

小型魚類の嗅覚受容体遺伝子ファミリーのエピジェネティックな転写制御機構の解析

●榎森康文

東京大学・大学院理学系研究科

〈研究の目的と進め方〉

主嗅覚受容体 (MOR) をコードする遺伝子は大きなファミリーを形成し、魚類から哺乳類までの脊椎動物に普遍的に存在する。嗅神経細胞1個にはただ1種類のMOR遺伝子が発現し、同じMOR遺伝子を発現する細胞は嗅球の同じ場所 (糸球) に投射する。MOR遺伝子の発現制御などの諸問題を解析するためには、遺伝子構成や構造の簡単さから、魚類が有力な解析系となると認識し、研究の対象に設定した。中でも、ドジョウはモデル魚類であるゼブラフィッシュと近縁であり、比較遺伝子学を行うに都合がよい。また、MOR遺伝子ファミリーは進化が早く解析しやすい系であるため、標題の遺伝子発現制御機構の解明と共に、分子進化学と比較遺伝子学の観点からも研究を行った (図1)。

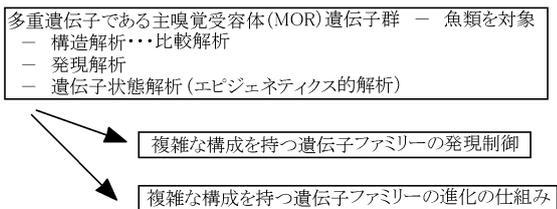


図1. 研究の概念図

具体的なアプローチとしては、まず、ドジョウを中心とした近縁な魚種を用いてMOR遺伝子を網羅的に単離し、その遺伝子構造の詳細を発現パターンと併せて解析した。そこから分子進化の観点の研究、さらに、典型的な特徴を備えたいくつかのMOR遺伝子クラスター (系統樹上ではサブファミリーにほぼ相当する) に着目して、MOR遺伝子を発現しない細胞ではヘテロクロマチン様の転写が不活性な状態にあるとの仮説の基に、クラスター構造とその遺伝子修飾状態 (メチル化など)、そして遺伝子機能 (発現制御) というエピジェネシスの観点から研究を進めた。また、ドジョウ (*Misgurnus anguillicaudatus*) における遺伝子構造の知見が少ないため、EST解析を行ったほか、合わせて化学受容系 (嗅覚・味覚) 全般に関して、DNAマイクロアレイ解析を行い、発現遺伝子を中心とした遺伝子情報の獲得を目指した。

〈研究開始時の研究計画〉

- 1) ドジョウMOR遺伝子の比較遺伝子学的解析
ゲノム情報が少ない魚種であることから、遺伝子ライブラリーを第1段階としてファージベクターを用い、第2段階としてコスミドベクター (ちょうどパラログを構成するMOR遺伝子クラスターが入る挿入鎖長を持つ) を用いて作成、解析する。また、後者を用いてアレル差、個体差の問題を明らかにする。
- 2) MOR遺伝子の進化的解析
系統樹を作成し、近縁な遺伝子グループを見いだ

し、パラログを規定する。ORF全体、および、機能ユニットに分割して ω (dn/ds) 値を計算、比較する。また、コドン毎の進化過程をいくつかの方法論で推測して、ポジティブセレクション部位やネガティブセレクション部位を予想する。

