

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07366

研究課題名(和文) Bcl11bによる嗅神経細胞の二者択一的運命決定の制御機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of odorant receptor class choice in mice

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：匂いを感知する嗅覚受容体は、魚類から哺乳類に至る脊椎動物に共通して存在するクラスI(水棲型)と陸棲動物に特異的なクラスII(陸棲型)の2種類に大きく分類される。つまり鼻の中では発現する受容体のタイプによって異なる2種類の嗅神経細胞が作り出されるが、そのメカニズムは長年未解明のままだった。本研究では、2種類の嗅神経細胞を作り分けるのに転写因子Bcl11bが重要な機能を果たしていることを明らかにした。またBcl11bの発現を人為的に操作によって鼻のなかの水棲型と陸棲型の受容体のバランスが崩れたマウスでは、感じ取る匂いの世界が大きく変化することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム上最大の遺伝子ファミリーを形成する嗅覚受容体は大きく2つのクラスに分類されることが知られていた。嗅覚受容体の発見以来、四半世紀以上未解明であった嗅覚受容体のクラス選択の分子メカニズムを明らかにした本研究の学術的価値は高いと言える。また末梢神経である嗅神経細胞のクラス選択を変えるだけでマウスが感じる匂いの世界と嗅覚行動は大きく変化した結果は興味深く、今後、嗅覚受容体クラス選択と動物の嗅覚行動を繋ぐ神経基盤が解明できるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Odorant receptors are classified into two classes: class I (aquatic), which is common in vertebrates from fish to mammals, and class II (terrestrial), which is specific to terrestrial animals. Thus, two different types of olfactory sensory neurons are produced in the nose, depending on the type of odorant receptor they express, but the mechanism has remained unknown. In this study, we, for the first time, identify the transcription factor Bcl11b as a critical regulator that determines the OR class to be expressed in OSNs. We further demonstrate that OSN-specific genetic manipulations of Bcl11b bias the OR class choice, generating mice with “class I-dominant” and “class II-dominant” noses, which display contrasting innate olfactory behavior to two distinct aversive odors. Overall, these findings reveal a unique transcriptional mechanism that serves as a binary switch for OR class choice that is crucial to both the anatomical and functional organization of the olfactory system.

研究分野：分子神経科学

キーワード：嗅覚 嗅覚受容体 嗅神経細胞 神経分化 遺伝子発現

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物は外界の化学物質を検知し、必要な適応行動をとる。例えば、食物探索・天敵からの危険回避・生殖行動などは、匂い物質やフェロモンを受容することにより表れる。こうした化学情報の受容を担うのが嗅覚であり、匂いの受容を行う主嗅覚系とフェロモン受容を行う鋤鼻(じょび)系がある。嗅覚系神経細胞(嗅神経細胞・鋤鼻神経細胞)は、特定の物質や官能基に反応するセンサーとして機能する。膨大な匂い情報に対応するため、嗅覚系神経細胞は多様な個性を有する細胞集団として産生される。匂い分子を受容する嗅覚受容体(Odorant Receptor: OR)はゲノム上最大の遺伝子ファミリーを形成し、系統学的に魚類から哺乳類に共通して存在する Class I OR と陸棲動物特異的な Class II OR の2つに分類される。一方、フェロモン分子を受容する鋤鼻受容体(VR)は系統学的に OR に類似した V1R と代謝型グルタミン酸受容体に類似した V2R の2つに分類される。

嗅覚系受容体遺伝子は、「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。これまでに申請者は、嗅神経細胞の Class I 系譜と Class II 系譜で OR 遺伝子の発現機構が異なること、Class II OR 遺伝子発現に必要な *cis*-および *trans*-エレメントを決定し、Lhx2 が必須転写因子であることを明らかにするなど、嗅覚受容体遺伝子の発現制御機構の解明に貢献してきた。一方、受容体遺伝子発現に先行する二者択一的運命選択(主嗅覚系では Class I か Class II か、鋤鼻系では V1R か V2R かのクラス選択)の分子機構はほとんど解明されていなかった。申請者は、この問題の解決にも取り組み、免疫系において細胞の運命決定制御を担うジンクフィンガー型転写因子 Bcl11b が、嗅覚系組織に発現していることを見出し、鋤鼻神経系において神経前駆細胞から V1R 系譜および V2R 系譜への分化をそれぞれ正と負に制御していることを明らかにした。同じ嗅原基から発生・分化する嗅神経細胞においても Bcl11b が重要な役割を果たしている可能性は極めて高い。

