

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 7日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500302

研究課題名（和文） Runxファミリー転写因子によるショウジョウバエ嗅覚神経細胞のサブタイプ分化機構

研究課題名（英文） Subtype specification of the olfactory sensory neurons in *Drosophila* by RUNX family transcription factor Lozenge

研究代表者

遠藤 啓太 (ENDO KEITA)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：40425616

研究成果の概要(和文):キイロショウジョウバエの嗅覚神経細胞は50種類のクラスに分化し、それぞれクラス特異的な匂い受容体を発現することで、多様な匂い分子の受容/識別に貢献している。この多様な神経クラス分化の機構を明らかにするために、Runxファミリーの転写因子Lozengeと、Evi1原癌遺伝子のショウジョウバエにおける相同遺伝子Hamletに注目してその機能解析を行った。その結果、嗅覚神経細胞の前駆細胞の分化が発生過程を通じて連続して起こり、これと平行してLozengeの発現量が段階的に減少していくことで、時期によって異なる量のLozengeが異なるタイプの前駆細胞を分化させる仕組みが明らかになった。またHamletは、前駆細胞から嗅覚神経細胞を生み出す過程で、Notchシグナルの標的遺伝子の発現をエピジェネティックな機構を介して調節することで、多様な神経クラス分化に貢献していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文): Olfactory sensory neurons in *Drosophila melanogaster* are diversified into 50 different classes, each expressing specific odorant receptors, and together contributing to detection and discrimination of a myriad of odorous chemicals in environment. To reveal the developmental mechanisms that generate this neuronal diversity, I analyzed the function of two molecules; Runx-family transcription factor Lozenge and *Drosophila* homologue of Evi1 proto-oncogene Hamlet. I found that the precursor cells for the olfactory sensory neurons differentiate continuously while Lozenge level gradually decreases during development. This makes precursor cells that are differentiated at different time points receive different levels of Lozenge, thereby generating different classes of olfactory sensory neurons. I also found that Hamlet contributes to the process of a single precursor cell generating different classes of olfactory sensory neurons, by modifying the expression of the Notch-target genes through epigenetic mechanisms.

交付決定額

(金額単位:円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,500,000 | 450,000   | 1,950,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 2011年度 | 900,000   | 270,000   | 1,170,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：神経クラス分化、嗅覚神経細胞、Runx、Notch、エピジェネティック

## 1. 研究開始当初の背景

キイロショウジョウバエの嗅覚神経細胞は50種類のクラスに分化し、それぞれクラス特異的な匂い受容体を発現するとともに、その軸索を脳の一次嗅覚中枢のクラス特異的な領域へと投射することで脳内に匂い情報の空間地図を構築している。本研究代表者は、この50種類の嗅覚神経細胞が24種類のクラスターに分けられ、個々のクラスターは単一の前駆細胞に由来する1~4個の嗅覚神経細胞から構成されていることを過去の研究において見出した。さらに、単一のクラスターを構成する複数の嗅覚神経細胞は、その前駆細胞からの分化の過程で起こるNotchシグナルの活性化の違いによって、それぞれ異なる神経クラスに分化することも明らかにした。しかし、Notchシグナルの活性化の違いが最大4種類もの異なる神経クラスを生み出す分子機構の詳細や、そもそも個々のクラスターを生み出す前駆細胞を24種類にも分化させる分子機構については全く分かっていなかった。

本研究者は、平成19~20年度の基盤研究(C)において、嗅覚神経細胞の前駆細胞がRunxファミリーに属する転写因子Lozengeの量に依存して異なるタイプに分化することを示唆する結果を得た。しかし、その量の違いがどのようにして生じるのか、また、量の違いがどのような発生機構によって異なるタイプの前駆細胞を生み出すのかは分かっていなかった。また、同基盤研究においては、Evi1原癌遺伝子のショウジョウバエにおける相同遺伝子Hamletが、前駆細胞から最大4種類の嗅覚神経細胞クラスを生み出す過程で、系譜特異的にNotchシグナルの活性を調節することで神経クラス分化に関わることを示唆する結果も得られていた。しかし、その具体的な分子機能は明らかになっていなかった。

## 2. 研究の目的

平成19~20年度の基盤研究(C)の結果を踏まえ、以下に挙げる二つの機構の解明を目的とする。

(1) Lozengeの量の違いがどのようにして生じ、どのようにして前駆細胞のタイプの違いを生み出すのか、その発生機構を解析することで、前駆細胞自体の分化機構の一端を明らかにする。

