

平成 22 年 4 月 21 日現在

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2005～2009

課題番号：17107005

研究課題名（和文） 神経系成立の基盤としての SOX 因子群の制御と相互作用

研究課題名（英文） Regulation and interaction of SOX family transcription factors as the basis of neural primordial development

研究代表者

近藤 寿人 (KONDOH HISATO)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

研究者番号：71027083

研究成果の概要（和文）：神経系原基（神経板）は脊椎動物胚で最初につくられる体細胞組織である。その成立に対応して発現される *Sox2* 遺伝子が、神経系原基の領域ごとに異なったエンハンサーによって制御されることに注目して、個々のエンハンサーの活性化機構を研究した。その結果、神経板は、前部、中間部、後部で全く異なった制御機構に基づいて形成されること、特に後部神経板は、沿軸中胚葉組織と共通の前駆体から生ずることが明らかになった。中胚葉から分離した後の外胚葉から神経板が誘導されるという、古典的なモデルは否定される。SOX2 は、POU 因子と相互作用しながら、神経系原基形成に関与する多くの遺伝子を制御していることを示した。

研究成果の概要（英文）：The neural plate, or the embryonic neural primordium, is the first somatic tissue to develop in vertebrate embryos. Although its development is marked by *Sox2* gene activation regardless of the tissue domain, the *Sox2* gene itself is regulated by different enhancers of distinct domain specificities. Investigation of this domain-specific regulation indicated that the anterior, medial and posterior portions of the neural plate are individually derived from the epiblast through distinct regulatory mechanisms. Of particular note is that the posterior neural plate arises from a common precursor shared by the paraxial mesoderm, which is a derivative of the posterior epiblast. This fact rules out a classical model that describes the neural primordium as being induced from the ectoderm after its separation from the mesoderm. Further results indicated that SOX2 interacts with POU factors to regulate many genes involved in promoting neural plate development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	26,600,000	7,980,000	34,580,000
2006年度	16,600,000	4,980,000	21,580,000
2007年度	14,500,000	4,350,000	18,850,000
2008年度	14,500,000	4,350,000	18,850,000
2009年度	14,500,000	4,350,000	18,850,000
総計	86,700,000	26,010,000	112,710,000

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

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

胚発生の過程で最初に生まれ、そして初期胚の大部分の領域を占めるのが、神経系の原基である。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。神経系が生み出される最も基本的な機構を明らかにすることによって、胚発生全体を支配する基盤原理を明らかにする。

転写制御因子 SOX2（ならびに機能を共有する B1 グループの SOX 因子）の発現は、神経系原基の成立を担っている。そこで (1) 神経系原基成立のための *Sox2* 遺伝子の発現調節機構の研究、(2) 神経系原基とその領域化における転写因子 SOX2 による転写調節機構の研究を行う。*Sox2* 遺伝子の発現は胚の中での領域特異性を異にする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。各エンハンサーの制御機能に対応した組織間相互作用シグナルの解析、領域ごとに異なる SOX2 のパートナー因子の解析によって、神経系原基がどのように成立し、その領域化が具体的にどのような遺伝子群を調節することによって実現されているのかを研究する。

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、それらが遺伝子発現のために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、その *Sox2* 発現への直接的な関与を確認するとともに、領域特異的に *Sox2* 発現を低下させることの胚

発生への効果を検討する。(3) 神経系成立に関わる転写制御への転写因子 SOX2 の関与と。その制御において相互作用するパートナーとしての転写因子を研究する。

4. 研究成果

(1) SOX2 は、将来の体を作るための幹細胞組織である、胚盤胞の内部細胞塊、円筒胚の Epiblast (胚盤葉上層)、神経板 (神経系原基)、胚から成体に至るまでの神経幹細胞に一貫して発現されており、神経系原基を成立させるマスター因子の一つである。*Sox2* 遺伝子発現自体は、発生ステージ、神経系領域ごとに異なったエンハンサーによって制御されており (図 1)、そのエンハンサーの制御自体が、神経系原基の、領域性を伴った成立に関わる制御を、直接的に反映していると想定された。