- 3) MOR遺伝子領域のDNAメチル化状態の解析
MOR遺伝子が発現しない細胞でのMOR遺伝子クラスターのCpGメチル化状態を解析することで、MOR遺伝子内、クラスター内に存在するCpGアイランド、遺伝子間領域のそれぞれにおけるメチル化状態を明らかにする。次に嗅神経細胞を多く含む嗅上皮において異なるメチル化状態が観察されるかを検討する。最終的には1つのMOR遺伝子を発現する嗅神経細胞において、その遺伝子のメチル化状態を解析する。
- 4) MOR遺伝子領域を含むクロマチンのヒストンメチル化状態の解析
まず、上記の解析と同様にMOR遺伝子非発現細胞におけるクロマチン状態をChIP法で解析し、MOR遺伝子内、クラスター内に存在するCpGアイランド、遺伝子間領域のそれぞれにおいて見られるヒストンの修飾状態を明らかにする。これと上記3)の解析結果の関連を総合して、2つのエピジェネティクス指標のデフォルト値を求める。次に嗅上皮における状態、最終的には1つのMOR遺伝子を発現する嗅神経細胞におけるクロマチン状態を解明し、デフォルトからの変化と遺伝子発現の関係を明らかにする。
- 5) ドジョウMOR遺伝子の発現解析
遺伝子機能の基本面および個々のMOR遺伝子の発現状態をin situ ハイブリダイゼーション法で解析する。まず、遺伝子クラスター (パラログ群) の発現をORF全長を用いて解析した後、個々の遺伝子について3'非翻訳領域を用いて解析する。これにより、クラスター全体の発現頻度および個々の遺伝子の発現頻度を知り、上記3),4)の結果との関係を明らかにする。また、この結果から、7)の解析の対象となる遺伝子を設定する。
- 6) ドジョウ嗅覚組織のEST解析とDNAアレイ解析
ドジョウに関する遺伝子情報が少ないことから、発現マーカー遺伝子やプロモーター-エンハンサーなどを同定するためのプローブ群を得ることを目的に、遺伝子ライブラリーの作成 (上記1)) と共にEST解析を行う。単離した嗅上皮からcDNA合成、プラスミドライブラリーの作成の後、配列解析、クラスターリング、近縁魚種 (ゼブラフィッシュ) との比較解析を行う。
- 7) タグ付MOR遺伝子導入系統の樹立と解析
上記解析から、遺伝子導入の標的としてふさわしいMOR遺伝子クラスターとそこに含まれるMOR遺伝子 (ペア) を設定し、2つの異なる蛍光タグをつけたコンストラクトを作成し、遺伝子導入系統を樹立して発現状態をモニターする。次に、3),4)の解析結果から発現に重要であることが予想されるDNA領域

を改変したコンストラクトや重要な領域を異動させたコンストラクトを作成、導入して、発現状態をモニターする。

＜研究期間の成果＞

1) ドジョウMOR遺伝子の比較遺伝子学的解析

ドジョウゲノムライブラリーからMOR遺伝子クラスターを単離解析し、4つのサブファミリーを形成する約30個の遺伝子を解析した。最近明らかになったゼブラフィッシュゲノムにコードされるMOR遺伝子との比較検討を行ったところ、それぞれの魚種で単系統を形成するパラログスな遺伝子を含むグループが多数（4個以上のパラログを含むもので、ドジョウで4グループ、ゼブラフィッシュで13グループ）見られた。（図2、図3にその一部の結果、関連論文3）

また、コスミドをベクターとしたゲノムライブラリーを作成して長鎖DNAを解析して、アレル差、個体差を観察したところ、コード領域でも1～3%程度の塩基配列の差異が見られ、非コード領域ではさらに大小の欠失・挿入を含む差が見られた。

