

機関番号：12608  
 研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20570208  
 研究課題名 (和文) Lhx2 非依存的に発現するマウス嗅覚受容体多重遺伝子の  
 発現機構の解明  
 研究課題名 (英文) Regulation of odorant receptor gene expression

## 研究代表者

廣田 順二 (Hirota Junji)  
 東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・准教授  
 研究者番号：60405339

## 研究成果の概要 (和文)：

マウス嗅覚受容体 (odorant receptor: OR) 遺伝子の発現制御機構の解明を目的とし、OR 遺伝子の発現制御に関与する因子の探索と発現制御領域同定のためのトランスジェニックマウスの作成を行った。その結果、OR 遺伝子発現に関与すると考えられる制御因子を新たに同定した。また発現制御領域の同定のためのトランスジーンコンストラクトを作成し、現在までに複数のトランスジェニックマウス系統を得ている。今後これらのトランスジェニックマウスの詳細な解析を行い、制御領域の同定を継続して行う。

## 研究成果の概要 (英文)：

To study molecular mechanisms underlying odorant receptor (OR) gene expression in mice, we have screened transcription factors which might be involved in OR gene regulation, and have made transgenic mice to identify promoter/enhancer regions. We found a few candidate factors which may regulate OR gene expression. In addition, we have constructed transgenes to identify regulatory regions OR genes, and have obtained several transgenic lines.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：遺伝子発現調節、嗅覚受容体多重遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

嗅覚は、動物の生命維持のために必要な行動に密接に関与し、進化の過程で原始から現代に至るまで保存されてきた感覚である。匂い分子を感知する嗅覚受容体 (odorant receptor: OR) は、水棲から陸棲への生活環境の変化に伴って分子進化を遂げ、社会環境の複雑化に対応するためにその遺伝子数を

増加させてきた。動物にとっての嗅覚の重要性は、OR 遺伝子の数の多さにもうかがえる。OR 遺伝子はゲノム最大の遺伝子ファミリーを形成しており、マウスにおいてその総数は約 1400 個、実に全遺伝子の 5%にも及ぶ。個々の嗅神経細胞は、1つの細胞で1種類の遺伝子が対立遺伝子の一方からのみ発現するという極めて興味深い発現様式をとる。しかし

ながら、その分子機構は未解明のままである。マウスクローン技術を用いた研究によって、遺伝子組換えなどによる遺伝子再構成が OR 遺伝子発現機構に当てはまらないことが示された。この結果、OR 遺伝子発現機構に関する研究は、転写因子による発現制御・エピエネティックな発現制御の解明へと研究の中心が一気に移行した。

OR 遺伝子ファミリーは、系統発生的に魚類由来の OR (Class I OR) と陸棲動物特異的 OR (Class II OR) とに分類される。これまで申請者は、Class II OR 遺伝子の発現制御領域の同定と機能解析を行い、複数の Class II OR 遺伝子に保存される機能的モチーフ (ホメオドメイン配列) に結合する転写因子として、LIM ホメオドメイン型転写因子 Lhx2 を同定した。Lhx2 欠損マウスでは、調べたすべての Class II OR 遺伝子の発現が認められないことから、Lhx2 は Class II OR 遺伝子の発現制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに Class II OR とは異なり、Class I OR 遺伝子の発現に Lhx2 は必須でないことを明らかにした (基盤研究 (C) #18570206)。これらの結果から、Class I OR と Class II OR 遺伝子発現制御には異なる分子機構/経路の存在が示唆されている。

## 2. 研究の目的

(1) Lhx2 は Class II OR である *M71* 遺伝子のプロモーター領域に存在するホメオドメイン配列に結合する。Lhx2 KO マウスでは Class I OR は発現するが Class II OR は発現しない。また Lhx2 は分子内に存在する LIM ドメインを介して他のタンパク質と相互作用することで機能していると考えられる。Class II OR 遺伝子発現制御の分子機構の解明には、Lhx2 を中心とした転写制御因子複合体の全容を明らかにする必要がある。そこで本研究では嗅神経細胞における Lhx2 の機能を明らかにするために、Yeast Two-Hybrid 法を用いて嗅覚系で Lhx2 と相互作用するタンパク質を同定することを目的とした。さらに、あらたに Class I OR と Class II OR の発現に関与する転写因子の同定を試みた。

