

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K14932

研究課題名(和文)水棲型嗅覚受容体巨大遺伝子クラスターを支配する発現制御領域の解析

研究課題名(英文)Studies on the cis-element for mouse class I odorant receptor genes

研究代表者

岩田 哲郎(Iwata, Tetsuo)

東京工業大学・技術部・技術職員

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する嗅覚受容体は、系統的にClass IとClass IIに分類される。Class I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特徴的なファミリーである。嗅神経細胞における1細胞-1受容体ルールから、Class I遺伝子クラスターを支配する共通の発現制御領域の存在が推定されているが、同定には至っていなかった。本研究課題では、マウス遺伝学的手法や情報学的解析により、Class I遺伝子クラスターを制御する新たな嗅覚受容体遺伝子発現制御領域(Jエレメント)の同定に成功し、エンハンサーを介した嗅覚受容体遺伝子の発現制御モデルを提唱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、クラス I 嗅覚受容体遺伝子を制御するエンハンサーを初めて明らかにした。このエンハンサーはマウス以外の哺乳動物間でも高度に保存されており、クラス I 遺伝子クラスター全体を制御し、制御する遺伝子の数とゲノム上の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していることが明らかになった。この“超”長距離作用性のエンハンサーの発見は、嗅覚受容体の遺伝子進化の謎を解く重要な手掛かりになると期待される。

研究成果の概要(英文): Individual olfactory sensory neurons express a single odorant receptor gene from either class I genes residing in a single cluster on a single chromosome or class II genes spread over multiple clusters on multiple chromosomes. In this study, we identify an enhancer element for mouse class I genes. The J element regulates most class I genes expression by exerting an effect over ~3 megabases within the whole cluster. Deletion of the trans J element increases the expression frequencies of class I genes from the intact J allele, indicating that the allelic exclusion of class I genes depends on the activity of the J element. Our data reveal a long-range cis-regulatory element that governs the singular class I gene expression and has been phylogenetically preserved to retain a single cluster organization of class I genes in mammals.

研究分野：神経科学

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

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 嗅覚は外界の化学物質を検知し、食物探索・危機回避・生殖などの個体生存に必須の行動を誘導する。多様な匂い情報に対応するため、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、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。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、個々の嗅神経細胞に「個性」を付与し、受容体の数と相まって膨大な匂い情報の識別を可能にしている。近年、エピジェネティック修飾を基とした発現制御機構が提唱されてきているが、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基盤は未解明のままである。

Class II 嗅覚受容体は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。これまでに Class II 嗅覚受容体遺伝子発現に必要なエンハンサー領域がいくつか同定されている (Serizawa *et al.* *Science* 2003, Markenscoff-Papadimitriou *et al.* *Cell* 2014)。一方、Class I 嗅覚受容体遺伝子は 1 つの染色体上に単一のクラスターを形成して存在する。動物種間で広範なシンテニー (遺伝子位置の相同性) を確認することができる。進化の過程で Class I 嗅覚受容体が単一クラスター内に留まり続けていることから、共通のエンハンサーが全ての Class I 嗅覚受容体遺伝子の発現を制御するモデルが考えられるが、Class I 嗅覚受容体遺伝子の発現制御領域は明らかにされていない。

(2) 研究代表者は、枯草菌ゲノム (BGM) ベクターを用いた新たなトランスジェネシス法によって、初めてマウス Class I 嗅覚受容体遺伝子の発現制御領域の存在を実験的に証明した (Iwata *et al.* *BMC Genomics* 2013)。さらにゲノム比較解析などにより、この領域には、動物種間で高度に保存される約 2 kb の領域『J エlement』とそれを挟む 2 つの既知転写因子結合モチーフが存在することを見出した (図 1)。しかし、これらの配列の機能や、約 130 個もある Class I 遺伝子のへの寄与は明らかにされていなかった。

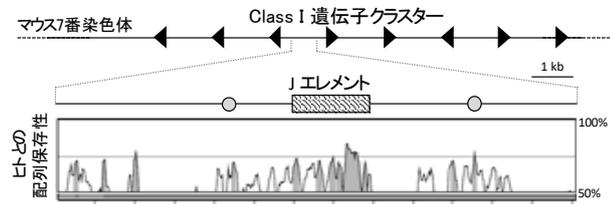


図 1. BGM トランスジェネシス法により明らかにされた

2. 研究の目的

本研究では、約 300 万塩基対 (Mb) のマウス Class I 嗅覚受容体巨大遺伝子クラスターを統制する発現制御領域の同定し、Class I 嗅覚受容体ファミリーの遺伝子選択・制御機構を明らかにすることを目的とする。特に、Class II 遺伝子と異なり Class I 遺伝子には、広範な生物種での進化的保存性や染色体上の遺伝子分布の点から特徴的な性質があることから、発現制御領域 (シスエレメント) と発現制御因子 (転写因子) の両観点から Class I 嗅覚受容体遺伝子発現機構を明らかにするため、以下の 3 つの解析を実施する。