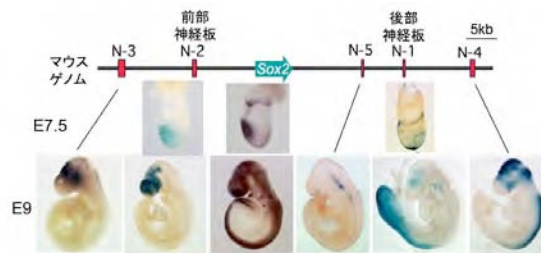


図 1 *Sox2* 遺伝子を領域ごとに異なった機構で活性化するエンハンサー群。

エンハンサー N-1, N-2, N-3, N-4 の各々について、それらの制御機構を解析するとともに、エンハンサーのノックアウトマウスを作製して、その表現型から *Sox2* 遺伝子の制御全体の中での役割分担を調べた。それらの研究成果の概略を表 1 に示す。

Sox2 遺伝子は明らかに神経板 (神経系原基) の領域ごとに異なった機構で活性化されており、それらの機構自体が神経板の領域特性に深く関わっていた。

エンハンサー	エンハンサーが受ける制御	エンハンサー特異的なノックアウトマウス胚の主な表現型	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	後部神経板伸長端での <i>Sox2</i> 発現の遅延	後部神経系・中胚葉の共通前駆体 Stem zone の研究
N-2 (前部)	ZIC, POU, OTX 因子による制御	前部神経板 (脳の前基) での <i>Sox2</i> 発現の欠落	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	単独の表現型軽微	SOX2-PAX6 複合体による制御標的、positive feedback 制御の研究
N-4 (脊髄等)	核内受容体他の多因子制御	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

表 1

各エンハンサーのノックアウトによって、*Sox2* 発現は対応する領域で顕著に低下したが、そのノックアウト単独での胚発生全体への影響は軽微なケースが多かった。*Sox3* による機能補完などによるものである。

(2) 神経板形成初期では *Sox2* 発現領域の前部と後部を2分するエンハンサーN-2 と N-1 について、さらに詳細な解析をした。

① Epiblast と前部神経板における *Sox2* の発現は同じエンハンサーN-2 に担われているが、これら2つの幹細胞状態の間で、エンハンサーN-2 の制御は異なる。このことをもとにして、Epiblast、前部神経板の成立にそれぞれかかわる2つの転写因子セット [ZIC2+OCT3]、[ZIC2+OCT6+OTX2] を見出した (図2)。

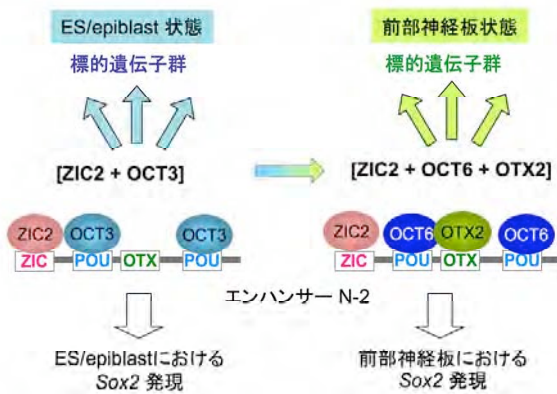


図2 Epiblast から前部神経板への幹細胞状態の遷移をもたらす「転写因子セット」の切換えの例。

② 後部神経板と中胚葉組織は、共通の前駆体である Stem zone から生み出される。両者が分れて生み出される過程は、T-box 因子 (Brachyury, *Tbx6* など) の作用と、エンハンサーN-1 に支配された *Sox2* 発現の、いわばせめぎ合いによって成り立っていることを明らかにした。この過程での *Tbx6* の関与を図3に示す。

