

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16255

研究課題名(和文) 超長距離作用性シスエレメントによる巨大遺伝子クラスターの発現制御機構

研究課題名(英文) The regulatory mechanisms of a long-range cis-regulatory element for a large gene cluster

研究代表者

岩田 哲郎 (Iwata, Tetsuo)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：30771563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウスゲノム最大の遺伝子ファミリーを形成している嗅覚受容体ファミリーのうち、Class タイプは約300万塩基対の単一の巨大遺伝子クラスターを形成する。これらの遺伝子発現は、長距離作用性調節配列(シスエレメント)の「Jエレメント」により、制御する遺伝子数とゲノム上の作用範囲の2点において他に類を見ない規模で制御されている。本研究では、種々のトランスジェニックマウスを用いてJエレメント中の機能領域を詳細に解析することにより、長距離遺伝子発現制御の分子機構の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

個々の嗅神経細胞は単一の嗅覚受容体遺伝子を膨大なレパートリーから選択して発現するため、嗅覚系の形成には適切な嗅覚受容体遺伝子発現が不可欠である。これまでの嗅覚受容体遺伝子の発現制御モデルは、陸棲動物特異的なClass タイプを対象とした研究から明らかになってきた。本研究により、Class タイプ遺伝子を制御するシスエレメントの機能配列を明らかにしたことで、今後、嗅覚受容体遺伝子発現制御の全容解明につながることで期待される。

研究成果の概要(英文)：In the mouse, 129 functional class I odorant receptor (OR) genes reside in a ~3 megabase huge gene cluster on chromosome 7. The J element, a long-range cis-regulatory element governs the singular expression of class I OR genes by exerting its effect over the whole cluster. To elucidate the molecular mechanisms underlying class I-specific enhancer activity of the J element, we analyzed the J element sequence to determine the functional region and essential motif.

研究分野：神経科学

キーワード：発現制御領域 遺伝子クラスター 嗅覚受容体 シスエレメント 長距離エンハンサー

1. 研究開始当初の背景

【学術的背景】

嗅覚は、食物探索・危機回避・生殖などの個体生存や種の保存に必要となる、外界の様々な化学物質（シグナル）を検知する。匂い分子を受容する嗅覚受容体は、ゲノム上最大の遺伝子ファミリーを形成しており、膨大な匂い情報の検知を可能にしている。その機能遺伝子数はマウスにおいて約1100個、全遺伝子の約5%にも及ぶ。哺乳動物の嗅覚受容体は、系統的に2つのクラスに分類される。Class IIは陸棲生物特異的なファミリーで、進化の過程で遺伝子重複と転座を繰り返し、生物種を問わずほぼすべての染色体に散在している。他方、Class Iは魚類から哺乳類まで共通な嗅覚受容体を含むファミリーで、単一の遺伝子クラスターを形成して存在し、進化の過程で遺伝子重複を経ても1つの染色体上に留まり続けている。

嗅覚受容体遺伝子は「1細胞1受容体かつ対立遺伝子排除」という特徴的な発現様式をとることにより、嗅神経細胞に“特定の匂いに応答する”という「個性」が付与される。近年、Class II 遺伝子のエンハンサー領域が発見され (Serizawa, S et al. Science 2003)、エピジェネティック修飾を基とした発現制御機構、散在する各 Class II 遺伝子クラスターに配置されたエンハンサーによる単一遺伝子の選択的活性化が着目されてきているが (Markenscoff-Papadimitriou, E et al. Cell 2014)、未だ「1細胞1受容体」を保証する嗅覚受容体遺伝子発現の詳細な分子機構は解明されていない。また、① Class II 遺伝子発現に必須な転写因子のノックアウトマウスにおいて、Class I 遺伝子発現は部分的にしか影響を受けない (Hirota, J et al. Mol Cell Neurosci. 2007)、② Class II 遺伝子座で高レベルに蓄積している構成的ヘテロクロマチン修飾が Class I 遺伝子座では低い (Magklara, A et al. Cell 2011) ことが報告され、Class I と Class II 嗅覚受容体遺伝子の発現制御機構が異なることが示唆されてきている。

【本研究に至った経緯】

Class II 遺伝子エンハンサーが発見された後も Class I 遺伝子の発現制御領域は長い間明らかになっていなかったが、申請者らは、初めて Class I 遺伝子エンハンサー領域『J エlement』の同定に成功した (Iwata, T et al. Nat Commun. 2017)。作用距離が約200 kb の Class II エンハンサーとは対照的に、J エlementは約3 Mb の Class I 遺伝子クラスター全体にわたって半数以上の Class I 遺伝子発現を制御していた (図1)。しかし、その遺伝子制御機構は明らかでなく、さらなる機能解析や分子機構の解明が今後の課題であった。