(2) Hamlet分子がどのようにしてNotchシグナルの活性を調節するのか、その具体的な

分子機構を解析することで、単一の前駆細胞から最大4種類の神経クラスを生み出す機構の詳細を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 平成19~20年度の基盤研究(C)の結果から、触角原基の異なる領域において分化する前駆細胞の間でLozengeの発現量に著しい違いは見られないことが分かっていた。そこで、本研究では、異なる発生時期に分化する前駆細胞の間でLozengeの発現量を比較する。さらに、発生時期と分化する嗅覚神経細胞のクラスとの相関を明らかにするために、嗅覚神経細胞の分化が起こる発生過程の様々な時期にクローンを作成し、得られる嗅覚神経細胞クラスを時期ごとに同定/分類する。

(2) 嗅覚神経細胞の分化過程におけるNotchシグナルの標的遺伝子の発現を、野生型とhamlet変異とで比べることで、この過程におけるNotchシグナルの活性化がHamlet分子によってどのように調節されているのか具体的に解析する。また、Hamlet分子によるNotchシグナル標的遺伝子の発現調節の分子機構を、培養細胞を用いて生化学的に解析する。

## 4. 研究成果

(1) Lozengeの発現を発生過程の異なる時期で解析したところ、その発現量は、嗅覚神経細胞の前駆細胞が分化する蛹期の約12時間のあいだに段階的に減少することが明らかになった。一方、発生過程の異なる時期にクローンを作成し、神経クラスごとに分化の時期を解析した結果、異なるクラスの嗅覚神経細胞を生み出す前駆細胞は、それぞれ異なる発生時期に分化することがわかった。本研究者の平成19~20年度の基盤研究(C)の結果、嗅覚神経細胞のクラスによって分化に必要なLozengeの量が異なることが明らかになってきたが、興味深いことに、この神経クラス特異的なLozengeの必要量と前駆細胞の分化の時期には相関があることが分かった。つまり、分化に多くのLozengeを必要とするクラスの嗅覚神経細胞を生み出す前駆細胞は、発生過程の早い時期、すなわちLozengeの発現が多い時期に分化し、一方、分化にLozengeをほとんど必要としないクラスの嗅覚神経細胞を生み出す前駆細胞は、発生過程の遅い時期、すなわちLozengeの発現が減少してから分化しているということ

である。したがって、発生過程を通じて前駆細胞の分化が連続して起こり、これと平行して **Lozenge** の発現が段階的に減少していくことで、発生時期によって異なる量の **Lozenge** が異なるクラスを生み出す前駆細胞を分化させるという発生機構が明らかになった。類似の発生機構は、中枢神経系において幹細胞が神経細胞を繰り返し生み出す過程では知られていたが、末梢神経系の発生過程においては新奇の発見である。

(2) 前駆細胞の分裂によって pNa と pNb という二つの神経系中間前駆細胞が作られるが、この pNa 細胞でのみ Notch シグナルの活性化が起きることが示唆されていた。Notch シグナルの標的遺伝子の一つ、*E(spl)m8* の発現を調べると、実際に pNa 細胞において強く発現していることが確認された。pNa 細胞は分裂して Naa と Nab という二つの神経細胞を作るが、分裂直後は、この両方の細胞において *E(spl)m8* の発現が減少し、その後、Naa 細胞においてのみ新たな Notch シグナルの活性化が起きること、*E(spl)m8* の発現が再び増加することが分かった。ところが、*hamlet* 変異では、pNa 細胞は分裂後も *E(spl)m8* の発現の減少が起きず、Naa と Nab の両方の細胞で *E(spl)m8* の強い発現が維持されてしまうことが分かった。したがって、Hamlet 分子は、系譜特異的に Notch シグナルの標的遺伝子の発現を抑制していることが明らかになった。

Hamlet 分子による Notch シグナルの標的遺伝子の発現抑制機構を培養細胞を用いて解析したところ、Hamlet 分子の存在化では、Notch シグナルの標的遺伝子領域に結合しているヒストン分子のメチル化状態が変化し、同時に、ヒストン分子の結合量も増加することが分かった。したがって、Hamlet 分子の存在化では、標的遺伝子領域のクロマチン構造が凝集していることが示唆された。さらに、Hamlet 分子の存在化では、Notch シグナルを仲介して標的遺伝子の発現を活性化する CSL 分子が標的遺伝子領域へ結合しにくくなることも明らかになった。