- (1) トランスジェネシスによる発現制御領域の機能解析
- (2) ノックアウトマウスによるエンハンサー領域の同定と機能解析
- (3) 候補転写因子の Class I 遺伝子発現への寄与の解析

3. 研究の方法

3 つの各解析において、それぞれ次に示すような種々の遺伝子改変マウスを作出した。作出したマウスを用いて、分子生物学的手法や組織化学的手法などにより、嗅覚組織 (嗅上皮および嗅球) における発現パターン解析や網羅的遺伝子発現解析を実施した。

(1) 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、実験的に発現制御領域を証明した 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。これらのトランスジーンを用いてトランスジェニックマウスを作出し、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) ゲノム編集ツール CRISPR-Cas9 システムを用いて、エンハンサー活性が認められた J エlement の欠失変異マウスを作出した。J エlement 欠失変異マウスにおける嗅覚受容体発現変化を、組織学的解析および DNA マイクロアレイ解析により明らかにした。

(3) J エlement を挟むように結合することが推定された候補転写因子の 1 つについて、嗅覚系特異的ノックアウトマウス (cKO) を作製し、嗅覚受容体遺伝子発現解析を実施した。cKO マウスは、嗅神経細胞特異的 Goofy プロモーター (Kaneko-Goto *et al.* *J. Neurosci.* 2013) の下流に Cre 組換え酵素コード配列を組み込んだトランスジェニックマウスと、候補転写因子のコード配列が 2 つの loxP により挟まれた flox マウスを交配させることにより作出した。

4. 研究成果

(1) トランスジェネシスによる発現制御領域の機能解析

トランスジェニックマウスを用いた機能解析の結果、先行研究において絞り込まれた発現制御候補領域全長 (13 kb) および J エLEMENTのみ含む断片 (3.8 kb) を有する両トランスジェニックマウスにおいて、Class I 遺伝子を発現する嗅神経細胞が存在するパターンと同様に、嗅上皮の背側領域と嗅球の背側領域においてレポーター遺伝子 (gapVenus) の蛍光が認められた (図2)。すなわち、J エLEMENTは嗅神経細胞特異的に Class I 遺伝子発現を駆動するエンハンサー活性を有することが明らかとなった。

さらに、様々な動物種のゲノム比較による塩基配列の保存性解析の結果、J エLEMENTはヒトやイヌなどの有胎盤類だけでなく、カモノハシ (単孔類) や3種の有袋類を含め、調べた哺乳動物すべてで保存されていた。非遺伝子領域にも関わらず多種生物種において塩基配列が保存されていることは、その機能的な重要性を示唆している。



図2. J エLEMENTを含むトランスジーンが発現パターン

(2) ノックアウトマウスによるエンハンサー領域の同定と機能解析

J エLEMENTの生体内での機能を明らかにするため、ゲノム編集技術 (CRISPR-Cas9) を用いて J エLEMENT欠失変異マウスを作出した。DNA マイクロアレイにより嗅覚受容体遺伝子発現変化を網羅的に解析したところ、J エLEMENT欠失マウスでは、75 個もの Class I 遺伝子の発現が減少しており、その影響は遺伝子クラスター全体に及んでいた (図3)。さらに、Class II 遺伝子では優位に変化した遺伝子が認められないこと、および J エLEMENT欠失マウスにおける Class I 遺伝子の発現量変化と嗅上皮における各 Class I 遺伝子発現細胞数変化が相関することから、J エLEMENTは Class I 遺伝子特異的に遺伝子選択頻度を制御していることが明らかになった。

