

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590179

研究課題名（和文） プラコードの細胞系譜と頭部形成における機能解析

研究課題名（英文） Cell lineage and functional analyses of the cranial sensory placodes in the vertebrate head

研究代表者

佐藤 滋 (SATO SHIGERU)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70306108

研究成果の概要：

**Six1** ホメオボックス遺伝子の発現解析により多様な感覚器プラコードの共通の原基である **preplacodal region (PPR)** の存在をマウスではじめて示した。次にニワトリとマウス胚の前側 **PPR** で **Six1** の発現を活性化する保存されたエンハンサーを同定した。**Six1** 前側 **PPR** エンハンサーの活性化因子と抑制因子の有力な候補を同定し、**Six1** 発現領域 (=PPR) が規定される分子基盤の一端を明らかにした。また、2種類の **Six1** プラコードエンハンサーの制御下で **Cre** リコンビナーゼを発現するマウスの樹立に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般

キーワード：感覚器プラコード、比較ゲノム、脊椎動物進化、転写制御、エンハンサー

## 1. 研究開始当初の背景

生物は感覚器によって外界の刺激を受容し、脳へ伝達し、刺激に応じた行動を起こす。脊椎動物頭部の感覚器と知覚神経のほとんどはプラコードと呼ばれる肥厚した外胚葉から形成される。そして、嗅覚、味覚、聴覚、平衡覚、顔面や口腔の体性感覚が、鼻、レンズ、三叉神経節、耳および上鰓プラコードに由来する感覚器と知覚神経によって受容さ

れる。哺乳類以外の脊椎動物では神経板前端を取り囲む一続きのプラコード原基である **preplacodal region (PPR)** から全てのプラコードが生じるとされ、この **PPR** 特異的に発現する代表的な遺伝子として **Six1** ホメオボックス遺伝子が知られていた。一方、**Six1** 欠損マウスは嗅上皮、内耳、脳神経節の劇的な形成異常を示し、**Six1** は単なるマーカー遺伝子ではなく、プラコード由来感覚器形成に不可欠な遺伝子であることがわかってきた。

しかし、哺乳類における PPR の存在、PPR およびプラコードにおける Six1 の発現を制御するシス・エレメントや転写因子は不明であった。また、PPR とプラコード特異的に転写を活性化するシス・エレメント（エンハンサー）を利用した細胞系譜解析を可能にするマウスの開発が待たれていた。

## 2. 研究の目的

ニワトリ胚を用いて同定した 3 種類の Six1 の PPR およびプラコード特異的エンハンサーを活用して、全ての感覚器の原基である PPR と感覚器特異的プラコードの発生メカニズムと細胞系譜解析を可能にするマウスの開発を目指す。具体的な到達目標は以下の 4 点である。

- (1) マウス初期胚における Six1 の mRNA の発現とタンパク質の局在パターンの解明。
- (2) Six1 の PPR 特異的エンハンサーを活性化するエンハンサーの特徴の詳細な解析。
- (3) Six1 の PPR 特異的エンハンサーの活性化に関わる主要な転写因子の同定。
- (4) Six1 の PPR およびプラコード特異的エンハンサー下で Cre リコンビナーゼを発現するマウス系統の樹立。

## 3. 研究の方法

(1) Six1 発現パターンの同定：ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションによりマウス初期胚における Six1 の mRNA の発現パターンを明らかにする。また特異的抗体を用いて Six1 タンパク質の局在パターンを明らかにする。

(2) Six1 の PPR 特異的エンハンサーの機能解析：ニワトリ胚を用いて同定した Six1 の PPR 特異的エンハンサーの活性をさらに詳細に調べ、マウス胚における活性も明らかにする。

(3) Six1 の PPR 特異的エンハンサーを活性化する転写因子の同定：マウスとニワトリを用いた実験により重要な転写因子結合部位を同定する。また、ゲルシフト法により結合する転写因子を同定する。ニワトリ胚での過剰発現実験により転写因子の機能（活性化または抑制）を明らかにする。

