

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22500292

研究課題名(和文) 神経分化を負に制御する新規転写抑制機構の解明

研究課題名(英文) Novel transcriptional repression mechanisms that negatively regulate neuronal differentiation

研究代表者

蒲池 雄介 (Kamachi, Yusuke)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：90263334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：神経系の幹細胞の成立過程および維持機構の理解は、生物学的にも、再生医療への応用という観点からも非常に重要な課題である。本研究は、ゼブラフィッシュをモデル生物として利用することで、グループ B1 Sox 転写因子(Sox1/2/3/19) が、神経細胞の分化を、どのようなメカニズムで抑制することで、神経系の幹細胞の成立と維持にかかわるのかに焦点をあてて研究を行った。その結果、Zic1などの転写抑制因子、ならびにいくつかのmiRNAが、B1 Sox 転写因子の下流で神経分化抑制のプロセスに関わる可能性が見いだされた。

研究成果の概要(英文)：Mechanisms of how neural stem/precursor cells are established and maintained have been important questions. In this study, we investigated mechanisms of how group B1 Sox transcription factors (Sox1/2/3/19) regulate neural stem cell states using zebrafish as a model system. We show that transcriptional repressors including Zic1 and several miRNA are involved in B1 Sox-dependent-inhibition of neuronal differentiation.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：遺伝子 発生・分化

## 1. 研究開始当初の背景

Sox2 を代表とするグループ B1 Sox (Sry-type HMG box) 転写因子 (以下 SoxB1 因子) は、神経系の成立および神経幹細胞の維持に重要な因子であると考えられてきたが、その制御メカニズムはこれまでほとんど分かっていなかった。私たちは、ゼブラフィッシュをモデル動物として利用することで、SoxB1 の活性をほぼ完全にノックダウンした胚を作り出すことに成功し、実際に SoxB1 因子が、神経系の初期発生を支配する遺伝子制御ネットワークにおいて中心的な役割を持つことを示した。この SoxB1 ノックダウン胚を利用した一連の研究で、神経細胞の分化に関わる遺伝子が SoxB1 因子により抑制されていることが見出された。SoxB1 は転写活性化因子として機能することから、未知の転写抑制因子を活性化することで神経分化の抑制に関わることが強く示唆された。

## 2. 研究の目的

神経系の幹細胞の成立過程および維持機構の理解は、生物学的にも、再生医療への応用という観点からも非常に重要な課題であるが、多くの不明な点が残されている。私たちは、SoxB1 グループ転写因子 (Sox1/2/3/19) が、神経系の成立の鍵となる因子であることをこれまでに示した。この一連の研究において、SoxB1 の下流で働く未知の因子が神経細胞特異的な遺伝子の発現を抑制することが示唆された。この新規転写抑制機構は、神経系の幹細胞の成立と維持に密接に関係している、極めて重要な制御機構である可能性が高いことから、本研究での解明を目指す。

## 3. 研究の方法

SoxB1 の下流で働き、神経分化に抑制的に働く未知の転写抑制因子の同定およびその機能の解析を、ゼブラフィッシュをモデル動物として実施する。

(1) SoxB1 ノックダウン胚では、神経特異的遺伝子の抑制に必要な因子の発現が低下し

ていると予想される。マイクロアレイによる発現解析を行い、転写抑制因子として働く可能性がある因子を候補として選び出し、それらの因子の神経分化に関係する遺伝子群 (ascl1a, stmn2a など) の発現に対する作用を調べる。

(2) 神経分化関連遺伝子群 (ascl1a, stmn2a 遺伝子など) の転写抑制に必要なシスエレメント (SoxB1 に間接的に依存したもの) を同定し、その部位に作用する転写抑制因子を探索する。

(3) 以上の方法で同定された新規の転写抑制因子が、神経系細胞の分化にどのような役割を持つのかを、loss-of-function および gain-of-function の解析を通して調べる。