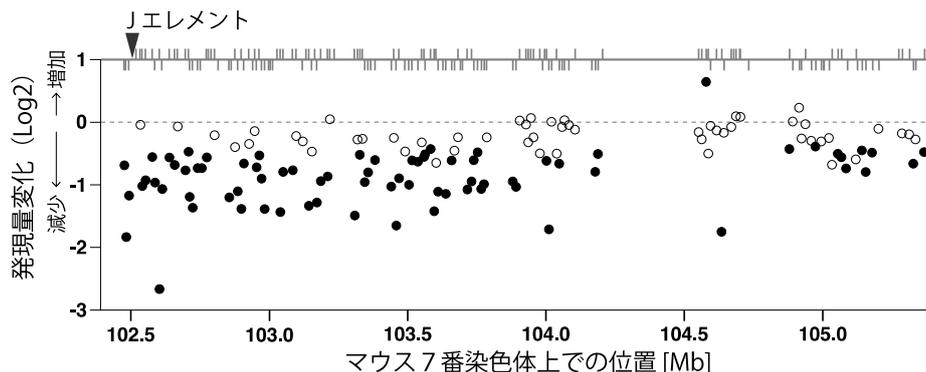


図3. J エLEMENT欠失マウスにおける Class I 遺伝子の発現量変化

プロット上段の縦棒は 129 個の Class I 嗅覚受容体遺伝子の位置を示し、各点はそれぞれの遺伝子の発現量変化を示す (●は統計的に有意に変化したもの、○は変化なし)。J エLEMENTは遺伝子クラスターの左端の方に位置している (三角)。点線よりも下段は J エLEMENT欠失マウスにおいて減少、上段は増加傾向であることを示す。

遺伝子クラスターの発現制御領域として代表的な β グロビン遺伝子座調節領域 (LCR) が約 60 kb の範囲にある 5 個の遺伝子を、Class II 嗅覚受容体遺伝子エンハンサーが約 200 kb の範囲にある 7~10 個の遺伝子を制御していることと比較すると、J エLEMENTがこれまでにない規模で遺伝子発現を制御していることが分かる (図4)。また J エLEMENTは、これまでに報告されただのエンハンサーよりも制御する遺伝子数ならびに作用範囲が最大であった。Class I 遺伝子は、J エLEMENTの制御の範囲内に留まることでしか機能できず、このことが進化の過程で Class I 遺伝子が単一の遺伝子クラスターに留まり続けた要因になっていると考えられた。

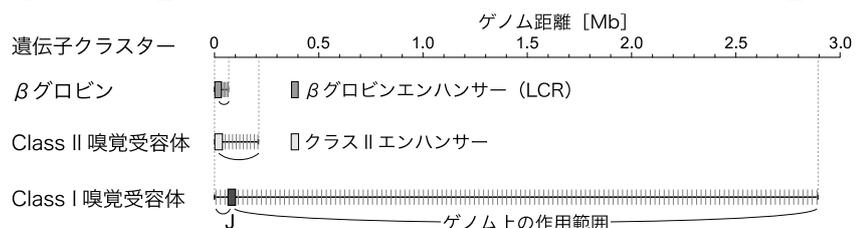


図4. 遺伝子クラスターを制御するエンハンサーの作用距離の比較

(3) 候補転写因子の Class I 遺伝子発現への寄与の解析

本研究では、J エLEMENT近傍に認められた結合モチーフに着目し、このモチーフに結合する転写因子の cKO マウスを解析することによって、Class I 遺伝子発現に特異的に寄与する転写因

子の同定も試みた。作出した cKO マウスにおいて網羅的遺伝子解析をおこなったところ、Class I 遺伝子については増加傾向、Class II 遺伝子については減少傾向が認められた。しかし、その影響は J エlement 欠失と比較するとあまり大きいものではなく、今回着目した転写因子は嗅覚受容体遺伝子発現に必須ではないと考えられた。現在のところ、Class I 遺伝子発現制御に特異的な転写因子は明らかになっていない。本研究における J エlement の同定によって、Class I 嗅覚受容体遺伝子の発現制御メカニズムの全容解明に向けてさらなる進展が期待される。

以上の研究成果によって、本研究では初めて Class I 遺伝子を制御するエンハンサーの機能解析を実施するに至ったが、その過程で嗅覚受容体の遺伝子発現メカニズムに新たな知見が得られた。これまで嗅覚受容体遺伝子の発現メカニズムとして、確率的に1つの遺伝子が直接選択されるモデルが提唱されている。従来のモデルが正しいとすると、対立遺伝子の片方の J エlement を欠失したヘテロ欠失マウスでは、1つの遺伝子が選択されたとしても機能できるエンハンサーが2つから1つになったため、Class I 遺伝子の発現数は半減すると予想された。しかし予想に反して、J エlement ヘテロ欠失マウスでは Class I 遺伝子の発現数は半減せず、正常なマウスに近い発現を示した。これは、片側のエンハンサーを欠失しても、もう一方の正常なエンハンサーが遺伝子発現を補填したことを示している。このことは、遺伝子本体の選択より先に機能的なエンハンサーの選択が先行することに他ならない。以上のことから、嗅覚受容体遺伝子発現のメカニズムとして、単一の遺伝子選択の前にエンハンサーが選択され、続いて選択されたエンハンサーの制御下にある嗅覚受容体遺伝子が1つ選択されるという新たなモデル(図5)を提唱した。