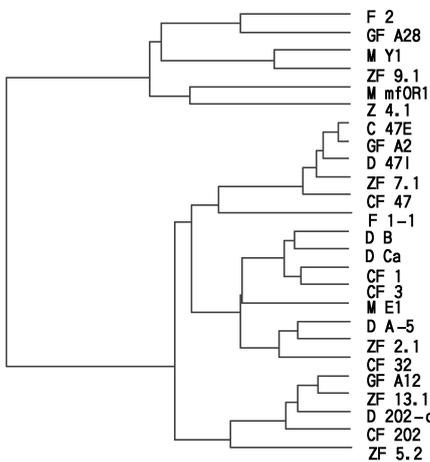


図2. 魚類MOR遺伝子はサブファミリーに分かれる
冒頭の文字が魚種（たとえば、D=ドジョウ、ZF=ゼブラフィッシュ）を表す。

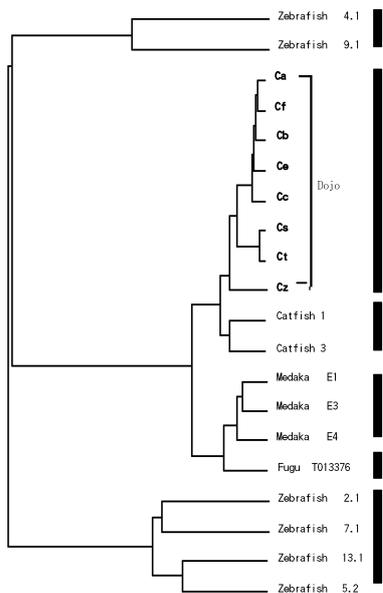


図3. 魚類MOR遺伝子サブファミリーに見られるパラログスな遺伝子群
右の太い棒が魚種毎の単系統（パラログ）を示している。

2) MOR遺伝子の進化的解析

MOR遺伝子は、種が分化した後の比較的短期間に遺伝子重複や変異を起こし、機能的に異なる遺伝子を多数作っていることが上記の解析結果などから推定される。そこで、上記の解析から見いだされたパラログが進化の過程で最近に形成されてきたプロセスやその意味を明らかにするため、コード領域を細分化した ω 値（dn/ds値）解析や、DataMonkeyパッケージソフトウェアを用いたポジティブセレクション/ネガティブセレクション予想解析を行った。その結果、MOR遺伝子は、リガンド結合に関わる領域での ω 値が高く、いくつかの領域・組み合わせにおいて $\omega > 1$ であり、ポジティブセレクションが起きていることが示唆された（表1）。コドン毎の予測においても、リガンド結合領域において数カ所のポジティブセレクション部位が予想された（図4）。一方、MOR遺伝子全般では、緩やかなネガティブセレクションがかかっており（表1）、特に、Gタンパク質との共役や構造維持に関わるコドンでは強いネガティブセレクションがかかっていることが示された。

表1. パラログ内比較の各種パラメーターと
ポジティブセレクションが予想された構造ユニット

Name	s	SBL	ω	κ	Domain
D32	8	0.325	0.527	1.294	TM3, TM4, EL2, EL3
ZF106	12	0.714	0.505	1.181	TM3, TM4, TM5, EL1, EL2
ZF109	8	0.764	0.454	1.389	TM4, TM6, EL3
ZF111	8	0.743	0.416	1.239	TM3, TM4, TM5
ZF125	8	1.004	0.414	1.319	TM5, TM6, EL3
ZF133	8	0.653	0.486	1.442	TM1, TM3, TM4, TM6

s : number of sequences
SBL: sum of branch lengths
 ω : average dN/dS ratios
 κ : transition/transversion rate ratios
Domain : domains (TM1-7, EL1-3, IL1-3) containing $\omega > 1$
(more than 5 cases among pairwise comparison)

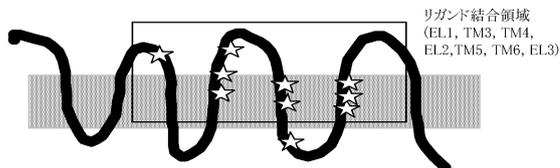


図4. パラログ間の比較から予想されたポジティブセレクションの位置
表1の6グループのパラログ内のコドン毎の比較から10箇所のポジティブセレクション部位が予想された（☆印）。これらをMORのトポロジーにマップした。予想リガンド結合領域を四角で囲んである。上方方向が細胞外を示す。

3) MOR遺伝子領域のDNAメチル化状態の解析

ドジョウ嗅覚受容体（MOR）遺伝子クラスター（Cサブファミリークラスター）のデフォルト状態のメチル化を、非発現組織である肝臓を材料に用いてbisulfite法で解析した。その結果、コード領域内、および、そのごく近傍では、通常のメチル化、すなわち、CpG配列の80%程度がメチル化されていることがわかった（図5）。一方、クラスター内の遺伝子間に存在するCpGアイランド2箇所のメチル化状態を解析したところ、デフォルト状態では、ほとんど（90%以上）がメチル化を受けており、通常のCpGアイランドとは異なる状態にあることが判明した（図6）。この結果から、MOR遺伝子を発現していない組織細胞では、MOR遺伝子クラスターはヘテロクロマチン化しており、発現し得ない染色体状態にあるこ

とが推測された。

一方、このクラスター領域の塩基配列レベルでの個体差に関して4個体を用いて検討したところ、コード領域とその周辺の塩基配列はきわめて保存されていたが、遺伝子間の領域では、CpGアイランド領域も含めて相当の個体差が存在していた。しかし、CpGアイランド自体は塩基配列が大きく異なるような場合にも存在しており、CpGアイランドの存在がMOR遺伝子クラスターの発現制御において重要であることが示唆された。次にMOR遺伝子を発現する嗅上皮に関して解析を行ったが、これまでのところ再現性がある結果が得られていない（上記の非発現組織との差は見られていない）。

