

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840085

研究課題名(和文) 嗅神経細胞の分化・運命決定機構における転写因子Bcl11bの機能

研究課題名(英文) A role of Bcl11b in the development of olfactory sensory neurons

研究代表者

榎本 孝幸 (Enomoto, Takayuki)

東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・東工大特別研究員

研究者番号：70635680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：食物や危険物等に由来する匂い分子は鼻腔内に存在する嗅神経細胞によって検出される。嗅神経細胞は外環境からの膨大な種類の匂い分子に対応するために多様な個性を持つ細胞集団として産生されるが、その産生制御メカニズムはよく解っていない。本研究によって、転写因子をコードする“Bcl11b遺伝子”が嗅神経細胞の産生制御メカニズムの一端を司ることが明らかとなった。モデル生物としてマウスを用いてBcl11bの機能を調べた結果、Bcl11bが大きく2種類に分かれる嗅神経細胞の片方の細胞集団にのみ発現し、どちらの細胞に分化するのか方向性を制御することによって、嗅神経細胞の産生に寄与していることを解明した。

研究成果の概要(英文)：Olfactory sensory neurons (OSNs) detect a vast number of odorous chemicals from the external environment. Each OSN has distinct characteristics by choosing only one from the repertoire of odorant receptor (OR) genes. However, the molecular mechanism underlying the characterization of OSNs is not well understood. In this study, we show that a zinc finger transcription factor Bcl11b is a key regulator for the cell-fate determination of OSNs. In the mouse, OR genes are classified into two groups, class and class . During the development of OSNs, an individual OSN is fated to express a single OR gene from either class or class OR repertoires. We found that Bcl11b is predominantly expressed in class OSNs. Loss of Bcl11b function resulted in a severe reduction of class OSNs, instead in an increase and expansion of class OSNs. Gain of Bcl11b function mutation decreased class OSN population and increased class . Thus, Bcl11b controls the alternative OSN-fates.

研究分野：神経科学

キーワード：細胞分化 転写因子 嗅覚 遺伝子発現制御 細胞運命決定 マウス遺伝学 感覚神経 神経接続

1. 研究開始当初の背景

嗅覚は、食物の探索、天敵などからの危険の回避、生殖行動、仲間とのコミュニケーションといった個体の生存や種の保存において、重要な役割を担っている。マウスでは、食物・危険物・他個体由来する膨大な数の匂い分子は、主に鼻腔内の嗅上皮にある嗅神経細胞によって検出される(図1A)。それぞれの嗅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ため、嗅神経細胞は膨大な数の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(OR)は、系統学的にclass I ORとclass II ORの2つに分類される。嗅上皮にある個々の嗅神経細胞は、class Iとclass IIの2つの細胞系譜のいずれかの運命を選択した後、決められた遺伝子レパートリーから1つのOR遺伝子を選択的に発現することで嗅神経細胞の多様性が産生されると考えられている(図1B)。しかしながら、これまで一連の多様性産生の分子機構は明らかになっていなかった。

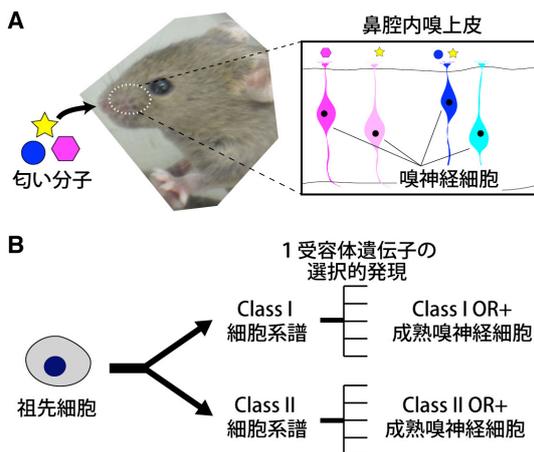


図1 マウス嗅覚系の模式図 (A) 外環境からの匂い分子は、鼻腔内嗅上皮にある嗅神経細胞によって検出されている。(B) 嗅神経細胞の分化過程。共通の祖先細胞から、class I系譜とclass II系譜に嗅神経細胞の運命が分岐する。