2. 研究の目的

膨大な匂い情報を感知する嗅神経細胞は、多様な個性を有する細胞集団として産生される。この個性を規定する嗅覚受容体は、ゲノム上最大の遺伝子ファミリーを形成する。嗅覚受容体の遺伝子数は、マウスにおいて約 1000 個にも及ぶ。個々の嗅神経細胞はこの巨大遺伝子レパートリーより1つのみを選択的に発現し、細胞の多様性を創出している。嗅覚受容体は、系統学的に Class I 型と Class II 型の2つに分類される。嗅神経細胞は、その分化過程において Class I 型か Class II 型かの二者択一的なクラス選択をおこない、その決定に従い、対応するクラスの嗅覚受容体レパートリーより、1つの遺伝子を選択し発現するが、その分子機構は明らかになっていない。最近、Class II 嗅神経細胞特異的に発現する転写因子 Bcl11b がこの運命決定を制御していることを示すデータを得た。すなわち、Bcl11b 機能欠失型変異マウスの嗅上皮では、Class I OR 発現細胞数が増加し、Class II OR 発現細胞数は激減していたのである。本研究課題では、Bcl11b による嗅神経細胞の運命選択の制御機構を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 嗅神経細胞の二者択一的運命決定の制御機構の解明

これまでの研究から、Bcl11b 機能欠失型変異マウスの嗅上皮では、Class I OR 発現細胞数が増加し、Class II OR 発現細胞数は激減する。このことから Bcl11b は、Class I OR 遺伝子発現を負に制御する、もしくは Class II OR 遺伝子発現を正に制御する、もしくはその両方の可能性が考えられる。Bcl11b の作用機序を明らかにするために、Bcl11b 機能獲得型変異マウスを作成し、その表現型を解析した。Bcl11b 機能獲得型変異マウスは、嗅神経細胞特異的に組換え酵素 Cre を発現する Goofy-Cre Tg マウスと Cre 依存的に Bcl11b を発現する pCAG-lox-Stop-lox-Bcl11b Tg マウスを掛け合わせることによって作成した。Bcl11b 機能獲得型変異マウス嗅上皮では、本来 Bcl11b を発現しない Class I 嗅神経細胞にも強制的に Bcl11b を発現させることができる。まず、全嗅神経細胞に Bcl11b が発現することを確認し、Bcl11b 機能獲得型変異マウスにおける OR の遺伝子発現を RNA-seq によって網羅的に解析した。

(2) Bcl11b による嗅覚受容体エンハンサー機能の制御

嗅覚受容体の monogenic な遺伝子発現には、グロビン遺伝子の遺伝子座調節領域のような転写調節配列(エンハンサー)が必要とされている。つまり、嗅神経細胞の Class I か Class II かのクラス選択は、エンハンサーの選択とそれに続く単一遺伝子発現によって成立する。

これまでにいくつかの Class II OR 遺伝子のエンハンサーが同定されてきたが、Class I OR 遺伝子のそれは同定されていなかった。我々は、これまでのマウス遺伝学的手法と情報学的解析を組み合わせた研究から、カモノハシからヒトに至る哺乳動物間で高度に保存された Class I OR 遺伝子のエンハンサー候補配列(Jエレメント)を見出した。本研究では、生体における Jエレメントの機能を明らかにするために、ゲノム編集によって Jエレメント欠損マウスを作成し、その機能を明らかにすることとした。さらに、Bcl11b が Jエレメントのエンハンサー活性に及ぼす影響をマウス遺伝学的手法によって解析した。具体的には、Jエレメントによって駆動される遺伝子発現を蛍光タンパク質 gapVenus によって可視化できる J-gapVenus Tg マウスを作成し、Bcl11b 機能獲得型変異マウスにおける Jエレメントのエンハンサー活性を解析した。