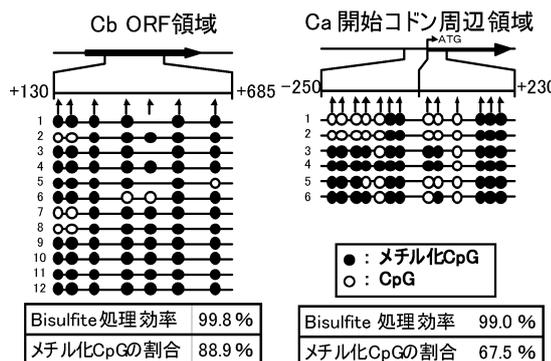


図5. MOR遺伝子クラスターのデフォルトのメチル化状態①（ORF内、および、5'-上流近傍）

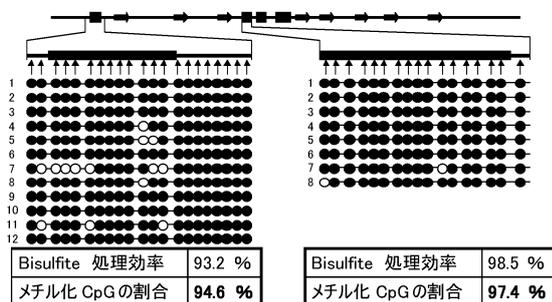


図6. MOR遺伝子クラスターのデフォルトのメチル化状態②（2箇所のCpGアイランド）

4) MOR遺伝子領域を含むクロマチンのヒストンメチル化状態の解析

MOR遺伝子クラスターにあるCpGアイランド領域、および、MOR遺伝子5'-上流域について、2種の修飾状態に特異的な抗Histone H3抗体（Lys9/14-アセチル化特異的、Lys9-ジメチル化特異的）を用いて検討した。その結果、CpGアイランド領域は相対的に抗H3ジメチル抗体で沈降されやすいことがわかり、ヘテロクロマチン状態である可能性が示された（図7）。これは、上記のDNAメチル化状態から推測されるクロマチン様の状態と一致する。

次に、上記と同様の方法でクロマチン状態の解析を発現組織である嗅上皮を用いて行っているが、ChIPの定量性に乏しく、有意な差を検出するに至っていない。

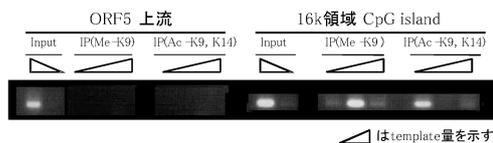


図7. MOR遺伝子クラスター内のデフォルトのヒストン修飾状態

用いた抗体は、抗ヒストンH3ジメチル化抗体（Me-K9）および抗ヒストンH3アセチル化抗体（Ac-K9,K14）。鋳型量依存性などには問題があるが、CpGアイランド領域（高CpGメチル化領域）はORF上流域（低CpGメチル化領域）よりも修飾度が高い。

5) ドジョウMOR遺伝子の発現解析

in situハイブリダイゼーション法によるMOR遺伝子個々の発現パターンの解析を進めた。4つのファミリーに属するサブグループ毎の発現頻度を得た。その結果、サブグループ、あるいはパラログ遺伝子群によって発現頻度はかなり異なり、嗅神経細胞の1~3%程度においてしか発現しないものも存在することがわかり、発現制御解析に適したMOR遺伝子を選択することが詳細な制御領域の解析には必要であると考えられた（関連論文3）。したがって、遺伝子個々の発現頻度を知ることが重要であり、このレベルの解析に着手したが、これまでの段階では、3'-非翻訳領域が長く、かつ、配列差が類似した遺伝子との差が大きい一部のMOR遺伝子の発現を明らかにしたところである。

6) ドジョウ嗅覚組織のEST解析とDNAアレイ解析

嗅覚系で発現する遺伝子増全体を明らかにするため、また、同じ化学受容系と比較するため、ラットの嗅上皮と味蕾を含む舌乳頭上皮のDNAマイクロアレイ解析を行うと同時に（関連論文2,4）、ドジョウ約100個体より、嗅上皮と味蕾を含む組織をそれぞれ取り出し、cDNAライブラリーを数十万個分、pBSベクターに作製した。1万数千個のクローンについて塩基配列決定し、クラスタリング等の解析を行い、5'方向、3'方向それぞれ4000余りの配列（クラスター）を得た（配列決定等は遺伝研に依頼）。その中には、いわゆるハウスキーピング遺伝子のほか、様々な神経機能遺伝子、シグナル伝達系因子、さらには嗅覚受容体遺伝子を含む数個の嗅覚特異的な遺伝子も含まれていた。

