

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：14401  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23770248  
 研究課題名（和文） 転写制御因子SOX2とそのパートナー因子の協調的作用による感覚器原基特異化の研究  
 研究課題名（英文） Specification of sensory primordia by the synergistic action of SOX2 and its partner factor  
 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

研究成果の概要（和文）：本研究は、転写制御因子SOX2とそのパートナー因子の協調的作用による感覚器原基の特異化機構について研究した。鼻、眼、耳などの感覚器原基は頭部外胚葉に由来し、*Sox2*が常に発現される。この発現は時期・領域特異的な制御領域（エンハンサー）により制御される。今回解析したNOP1エンハンサーは、嗅上皮・内耳プラコード特異的に活性を示す。その活性に必須な配列の一つは、SOX2/9とSall14により協調的に制御されることを明らかにした。さらにドミナントネガティブフォームSOX2は、内耳プラコードでNOP1エンハンサー活性を阻害したことから、嗅上皮・内耳プラコード特異的なNOP1エンハンサーの活性にはSOXとSall14の協調的な作用が重要であることが示された。

研究成果の概要（英文）：Sensory tissues, e.g. olfactory epithelium, inner ear and lens, develop from cephalic ectoderm through progressive specification steps. The transcription factor gene *Sox2* is consistently expressed in the sensory primordia regardless of developmental stages, owing to the sequential activation of stage-/placode-specific enhancers. The NOP1 enhancer is specifically active in the nasal and otic placodes. An essential activating element of NOP1 enhancer was shown to be regulated by the synergistic action of Sox2 and Sall14, as well as Sox9 and Sall14 (but not Sox11 and Sall14). Inhibition of Sox activity in the posterior cephalic ectoderm inactivated the NOP1 enhancer. These data indicate that Sox-Sall14 synergism is essential for *Sox2* regulation in the nasal and otic placodes.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：細胞分化、発現制御、感覚器原基、エンハンサー、Sox2、Sall14

## 1. 研究開始当初の背景

眼の水晶体、鼻の嗅上皮、耳の内耳といった感覚器は、その形態や機能はさまざまだが、その形成過程には共通点が多い。それらはいずれも胚の頭部外胚葉から発生し、まず初めに肥厚して感覚器プラコードを形成する。感覚器プラコードが初期に共通した性質(互換

性)を持つことは、組織の交換移植の実験から示唆されている。この感覚器プラコードの形成に先駆けて、共通に発現される転写制御因子がSOX2である。

SOX 転写制御因子は、その標的遺伝子の発現を制御する際に、特定のパートナー因子とともに協調的に作用する。感覚器プラコード

形成において、SOX2 は水晶体プラコードではそのパートナー因子として Pax6 と協調的に働く。また嗅上皮・内耳プラコードで活性を示す NOP1 エンハンサーでは、SOX2 と Sal14 によって協調的に作用することが示唆されつつあった。

そこで本研究では、感覚器形成過程における SOX2 の役割に着目し、SOX2 が機能する際に重要な役割を果たすパートナー因子との協調的作用について研究する。

## 2. 研究の目的

胚発生は、連続した細胞分化によって推進され、さまざまな細胞種を生み出す。この過程には転写制御因子が大きな役割を果たす。しかし細胞分化における転写制御因子の機能を明確に理解するには、個々の因子ではなく、その組合せによる機能を理解する必要がある。

本研究では、感覚器形成を直接的に制御する転写制御因子 SOX2 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。SOX2 とそのパートナー因子の組合せの使い分けで、共通の性質の頭部外胚葉から各々の個性を持った感覚器原基(眼・鼻・耳)が特異化される仕組みを明らかにする。特に、鼻・耳の原基が眼の原基からどのように特異化されるかを、SOX2 とそのパートナー因子の組合せによる制御機構から解析する。

## 3. 研究の方法

本研究では、転写制御因子 SOX2 とそのパートナー因子による感覚器形成の特異化機構の解明を目指す。感覚器形成の初期過程に重点をおき、次の課題に取り組む。

(1) 転写制御因子 SOX2 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を明らかにする。水晶体プラコードでは SOX2 と Pax6 の組合せが、嗅上皮・内耳プラコードでは SOX2 と Sal14 による組合せが、どのようにそれぞれの細胞分化を促進するか解析する。

