

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440106

研究課題名(和文) 共通原基である頭部外胚葉から眼・鼻・耳の感覚器が特異化される仕組み

研究課題名(英文) Specification of sensory primordia in cephalic ectoderm

## 研究代表者

内川 昌則 (UCHIKAWA, Masanori)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：80346147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、眼、鼻、耳の共通原基である頭部外胚葉から、それぞれの感覚器が特異化される仕組みの解明を目的とした。嗅上皮・内耳プラコード特異的に活性を示すNOP1エンハンサーの制御機構に着目した。その制御にはSox2/9とSal14の協調的な活性化と共に、嗅上皮・内耳プラコード以外での抑制機構が重要であるが明らかになった。転写抑制因子Zeb1/2, Snail1/2が、その一端を担うことが示唆された。このような機構は、内耳特異的な他のエンハンサーでも見いだされた。Sox因子とSal14の協調的活性化と抑制因子による抑制機構が、感覚器原基の特異化に関与していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Sensory organ primordia are derived from the cephalic ectoderm, and specified through multiple progressive steps. The NOP1 enhancer is specifically active in nasal and otic placodes, which is regulated not only by synergistic activation of Sox2/9 and Sal14 but also by multiple repressions. Zeb1/2 and Snail1/2 zinc finger proteins could repress the NOP1 enhancer. The otic placode specific enhancer, Otic1 enhancer, is also regulated by synergistic action of Sox and Sal14. These results imply that the combination of cooperative action of Sox and Sal14 and repressions would be a key mechanism in the specification of sensory placodes.

研究分野：発生生物学

キーワード：転写制御因子 感覚器原基 発現制御 細胞分化 エンハンサー Sox転写因子 Sal14 転写抑制因子

### 1. 研究開始当初の背景

眼の水晶体、鼻の嗅上皮、耳の内耳を代表とする感覚器は、その形態や機能は大きく異なるが、その形成過程には共通点が多い。それらは胚の頭部外胚葉から発生する。それらの形態形成は、頭部外胚葉が肥厚した感覚器プラコードを形成することで開始される。感覚器プラコードが初期に共通した性質を持つことは、組織の交換移植の実験から示唆される。この感覚器プラコード形成に先駆けて、共通に発現される転写制御因子が Sox2 である。

感覚器形成過程における Sox2 遺伝子の発現は、時期・領域特異的な複数の制御領域(エンハンサー)によって制御される。水晶体プラコードでは N3 エンハンサー、嗅上皮・内耳プラコードでは NOP1, NOP2 エンハンサーによって制御される。これらのエンハンサーの発現制御では、水晶体プラコードでは Sox2 と Pax6 が、嗅上皮・内耳プラコードでは Sox2/9 と Sal14 が協調的に作用する。

本研究では転写制御因子群「Sox 因子とパートナー因子」による細胞分化における機能を明らかにし、感覚器プラコード特異化の機構を解明する。特に感覚器の最初の分岐点である眼と鼻・耳の違いが、発生初期にどのように生み出されるのかを明らかにする。

### 2. 研究の目的

眼、鼻、耳の共通原基である頭部外胚葉から、それぞれの感覚器が特異化される仕組みの解明を目的とする。この過程には転写制御因子が大きな役割を果たす。しかしその理解には、個々の機能だけでなく、「組合せによる機能」を理解する必要がある。

本研究では、転写制御因子群「Sox 因子とそのパートナー因子」の機能に着目する。感覚器形成を直接制御する転写制御因子 Sox とそのパートナー因子による協調的な作用を明らかにする。Sox 因子がそのパートナー因子の組合せを使い分けることで、共通の性質の頭部外胚葉から、個々の個性をもった感覚器原基(眼・鼻・耳)を特異化する仕組みを明らかにする。実際に転写制御因子群による細胞分化の操作を行い、その仕組みの実証を目指す。

### 3. 研究の方法

感覚器形成の初期過程に重点をおき、次の3つの課題に取り組む。

(1) 転写制御因子群「Sox 因子とそのパートナー因子」による頭部外胚葉から感覚器プラコードの特異化の機構

Sox2/9+Sal14(嗅上皮・内耳プラコード)による特異化の機構を解析する。Sox 因子と Sal14 の組合せによって、どこまで感覚器プラコードが特異化されるかを調べる。