7) タグ付MOR遺伝子導入系統の樹立と解析

配列から得られた個体差が大きいこと、また、上記3),4),5)の解析結果が不十分で、タグを導入して有効な遺伝子導入の対象となる遺伝子を特定することが難しい状態である。

<国内外での成果の位置づけ>

嗅覚受容体遺伝子を研究する流れは、1991年に Buck & Axelによって主嗅覚受容体遺伝子（MOR遺伝子、但し、当時は候補遺伝子）の同定によって作られ、その後、主に3つの方向で研究が進んでいる。1つは、匂い物質の受容というタンパク質機能に関わるものであり、着実な進展はあるものの、この受容体がヘテロ発現系で機能を検出することが難しいため、依然として受容体のリガンド特異性の全容は不明である。2番目は、MOR遺伝子の1細胞1遺伝子、および、1遺伝子1投射先の問題である。この両面に関しては、MORタンパク質の発現が必要

であることは最近知られるようになったが、詳細に関しては（たとえば、シグナル伝達系、誘引・忌避因子など）不明である。第3は、嗅覚受容体は、環境応答（外部感覚系）の1要素であり、進化と共に移り変わる生育環境に適応するように遺伝子の進化も早い（種差やアレル差、個体差が大きいほか、擬遺伝子化も早い）。本研究は、上記のうち、第2第3の流れの基礎的な面に関するものである。

これまで得られた本研究の成果に関しては、魚類を対象としたことにより、種間・種内分化においてパラログが形成されていること、また、そこにはポジティブセレクションが働いていることが明らかにされたことは、上記の第3の流れにおいて意義が大きいと考えている。また主要な材料であるドジョウに関する遺伝子知見が少ないことからESTライブラリーの作製と配列解析を行ったが、ここで得られた情報は、モデル動物以外の動物に関する有効な遺伝子および遺伝子発現情報になると考えている。特に、嗅覚組織（嗅神経細胞）に関する発現解析は、哺乳類を含めて全般に進んでおらず、嗅覚受容体を含む本研究の成果は、比較ゲノム解析と共に今後有効に活用できると期待している。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

本研究は、主として7つの段階的な項目を設定して研究を進めたが、内容的には1)魚類（特にドジョウ）のMOR遺伝子の構造解析とEST解析を含めたドジョウゲノムの情報獲得、2)MOR遺伝子ファミリーの進化過程の解析、3)1細胞1受容体遺伝子選択過程に関わるMOR遺伝子の転写制御の解析、の3つの方向を並行して進めることを意図した。全体としては、1)および2)に関してはある程度の成果が挙げられたが、3)については準備段階に留まっていると総括されよう。以下に、未達成点、困難点、その理由を整理する。

1)ゲノム解析

ドジョウにおいて相当数（30%程度）のMOR遺伝子が研究当初で解析されたと見積もって研究を進めてきたが、最近、ゼブラフィッシュのゲノムデータが整理されてきて、種毎にMOR遺伝子の進化はかなり異なり、その結果、ドジョウMOR遺伝子の絶対数、分類についても見直す必要が出てきたが、これについては方法的にゲノムプロジェクト以外の方法がなく、総合的なMOR遺伝子の解析はできなかった。

2)分子進化解析

独自性を有する解析を行うには、遺伝子情報の量的質的な先進性が必要であり、本研究では魚種差に加えて、アレル差、個体差を詳細に解析することを設定した。そのために、対象領域を含むコスミドクローンを得て解析することを行っているが、ライブラリーの構築やクローンの単離などは順調にいったものの、塩基配列の解析は未完である。理由は予想以上に、個体差が大きく、1つのアレルの配列を基にしたプライマーセットでクラスター全体の塩基配列を決定することが難しかったことにある。また、種特異的なMOR遺伝子をドジョウゲノム中に同定することができなかったため、厳密な意味でのパラログの進化解析ができなかった。

3)発現制御機構解析

総括的に上述したように、これに関しては未熟な時点にいる。1)2)における積み残し事項は発現制御機構の解析において基盤となるものであり、進捗を妨げた大きな要因の一つである。また、デフォルト