近年、ジンクフィンガー型転写因子 Bcl11b は様々な組織において、細胞の運命決定制御に重要な役割を担っていることが次々と明らかとなりつつある。特に、免疫系細胞の分化過程において Bcl11b が T 細胞系譜への運命決定の“鍵”となる機能を持っている。免疫系細胞と嗅覚系細胞の間には、1細胞1受容体といった受容体遺伝子の発現様式や、MHC ペプチドを検出する機能を有するなどの類似性が認められることから、両システムの細胞分化においても Bcl11b が関与する分子機構に何らかの共通項が存在する可能性を考え、本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究で着目している転写因子 Bcl11b をコードしている遺伝子は、マウス胎生期の嗅上皮において強く発現していることが報告されている (Leid et al., 2004)。しかしながら、嗅神経細胞の分化過程において Bcl11b がどのような役割を担っているのか、免疫系と同様に細胞の運命決定制御に関わっているのか分かっていない。そこで、嗅神経細胞の分化における転写因子 Bcl11b の機能を明らかにするために、以下の2つの解析を行う。(1) Bcl11b の機能欠損型および、機能獲得型変異マウスの表現型解析 (2) 嗅神経細胞における Bcl11b の制御する下流遺伝子の解析

3. 研究の方法

(1) Bcl11b の機能欠損型および、機能獲得型変異マウスの表現型解析

生体内において転写因子 Bcl11b が嗅神経細胞の分化にどのような役割を担っているのか、また嗅神経細胞自律的/非自律的な作用を明らかにするために、① Bcl11b 機能欠失変異マウスならびに、② Bcl11b 機能獲得変異マウス、③ 嗅神経細胞特異的機能欠失変異マウスを作成し、それらの嗅覚系における表現型解析を行った。嗅神経細胞の分化や系譜選択を明らかにするためには、class I 型とclass II 型のそれぞれの系譜特異的な受容体遺伝子の発現を *in situ* hybridization 法によって解析した。

以下に解析する変異マウスを記述する。

- ① Bcl11b 機能欠失変異マウスは *Bcl11b* 遺伝子を破壊した既報の変異マウス (Wakabayashi et al., 2003) を用いた。
- ② Bcl11b 機能獲得変異マウスでは、嗅神経細胞特異的 Cre 発現トランスジェニックマウス (Kaneno-Goto et al., 2013) と、新たに作成した CAG プロモータの下流に *loxP-STOP-loxP-Bcl11b* を組み込んだトランスジェニックマウスとの交配によって、嗅神経細胞で Bcl11b を強制的に発現させた (図 2A)。
- ③ 嗅神経細胞特異的 Bcl11b 機能欠失変異マウスでは、嗅神経細胞特異的 Cre 発現トランスジェニックマウスと、*Bcl11b* 遺伝子に loxP 配列を組み込んだ遺伝子改変マウスとの交配によって、嗅神経細胞特異的に *Bcl11b* 遺伝子を破壊した (図 2B)。

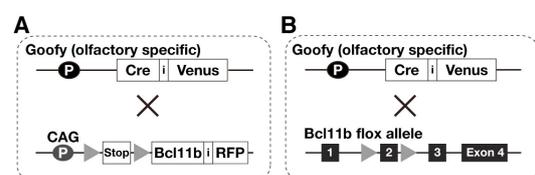


図2 機能獲得変異マウス (A) と、嗅神経細胞特異的機能欠失変異マウス (B) が有する変異遺伝子コンストラクト

(2) 嗅神経細胞におけるBcl11bの制御する下流遺伝子の解析

転写因子であるBcl11bが発現制御する遺伝子を同定することは、Bcl11bの作用機構を解明するために重要となる。そこでBcl11bの機能欠失型変異によって変化するBcl11bの下流に位置する遺伝子群をマイクロアレイ解析によって同定することによって、Bcl11bが直接的／間接的に発現を制御する遺伝子群を明らかにした。