(4) Cre 発現マウスの樹立：Six1 の 2 種類のプラコード特異的エンハンサーのマウス胚での活性を明確にする。2 種類のプラコード特異的エンハンサーと PPR 特異的エンハンサーの制御下で Cre リコンビナーゼを発現するマウス系統を樹立する。

## 4. 研究成果

(1) PPR はマウスにも存在した。

E8.0 のマウス胚を用いてホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションを行った結果、TS12a (1-4 体節期) および TS12b (5-7 体節期) において Six1 が神経板前側を取り囲む外胚葉で発現することがわかった。次に所属研究室で最近作製された Six1 特異的抗体を用いてさらに詳細な検討を行ったところ、Six1 は神経板前側のかかなり広い領域を取り囲む一続きの外胚葉に局在していることが明確になった。この馬蹄形の発現パターンはニワトリやカエルで報告されていたパターンと一致しており、Six1 を発現するプラコード原基 (PPR) はマウスにも存在し、脊椎動物共通の特徴であることがはじめて明らかとなった。マウスにおける PPR すなわち感覚器官細胞の同定は、将来的に感覚器の再生医療を計画する際に有用な非常に重要な発見であった。また、マウス Six1 の発現は内胚葉と頭部間充織でも見られ、ニワトリ Six1 の発現パターンに良く似ていることもわかった。

(2) Six1 の PPR エンハンサーは PPR の前側特異的に転写を活性化する。

Six1 の PPR エンハンサー (Six1-14、565 bp) はニワトリ胚を用いたエンハンサー検索実験で同定された。マウス胚でのエンハンサー活性を調べたところ、PPR 特異的に転写を活性化することがわかった。切片の観察と神経板特異的 Sox2 抗体を用いた解析から、その活性は外胚葉に特異的であり、隣接する神経板では検出されないことも明確となった。興味深いことに Six1 の PPR エンハンサーは馬蹄形の PPR の前側部分だけで転写を活性化する (マウスとニワトリ胚の両方で) という特徴を持っていることもわかった。この Six1-14 の持つエンハンサー活性を PPR 全体に拡大する補助的なシスエレメントがあるのか、後側 PPR での発現を担うエンハンサーが別にあるのかはまだ明らかではないが、連続して見える PPR での Six1 の発現が複数のエンハンサーによって制御されているという事実は驚きであった。馬蹄形の Six1 の発現を生み出すすべてのシスエレメントと制御メカニズムの解明は今後の重要な課題である。

(3) Six1 の前側 PPR エンハンサーの活性は 2 種類のホメオドメインタンパク質の競合的な作用によって規定されている。

保存された転写因子の結合部位に点突然

変異を導入したレポーターを用いて機能的に重要な部位を同定した。5ヶ所の *Gata* タンパク質結合部位の変異はニワトリ胚においてエンハンサー活性を減弱させた。一方、3ヶ所の *Sox* タンパク質結合部位の変異は影響がなかった。ところが、3ヶ所のホメオドメイン (HD) タンパク質の結合部位に変位を導入したところ、エンハンサー活性はほぼ完全に消失した。その結果はマウスにおいても再現され、HD タンパク質の結合部位がエンハンサー活性に必須であることが明らかとなった。

発現パターンから予想される結合因子の候補は *Gata2/3*、HD タンパク質の *Dlx5/6*、*Msx1/2* であった。ニワトリ、カエル、魚を用いた過剰発現およびノックダウン実験などの結果を参考にして、活性化因子の候補としては *Dlx5* を、抑制因子の候補として *Msx1* に焦点を当て、さらに解析を進めた。まず、大腸菌で発現させた GST-*Dlx5* と GST-*Msx1* が3ヶ所の HD タンパク質結合部位に試験管内で結合することを確認した。続いて、ニワトリ胚での過剰発現実験により、*Dlx5* と *Msx1* がエンハンサーに及ぼす効果を検討した結果、VP16 転写活性化ドメインと *Dlx5* との融合タンパク質はレポーター遺伝子の発現を活性化し、一方、*Engrailed* 転写抑制ドメインと *Dlx5* との融合タンパク質と *Msx1* はレポーター遺伝子の発現を抑制することがわかった。