(3) 他の化学感覚系(味覚系)における Bcl11b の機能の解明

嗅覚系(主嗅覚系と鋤鼻系)における転写因子 Bcl11b の機能が明らかとなり、同じ化学感覚である味覚系における Bcl11b の機能解明へと研究を進展させた。まず、舌上皮における Bcl11b の発現解析を *in situ hybridization* 法および免疫組織化学手法によって解析した。さらに味覚系における Bcl11b 機能を明らかにするために、Bcl11b 機能欠失型変異マウスの舌上皮ならびに軟口蓋の表現型解析をおこなった。

4. 研究成果

(1) 嗅神経細胞の二者択一的運命決定の制御機構の解明

Bcl11b 機能獲得型変異マウス嗅上皮における嗅覚受容体遺伝子発現を RNA-seq によって網羅的に解析した結果、Class I OR の遺伝子発現が有意に減少していた。一方、Class II OR 遺伝子発現には顕著な変化は見られなかった。また、*in situ hybridization* 法を用いた OR 発現細胞数の定量結果からも同様の結果が得られた。これらの結果から、Bcl11b は、Class I OR 遺伝子発現を負に制御していることが明らかとなった。

(2) Bcl11b による嗅覚受容体エンハンサー機能の制御

CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集によって J エlement 欠損マウスの作成に成功した。J エlement 欠損マウスでは、129 個の機能的 Class I OR 遺伝子のうち 78 個の遺伝子発現が有意に減少し、その他のほとんどの遺伝子も 1 つの例外をのぞき減少傾向にあった。また、興味深いことに J エlement の作用範囲は、ゲノム上約 3 Mb 離れた Class I OR 遺伝子にも及んでいた。この結果、J エlement は Class I OR クラスター全体を制御しており、制御する遺伝子数とゲノム上の作用距離の両方において、これまでに例をみない規模で遺伝子発現を制御するエンハンサーであることが明らかとなった。

(1) の結果から、Bcl11b は Class I OR 遺伝子発現を負に制御する。この制御機構として、Bcl11b が J エlement のエンハンサー活性を負に制御すること、一括して Class I OR 遺伝子発現を抑制するモデルが考えられた。この仮説を検証するために、Bcl11b 機能獲得型変異マウスにおける J エlement のエンハンサー活性を解析した。その結果、J エlement のエンハンサー活性は Bcl11b 存在下で負に制御されること、逆に Bcl11b 非存在下では活性化状態であることが明らかとなった。以上の結果から、我々は Class I デフォルトモデルを提唱した。すなわち Bcl11b 非存在下(デフォルト)では、J エlement のエンハンサー活性が On の状態にあり、Class I OR が優先的に嗅神経細胞に発現する。Bcl11b 存在下では J エlement のエンハンサー活性が抑制され、Class II OR の選択が許容されることで、Class II OR 遺伝子が発現するモデルである。

進化の過程において、動物は陸棲化に伴って陸棲動物特異的な Class II OR 遺伝子の数を爆発的に増やしてきた。これによって嗅神経細胞は、Class I 型か Class II 型のどちらかを選択する必要性が出てくることから、Bcl11b による OR のクラス選択の制御機構は、陸棲進化によって獲得した可能性が考えられる。この仮説を検証するために、個体の一生で水棲から陸棲へと生活環境を変える両生類のカエルに着目した。カエル(*X. tropicalis*)のゲノムを調べると、Bcl11b のオルソログが存在し、マウス Bcl11b タンパク質と比べて機能ドメインがよく保存されていることが分かった。水中で生活するオタマジャクシの鼻には水棲型の Class I OR のみが発現しており、成体のカエルの鼻では水に浸かっている部分(water nose) Class I OR が、空中に出ている部分(air nose)に陸棲型の Class II OR がそれぞれ発現している。カエルの発生過程における Bcl11b の発現パターンを解析したところ、水中で生活するオタマジャクシの嗅神経細胞では Bcl11b は発現しておらず、変態期になって初めて将来 air nose となる部分に Bcl11b が発現し始めること、さらに成体のカエルではマウスと同様に、air nose のクラス II 嗅神経細胞に Bcl11b が特異的に発現していることがわかった。これらの結果は、発生過程で水棲から陸棲へと生息環境が変化するカエルにおいても Bcl11b が OR のクラス選択を制御していると考えられ、転写因子 Bcl11b が嗅覚の陸棲適応に深く関わっている可能性を示唆している。