以上の結果から、Hamlet 分子は、Notch シグナルの標的遺伝子領域のクロマチン構造を変化させ、そのシグナルに対する反応性を変化させることで、Notch シグナルの活性化によって起こる細胞分化を系譜特異的に調節し、多種類の神経クラスの分化に寄与していることが明らかになった。したがって、神経クラス分化は、今まで明らかにされてきたような転写調節因子の組み合わせによる標的遺伝子発現の違いのみならず、標的遺伝子の転写調節因子に対する反応性の違いによっても生み出されていると考えられる。おそらく、同様な機構が、他の発生現

象においても細胞分化の過程で普遍的に用いられていると考えられることから、本研究結果は、より普遍的な細胞分化機構の解明に貢献すると思われる。

#### 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1件)

- ① Endo, K., Karim, M. R., Taniguchi, H., Krejčí, A., Kinameri, E., Siebert, M., Ito, K., Bray, S. J., and Moore, A. W. (2012). Olfactory receptor neuron identity is diversified by the *Drosophila* Evi1-Prdm16 homolog Hamlet that mediates chromatin modification at Notch-target loci. *Nat. Neurosci.* **15**: 224–233. doi: 10.1038/nn.2998.

[学会発表] (計10件)

- ① 遠藤啓太「Olfactory Receptor Neurons are Diversified by the Prdm Protein Hamlet that Mediates Chromatin Modification at Notch-Target Loci」1st Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference (Taipei, 2011年5月) 口頭発表/ポスター発表
- ② 遠藤啓太「Olfactory Receptor Neuron Identity is Diversified by the *Drosophila* Evi1/Prdm16 Homologue Hamlet that Mediates Chromatin Modification at Notch-Target Loci」第44回発生生物学会大会(沖縄, 2011年5月) 口頭発表
- ③ 遠藤啓太「キイロショウジョウバエにおける嗅覚神経細胞のクラス分化機構」第179回つくばブレインサイエンス(TBSA)・セミナー(つくば, 2011年2月) 招待講演
- ④ 遠藤啓太「Resetting of Notch signaling by hamlet ensures the repeated use of the Notch-mediated cell-fate specification at each cell division to diversify the *Drosophila* olfactory sensory neurons」第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会(神戸, 2010年12月) 口頭発表
- ⑤ 遠藤啓太「キイロショウジョウバエ嗅覚神経細胞の多様性は細胞系譜特異的な Notch シグナルの修飾により獲得され

る」第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会合同大会（神戸、2010 年 9 月）口頭発表

- ⑥ 遠藤啓太「Sub-lineage-Specific Modification of Notch Transcriptional Regulation by Hamlet Generates *Drosophila* Olfactory Sensory Neuron Diversity」第 43 回発生生物学会大会（京都、2010 年 7 月）ポスター発表
- ⑦ 遠藤啓太「A *Drosophila* RUNX family transcription factor, Lozenge, specifies the olfactory receptor neuron class in a does-dependent manner」CSHL meeting “Neurobiology of *Drosophila*”（Cold Spring Harbor, New York、2009 年 9 月）ポスター発表
- ⑧ 遠藤啓太「Combinatorial role of the EGFR signaling pathway and a RUNX family transcription factor Lozenge in the subtype specification of the *Drosophila* olfactory sensory neurons」第 32 回日本神経科学大会（名古屋、2009 年 9 月）ポスター発表
- ⑨ 遠藤啓太「Lineage-specific modification of Notch signaling by Hamlet generates *Drosophila* olfactory neuron diversity」9th Japanese *Drosophila* Research Conference（孀恋、2009 年 7 月）ポスター発表
- ⑩ 遠藤啓太「Combinatorial role of the EGFR signaling pathway and a RUNX family transcription factor Lozenge in the subtype specification of the *Drosophila* olfactory sensory neurons」9th Japanese *Drosophila* Research Conference（孀恋、2009 年 7 月）ポスター発表

〔その他〕

新聞報道

- ① 日刊工業新聞「理研と東大、嗅覚神経細胞をつくる仕組みを解明・iPS 細胞分化に貢献」2012 年 1 月 9 日
- ② 日経バイオテク ONLINE「理研 BSI と東大 IMCB、嗅覚神経細胞分化で Notch と Hamlet がエピジェネティクス制御、12 月 24 日に説明会」2011 年 12 月 28 日
- ③ 化学工業日報「嗅覚神経細胞の多様な分化／エピジェネティクスな現象／核内因子が標的遺伝子制御」2011 年 12 月 26 日

6. 研究組織

(1)研究代表者

遠藤 啓太 (ENDO KEITA)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：40425616

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし