

神経系成立の基盤としての SOX 因子群の制御と相互作用
Regulation and interaction of SOX family transcription
factors as the basis of neural primordial development

近藤 寿人 (Kondoh, Hisato)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授



研究の概要

転写制御因子 SOX2 の発現は神経系原基の成立に対応している。たとえば、神経系原基での SOX2 の発現開始は、オーガナイザーの作用に依存した「神経誘導」に対応する。そこで (1) 神経系原基成立のための SOX2 の発現調節機構の研究、(2) 神経系原基とその領域化において、SOX2 および関連転写制御因子が関与する調節機構の研究をおこなう。

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：遺伝子、シグナル伝達、脳・神経、発現制御、発生・分化

1. 研究開始当初の背景・動機

単純な構造をもつ初期胚がどのようにして組織や器官の原基を、正しい領域性とともに生み出すのかという発生生物学の基本課題を研究する。胚発生の過程で最初に生まれ、初期胚の大部分の領域を占める神経系の原基を対象とする。神経系原基はその誕生とともに領域特異性を備えている。その成立機構を明らかにすることによって、胚発生を支配する基盤原理を明らかにする。

2. 研究の目的

転写制御因子 SOX2 の発現と神経系原基の成立とはよく対応している。たとえば、神経系原基での SOX2 の発現開始は、オーガナイザーの直接的な作用に依存しており、「神経誘導」に対応している。そこで (1) 神経系原基成立のための SOX2 の発現調節機構の研究、(2) 神経系原基とその領域化において、SOX2 および関連転写制御因子が関与する調節機構の研究をおこなう。Sox2 遺伝子の発現は多数のエンハンサーの活性の組合せによって実現されている。このことに注目して研究を進める。

3. 研究の方法

(1) Sox2 遺伝子のエンハンサー N-1 から N-4 について、それらが受ける制御機構を研究する。(2) Sox2 エンハンサー N-1 から N-4 について、エンハンサーのノックアウトマウスを作成し、研究する。(3) 神経系成立に関わる転写制御への SOX2 の関与を研究する。[マウス実験のためのクリーンラック、マイクロピペットプラー、DNA 調製のためのバイオシェーカー、ニワトリ胚への遺伝子導入実験に用いる遺伝子導入装

置、顕微鏡用デジタルカメラを購入。]

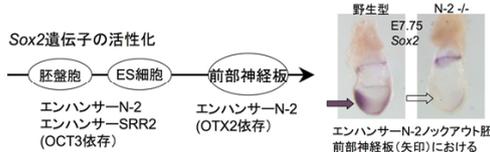
4. これまでの成果

これまでの3年間の研究で、[1] Sox2 遺伝子の各エンハンサーの解析・各エンハンサーのノックアウトマウスの解析を通して、[2] 初期胚における Sox2 の発現の制御の全容を明らかにし、[3] 初期胚で最初に成立する組織としての神経系原基における SOX 因子の役割を明らかにする、という当初の基本的な研究計画は達成しつつある。さらに当初計画を超えた研究の展開がある。

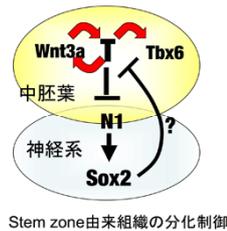
- ・エンハンサーのノックアウトマウス(胚)の作製と解析：ES 細胞でのターゲティングによって、まず Sox2 遺伝子に IRES を介して EGFP 配列をつなげて、Sox2 の発現状態をモニターできるようにした。各エンハンサーの領域ごとに、ES 細胞で2度目のターゲティングをしたのち、キメラマウスをへて各エンハンサーの条件的(Cre 組換え酵素依存的な)ノックアウトマウスを得た。エンハンサー毎のノックアウトの Sox2 発現に対する効果を解析した。
- ・各エンハンサーについて、エンハンサー活性に必要最小限の領域(コア領域)を特定し、コア領域にさまざまな変異を導入することによって、エンハンサーを構成する制御エレメント群を同定するとともに、それらのエレメントに作用する転写制御因子や上流で作用するシグナル系を分析した。
- ・これらの研究成果の概要は以下の表にまとめた。初期胚の3胚葉成立に関する古典的なモデルを根底から覆す、新しい研究が展開している。最近の研究の展開の2例について述べる。