(2) 感覚器形成の開始機構を模範例とした、転写制御因子群による細胞分化の操作を試みる。感覚器原基が形成される頭部外胚葉で転写制御因子群を操作によることによって、積極的に細胞分化を操作する。

## 4. 研究成果

(1) 転写制御因子 SOX2 と Sal14 による嗅上皮・内耳プラコードで活性を示す NOP1 エンハンサーの制御

Sox2 遺伝子の発現制御領域の一つである 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)。この活性に必要な部位として SOX 結合配列とそれに隣接する部位を同定した。それぞれに変異を導入、あるいは両方に変異を導入すると、その活性は消失した。このことから、SOX 結合配列とその隣接した配列は、嗅上皮・内耳プラコードで活性を示す NOP1 エンハンサーの活性に必須であることが示された。

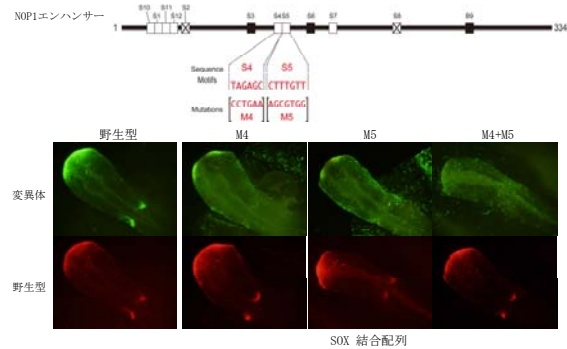


図1 NOP1エンハンサーの嗅上皮・内耳プラコード特異的活性と SOX結合配列およびその隣接した配列への変異による影響

この領域[110-133]を 8 量体にしてその活性を調べると、嗅上皮・内耳プラコードと中枢神経系や神経冠細胞で活性を示した。これらの活性化組織は、Sox2 と Sal14 の発現が重なった組織とほぼ一致するが、神経冠細胞では Sox2 は発現されない。このステージでの神経冠細胞では、グループ E に属する Sox8, 9, 10 が発現される(図2)。

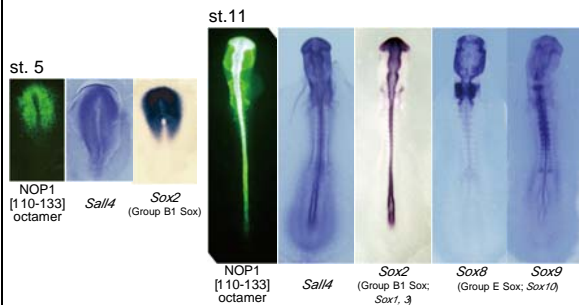


図2 NOP1エンハンサーのサブフラグメント[110-133]x8のエンハンサー活性とグループB(Sox2), グループE(Sox8, 9) Sox遺伝子と Sal14 の発現

そこで[110-133]の活性化にグループ E を含む SOX 転写制御因子が Sal14 と協調的に作用できるかどうかを、培養細胞を用いて検討した(図3)。その結果、グループ B に属する Sox2, 3 とグループ E に属する Sox9 は共に Sal14 と協調的に[110-133]を活性化することができた。この活性化には両者の結合が必要で、どちらかの結合部位に変異を入れると、その活性化は消失した。しかしグループ C に属する Sox11 は、[110-133]を活性化できなかった。このことから、SOX 転写制御因子と

Sall14 による協調的な作用には、SOX 転写制御因子群のグループ特異性があることが示された。このことは SOX 転写制御因子が、胚発生過程でそれぞれ特異的なパートナー因子と共に作用することと一致する。

