrestin が  $\beta$ -Arrestin シグナルを抑制出来た場合には、トランスジェニック OR 遺伝子である *r17* 以外に内在性の OR 遺伝子も同時に発現してくる可能性が考えられた。しかし実際には、dominant negative 型の  $\beta$ -Arrestin を発現させた嗅細胞においても、OR 遺伝子の単一発現は守られており、*r17* 遺伝子以外の OR 遺伝子は発現していなかった。OR 遺伝子のプロモーターを用いた系では、発現時期が遅い、あるいは発現量が不十分という理由で、OR 分子からの負のフィードバックシグナルを十分制御出来なかったと予想される。

そこで受容体そのものに変異を導入して、 $\beta$ -Arrestin シグナルを抑制する方法に取り掛かった。OR 分子を介したシグナルに関しては、G タンパク質と共役する部位以外は殆ど解析されておらず、どの領域を介して  $\beta$ -Arrestin シグナルが発せられるかわからない。そこで、7 回膜貫通型タンパク質として OR の機能を代替出来、しかも様々な変異導入の解析から、 $\beta$ -Arrestin シグナルを抑制できる変異体も多数同定されている、 $\beta$  2-アドレナリン受容体 ( $\beta$  2AR) を利用した。つまり、OR 遺伝子のプロモーターの制御下で、野生型  $\beta$  2AR、あるいは  $\beta$ -Arrestin シグナルのみ抑制される変異型  $\beta$  2AR を発現するトランスジェニックマウスを作製した。その結果、野生型  $\beta$  2AR を発現させた場合には、OR 分子と同様に振る舞い、内在性の OR 遺伝子は全く共発現していない。一方、変異型  $\beta$  2AR を発現させた場合には、様々な内在性の OR 遺伝子が共発現し、嗅細胞の軸索投射も乱れていた。

### $\beta$ -Arrestin signal is involved in negative feedback regulation for OR genes choice



今後先ず、変異型  $\beta$  2AR が嗅細胞の膜上に正しく提示され、 $\beta$ -Arrestin シグナル以外のシグナル系に異常がないかなどを確かめておく必要がある。また、現在  $\beta$ -Arrestin1/2 の二重欠損マウスを作成している所であるが、実際に  $\beta$ -Arrestin 分子が OR 遺伝子の負の発現制御に関与しているかも確かめる必要がある。

最終的には、 $\beta$ -Arrestin を介したシグナルが、どの様にして選ばれなかった OR 遺伝子の発現を抑制しているかについても、DNA のメチル化修飾、転写活性化因子の修飾による活性制御といった観点の他、 $\beta$ -Arrestin 自身が核に移行して、直接 OR 遺伝子の発現を抑制している可能性について検討して行く予定である。

#### <国内外での成果の位置づけ>

我々のグループは、OR 遺伝子の一つ選択して発現させる正の制御機構として、マウス *H* 領域という LCR を見出し、クラスターレベルでの発現制御機構を提唱した。更には、OR 遺伝子をコードする配列の欠損、あるいはゲノム中に存在する OR 偽遺伝子を発現した嗅細胞では、新たに他の OR 遺伝子を選び直す事を観察し、機能的な OR 分子の発現が他の OR 遺伝子の発現抑制に必要であることを世界に先駆けて報告してきた。

国内では、理研の吉原らがゼブラフィッシュを用いて、クラスターレベルでの OR 遺伝子発現制御があることを示す報告をしている他に、類似する研究は見当たらない。

一方国外では、OR 遺伝子の発現が stochastic に選ばれるというモデル、発現する OR 遺伝子がスイッチするというモデル、マウス *H* 領域が interchromosomal に相互作用して、他の染色体上の OR 遺伝子の発現をも制御するというモデルなどが、複数のグループから次々に提唱され、活発に議論され続けている。直近では、OR をコードする DNA 配列が OR 遺伝子の単一発現に必要であるとする Belluscio らの報告 (*Cell*, 131, 1009-1017, 2007) や、tet-ON システムを用いて殆どの嗅細胞で単一の OR 遺伝子が発現するマウスを作出し、匂い情報処理異常による行動解析などを行なった Axel らの報告 (*Neuron*, 60, 1068-1081, 2008) などが相次いでおり、OR 遺伝子の発現制御機構の謎はなおも多くの研究者の興味を引き付けており、熾烈な競争が予想される。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

