

## 研究課題別評価

### 1. 研究課題名 嗅覚神経回路の形成と再生の分子基盤

### 2. 研究者氏名 坪井昭夫

### 3. 研究の狙い：

私は、神経回路がどの様にして形成され維持されるのか、また神経回路が何らかの原因で破壊された時、どの様にして再構築されるのかを明らかにすることを目的とし、嗅覚系をモデルに研究を行っている。高等動物の嗅覚系では、全遺伝子の約3%を占める一千種類に及ぶ嗅覚受容体遺伝子により、数十万種類の匂い分子が識別されている。一般に、匂い分子はその官能基を介して複数種類の嗅覚受容体と異なる親和性で結合し、それに伴い嗅球において、それら受容体に対応する糸球が、結合の度合いに応じて異なる強さで発火する。従って、個々の匂い分子は、嗅球における糸球の空間的な発火パターンの微妙な相違として識別されると考えられている。このような嗅球におけるトポグラフィックな糸球マップ(匂い地図)の形成は、個々の嗅細胞が嗅覚受容体遺伝子群の中から一種類のみを選択的に発現する、同じ種類の受容体を発現する嗅細胞が嗅球上の特定の糸球に対して位置特異的に軸索投射すると云う二つの基本ルールによって支えられている。また、ヒトやマウスの嗅細胞は神経細胞の中でも、生涯にわたって再生するというユニークな特性を備えている。再生の際新たに生じる嗅細胞は、相互排他的に嗅覚受容体遺伝子を発現し、その軸索を特定の糸球に投射し、元通りに神経回路(匂い地図)が再構築される。本研究では、嗅球における糸球マップ(嗅覚受容体と糸球の対応)を分子生物学的に解析することにより、匂い地図の構築原理の解明を、延いては、嗅覚神経回路の形成と再生に関するメカニズムの解明を目指した。

### 4. 研究結果：

嗅覚受容体遺伝子は、マウスにおいて約1500種類の多重遺伝子系を形成し、殆どの染色体上に約40個のクラスターをなして存在する。本研究では先ず、マウス嗅覚受容体遺伝子MOR28クラスターを含めた複数のクラスターに関して、受容体遺伝子を発現する嗅細胞の投射先を解析した。その結果、'同一クラスター上に隣接して存在し、相同性の高い嗅覚受容体遺伝子ファミリーを発現する嗅細胞は、嗅上皮において同一ゾーンに局在し、嗅球において局所的な糸球ドメインに軸索投射する'ことが示唆された。その一例を示すと、私共のマウスゲノム解析からMOR28遺伝子クラスターは、6つのメンバー(MOR28-10-83-29A-29B-30)から構成され、アミノ酸配列の相同性から、これら受容体遺伝子群は二つの異なるファミリー、MOR28, 10, 83とMOR29A, 29B, 30に分類され、各々のファミリーは嗅上皮において異なるゾーン4とゾーン1で発現していることが明らかになった。更に、嗅球切片に関するin situ hybridization解析より、MOR28, 10, 83の発現細胞は腹側後方の糸球ドメインへ、MOR29A, 29B, 30の発現細胞は背側前方の糸球ドメインへ、局所的に軸索投射していることが判明した。この観察は、嗅球の光学的イメージング解析より得られた'特定の官能基を有する匂い分子は、嗅球表面において局所的なドメイン内の糸球を興奮させる'という知見を勘案すると、'類似した匂い分子はその官能基を介して、相同性の高い嗅覚受容体群により受容され、嗅球上の特定のドメインに属する糸球を興奮させる'と考えられる。