(2) これまで陸棲動物特異的に進化した Class II OR 遺伝子の発現機構の解明を中心に研究が精力的に行われてきた。しかしながら Class I OR 遺伝子に関する研究はなされておらず、その制御領域の解析も行われていない。本研究では Lhx2 非依存的に発現する Class I OR の発現制御機構の解明を目指し、その制御領域を同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) Lhx2 と相互作用するタンパク質の同定には、Yeast Two-Hybrid 法を用いた。Bait として Lhx2 の CDS の全長をプラスミド pBD-GAL4 Cam に組み込んだコンストラクトを作成し、酵母 AH109 株を形質転換させた。形質転換体を SD/Trp-プレートで選択し、続いてマウス嗅上皮 cDNA library が組み込まれた prey 用プラスミド pAD-GAL4-2.1 を形質転換し、栄養要求性と酵母のレポーター遺伝子 (Ade2, His3, LacZ) を指標にし、SD/Trp-/Leu-/His-/Ade-プレートと  $\beta$ -ガラクトシダーゼアッセイを用いて Lhx2 と相互作用するタンパク質の遺伝子を含むプラスミドを持つクローンを選別した。得られた Lhx2 結合タンパク質が、生理的に意味のある分子であるかどうかを、細胞レベルでの共発現を指標に確認する。実験は Two-color *in situ* hybridization によって行う。DIG または FITC でラベルしたプローブを Lhx2 と Lhx2 結合タンパク質をコードする遺伝子に対して作製し、*in situ* hybridization を行い、DIG, FITC に対する抗体を用いて同時に検出する。

(2) Class I OR 遺伝子発現制御機構の解明には、OR 遺伝子の転写開始点 (TSS) の同定とその上流の塩基配列情報が必要となる。本課題では、5' RACE によって Class I OR 多重遺伝子の TSS を決定した。同定した Class I 遺伝子 TSS 上流配列を含むトランスジーンベクターを構築する。Class I 遺伝子の 3' -UTR 内には IRES-tauLacZ を挿入することによって、Class I 遺伝子の発現と同時にレポーター遺伝子 tauLacZ を発現させ、軸索投射の可視化による機能的 OR 遺伝子発現の観察を可能とした。

具体的には、マウス Class I OR は第 7 染色体に約 3Mb にも及ぶ巨大なクラスターを形成している。そのため発現制御領域が TSS 近傍に存在しない場合は予想された。そこで BAC (細菌人工染色体) を用いた巨大遺伝子断片を用いることとした (図 1)。本研究では、この領域を含む計 24 本の BAC を使用し、OR 遺伝子の終止コドンの下流にレポーター遺伝子 IRES-tauEGFP (もしくは IRES-tauLacZ) を挿入した BAC トランスジーンを作製し、マウス遺伝学的手法によって遺伝子発現制御領域の同定を行うこととした。さらにこの制御領域は Class I OR から数百 kb 以上遠方に存在する可能性も考えられるため、マウスゲノム領域の改変ツールとして BAC 同士の連結など、YAC を上回る Mb スケールの遺伝子操作・改変が可能な枯草菌ゲノムベクター (BGM ベクター) のシステムを使用することとした。

マーカー遺伝子を挿入した改変 BAC Tg 作製し、これらのトランスジェニックマウスの作出を行っている。

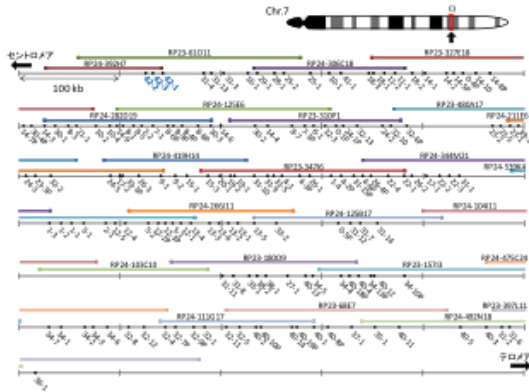


図1 Class I OR 遺伝子座の構造と用いた BAC クローン

#### 4. 研究成果

(1) Yeast Two-Hybrid 法による Lhx2 結合タンパク質のスクリーニングを行い (3.0 × 10<sup>6</sup> クローン)、1 次陽性クローン 114 個得た。遺伝子配列解析から 1 次陽性クローンは 4 つの遺伝子 A, B, C, D であることがわかった。相互作用の再確認から、遺伝子 B, C, D は擬陽性であり、遺伝子 A が Lhx2 結合タンパク質をコードする遺伝子であることを明らかにした。