（非発現細胞）におけるエピジェネティックな解析については概要は掴めたが、発現細胞に関する知見は得られなかった。それには、単一のMOR遺伝子を発現する細胞を分離取得する遺伝子導入ラインの確立には至らなかったこと、また、解析に必要な細胞数が未だ多すぎるという方法論的な問題である。

〈今後の課題〉

MOR遺伝子は、種内での進化過程が解析できる数少ない遺伝子ファミリーであり、種分化以降にパラログの形成や消失（欠失）が高い頻度で起こっている遺伝子でもあることが、これまでの解析から明らかになった。また、1細胞1発現遺伝子の発現制御機構に関しても、通常の遺伝子に見られるようなシス配列-トランス因子の組み合わせによる制御が中心ではなく、クロマチン構造による制御が主要であるとのコンセンサスも一部研究者では作られつつある。本研究において未達成であった事項を含めて今後の課題を以下に要約する。

1)種内における機能獲得を担う分子進化解析

MOR遺伝子は、異なる機能（リガンド特異性）を獲得する方向で新たな遺伝子の獲得（増幅）と変異による進化を行うと共に、不要となった遺伝子の相同組み換えによる喪失と変異による機能消失が起こっている。この過程を検証するには、野生等に生育する多個体のゲノムをアレル毎に配列解析することが必要かつ十分である。また、メダカのように複数の純系を検討することも種内分化や個体差の形成の機構と意義を明らかにする点で重要である。

2)クロマチン構造の変換が主因子となる発現制御機構解析

1つのMOR遺伝子を発現するには、2つのコミットメントが必要であるとの仮説を持っている。第1段階として、クラスターレベルでの選択、これは幹細胞から2次幹細胞への分裂・分化の際に起こり、レパートリー（選択の幅）を約1桁下げる。ここには、クラスターにおそらく1箇所存在するマスターローカスのクロマチン構造がデフォルト状態から変化し、CpG脱メチル化とヒストンの修飾状態の変化が引き起こされる。したがって、1群のパラログ（クラスター遺伝子群）を発現する嗅神経細胞で共通に見られるクロマチン状態の変化を解析することが必要である。また、さらに感度よくCpGメチル化解析とChIP解析を行うことが課題である。

第2段階の制御は、パラログ（クラスター遺伝子群）内における1つの遺伝子の選択である。これは、嗅神経細胞の最終分化段階で起こり、おそらくORF周辺とORF内の少数のCpG配列のメチル化状態の変化が起点となっている。上記の同様な解析で別々のパラログを発現する細胞の差異を明らかにすることが仮説の正しさを立証するものである。この方向での成否も上記と同様にエピジェネティック解析の手法としての検出限界を上げることが課題である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1)論文

1. 0208161358

Suzuki, T., Yano, K., Sugimoto, S., Kitajima, K., Lennarz, W. J., Inoue, S., Y. Inoue, Y., and Emori, Y., End- β -N-acetylglucosaminidase, an enzyme involved in processing of free oligosaccharides in the cytosol, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 9691-9696 (2002)

2. 0312021607

Matsumoto, I., Emori, Y., Nakamura, S., Shimizu, K., Arai, S., and Abe, K., DNA microarray cluster analysis reveals tissue similarity and potential neuron-specific genes expressed in cranial sensory ganglia, *J. Neurosci. Res.*, 74, 818-828 (2003).

3. 0312221320

Irie-Kushiyama, S., Asano-Miyoshi, M., Suda, T., Abe K., and Emori, Y., Identification of 24 genes and two pseudogenes coding for olfactory receptors in Japanese loach, classified into four subfamilies: a putative evolutionary process for fish olfactory receptor genes by comprehensive phylogenetic analysis, *Gene*, 325, 123-135 (2004)

4. 0408130954

Matsumoto, I., Nagamatsu, N., Arai, S., Emori, Y. and Abe, K., Identification of candidate genes involved in somatosensory functions of cranial sensory ganglia, *Mol. Brain Res.*, 126, 98-102 (2004)

2) データベース

1. ESTデータベース : DDBJ登録・公開済 (DB名・URL、*Misgurnus anguillicaudatus*, <http://dolphin.lab.nig.ac.jp/>内) ……ドジョウ (*Misgurnus anguillicaudatus*) 嗅覚組織のESTライブラリー (約20万個) のうち約11,000クローンの塩基配列。