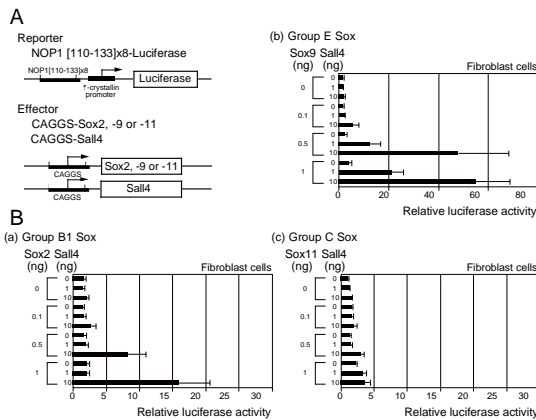


図3 NOP1エンハンサーのサブフラグメント[110-133]x8におけるSoxとSall14による協調的な活性化

嗅上皮・内耳プラコードで特異的な活性を示す NOP1 エンハンサーは、グループ B SOX あるいはグループ E SOX と Sall14 の協調的な作用によって活性化されることが示された。NOP1 エンハンサーの[110-133]の領域は、SOX 転写制御因子のパートナー因子として Sall14 が作用することが示された初めての例である。また[110-133]の活性は、嗅上皮・内耳プラコード以外にも活性を示し、NOP1 エンハンサーの嗅上皮・内耳プラコード特異性にはその他の組織で活性化を抑制する抑制領域が重要であることが示唆された。多くの抑制領域は、NOP1 エンハンサーの 3' 側に存在することが明らかになっている。今後は、これらの領域にどのような転写抑制因子が作用するのかを明らかにしていきたい。

(2) 頭部外胚葉における転写制御因子群 SOX2, Sall14 の機能解析

感覚器原基が形成される頭部外胚葉で転写制御因子群を操作して、積極的な細胞分化を試みた。ニワトリ胚を用いた強制発現を行い、SOX2 と Sall14 の作用によってどこまで嗅上皮・内耳プラコードの特異性を推進できるかを検討した。Sox2 と Sall14 の強制発現によって、2つの因子が作用する[110-130]x8 のエンハンサー活性は頭部外胚葉の広い領域で異所的に活性化された。しかし全長の NOP1 エンハンサーの活性化は、嗅上皮・内耳プラコードに限られた。このことは NOP1 エンハンサーの嗅上皮・内耳プラコード特異性には、抑制領域が重要な役割をすることと一致した。Sox2 と Sall14 の作用による嗅上皮・内耳プラコード特異化には、脱抑制が重要であることが示唆された。

SOX2 と Sall14 の頭部外胚葉での機能の必要性を調べるために、それぞれのドミナントネガティブフォームを作成した。Sall14 については、機能的なドミナントネガティブフォームを作成することができず、その効果を検討することができなかった。今後、morpholino antisense oligo や siRNA を用いた発現阻害の方法を検討していきたいと考えている。ドミナントネガティブフォーム SOX2 による機能阻害を行ったところ、NOP1 エンハンサー活性が完全に阻害された(図4)。このことから NOP1 エンハンサーの活性には、SOX 転写制御因子の活性が必須であることが示された。



図4 頭部外胚葉でのSOX2あるいはドミナントネガティブフォームSOX2の強制発現によるNOP1エンハンサー活性への影響。mRFP1の赤い蛍光で示された頭部外胚葉でそれぞれの因子を強制発現した。抑制ドメインとの融合タンパク質として発現したSOX2EnRでは、内耳プラコードでNOP1エンハンサー活性が阻害された(白矢尻)。

さらにドミナントネガティブフォーム SOX2 による内耳プラコードの形成に対する影響を調べたところ、頭部外胚葉の肥厚は確認されたが、その後の陥入は確認できなかった。今後、陥入については慎重に検討する必要がある。また、いくつかの内耳プラコードのマーカー遺伝子の発現を調べたところ、Pax2 などの初期マーカー遺伝子に変化は観察されなかった。今後、より後期のマーカー遺伝子についても検討していきたいと考えている。

以上の結果から、頭部外胚葉における感覚器プラコードの特異化に、転写制御因子 SOX2 とそのパートナー因子である Sall14 が協調的に作用することが明らかになった。SOX 転写制御因子群は、そのパートナー因子との組合せによって組織特異的な作用を行っている可能性がある。