上述した様に、MOR28, 10, 83 (ゾーン4レセプター)は同一ファミリーに属し、これら発現細胞は嗅球上の腹側後方の近接した系球に投射しているが、本研究では更に、MOR28 系球近傍にどのような種類の嗅覚受容体を発現する嗅細胞が軸索投射しているのかをlaser micro-dissection 法とin situ hybridization 法を用いて検討した。これ迄の解析から、MOR28, 10, 83 遺伝子ファミリーと相対性の高い嗅覚受容体遺伝子ファミリーを発現する嗅細胞が、必ずしも MOR28 系球近傍に軸索投射しているのではないことが判明した。そこで次に、どの様のパラメータが、MOR28 系球近傍への投射に関与しているのかを知る為、近傍の系球に対応する嗅覚受容体群に関して、嗅上皮における発現様式を解析した。その結果、興味深いことに、これ迄提唱されていた嗅上皮のゾーン構造 (ゾーン4) が、嗅覚受容体の発現に依存してサブゾーンに細分化されること、及び、嗅上皮での嗅覚受容体の発現サブゾーンが、嗅球での投射サブゾーンに対応して、大まかな投射位置を規定していることが示唆された。

#### 5. 自己評価：

本研究により、これ迄、嗅上皮において大まかに四つに区画化されていたゾーン構造がサブゾーンに細分化され、更に、これらサブゾーンの背腹軸に沿った連続した重なり合いにより嗅上皮が形成されていると推定された。また特定の嗅覚受容体を発現する嗅細胞は、嗅上皮のサブゾーン内で軸索を伸展し、嗅球上で対応するサブゾーン内の系球に軸索を収斂していることが示された。このような現象は、ニワトリの視覚系における網膜? 視蓋のトポグラフィックな投射に類似しており大変興味深い。しかしながら本研究では、嗅細胞がどの様にして嗅上皮から嗅球へ subzone-to-subzone 対応によって投射するのか、並びに、嗅球上に subzone-to-subzone 対応によって軸索を伸展する嗅細胞が、どの様にしてサブゾーン内の特定の系球に投射するのかと云うメカニズムの解明には至らなかった。そこで今後、嗅球において近接した系球に対応する嗅覚受容体群に関して、その嗅上皮での発現時期、一次構造、共発現する軸索ガイダンス分子などを解析することにより、これらの分子機構を明らかにしたいと考えている。これ迄他のグループにより、嗅覚受容体分子が嗅細胞の嗅球への軸索投射に instructive な役割を果たしていることは示されているが、その実体は未だ明らかにされていない。本研究を発展させることにより、嗅球における匂い地図の構築に関する新たなlogicが明らかになれば、神経系における多様性の識別に一つのブレークスルーを生むと期待される。

#### 6. 研究総括の見解：

先駆的で国際的注目度の極めて高い課題に意欲的に挑戦した。中枢神経系の嗅覚神経回路形成と再生の機構を“匂い地図の構築原理”といった視点から探究し、嗅上皮で区画化されていたゾーン構造は嗅覚受容体の発現に依存してサブゾーンに細分化され、当該サブゾーンが大略脳内の嗅球への投射位置を規定していることを明らかにした。この成果そのものは非常に重要であり高く評価できる。しかし、本研究者の独自性を十分担保しうる発表論文がないので、個人研究としての主体性がやや稀薄である点に意を注ぎつつ、研究を一層発展させることを強く望む。