(3) 味覚系における Bcl11b の機能の解明

味覚系における Bcl11b の発現解析の結果、Bcl11b は味覚器である舌および軟口蓋の上皮基底細胞に発現していた。Bcl11b 機能欠失型変異マウスの表現型解析の結果、味を感知する味細胞の産生に異常は認められなかったが、舌乳頭、中でも角化上皮である糸状乳頭の形成不全が顕著であった。これらの結果は、嗅覚系とは異なり、味覚系では Bcl11b は感覚細胞の産生・分化には関与しないものの、角化上皮細胞への分化に関与し、乳頭形成において重要な役割を持つことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 岩田哲郎、廣田順二	4. 巻 76(3)
2. 論文標題 ゲノム最大級の巨大遺伝子クラスターを制御するゲノム領域の発見	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 232-233
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 岩田哲郎、廣田順二	4. 巻 19(2)
2. 論文標題 匂い受容体遺伝子の新たな発現制御領域の発見	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 アロマリサーチ	6. 最初と最後の頁 32-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iwata Tetsuo, Niimura Yoshihito, Kobayashi Chizuru, Shirakawa Daichi, Suzuki Hikoyu, Enomoto Takayuki, Touhara Kazushige, Yoshihara Yoshihiro, Hirota Junji	4. 巻 8
2. 論文標題 A long-range cis-regulatory element for class I odorant receptor genes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1 - 12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-017-00870-4	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 Yamashita Junpei, Ohmoto Makoto, Yamaguchi Tatsuya, Matsumoto Ichiro, Hirota Junji	4. 巻 12
2. 論文標題 Skn-1a/Pou2f3 functions as a master regulator to generate Trpm5-expressing chemosensory cells in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1 - 14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0189340	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

1. 著者名 Yugo Nishiguchi, Makoto Ohmoto, Jun Koki, Takayuki Enomoto, Ryo Kominami, Ichiro Matsumoto, Junji Hirota	4. 巻 416
2. 論文標題 Bcl11b/Ctip2 is required for development of lingual papillae in mice	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 98 - 110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2016.06.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計24件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Junji Hirota
2. 発表標題 Molecular mechanism of odorant receptor class choice in mice
3. 学会等名 The 17th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 猪爪舞花、岩田哲郎、Saiku Daniel、齋藤真人、飯塚遥香、小澤悠太、永嶌鮎美、廣田順二
2. 発表標題 嗅覚受容体遺伝子発現における転写因子Ldb1の機能解析
3. 学会等名 日本味と匂学会第52回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柏木貴裕、榎本孝幸、岩田哲郎、廣田順二
2. 発表標題 転写因子Bcl11bによる嗅神経細胞の二者択一的運命決定の制御機構の解明
3. 学会等名 日本味と匂学会第52回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 留岡諭志、岩田哲郎、廣田順二
2. 発表標題 Class I 嗅覚受容体遺伝子の転写調節領域の機能解析
3. 学会等名 日本味と匂学会第52回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩田哲郎、新村芳人、小林千鶴、白川大地、鈴木彦有、榎本孝幸、東原和成、吉原良浩、廣田順
2. 発表標題 嗅覚受容体巨大遺伝子クラスターを制御する長距離シスエレメント
3. 学会等名 日本遺伝学会第90回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tetsuo Iwata, Yoshihito Niimura, Chizuru Kobayashi, Daichi Shirakawa, Hikoyu Suzuki, Takayuki Enomoto, Kazushige Touhara, Yoshihiro Yoshihara Junji Hirota
2. 発表標題 An extraordinary long-range cis-regulatory element for class I odorant receptor genes
3. 学会等名 ゲノム編集学会第3回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩田哲郎、留岡諭志、廣田順二
2. 発表標題 Class I 嗅覚受容体遺伝子転写調節領域の機能解析
3. 学会等名 第6回ケモビ研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	榎本孝幸、西田秀史、岩田哲郎中山叶子、藤田暁登、柏木貴裕、畠中靖恵、梶谷嶺、伊藤武彦、應本真、松本一朗、廣田順二
2. 発表標題	Bcl11bは2種類の嗅神経細胞の運命選択を支配する
3. 学会等名	第40回日本神経科学大会
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	白川大地、小林千鶴、岩田哲郎、廣田順二
2. 発表標題	嗅覚受容体遺伝子発現における転写因子Ssbp2の機能解析
3. 学会等名	日本味と匂学会第51回大会
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	山下純平、應本真、山口達也、松本一朗、廣田順二
2. 発表標題	Trpm5陽性化学感覚細胞における転写因子Pou2f3/Skn-1aの機能解析
3. 学会等名	日本味と匂学会第51回大会
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	岩田哲郎、新村芳人、小林千鶴、白川大地、鈴木彦有、榎本孝幸、東原和成、吉原良浩、廣田順二
2. 発表標題	Class I嗅覚受容体遺伝子の長距離シスエレメントの同定
3. 学会等名	日本味と匂学会第51回大会
4. 発表年	2017年