まずマウスのコア *H* 配列に結合する事が判明した転写因子群が、実際に OR 遺伝子の発現制御に関与するかを解析するには、それぞれの転写因子のノックアウトマウスを作製し、嗅細胞で千種類の OR 遺伝子の発現がどうなるか解析するしかない。しかし今回同定した転写因子の中で現存する null ノックアウトマウスの多くは、胎生致死性であったり、嗅細胞の分化を早い段階で停止させてしまい、OR 遺伝子の発現を観察出来ないことが多い。適切な分化段階の嗅細胞でのみ欠損させるなどの工夫をしないと、転写因子群が OR 遺伝子の発現制御に関与するか結論付けるのが難しいと考えられる。

また 2008 年度研究計画にあげていた様に、3C 解析によって LCR 複合体と相互作用するプロモーター部位の同定も試みた。しかし嗅上皮組織より、必要十分な数の均一な嗅細胞を精製することが出来ず、現時点では明瞭な結果を得られていない。そのため FACS ソートするなどの手段によって、効率よく嗅細胞を分取する方法を検討中である。

次に負のフィードバックシグナルとしての、 $\beta$ -Arrestin シグナルについてであるが、最初にとった dominant negative 型の  $\beta$ -Arrestin を発現させる方法は、発現させるタイミングが遅い、あるいは発現量が不十分などの理由から、 $\beta$ -Arrestin シグナルを十分抑える事が出来なかったと考えている。OR 遺伝子の発現を解析するために有用な嗅細胞株は存在しないので、各モデルに対してそれぞれ遺伝子組み換えマウスを作製し、生の嗅細胞での OR 遺伝子の発現を解析してからでないと、モデルが正しいかどうかを検証出来ず、非常に時間がかかり苦勞している。対応策と

して取った  $\beta$  2- アドレナリン受容体を用いる方法は、先の問題点をクリア出来る良いアイデアであり、負のフィードバックシグナルとしての、 $\beta$ -Arrestin シグナルについて検証出来ると期待される。

#### <今後の課題、展望>

OR 遺伝子の発現を活性化する転写因子群まで辿り着いたら、逆にどの様な方法で、その活性化が抑えられるのかを解析していきたい。つまり、OR 分子を介した負のフィードバックシグナルが、最終的に OR 遺伝子の転写活性化複合体を修飾したり、転写因子が結合する DNA 配列を修飾して、さらなる OR 遺伝子の発現を抑える可能性について探る必要がある。

一方、負のフィードバックシグナルとしての  $\beta$ -Arrestin シグナルについては、先ず変異型  $\beta$ -アドレナリン受容体が嗅神経細胞の膜上に正しく提示され、 $\beta$ -Arrestin シグナル以外のシグナル系に異常がないかなど、確認実験が必要である。最終的には、嗅細胞特異的に  $\beta$ -Arrestin をノックアウトした場合に、嗅細胞で次から次に色々な種類の OR 遺伝子が発現するか調べていく必要がある。

#### <研究期間の全成果公表リスト>

##### 1) 論文

1.0601300256

Tsuboi, A., Miyazaki, T., Imai, T., and 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.* 23, 1436-1444 (2006).

2.0912040192

Nishizumi, H., Kumasaka, K., Inoue, N., Nakashima, A., and Sakano, H.: Deletion of the core-*H* region in mice abolishes the expression of three proximal odorant receptor genes in *cis*. *Proc. Natl. Acad. USA.* 104, 20067-20072 (2007).

##### 3.

Kishishita, N., Matsuno, T., Takahashi, Y., Takaba, H., Nishizumi, H., and Nagawa, F.: Regulation of antigen receptor gene assembly in hagfish. *EMBO Report* (in press).

##### 4.

Takahashi, H., Yoshihara, S., Nishizumi, H., and Tsuboi, A.: Neuropilin-2 is required for the proper targeting of ventral glomeruli in the mouse olfactory bulb. *Molecular and Cellular Neuroscience* (in press).

##### 2) 学会発表

1. Nishizumi, H., Kumasaka, K., and Sakano, H., 「A Locus Control Region *H* for the Mouse Odorant Receptor Genes Acts in *cis*, and not in *trans*.」、Neuro2007、2007年9月11日、Yokohama

2. 西住裕文, 中山博文, 海老原章記, 坂野仁, 「Odorant receptor gene choice in the mouse olfactory system」、日本神経科学会、2008年7月9日、東京

3. 西住裕文, 坂野仁, 「マウス嗅覚受容体遺伝子の単一発現制御」、日本分子生物学会、2009年12月10日、横浜