Bcl11bは標的遺伝子の発現制御領域にクロマチンリモデリング複合体をリクルートすることによって、クロマチン構造を変化させその遺伝子発現を制御すると考えられている。嗅神経細胞においてもエピジェネティックな分化プログラムが関与していることが示唆されており、下流遺伝子群のゲノム領域周辺のクロマチン状態を解析することによって、Bcl11bによる遺伝子発現制御機構の解明を目指す。

4. 研究成果

(1) Bcl11b の機能欠損型および、機能獲得型変異マウスの表現型解析

① Bcl11b 機能欠失変異マウスを用いた Bcl11b の機能解析：

Bcl11b 遺伝子がマウス胎生期の嗅上皮において強く発現していることが報告されているが、どの細胞種で、どの分化段階で発現しているのか明らかではない。そこでまず、*in situ* hybridization と免疫組織化学を組み合わせた 2 色法によって Bcl11b 発現細胞の同定を行った。嗅神経細胞の系譜を *class I OR* 遺伝子と *class II OR* 遺伝子によって可視化し Bcl11b との共発現を調べた結果、Bcl11b は *class II OR* 遺伝子と優位に共発現し、*class I OR* 遺伝子とはほとんど共発現していなかった。このことから、Bcl11b が *class II* 型嗅神経細胞で系譜特異的な役割を担っていることが示唆された。

次に、2 種類の嗅神経細胞の系譜選択における Bcl11b の機能を調べるために、*Bcl11b* 遺伝子欠損マウス嗅覚系における表現型解析を行った。それぞれの嗅神経細胞の産生状態を *class I OR* 遺伝子と *class II OR* 遺伝子の発現を指標に解析した。その結果、*Bcl11b* 遺伝子欠損マウスでは *class I OR* 発現細胞が顕著に増加し、*class II OR* 発現細胞が減少していることが分かった。以上の機能欠損解析の結果から、Bcl11b が *class I OR* 遺伝子の発現を抑制するもしくは、*class II OR* 遺伝子の発現を促進する役割を持つことが明らかとなった。

② Bcl11b 機能獲得解析：

上記機能欠損解析の結果を確かめるために、本来 *Bcl11b* 遺伝子を発現しない *class I* 型嗅神経細胞にも強制的に Bcl11b を発現させる機能獲得変異マウス（研究の方法参照）を作成し、解析した。*Bcl11b* 遺伝子欠損マウスの解析と同様に、*class I OR* と、*class II OR* 遺伝子の発現を解析したところ、機能獲得変異マウスでは *class I OR* 発現細胞が激減し、*class II OR* 発現細胞数はコントロールとの有意差は認められなかった。以上の機能獲得解析の結果から、少なくとも Bcl11b が *class I OR* 遺伝子の発現を抑制する機能を持っていることが確かめられた。

③ 嗅神経細胞特異的機能欠失解析：

Bcl11b 遺伝子は嗅神経細胞とその軸索投射先の脳（嗅球）等様々な細胞種で発現しているため、機能欠損解析の結果が Bcl11b の細胞自律的な作用なのか、非自律的な作用なのか分からない。そこで、嗅神経細胞特異的に *Bcl11b* 遺伝子を欠損させたコンディショナルノックアウトマウス（研究の方法参照）を作成し、解析した。嗅神経細胞特異的 *Bcl11b* 遺伝子欠損マウス嗅上皮では、コンベンショナル *Bcl11b* 遺伝子欠損マウスの解析結果と同様に、*class I OR* 発現細胞が顕著に増加し、*class II OR* 発現細胞が減少していた。このことから、Bcl11b による発現する OR のクラス選択の制御は細胞自律的な作用によることが明らかとなった。さらに、嗅神経細胞特異的 *Bcl11b* 遺伝子欠損マウスでは、嗅神経細胞の分化過程において神経細胞に分化後に *Bcl11b* 遺伝子が破壊される。このことから、Bcl11b による OR クラス選択の制御は神経細胞へ分化後にも作用することが示唆された。