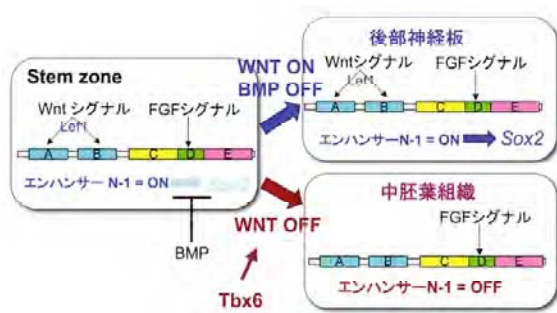


図3 Stem zone を共通の前駆体として、後部神経板と中胚葉組織が派生する過程と、その制御。

この Stem zone における細胞系列分岐の制御機構が明らかにされたことによって、以前からの謎であった、*Tbx6* ノックアウトマウスでは沿軸中胚葉組織に代わって神経管が発生するという現象が説明され、そして、*Tbx6* ノックアウトマウス胚でも、*Sox2* 遺伝子のエンハンサーN-1 を欠失させれば過剰な神経管が抑制されることによって、モデルの正当性を示した。(図4)

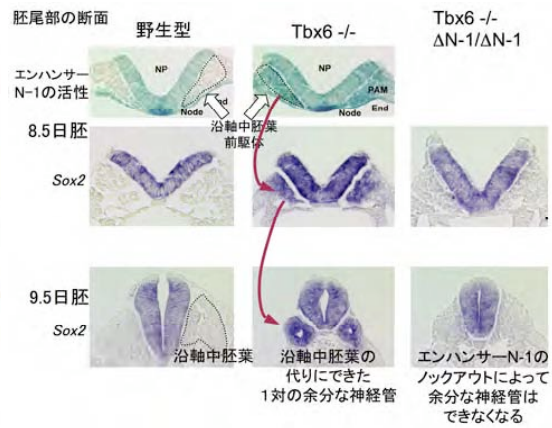


図4 *Tbx6* ノックアウトマウス胚では、中胚葉を生むべき細胞集団で *Sox2* 遺伝子のエンハンサーN-1 が活性を持ち、*Sox2* を異所的に発現させるために、中胚葉組織の代りに神経管が発生する。

後部神経板と中胚葉が共通の前駆体から二者択一的に生ずることを示したことによって、「胚発生においては、まず外・中・内の3胚葉が成立したのちに、その外胚葉が誘導を受けて神経板が生ずる」という古典的なモデルは否定される。

また、本研究は神経系原基(神経板)の生成機構が前部と後部で大きく異なる(*Sox2* エンハンサーN-2 と N-1 の制御の相違に対応する)ことを示した。この結論もまた、これまで主流であった考え方、すなわち、「均質な神経板原基に差次的なシグナルの勾配が加わることによって前部(頭部)から後部(尾部)にかけての中樞神経系の領域特異性が与えられる」というモデルを、大幅な修正を求めるものである。

(3) SOX2 および機能を共有する B1 グループ SOX 因子は、パートナー因子とともに協同的に作用して、発生過程のさまざまな遺伝子を制御する。その制御標的遺伝子群を明らかにするには、SOX 因子をノックアウトあるいはノックダウンした効果を解析することが有効であるが、マウスでの *Sox2* 遺伝子ノックアウトでは、初期胚の致死性の問題や、*Sox3* による機能補完のために、目的を果たすことが難しい。そこで、複数の遺伝子の同時ノックダウンが可能なゼブラフィッシュ胚を活用して、B1 SOX 制御標的遺伝子を解析した。B1 SOX 因子の制御標的遺伝子には、初期胚・神経系のパターン形成や形態形成に関与するシグナル因子群の遺伝子 (*bmp2b*, *bmp7*, *wnt11*)、神経系の領域化や神経分化に関与する転写因子群の遺伝子 (*her3*, *hesx1*, *neurog1*) など、特に神経系原基形成に直接的に関与するものが多いことを明らかにした。

原腸陥入期までの発生段階では、B1 SOX 因子のノックダウンの効果と、*pou5f1* (哺乳類の OCT3/4 に相当) 欠損胚の表現型 (さまざまな遺伝子の発現の欠損や発現パターンの異常) が酷似していた。実際に B1 SOX 因子の標的遺伝子のいくつかをとりあげて、その制御機構を解析すると、それらが SOX だけでなく POU 因子にも依存して活性化されることが明らかになった。これらのことから、発生初期では、B1 SOX 因子のパートナー因子は主として *pou5f1* であることが結論された。

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 22 件)