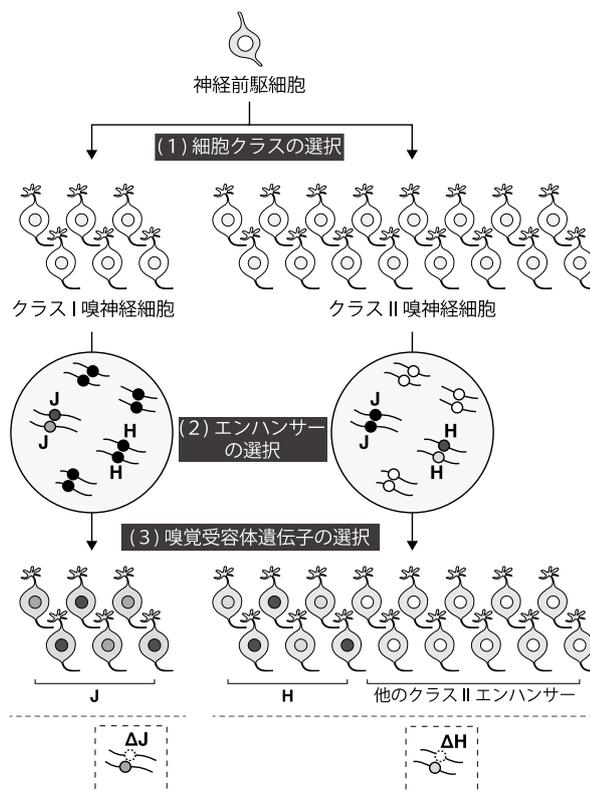


図5. 嗅神経細胞における嗅覚受容体遺伝子選択モデル

(1) 神経前駆細胞から2つの細胞タイプが産生される。(2) Class I タイプでは主に J エlement が、Class II タイプでは多数の Class II エンハンサー配列から1つ(例: H エlement)が選択される。(3) 選択されたエンハンサーの制御下にある1つの嗅覚受容体遺伝子が選択され発現する。対立遺伝子座の片方のエンハンサーが欠失すると、決められた細胞集団を埋めるため他のエンハンサーが選択される(点線下段、J 欠失(ΔJ)もしくは H 欠失(ΔH))。Class I タイプでは対立遺伝子座の J が優先して選択されるが、Class II タイプでは残りからランダムに選択されるため H を選択するものは見かけ上約半数となる。

<引用文献>

Iwata T, Kaneko S, Shiwa Y, Enomoto T, Yoshikawa H, Hirota J. "Bacillus subtilis genome vector-based complete manipulation and reconstruction of genomic DNA for mouse transgenesis." *BMC Genomics*. (2013) 14:300

Kaneko-Goto T, Sato Y, Katada S, Kinameri E, Yoshihara S, Nishiyori A, Kimura M, Fujita H, Touhara K, Reed R, Yoshihara Y. "Goofy coordinates the acuity of olfactory signaling." *J. Neurosci.* (2013) 33(32), 12987-12996

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3件（うち査読付論文 3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 Suzuki Hikoyu, Nishida Hidefumi, Kondo Hiro, Yoda Ryota, Iwata Tetsuo, Nakayama Kanako, Enomoto Takayuki, Wu Jiaqi, Moriya-Ito Keiko, Miyazaki Masao, Wakabayashi Yoshihiro, Kishida Takushi, Okabe Masataka, Suzuki Yutaka, Ito Takehiko, Hirota Junji, Nikaido Masato	4. 巻 35
2. 論文標題 A single pheromone receptor gene conserved across 400 million years of vertebrate evolution	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Biology and Evolution	6. 最初と最後の頁 2928-2939
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/molbev/msy186	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 -

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 885
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 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10件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

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 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 ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 猪爪舞花、岩田哲郎、Saiku Daniel、斎藤真人、飯塚遥香、小澤悠太、永島鮎美、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 近藤宏、岩田哲郎、鈴木彦有、永島鮎美、二階堂雅人、廣田順二
2. 発表標題 新規フェロモン受容体候補分子 ancV1R の機能解明
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 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 日本ゲノム編集学会 第3回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩田哲郎、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 岩田哲郎
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 榎本孝幸、西田秀史、岩田哲郎、中山叶子、藤田暁人、柏木貴裕、畠中靖恵、梶谷嶺、伊藤武彦、鷹本真、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 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〕

<p>プレスリリース (超巨大遺伝子群を制御するゲノム領域を発見) https://www.titech.ac.jp/news/2017/039272.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
研究協力者	廣田 順二 (Hirota Junji)		