(2) 嗅神経細胞における Bcl11b の制御する下流遺伝子の解析

転写因子 Bcl11b は標的遺伝子の発現の抑制因子もしくは、活性化因子として機能している。そこで、Bcl11b の機能欠失型と機能獲得型変異マウスの嗅上皮において、発現の変化する遺伝子群についてアフィメトリクス社製ジーンチップを用いて解析した。コントロールと比較して変化した主要な遺伝子群には OR 遺伝子ファミリーが含まれており、上述した *in situ* hybridization 法による遺伝子発現細胞解析と関連した結果が得られた。さらに興味深いことに、これまでに OR の発現に関与することが報告されている転写因子をコードする遺伝子群の *Bcl11b* 遺伝子欠損マウス嗅上皮における発現は、コントロールと比較してあまり変化していなかった。この結果から、Bcl11b は直接クラス特異的に OR 遺伝子の発現を制御しているか、もしくは OR 発現を制御する未知の因子を制御していることが示唆される。

以上本研究課題の成果をまとめると、転写因子 Bcl11b は嗅神経細胞が発現する OR 遺伝子のクラスを決定することによって細胞の系譜選択を制御していることを解明した。このことから、個々の嗅神経細胞がどの OR 遺伝子を選択的に発現するという細胞の個性を獲得していく分子基盤において、細胞自律的な制御の一端を司る因子として Bcl11b がその役割を担っていると考えられる。

今後、特に人工的に特定の細胞に分化させ、再生治療に利用するための分化誘導法やその細胞の安全性の観点からも、細胞分化機構の包括的な理解は学術的にも、産業利用にとっても重要となる。Bcl11b は免疫系細胞や脳神経細胞などの様々な細胞種の分化過程において、細胞の運命決定を制御するための鍵となる機能を持つことが報告されつつあり、より一般的な細胞分化の制御機構において Bcl11b が共通した重要な役割を担っていることが推察される。他の細胞の分化における分子機構との共通項を明らかにすることで、身体を構成する膨大な種類の細胞種への分化制御の全容解明への貢献が期待できる。

<引用文献>

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." *Journal of Neuroscience* (2013), 33(32), 12987-12996.

Leid M, Ishmael JE, Avram D, Shepherd D, Fraulob V, Dolle P. "CTIP1 and CTIP2 are differentially expressed during mouse embryogenesis." *Gene Expr. Patterns* (2004), 4, 733-739.

Wakabayashi Y, Watanabe H, Inoue J, Takeda N, Sakata J, Mishima Y, Hitomi J, Yamamoto T, Utsuyama M, Niwa O, Aizawa S, Kominami R. "Bcl11b is required for differentiation and survival of alphabeta T lymphocytes." *Nat. Immunol.* (2003) 4:533-539.

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 Nishiguchi Y, Ohmoto M, Koki J, Enomoto T, Matsumoto I, Kominami R, Hirota J. "Bcl11b/Ctip2 is required for development of lingual papillae in mice." *Developmental Biology* (in press), (査読有)

- ② Iwata T, Kaneko S, Shiwa Y, Enomoto T, Yoshikawa H and Hirota J. "Bacillus subtilis genome vector-based complete manipulation and reconstruction of genomic DNA for mouse transgenesis." *BMC Genomics* (2013), 14: 300. (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

- ① Nishiguchi Y, Ohmoto M, Koki J, Enomoto T, Kominami R, Matsumoto I, and Hirota J. "Bcl11b is required for development of lingual papillae in mice." The 13th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception, 2015. 11. 3~11. 4、九州大学馬出病院キャンパス、福岡
- ② Enomoto T, Nishida H, Iwata T, Ohmoto M, Fujita A, Nakamura R, Mishima Y, Kominami R, Matsumoto I and Hirota J. "Bcl11b regulates the class selection of olfactory sensory neurons." The 12th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception, 2014. 11. 2~11. 3、九州大学馬出病院キャンパス、福岡
- ③ 榎本孝幸、"マウス嗅覚系における転写因子 Bcl11b の役割" 第 2 回ケモビ研究会、2014. 10. 24~10. 26、箱根小湧谷ヴィラ箱根 80、箱根町

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎本 孝幸 (ENOMOTO, Takayuki)
東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・東工大特別研究員
研究者番号：7 0 6 3 5 6 8 0