## 4. 研究成果

(1) 4つの SoxB1 因子 (Sox2, Sox3, Sox19a, Sox19b) をアンチセンスモーフオリノオリゴでノックダウンした (4重ノックダウン) ゼブラフィッシュ胚では、通常は神経細胞の分化に伴い発現される遺伝子が、早いステージで活性化される。転写活性化型の bHLH 因子 (achaete-scute complex-like 1 [Ascl1] などの proneural 因子) は、神経分化を促進する鍵となる転写因子であるが、SoxB1 4重ノックダウン胚では、ascl1a が本来は発現がない時期に活性化されてしまう (図1)。これに加えて、通常は神経分化にともなって発現が開始される遺伝子群 (stmn2a, tuba1 遺伝子など) が、SoxB1 ノックダウン胚では早期に活性化されてしまうことも見出された (図1)。SoxB1 は転写活性化因子として機能することから、未知の転写抑制因子を活性化することで神経分化の抑制に関わることが強く示唆される。したがって、まず SoxB1 4重ノックダウン胚で発現が低下している転写抑制因子に注目した解析をおこなった。マイクロアレイ法を用いて、正常胚と SoxB1 4重ノックダウン胚との間で網羅的に遺伝子の発現レベルの差を解析したところ、神経板が形成される時期に SoxB1 4重ノックダウン

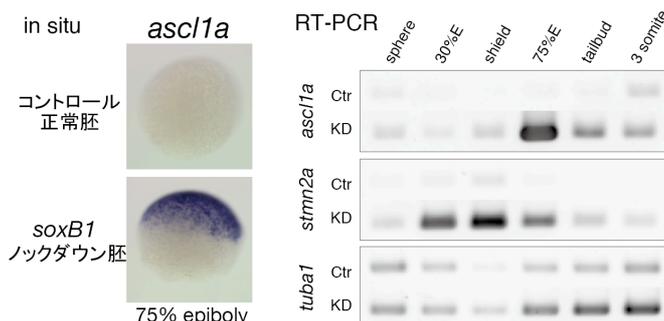


図1. SoxB1 4重ノックダウン胚では、ascl1a が本来発現されない時期に神経外胚葉の広い領域で活性化されてしまう (左)。また、stmn2a, tuba1 遺伝子も早期に活性化されてしまう (右)。

胚で発現が低下している転写抑制因子として、Her3, Hesx1, Zic1 などが見いだされた。これらの転写因子が、*ascl1a* などに対する転写抑制因子となり得るかどうかを調べるため、SoxB1 の4重ノックダウンを行うのと同時に、それぞれの mRNA を共導入することで、*ascl1a* などの発現上昇が抑えられるのかを調べた。その結果、Zic1 mRNA を共導入してその発現を回復させたときに、*ascl1a*, *stmn2a* の発現上昇が抑制されることが分かった (図2)。このとき、*tuba1* の発現上昇が抑制されることはなかった。一方、Her3, Hesx1 には、このような抑制効果はほとんど見られなかった。したがって、SoxB1 は転写抑制因子 Zic1 を活性化することで、神経細胞の分化を抑制していると考えられる。しかし、*tuba1* 遺伝子などは別の因子を介して発現が抑制されていることが示唆される。

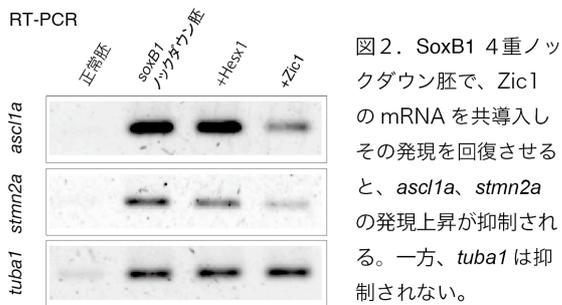


図2. SoxB1 4重ノックダウン胚で、Zic1 の mRNA を共導入しその発現を回復させると、*ascl1a*, *stmn2a* の発現上昇が抑制される。一方、*tuba1* は抑制されない。

(2) 多くの遺伝子の制御配列は、転写活性化因子と抑制因子が隣接したゲノム領域に作用することで、制御配列 (エンハンサー・プロモーター) の活性が厳密にコントロールされている場合が多い。この点に注目して、まず *ascl1a* 遺伝子の正常な発現に必要な制御配列の解析を行った。周辺のゲノム域を調べたところ、興味深いことに *ascl1a* 同様に SoxB1 4重ノックダウン胚で発現が上昇する遺伝子の一つである *pah* (phenylalanine hydroxylase) が、上流約 8 kb に存在することが分かった (図3)。さらに、この二つの遺伝子の間には、脊椎動物の種間でよく保存された配列があることから、この領域が両方の遺伝子の発現に関わる制御配列である可能性が予測された。このゲノム配列をレポーター遺伝子と連結したコンストラクトを製作し、これらのコンストラクトをゼブラフィッシュに顕微注入することで制御配列の同定を行ったところ、胚の神経板でエンハンサー様の活性を持つことがわかった。現在、この活性が SoxB1 に間接的に制御されているのかを調べている。*stmn2a* に関しては、そのプロモーター領域を制御配列の候補として調