同定した A がマウス嗅神経細胞で実際に Lhx2 と相互作用し得るかどうかを、同じ細胞での共発現を指標に検討した。両者の遺伝子発現パターンはよく似ており、嗅上皮の基底側で発現が強く、表層側にいくにつれ弱くなっていた。また共発現している細胞が確認された。このことから Lhx2 と Ldb1 はマウス嗅上皮において相互作用し、Class II OR の発現制御に関与している可能性が示唆された。

遺伝子 A がコードするタンパク質はさらに他のタンパク質との相互作用が予想される。今後 Lhx2-A 複合体にさらに結合するタンパク質の同定を継続して行い、Lhx2 を中心とした複合体の全容解明を目指す。

また、Class I OR 遺伝子と Class II OR 遺伝子の発現に関与する新たな転写因子 E を同定した。この転写因子の遺伝子欠損マウスでは、Class I OR と Class II OR 遺伝子の発現が大きく変化することを明らかにした。興味深いことに、この転写因子は、鋤鼻神経細胞にも発現しており、その発現パターンは、発生の段階で大きく変化していた。遺伝子欠損マウスを用いた研究によって、本転写因子が鋤鼻神経系の形成に必須であることを明らかにした。

(2) BAC のトランスジーンを作製するため、本研究では枯草菌ゲノムベクター (BGM ベクター) を使用する。そこでまず BAC-DNA を宿主大腸菌より抽出し、BGM ベクターへクローニングを行った。BGM ベクターにクローニングした BAC 中の OR の下流に、BGM ベクターのシステムを利用して相同組換えによりレポーター遺伝子である IRES-tau EGFP もしくは IRES-tauLacZ を導入して、BAC-トランスジーン (BAC-Tg) を作製した。

Tg を精製し、マウス受精卵へマイクロインジェクションを行い、Tg マウスを作製している。これまでに 2 つの BAC Tg について実験を行い、それぞれ複数の Tg ファウンダーマウスを得ている。今後系統化した後に GFP もしくは LacZ の発現を指標に発現制御領域が Tg に含まれているかを判定し、発現が認められたコンストラクトについて制御領域の絞り込みを行っていく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Takayuki Enomoto, Makoto Ohmoto, Tetsuo Iwata, Ayako Uno, Masato Saitou, Tatsuya Yamaguchi, Ryo Kominami, Ichiro Matsumoto and Junji Hirota, Bcl11b/Ctip2 controls the differentiation of vomeronasal sensory neurons in mice. Journal of Neuroscience (in press)、査読有り

② 榎本孝幸、木南凌、廣田順二、マウス嗅覚系における Bcl11b 遺伝子発現解析、日本味と匂学会誌 (2008) 15 (3), 569-572、査読有り

[学会発表] (計 4 件)

① 斎藤真人、小出裕太郎、廣田順二、嗅神経系における LIM ホメオドメイン型転写因子 Lhx2 結合タンパク質の同定、日本味と匂学会第 44 回大会、2010 年 9 月 8-10 日、北九州

② 榎本孝幸、木南凌、廣田順二、マウス嗅覚系における Bcl11b の機能、日本味と匂学会第 43 回大会、2009 年 9 月 8-10 日、旭川

③ Takayuki Enomoto, Ryo Kominami, Junji Hirota, Role of Bcl11b, C2H2 zinc finger transcription factor in the mouse olfactory system、日本味と匂学会第 43 回

大会、2009年9月8日、旭川（2009）

④ 榎本孝幸、木南凌、廣田順二、マウス嗅覚系における Bcl11b 遺伝子発現解析、日本味と匂学会第42回大会、2008年9月17-19日、富山

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hirota.bio.titech.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

廣田 順二 (HIROTA JUNJI)

東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・准教授

研究者番号：60405339