(2) 頭部外胚葉における特異化を行うための条件、その細胞状態の解明

NOP1 エンハンサーの活性を指標とした感覚器プラコード以外での抑制的な制御機構を解析する。そこに作用する転写抑制因子を探索する。また転写抑制因子の阻害による脱抑制と転写活性化因子による積極的な細胞分化を組合せ、感覚器プラコードの特異化を促進できるかどうかを検討する。

(3) 感覚器形成の開始機構を模範例とした転写制御因子群の操作による積極的な細胞分化の操作の試み

ES 細胞の分化系を利用して、感覚器プラコード様細胞を作製する。その系に転写制御因子群を作用あるいは阻害することで、感覚器プラコード細胞の誘導および操作を試みる。

### 4. 研究成果

(1) 転写制御因子群 Sox 因子と Sal14 による嗅上皮・内耳プラコード特異的な NOP1 エンハンサーの発現制御

Sox2 遺伝子の発現制御領域の1つである NOP1 エンハンサーは、嗅上皮・内耳プラコードで特異的に活性を示す(図1)。このエンハンサーの活性化に必要な部位の1つは、Sox 因子と Sal14 によって協調的に作用する。この領域[110-133]を取り出し、8量体を作製すると嗅上皮・内耳プラコードとともに、中枢神経系、神経冠細胞で活性を示した。この活性は、NOP1 エンハンサーの3'側を欠失した[1-173]とほぼ同様の活性を示した。このことから、NOP1 エンハンサーの嗅上皮・内耳プラコード特異的な活性には、Sox 因子と Sal14 による協調的な作用と共に、3'領域に由来する抑制機構が重要な役割を果たすことが示された。

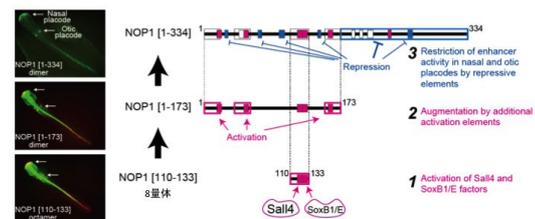


図1. NOP1エンハンサーの発現制御機構

また[110-133]の8量体のエンハンサー活性が観察された組織は、Sox2や Sox9と Sal14の発現が重複する組織であった。Sox2/9と Sal14の協調的な作用が、in vivoで NOP1 エンハンサーの活性化に重要であることと一致する。

(2) NOP1 エンハンサーの活性を指標とした感覚器プラコード以外での抑制的な制御機構の解析

NOP1 エンハンサーの3'側には、転写抑制因子が作用すると考えられる。その1つの配列に Zeb1/2, Snail1/2 zinc finger proteins が作用しうる配列が存在した。これらの転写抑制因子が、NOP1 エンハンサーの活性を制御するかどうかを、ニワトリ胚における強制発現を行って検討した。

その結果、Zeb1/2, Snai1/2 は NOP1 エンハンサーの活性を抑制した(図2)。[110-133] 8 量体や[1-173]がエンハンサー活性を示した中枢神経系や神経冠細胞では、Zeb1/2 および Snai1/2 が発現されており、これらの転写抑制因子が NOP1 エンハンサーの嗅上皮・内耳プラコード以外の活性を抑制することを示唆する。

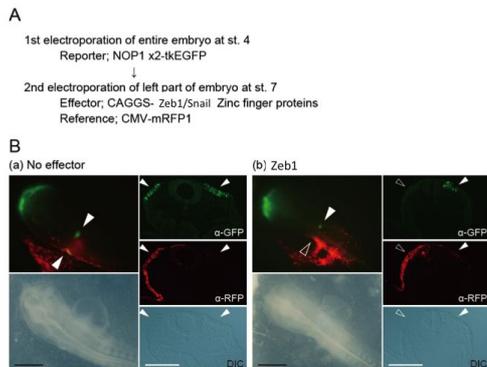


図2. Zeb1はNOP1エンハンサーの活性を抑制できる

さらに Zeb のドミナントネガティブフォームを作製して、NOP1 エンハンサーの活性が脱抑制によって Sox/Sal14 共発現領域で活性化されるかどうか検討した。