べたが、ゼブラフィッシュ胚における領域特異的な活性は明確には確認できなかった。



図3. ゼブラフィッシュ *ascl1a* 遺伝子上流約 8 kb に、*pah* 遺伝子がある。これらの遺伝子の間に、種間で保存された配列が存在する。

(3) SoxB1 因子4重ノックダウン胚で発現が低下している転写抑制因子として見いだされた Hesx1, Zic1 因子の神経分化における詳細な役割の解析は、今後の課題として残されている。特に、Zic1 がどのようなメカニズムで SoxB1 に制御されているのか、またどのようなメカニズムで *ascl1a* などの発現抑制に関わるのかを今後詳細に調べる必要がある。

(4) SoxB1 因子の下流で働き神経分化を負に調節する可能性がある因子として転写調節因子以外に、miRNA が関与することが予想されたことから、本研究では miRNA も研究対象とした。microRNA は、機能性小分子 RNA で、胚発生、細胞の分化や増殖に重要な役割を持つ。実際、SoxB1 4重ノックダウン胚における様々な miRNA 遺伝子の発現変化を RT-PCR 方により調べたところ、神経系の発生との関連も知られている mir-430 クラスターを含めて複数の miRNA に発現レベルの変化が見いだされた。現在、これらの miRNA と神経系の発生との関わりをさらに解析中である。

## 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 5 件)

(1) Kamachi, Y., and Kondoh, H. (2013) Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development*. 140, 4129-4144. doi: 10.1242/dev.091793. (査読有)

(2) Morimura H., Tanaka S. I., Ishitobi H., Mikami T., Kamachi Y., Kondoh H., Inouye Y. (2013) Nano-Analysis of DNA Conformation Changes Induced by Transcription Factor Complex Binding Using Plasmonic Nanodimers. *ACS Nano*. 23, 10733-10740. doi: 10.1021/nn403625s. (査読有)

(3) Kobayashi, I., Kojima, K., Uchino, K.,

Sezutsu, H., Iizuka, T., Tatematsu, K., Yonemura, N., Tanaka, H., Yamakawa, M., Ogura, E., Kamachi, Y., Tamura, T. (2011) An efficient binary system for gene expression in the silkworm, *Bombyx mori*, using GAL4 variants. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 76, 195-210. doi: 10.1002/arch.20402. (査読有)

(4) Iwafuchi-Doi, M., Yoshida, Y., Onichtchouk, D., Leichsenring M., Driever, W., Takemoto, T., Uchikawa, M., Kamachi, Y., Kondoh, H. (2011) The Pou5f1/Pou3f-dependent but SoxB-independent regulation of conserved enhancer N2 initiates Sox2 expression during epiblast to neural plate stages in vertebrates. *Dev. Biol.* 352, 354-366. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.12.027. (査読有)

(5) Okuda, Y., Ogura, E., Kondoh, H. and Kamachi, Y. (2010) B1 SOX coordinate cell specification with patterning and morphogenesis in the early zebrafish embryo. *PLoS Genet.* 6(5): e1000936. doi: 10.1371/journal.pgen.1000936. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

(1) 川合 杏奈, 近藤 寿人, 蒲池 雄介. Sox11 に依存した miRNA-17-92 クラスター発現の制御機構. 第36回日本分子生物学会年会. 神戸 2013年12月3日

(2) 蒲池 雄介, 川合 杏奈, 近藤 寿人. Sox11 は microRNA 遺伝子の転写活性化を通して胚発生を制御する. 第35回日本分子生物学会年会. 福岡 2012年12月11日

(3) Kamachi Y. Group B1 and C sox genes in zebrafish development. Third International Sox Meeting. Grainau Germany 2011年9月12日

(4) Okuda, Y., Kondoh, H., Kamachi, Y. B1 SOX Coordinate Cell Specification with Patterning and Morphogenesis in the Early Zebrafish Embryo. 69th Society for Developmental Biology Annual Meeting. Albuquerque USA 2010年8月7日

(5) 三上 智之, ANDRABI Munazah, 蒲池 雄介, 内川 昌則, 近藤 寿人. SOX - PAX 転写因子の協調相互作用が関与する発生的遺伝子調節. 第43回日本発生生物学会. 京都 2010年6月21日

[図書] (計 1 件)

蒲池雄介 丸善出版 分子生物学 第3版

田沼靖一編 (2011) 発生と細胞分化 p176-190

[その他]  
ホームページ  
<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/generall/lab/06/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

蒲池 雄介 (KAMACHI YUSUKE)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号: 90263334