以上の結果と、*Dlx* と *Msx* 間の競合的な関係を考慮すると、*Six1* の発現領域 (=PPR) は (*Dlx* の発現領域) - (*Msx* の発現領域) として規定されることが示唆された。このモデルは神経板の前後軸および内外軸方向に沿った *Six1* の発現領域 (=PPR) の分布パターンを非常にうまく説明できた。

(4) *Six1* のプラコードエンハンサー下で *Cre* リコンビナーゼを発現するマウス系統の樹立。

*Six1-8* は三叉神経節、耳、上鰓プラコードと脊髄神経節で転写を活性化するエンハンサーである。一方、*Six1-21* は鼻、耳、上鰓プラコードとラトケ嚢で転写を活性化するエンハンサーである。重要な点は、この2つのエンハンサーでレンズプラコード (*Six1* も発現しない) を除くすべてのプラコードがカバーされるという点である。そこで、これら2種類のエンハンサーの下流に *tk* プロモーターと NLS-*Cre* リコンビナーゼ遺伝子を繋げ、さらにゲノム中の挿入部位による影響を極力排除するために両末端にインスレーター配列を繋げたトランスジーンを構築した。*C57BL/6J* の受精卵にインジェクションを行い、*Six1-8* は7系統、*Six1-21* は3系統のフ

ァウンダーマウスを獲た。F1 個体を *R26R-lacZ* レポーターマウスとかけ合わせることで、少なくとも各1系統期待されたパターンで *Cre* 活性を発現するマウスを得ることができた。これらのマウスを用いた詳細な細胞系譜追跡実験と特異的な細胞障害実験によるプラコードの頭部形態形成における役割の解明が次の課題である。また、これらのマウスはプラコード特異的な過剰発現実験を行ったり、プラコード特異的なノックアウトマウスを作製するために大変有用である。さらに、将来的に感覚器および頭蓋顔面形成の研究コミュニティの発展にも大いに貢献する研究成果・研究資源だと思われる。

#### 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3件)

①Ishihara T, Sato S, Ikeda K, Yajima H, Kawakami K. Multiple evolutionarily conserved enhancers control expression of *Eya1*. *Dev Dyn*, 237, 3142-3156 (2008). 査読有

②Ishihara T, Ikeda K, Sato S, Yajima H, Kawakami K. Differential expression of *Eya1* and *Eya2* during chick early embryonic development. *Gene Expr Patterns*, 8, 357-367 (2008). 査読有

③Ikeda K, Ookawara S, Sato S, Ando Z, Kageyama R, Kawakami K. *Six1* is essential for early neurogenesis in the development of olfactory epithelium. *Dev Biol*, 311, 53-68 (2007). 査読有

[学会発表] (計3件)

①Sato S, Ikeda K, Hayashibara Y, Nakao K, Aizawa S, Ochi H, Ogino H, Kawakami K. Characterization of *Sx1* Enhancers. Implication for the Development and Evolution of PPR and Sensory Placodes. The 16th CDB Meeting "Cis-sequence regulation and evolution" 2008年9月29日~10月1日、理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター (理研 CDB)、要旨集 122 ページ

②Sato S, Nakayama R, Ikeda K, Bunno T, Hayashibara Y, Aizawa S, Kawakami K. Evolution of *Six1* enhancers - in vivo analysis using chick and mouse embryos. 日本発生生物学会第41回大会

2008年5月28日～30日、徳島県郷土文化  
会館、ポスター発表

③Sato S, Nakayama R, Ikeda K,  
Hayashibara Y, Nakao K, Aizawa S,  
Kawakami K. Placode enhancers of the  
mouse Six1 gene - in vivo analysis using  
chick and mouse embryos. 日本発生生物学  
会第40回大会、2007年5月28日～30日  
福岡国際会議場、ポスター発表

[その他]  
ホームページ等

<http://www.jichi.ac.jp/biol/home.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 滋 (SATO SHIGERU)  
自治医科大学・医学部・講師  
研究者番号：70306108