1. 発表者名 Junpei Yamashita, Makoto Ohmoto, Tatsuya Yamaguchi, Ichiro Matsumoto, Junji Hirota
2. 発表標題 Skn-1a/Pou2f3 functions as a master regulator to generate Trpm5-expressing chemosensory cells in mice
3. 学会等名 16th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 廣田順二
2. 発表標題 Class II嗅覚受容体遺伝子発現制御
3. 学会等名 第5回ケモビ研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 猪爪舞花、廣田順二
2. 発表標題 Class II嗅覚受容体発現におけるLhx2転写因子複合体の機能
3. 学会等名 第5回ケモビ研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩田哲郎、廣田順二
2. 発表標題 Class I嗅覚受容体遺伝子発現制御
3. 学会等名 第5回ケモビ研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 留岡諭志、岩田哲郎、廣田順二
2. 発表標題 Class I嗅覚受容体遺伝子の長距離シスエレメントの同定
3. 学会等名 第5回ケモビ研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山下純平、廣田順二
2. 発表標題 6)Trpm5陽性化学感覚細胞における転写因子Skn-1aの機能
3. 学会等名 第5回ケモビ研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Junji Hirota
2. 発表標題 The fate choice of olfactory sensory neurons in mice
3. 学会等名 "Olfaction: from Chemosensory Signals to the Brain", ISOT2016 Satellite Meeting (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Kanako Nakayama, Hikoyu Suzuki, Masato Nikaido, Takayuki Enomoto, Junji Hirota
2. 発表標題 Expression analysis of Bcl11b in Xenopus tropicalis olfactory epithelium
3. 学会等名 The 17th International Symposium on Olfaction and Taste (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Tetsuo Iwata, Shinya Kaneko, Takafumi Ogawa, Chizuru Kobayashi, Yuh Shiwa, Takayuki Enomoto, Hirofumi Yoshikawa, Junji Hirota
2. 発表標題 Studies on the cis-element for mouse class I odorant receptor genes using the Bacillus subtilis genome vector
3. 学会等名 The 17th International Symposium on Olfaction and Taste (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Chizuru Kobayashi, Tetsuo Iwata, Niles Galjart, Junji Hirota
2. 発表標題 Functional analysis of CTCF in odorant receptor gene expression in mice
3. 学会等名 The 17th International Symposium on Olfaction and Taste (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Takayuki Enomoto, Hidefumi Nishida, Tetsuo Iwata, Kanako Nakayama, Akito Fujita, Takahiro Kashiwagi, Rei Kajitani, Takehiko Ito, Makoto Ohmoto, Ichiro Matsumoto, and Junji Hirota
2. 発表標題 Bcl11b Governs the Binary Fate of Olfactory Sensory Neurons
3. 学会等名 The 14th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 岩田哲郎、廣田順二
2. 発表標題 嗅覚受容体遺伝子発現制御と陸棲適応
3. 学会等名 第4回ケモビ研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 榎本孝幸、廣田順二
2. 発表標題 嗅神経細胞分化の遺伝学的操作による本能的な忌避行動の制御
3. 学会等名 第4回ケモビ研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>超巨大遺伝子群を制御するゲノム領域を発見 匂い受容体の遺伝子進化の謎の解明へ https://www.titech.ac.jp/news/2017/039272.html Pioneering Discovery of an Odor-detecting Rec... https://www.titech.ac.jp/english/news/2017/039367.html 体を外敵から守る化学感覚細胞のマスター因子を同定 舌だけではない！全身の味細胞の機能解明へ https://www.titech.ac.jp/news/2017/039980.html A whole-body approach to understanding chemo... https://www.titech.ac.jp/english/news/2017/040087.html</p>

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