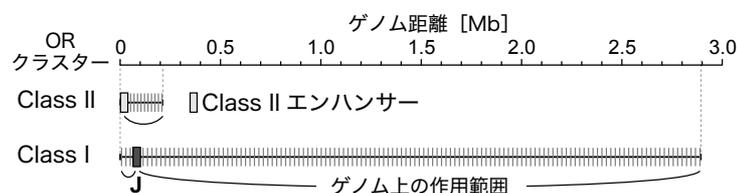


図1. 嗅覚受容体エンハンサーの作用範囲の比較

2. 研究の目的

Class I 嗅覚受容体遺伝子発現を制御する超長距離作用性エンハンサーJ エlementの機能解析をおこなうことにより、巨大 Class I 遺伝子クラスターからの単一遺伝子選択・発現制御機構の解明を目指す。具体的には、下記の3点に着目して研究をおこなった。

- (1) J エlementの最小機能領域の同定
- (2) J エlement中のモチーフの機能解析
- (3) J エlementのエピジェネティック制御

3. 研究の方法

(1) トランスジェニックマウスによる J エlementの機能解析

トランスジェニックマウスを用いたレポーター解析によって、各配列の嗅覚系における遺伝子発現調節機能を解析した。具体的には、先行研究で同様のレポーターアッセイの実績がある Class I 遺伝子 (MOR42-3) のプロモーター配列と gapVenus からなるレポーター遺伝子に、各候補配列をつなげたトランスジーン系列を構築した。これらのプラスミドは効率的な遺伝子導入のため Tol2 トランスポゾンの転移配列に挟まれている。構築したトランスジーンプラスミドと Tol2 transposase mRNA を B6C3F1 マウス受精卵へマイクロインジェクションした。作出したトランスジェニックマウスの嗅上皮および嗅球におけるレポーター遺伝子の発現パターンを解析した。

(2) Jエレメント推定制御配列のメチル化解析

先行研究で作出した Class I 嗅覚受容体発現嗅神経細胞特異的に Venus を発現するトランスジェニックマウス (J-gVenus Tg) の嗅上皮を用いて、パパインによる分散処理と Venus 蛍光を指標とした FACS により Class I 嗅覚嗅神経細胞群、およびコントロール細胞群 (Venus-) を分取した。集めた細胞からゲノム DNA を抽出し、バイサルファイト処理、Jエレメントの推定制御配列部分のクローニングとシーケンス解析をおこなった。

4. 研究成果

(1) Jエレメントの最小機能領域の同定

Jエレメントは哺乳動物間で高い保存性を示す約 1.9kb の領域として同定された。本研究では、単孔類までを含めた保存性解析でもっとも保存性の高い領域にのみ着目して、種々の欠失トランスジーンを用いたトランスジェニックマウスにおける発現解析により、Jエレメントの機能領域を約 5分の1 (330bp, CoreJ-H/O) にまで絞り込むことができた (図2)。ここでは、既知の嗅覚受容体遺伝子エンハンサーの中で Jエレメントにのみ保存されている新規コンセンサスモチーフ配列にも絞った欠失解析も実施したが、レポーター遺伝子の発現にその影響は認められなかった。

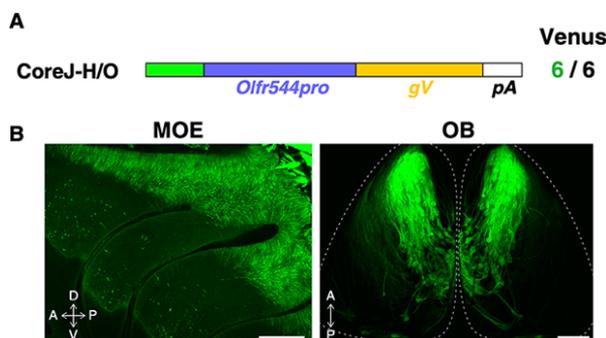


図2. コア J によるレポーター遺伝子の発現パターン

(2) Jエレメント中のモチーフの機能解析

コア J 領域には、嗅覚受容体遺伝子エンハンサーの機能に重要であるホメオドメインや O/E-like 配列が認められ、その内の 1 つは Class II エンハンサーにおいて見られるホメオドメインと O/E-like 配列が合体した機能モチーフ (“コンポジットモチーフ”) と類似していた。そこでこのモチーフへの変異導入とトランスジェニックマウスによる解析をおこなったところ、コア J 領域のエンハンサー活性が顕著に減少することが明らかになった。これは、Class II エンハンサーの機能モチーフが、Class I 遺伝子でも同様にエンハンサー活性に重要であることが明らかとなった (図3)。

一方、Jエレメントにのみ保存されている新規コンセンサスモチーフについては、Jエレメント特有の遺伝子制御機構への役割が示唆されることから、Yeast-One Hybrid 法による転写因子の同定を試みたが、有望な転写因子候補を得るには至らなかった。どのような機能を有するかは現在のところ不明であるが、今後このモチーフの欠失マウスを解析するなどして、その内因性の機能を明らかにしたいと考えている。