エンハンサー	エンハンサーが受ける制御	エンハンサー・ノックアウト胚の主な表現型	エンハンサー研究からの発展
N-1 (後部)	Wnt/FGF, T-box 因子による制御	神経板後部伸長端での <i>Sox2</i> 発現の欠落	ES や Epiblast から派生する後部神経系・中胚葉の共通の前駆体の研究
N-2 (前部)	OTX2/POU 因子、胚盤葉下層による制御	前部神経板での <i>Sox2</i> 発現の欠落	ES や Epiblast から派生する前部神経系原基の成立機構の研究
N-3 (間脳域)	SOX2-PAX6 系の自己制御	解析中	SOX2-PAX6 複合体による制御標的、positive feedback 制御の研究
N-4 (脊髄等)	レチノイン酸他の多因子制御	水晶体形成不全、小眼	脊髄・頭部外胚葉の制御の共通性と独自性に関わる転写制御の研究

(1) 神経誘導時の *Sox2* 制御の切換え：内部細胞塊や ES 細胞の段階では、N-2, SRR2 の2つのエンハンサーが同時に OCT3 依存的に作動して *Sox2* 遺伝子を発現させる。前部神経板の誘導は、OCT3 の発現低下と OTX2 の新規の発現によって起きるが、エンハンサー N-2 は OTX2 依存的にも活性を持ち *Sox2* 発現は継続する。神経系の誘導や成立に関わる最初期の制御機構をはじめて明らかにしたものであり、また、神経誘導のモデルを一新する。



(2) エンハンサー N-1 が活性を持つ、Stem zone 細胞群 (オーガナイザーよりも尾側に位置する) から、体幹部神経系原基および中胚葉が派生する機構の研究：Wnt3a, T, Tbx6 を欠損するマウス胚では、中胚葉組織領域に、異所的な神経組織が形成される。これらの胚では、エンハンサー N-1 活性が中胚葉領域で維持されるために異所的に *Sox2* が発現され、その結果異所的な神経組織が形成される。Stem zone 由来細胞群内では、T-box 因子と SOX2 との相互関係によって、神経系と中胚葉系のいずれに分化するのかが決まる (右図)。



5. これまでの進捗状況と今後の計画

研究は順調に進捗しているだけでなく、当初計画を超えたインパクトの大きな研究成果が得られている。今後、[1] 本研究の成果にもとづいた ES 細胞分化操作の新しいプロトコルを実践し、[2] Stem zone 由来細胞の、個々の細胞の移動と状態変化などに関する、リアルタイムイメージングによる研究などを進める。また、[3] *Sox2*/*Sox3* 間の機能補償の分析などから、SOX 因子群全体の神経系成立への関わりを解明する。

6. これまでの発表論文等

- (研究代表者は太字、研究分担者には下線)
 Inoue M, Kamachi Y, Matsunami H, Imada K, Uchikawa M, **Kondoh H**. PAX6 and SOX2-dependent regulation of the Sox2 enhancer N-3 involved in embryonic visual system development. *Genes Cells*. 12:1049-1061 (2007).
 Sato N, Kamachi Y, **Kondoh H**, Shima Y, Morohashi K, Horikawa R, Ogata T. Hypogonadotropic hypogonadism in an adult female with a heterozygous hypomorphic mutation of SOX2. *Eur J Endocrinol*. 156:167-171 (2007).
 Yasuhara N, Shibazaki N, Tanaka S, Nagai M, Kamikawa Y, Oe S, Asally M, Kamachi Y, **Kondoh H**, Yoneda Y. Triggering neural differentiation of ES cells by subtype switching of importin-alpha. *Nat Cell Biol*. 9:72-79 (2007).
 Miyoshi T, Maruhashi M, Van De Putte T, **Kondoh H**, Huylebroeck D, Higashi Y. Complementary expression pattern of Zfh1 genes *Sipl* and *deltaEF1* in the mouse embryo and their genetic interaction revealed by compound mutants. *Dev Dyn*. 235:1941-1952 (2006).
 Okuda Y, Yoda H, Uchikawa M, Furutani-Seiki M, Takeda H, **Kondoh H**, Kamachi Y. Comparative genomic and expression analysis of group B1 sox genes in zebrafish indicates their diversification during vertebrate evolution. *Dev Dyn*. 235:811-825 (2006).
 Takemoto T, Uchikawa M, Kamachi Y, **Kondoh H**. Convergence of Wnt and FGF signals in the genesis of posterior neural plate through activation of the Sox2 enhancer N-1. *Development*. 133:297-306 (2006).
 Yoshimoto A, Saigou Y, Higashi Y, **Kondoh H**. Regulation of ocular lens development by Smad-interacting protein1 involving Foxe3 activation. *Development*. 132: 4437-4448 (2005).
 Matsumata M, Uchikawa M, Kamachi Y, **Kondoh H**. Multiple N-cadherin enhancers identified by systematic functional screening indicate its Group B1 SOX-dependent regulation in neural and placodal development. *Dev Biol*. 286: 601-617 (2005).

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labo/01a.html>