#### 7. 主な論文等：

原著論文

1. Ishii, T., Serizawa, S., Kohda, A., Nakatani, H., Shiroishi, T., Okumura, K., Iwakura, Y., Nagawa, F., Tsuboi, A. and Sakano, H.: Monoallelic expression of the odourant receptor gene and axonal projection of olfactory sensory neurones. *Genes Cells* 6: 71-78 (2001)
2. Sengoku, S., Ishii, T., Serizawa, S., Nakatani, H., Nagawa, F., Tsuboi, A. and Sakano, H.: Axonal projection of olfactory sensory neurons during the developmental and regeneration processes. *NeuroReport* 12: 1061-1066 (2001)
3. Nagawa, F., Yoshihara, S., Tsuboi, A., Serizawa, S., Itoh, K. and Sakano, H.: Genomic analysis of the murine odorant receptor MOR28 cluster: a possible role of gene conversion in maintaining the olfactory map. *Gene* 292: 73-80 (2002)
4. Kobayakawa, K., Hayashi, R., Morita, K., Miyamichi, K., Oka, Y., Tsuboi, A. and Sakano, H.: Stomatin-related olfactory protein, SRO, specifically expressed in the murine olfactory sensory neurons. *J. Neurosci.* 22: 5931-5937 (2002)
5. Oka, Y., Kobayakawa, K., Nishizumi, H., Miyamichi, K., Hirose, S., Tsuboi, A. and Sakano, H.: O-MACS, a novel member of the medium-chain acyl-CoA synthetase family, specifically expressed in the olfactory epithelium in a zone-specific manner. *Eur. J. Biochem.* 270: 1995-2004 (2003)
6. Tsuboi, A., Nishizumi, H., Miyazaki, T., Kato, H., Oroku, K., Nagawa, F. and Sakano, H.: The murine olfactory sensory map: implication for a sub-areal correlation between the olfactory epithelium and bulb upon the axonal projection of olfactory sensory neurons. (submitted)

#### 総 説

1. 坪井昭夫 嗅覚受容体の発現に依存した嗅神経回路形成のメカニズム  
日本味と匂学会誌 第9巻 第1号 p43-50 (2002)

#### 口頭発表

1. 坪井昭夫、吉原誠一、芹沢尚、石井智浩、中谷洋子、名川文清、坂野仁 :マウス嗅覚受容体遺伝子 MOR28 クラスターの発現制御, 第23回日本分子生物学会年会 (神戸) 12月13? 16日 (2000)
2. Tsuboi, A., Oka, Y., Kobayakawa, K., Nishizumi, H., Nagawa, F. and Sakano, H.: Differential display screening of genes expressed in a zone-specific manner in the olfactory epithelium or in the olfactory bulb. Gordon Research Conference on "Chemical Senses: Taste & Smell", Newport, Rhode Island, July 1-6 (2001)
3. 坪井昭夫、吉原誠一、芹沢尚、名川文清、坂野仁 嗅神経細胞の嗅球への投射における軸索の選別と収束, 第24回日本分子生物学会年会 (横浜) 12月9? 12日 (2001)
4. Tsuboi, A., Yoshihara, S., Nagawa, F. and Sakano, H.: Genomic analysis of the murine odorant receptor MOR28 cluster: a possible role of gene conversion in maintaining the olfactory map. 第25回日本分子生物学会年会 (横浜) 12月11? 14日 (2002)
5. Tsuboi, A., Miyazaki, T., Nishizumi, H. and Sakano, H.: Expression and projection for murine Class I odorant receptors., 第26回日本神経科学大会 (名古屋) 7月22? 25日 (2003)

#### 招待講演

1. 坪井昭夫 嗅覚系におけるニューラルネットワ?ク形成の分子機構, 文科省科学研究費 基盤(C)企画調査 公開シンポジウム 多角的アプローチによる嗅覚情報伝達の総合的研究 :今、嗅覚研究がおもしろい! 神経から脳へ行動へ」東京大学農学部弥生講堂 (東京 2月 23 日 (2002))
2. 坪井昭夫 :マウス嗅覚系における神経回路形成の分子機構, 岡崎国立共同研究機構 生理学研究所 研究会 シナプス可塑性と丸ごとの脳機能」, 岡崎コンファレンスセンター (岡崎 5月 23? 24 日 (2002))
3. 坪井昭夫 嗅覚系における神経回路の形成と再生の分子基盤, 文科省科学研究費 特定領域研究 神経回路」, 冬のシンポジウム 神経回路の形成と働きの分子メカニズム」学術総合センター 一ツ橋記念講堂 (東京 1月 29? 30 日 (2003))

#### 特 許

1. 小早川高、坂野仁、林令子、坪井昭夫 嗅覚情報の受容伝達に関わるタンパク質 SRO  
特願 2002-130392 号 5 月 22 日 (2002) (出願中)