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 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  
査読有  
The Journal of Neuroscience, 2013, 33(9): 3879-3890.  
doi:10.1523/JNEUROSCI.4030-12.2013
- ② A Systematic Survey and Characterization of Enhancers that Regulate Sox3 in Neuro-Sensory Development in Comparison with Sox2 Enhancers.  
Naoko Nishimura, Yoshifumi Kamimura, Yoshiko Ishida, Tatsuya Takemoto, Hisato Kondoh, Masanori Uchikawa  
査読有  
Biology, 2012, 1(3): 714-735.  
doi:10.3390/biology1030714
- ③ The Prosensory Function of Sox2 in the Chicken Inner Ear Relies on the Direct Regulation of Atoh1.  
Joana Neves, Masanori Uchikawa, Anna Bigas, Fernando Giraldez  
査読有  
PLoS ONE, 2012, 7(1): e30871.  
doi:10.1371/journal.pone.0030871
- ④ The Pou5f1/Pou3f-dependent but SoxB-independent regulation of conserved enhancer N2 initiates Sox2 expression during epiblast to neural plate stages in vertebrates.  
Makiko Iwafuchi-Doi, Yuzo Yoshida, Daria Onichtchouk, Manuel Leichsenring, Wolfgang Driever, Tatsuya Takemoto, Masanori Uchikawa, Yusuke Kamachi, Hisato Kondoh  
査読有  
Developmental Biology, 2011, 352(2): 1354-366.  
doi:10.1016/j.ydbio.2010.12.027
- ⑤ B1 and B2 Sox gene expression during neural plate development in chicken and mouse embryos: Universal versus species-dependent features.  
Masanori Uchikawa, Megumi Yoshida, Makiko Iwafuchi-Doi, Kazunari Matsuda, Yoshiko Ishida†, Tatsuya Takemoto, Hisato Kondoh  
査読有  
Development, Growth & Differentiation, 2011, 53(6): 761-771.  
doi:10.1111/j.1440-169X.2011.01286.x

[学会発表] (計6件)

- ① 内川 昌則, 須賀原 智子, 近藤 寿人  
GroupB1/E Sox 因子と Sal14 の協調的な活性化と多数の抑制エレメントによる

- Sox2* 遺伝子の鼻・耳プラコード特異的 NOP1 エンハンサーの発現制御  
第35回日本分子生物学会年会  
3P-0556: 2012年12月13日  
福岡国際会議場・マリンメッセ福岡
- ② 安見 孝広, 内川 昌則, 近藤 寿人, 東雄二郎  
初期ニワトリ胚を用いた *zfhx1* ファミリーの機能重複の検討  
第35回日本分子生物学会年会  
3P-0504: 2012年12月13日  
福岡国際会議場・マリンメッセ福岡
- ③ 岡本 優, 西村 なおこ, 内川 昌則, 近藤 寿人  
内耳原基で活性を示すニワトリ Sox3 遺伝子のエンハンサーの解析  
第35回日本分子生物学会年会  
2P-0528: 2012年12月12日  
福岡国際会議場・マリンメッセ福岡
- ④ Masanori Uchikawa, Satoko Sugahara, Hisato Kondoh  
Regulation of Sox2 NOP1 enhancer indicates Sox-Sall4 dependent activation and multiple repression mechanisms involved in the nasal and otic placode specification  
Chick 7: Avian Model System  
7th International Chick Meeting  
P1-22: 2012年11月15日~17日  
Nagoya University Noyori Conference Hall, Nagoya, Japan
- ⑤ Satoko Sugahara, Toru Fujimoto, Masanori Uchikawa, Hisato Kondoh  
Nasal/otic placode-specific regulation of Sox2 enhancer NOP-1 depends on SoxB1/E-Sall4 interaction and multiple repression mechanisms  
Third International Sox Meeting: From Structure To Function  
September 11-14, 2011  
Grainau/Zugspitzdorf, Germany
- ⑥ Masanori Uchikawa, Miho Morishima, Yuka Saigou, Hisato Kondoh  
Small eye development caused by ectodermal Sox2 downregulation in enhancer N4 knockout mice  
日本発生生物学会 第44回大会  
P-2086: 2011年5月20日  
沖縄コンベンションセンター

## 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