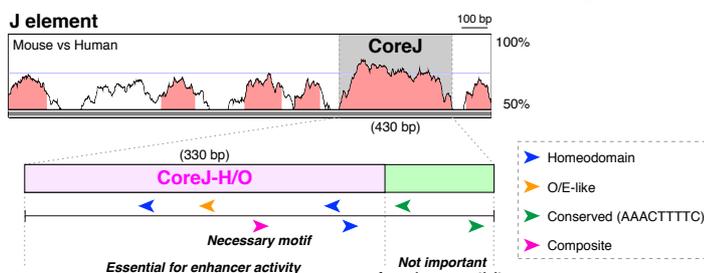


図3. Jエレメントの機能解析結果のまとめ

(3) Jエレメントのエピジェネティック制御

先行研究から、Jエレメントに隣接する CpG アイランド領域の DNA メチル化によって、発現する嗅覚受容体遺伝子のクラス別に Jエレメントの活性が制御されている可能性が示唆されたことから、嗅神経細胞の分散とセルソーターによる Class I 発現細胞の取集について条件検討を進め、バイサルファイト法による Jエレメント推定制御配列のメチル化解析を実施した。しかし、Class I 発現嗅神経細胞群、コントロール細胞群ともにほぼメチル化 CpG を検出できなかったことから、この部分の DNA メチル化は Jエレメントの機能制御には関与していないと考えられた。今回の解析では調製した細胞の生存率と死細胞の排除に懸念があり、今後は細胞の分取条件を改良してから、クロマチンアクセシビリティなどのエピジェネティック修飾の解析を進めていく予定である。

本研究では、超長距離作用性エンハンサー Jエレメントが、どのようなメカニズムで Class I 巨大遺伝子クラスターから単一遺伝子を選択し、発現を活性化するのかという、遺伝子発現制御機構の解明を目指した。数がそれほど多くない Class I タイプ嗅神経細胞の解析のため細胞数が少ないことによる実験の困難さも生じたが、現段階では、Jエレメント本体の機能解析を中心とした研究成果により、その制御機構の一端を明らかにすることができた。本成果は、長距離作用性エンハンサーによる嗅覚受容体遺伝子の発現制御機構の解明だけでなく、エンハンサーに

よる遺伝子発現調節機構というより汎用的な遺伝子制御モデルにも新たな知見をもたらすことが期待される。

<引用文献>

Hirota J, Omura M, Mombaerts P. Differential impact of Lhx2 deficiency on expression of class I and class II odorant receptor genes in mouse. *Mol Cell Neurosci.* (2007) 34:679-88.

Iwata T, Niimura Y, Kobayashi C, Shirakawa D, Suzuki H, Enomoto T, Touhara K, Yoshihara Y, Hirota J. A long-range cis-regulatory element for class I odorant receptor genes. *Nat Commun.* (2017) 8(1):885.

Magklara A, Yen A, Colquitt BM, Clowney EJ, Allen W, Markenscoff-Papadimitriou E, Evans ZA, Kheradpour P, Mountoufaris G, Carey C, Barnea G, Kellis M, Lomvardas S. An epigenetic signature for monoallelic olfactory receptor expression. *Cell.* (2011) 145(4):555-70.

Markenscoff-Papadimitriou E, Allen WE, Colquitt BM, Goh T, Murphy KK, Monahan K, Mosley CP, Ahituv N, Lomvardas S. Enhancer interaction networks as a means for singular olfactory receptor expression. *Cell* (2014) 159(3): 543-57

Serizawa S, Miyamichi K, Nakatani H, Suzuki M, Saito M, Yoshihara Y, Sakano H. “Negative feedback regulation ensures the one receptor-one olfactory neuron rule in mouse. *Science* (2003) 302(5653): 2088-94.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Iwata Tetsuo, Tomeoka Satoshi, Hirota Junji	4. 巻 11
2. 論文標題 A class I odorant receptor enhancer shares a functional motif with class II enhancers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 510
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-79980-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Enomoto Takayuki, Nishida Hidefumi, Iwata Tetsuo, Fujita Akito, Nakayama Kanako, Kashiwagi Takahiro, Hatanaka Yasue, Kondo Hiro, Kajitani Rei, Itoh Takehiko, Ohmoto Makoto, Matsumoto Ichiro, Hirota Junji	4. 巻 2
2. 論文標題 Bcl11b controls odorant receptor class choice in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 296
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-019-0536-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Sirapop Nithiuthai, Tetsuo Iwata, Junji Hirota
2. 発表標題 Molecular mechanisms underlying super-long-range gene regulation of a class I odorant receptor enhancer
3. 学会等名 第45回分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩田哲郎、留岡諭志、小林千鶴、白川大地、廣田順二
2. 発表標題 Class I 嗅覚受容体遺伝子の発現制御領域の機能解析
3. 学会等名 日本味と匂学会第55回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tetsuo Iwata, Takayuki Enomoto, Junji Hirota
2. 発表標題 Molecular mechanism of class I odorant receptor gene expression
3. 学会等名 日本味と匂学会第53回大会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

鼻の中でタイプの異なる匂いセンサーができる仕組みを解明
<https://www.titech.ac.jp/news/2019/044993.html>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関