Zeb ドミナントネガティブフォームでは、NOP1 エンハンサーの異所的な活性を誘導できなかった(図3)。このことは、Zeb ドミナントネガティブフォームによる脱抑制だけでは不十分であり、NOP1 エンハンサーには複数の抑制機構が関与していることを示唆している。このことは、NOP1 エンハンサーの変異体によるエンハンサー活性への影響を調べた結果とも一致する。今後、さらに抑制機構を解析することで Zeb/Snai1 以外の抑制因子を同定し、嗅上皮・内耳プラコード特異化の機構を明らかにしたい。

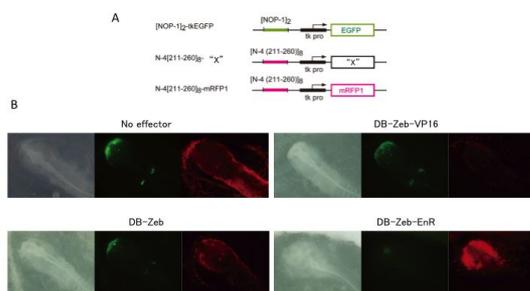


図3. NOP1エンハンサー活性へのDB-Zebの効果  
→Zeb1,2やsnai1,2の脱抑制だけではNOP1エンハンサーは活性化できない

### (3) 転写制御因子群「Sox 因子とそのパートナー因子」による感覚器プラコードの特異化の機構

これまで嗅上皮・内耳プラコード特異的な NOP1 エンハンサーの制御機構を解析することで、Sox 因子と Sal14 の協調的な作用を明らかにしてきた。Sox 因子は、Group B1 および Group E に属する Sox 因子特異的に Sal14

と協調的に作用することができた。

同じような機構が他のエンハンサーでも機能しているかどうか調べたところ、Sox3 遺伝子の内耳プラコード特異的なエンハンサーである Otic1 エンハンサーでも Sox 因子と Sal14 による制御が見いだされた。興味深いことに、このエンハンサーでは Group E Sox は作用するが Group B1 Sox は作用できず、Group 特異性を示した(図4)。また、Sal14 との協調的作用と共に、Sox9 単独での活性化も確認された。これは、Sox 予想結合配列とそれに隣接する Sal14 予想結合配列の両方に Sox9 が結合して、二量体を形成する可能性が考えられた。現在、解析中である。

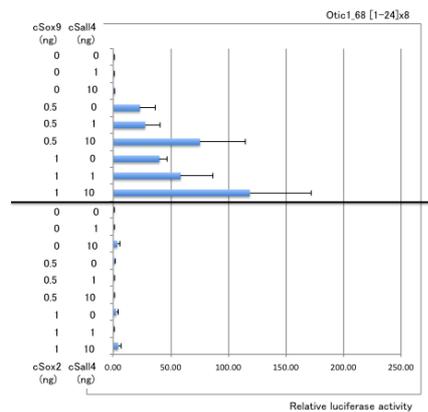


図4. Sox-Sal14によるOtic1エンハンサーの活性化

Sox 因子と Sal14 による協調的な制御は、嗅上皮・内耳プラコード特異的な NOP1 エンハンサーだけでなく、内耳特異的な Otic1 エンハンサーでも観察された。また、Sox 因子はそれぞれのエンハンサーで一部異なっていた。どちらのエンハンサーでも、感覚器プラコード特異的な制御には、それ以外の組織における抑制的な制御が重要な役割を果たすことが示唆された。このような機構が、感覚器プラコードの特異化の一端を担っている可能性がある。