- ① Saigou Y, Kamimura Y, Inoue M, Kondoh H, Uchikawa M. Regulation of Sox2 in the pre-placodal cephalic ectoderm and CNS by enhancer N-4. *Dev Growth Differ.* 52:397-408 (2010). (査読有)
- ② Okuda Y, Ogura E, Kondoh H, Kamachi Y. B1 SOX coordinate cell specification with patterning and morphogenesis in the early zebrafish embryos. *PLoS Genet.* 6, e100093 (2010). (査読有)
- ③ Kondoh H, Kamachi Y. SOX-partner code for cell specification: regulatory target selection and underlying molecular mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol.* 42:391-399 (2010). (査読有)
- ④ Ukita K, Hirahara S, Oshima N, Imuta Y, Yoshimoto A, Jang CW, Oginuma M, Saga Y, Behringer RR, Kondoh H, Sasaki H. Wnt signaling maintains the notochord fate

for progenitor cells and supports the posterior extension of the notochord. *Mech Dev.* 126:791-803 (2009). (査読有)

- ⑤ Ogura E, Okuda Y, Kondoh H, Kamachi Y. Adaptation of GAL4 activators for GAL4 enhancer trapping in zebrafish. *Dev Dyn.* 238:641-655 (2009). (査読有)
- ⑥ Kamachi Y, Iwafuchi M, Okuda Y, Takemoto T, Uchikawa M, Kondoh H. Evolution of non-coding regulatory sequences involved in the developmental process: reflection of differential employment of paralogous genes as highlighted by Sox2 and group B1 Sox genes. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 85:55-68 (2009). (査読有)
- ⑦ Kondoh H, Uchikawa M. Dissection of chick genomic regulatory regions. *Methods Cell Biol.* 87, 313-336 (2008). (査読有)
- ⑧ Kondoh H. Shedding light on developmental gene regulation through the lens. *Dev Growth Differ.* 50 Suppl 1:S57-69 (2008). (査読有)
- ⑨ 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). (査読有)
- ⑩ 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). (査読有)
- ⑪ Yasuhara N, Shibasaki 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). (査読有)
- ⑫ Miyoshi T, Maruhashi M, Van De Putte T, Kondoh H, Huylebroeck D, Higashi Y. Complementary expression pattern of Zfx1 genes Sip1 and deltaEF1 in the mouse embryo and their genetic interaction revealed by compound mutants. *Dev Dyn.* 235:1941-1952 (2006). (査読有)
- ⑬ 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). (査読有)
- ⑭ 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). (査読有)

⑮ 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). (査読有)

⑯ 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). (査読有)

[学会発表] (計 64 件)

① Kondoh H, Iwafuchi M, Yoshida M, Papaioanou VE, Lovell-Badge, R, Uchikawa M, Takemoto T. Anterior and posterior neural plates from epiblast are derived by distinct molecular mechanisms. Society for Developmental Biology, 68th Annual Meeting, July 23-27, 2009, San Francisco, USA.

② Kondoh H, Iwafuchi, M, Takemoto T, Kamachi Y, Uchikawa, M. The regional identity of neural ectoderm indicated by their dependence on specific Sox2 enhancers. 2nd International Congress on Stem Cells and Tissue Formation. July 6-9, 2008, Dresden, Germany.

③ Kondoh H. Chicken genome and embryos to discover genetic regulatory networks in vertebrate development. 2nd International Chick Meeting. April 11-14, 2007, Barcelona, Spain.

[図書] (計 1 件)

① 浅島誠編 (近藤寿人ほか 22 名共著)、コロナ社、再生医療のための発生生物学 (158-167)、2009、259

[その他]

ホームページ

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

2nd International SOX Meeting: September 16-19, 2008, Awaji, Japan を主催。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 寿人 (KONDOH HISATO)
大阪大学大学院生命機能研究科・教授
研究者番号：70127083

(2) 研究分担者

蒲池 雄介 (KAMACHI YUSUKE)
大阪大学大学院生命機能研究科・准教授
研究者番号：90263334
内川 昌則 (UCHIKAWA MASANORI)
大阪大学大学院生命機能研究科・助教
研究者番号：80346147

(3) 連携研究者

竹本 龍也 (TAKEMOTO TATSUYA)
大阪大学大学院生命機能研究科・助教
研究者番号：30443899