### (4) 感覚器形成の開始機構を模範例とした転写制御因子群の操作による積極的な細胞分化の操作の試み

これまでに Oshima K. et al., Cell, vol. 141(4), p704-716, 2010. を参考に、ES 細胞から内耳細胞分化系を確立した。この系で内耳プラコード特異的な Otic1 エンハンサーの活性を確認したところ、内耳マーカーである Pax2 発現細胞と Otic1 エンハンサーの活性は一致した(図5)。今後は、Otic1 エンハンサーの活性を指標に内耳プラコード細胞を特異的に選択し、その細胞群を用いて内耳プラコードの特異化の機構を明らかにしていきたいと考えている。

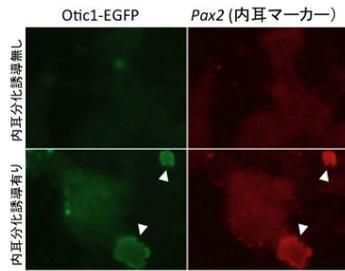


図5. Otic1エンハンサーを用いたES細胞の内耳細胞分化系

## 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6件)

Regulation of trunk neural crest delamination by EF1 and Sip1 in the chicken embryo.

Takahiro Yasumi, Masashi Inoue, Mitsuji Maruhashi, Yusuke Kamachi, Yujiro Higashi, Hisato Kondoh, Masanori Uchikawa.

Dev Growth Differ. 2016 Feb;58(2):205-14.

DOI: 10.1111/dgd.12256

査読有

Regulation of Sox2 via Many Enhancers of Distinct Specificities. In "Sox2. Biology and Role in Development and Disease." (Eds. Kondoh H and Lovell-Badge R.)

Masanori Uchikawa, Hisato Kondoh. Academic Press Elsevier, 2016;Chapter 7:107-129.

査読無

Multiple Roles for SOX2 in Eye Development. In "Sox2. Biology and Role in Development and Disease." (Eds. Kondoh H and Lovell-Badge R.)

Hisato Kondoh, Masanori Uchikawa, Yasuo Ishii.

Academic Press Elsevier, 2016;Chapter 12:217-233.

査読無

Sixteen additional enhancers associated with the chicken Sox2 locus outside the central 50-kb region.

Ryuji Okamoto, Masanori Uchikawa\*, Hisato Kondoh. (\*Corresponding author)

Dev Growth Differ. 2015 Jan;57(1):24-39.

DOI: 10.1111/dgd.12185

査読有

Regulation of mesodermal precursor

production by low-level expression of B1 Sox genes in the caudal lateral epiblast.

Megumi Yoshida, Masanori Uchikawa, Karine Rizzoti, Robin Lovell-Badge, Tatsuya Takemoto, Hisato Kondoh.

Mech Dev. 2014;132:59-68.

doi:10.1016/j.mod.2014.01.003

査読有

Progression of neurogenesis in the inner ear requires inhibition of Sox2 transcription by neurogenin1 and neurod1.

Lale Evsen, Satoko Sugahara, Masanori Uchikawa, Hisato Kondoh, Doris K. Wu. J Neurosci. 2013;33(9):3879-90.

doi: 10.1523/JNEUROSCI.4030-12.2013

査読有

### [学会発表](計3件)

岡本 優、西村 なおこ、近藤 寿人、内川 昌則

Sox3 遺伝子の発現制御領域 Otic1 エンハンサーの内耳特異的な活性に必要なエレメントの解析

第37回日本分子生物学会年会

1P-0561, 2014年11月25-27日, 「パンフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」.

内川 昌則、岡本 隆司、近藤 寿人

ニワトリ Sox2 遺伝子座 200 kb における制御領域の解析

第47回日本発生生物学会年会

P047B, 2014年5月27-30日, 「ウインクあいち(愛知県・名古屋市)」.

岡本 優、内川 昌則、西村 なおこ、近藤 寿人

Sox3 遺伝子の発現制御領域 Otic1 エンハンサーの内耳特異的な活性制御機構の解析

第36回日本分子生物学会年会

2P-0584, 2013年12月3-6日, 「神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)」.

### [その他]

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/general/lab/06/>

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/general/lab/131/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

内川 昌則 (UCHIKAWA, Masanori)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号: 80346147

### (2)研究分担者

なし

(3)連携研究者  
なし