

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 18 日現在

機関番号：34304

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2014

課題番号：23657007

研究課題名(和文)細胞分化スイッチ機構を担うSOX-パートナー因子複合体のゲノム標的認識

研究課題名(英文)Genomic target site recognition by SOX-partner factor complexes that underlies switching mechanisms in cell differentiation

研究代表者

近藤 寿人(KONDOH, Hisato)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：70127083

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文):細胞分化は、複数の転写制御因子が互いにパートナー因子として作る複合体がスイッチ機能を果たすことによって進行する。これらの複合体が結合するDNA配列は固有のもので、個々の因子の結合配列の和ではない。本研究では、Sox2とパートナー因子複合体のDNA結合配列をin vitroおよびin vivoの2つの条件で体系的に研究した。(1) Sox2とPax6の複合体がin vitroで結合する配列群を、EMSAを用いたSELEX法を開発して決定した。(2)ビオチン化された転写因子を用いたChIP-seq法を改良して、エピブラスト幹細胞においてSox2とPou5f1が結合するゲノム領域を網羅的に解析した。

研究成果の概要(英文):Transcription factors function as heterologous complexes, and changing their partner in the complex results in a major alteration in their regulatory targets. This mechanism is responsible for the switching of cell states during differentiation. In addition, the DNA-binding sequences of transcription factor complexes are not mere additions of sequences for individual factor binding.

In this study, we systematically analyzed in vitro and in vivo DNA-binding sequences for Sox2-partner factor complexes. (1) We collected high-affinity Sox2;Pax6 co-binding sequences in vitro using a new SELEX procedure with non-RI EMSA and characterized these sequences. (2) We improved the ChIP-seq procedure using biotinylated transcription factors and applied it to epiblast stem cells to characterize Sox2;partner (e.g., Pou5f1) co-binding sequences in vivo.

研究分野：分子発生生物学

キーワード：発現制御 遺伝子 ゲノム 細胞分化 転写制御因子

1. 研究開始当初の背景

細胞分化は、複数の転写制御因子がつくる複合体がスイッチ機能を果たすことによって進行する。これらの複合体が結合する DNA 配列は、個々の因子が単独で結合する配列の和ではなく、複合体に固有のものである。しかし、転写制御因子複合体の DNA 結合配列を体系的かつ網羅的に研究した例はなかった。実際、これまでのゲノム上での転写制御因子の結合領域を予測する研究では、転写制御因子複合体に固有の結合配列を考慮していないために、その予測には大きな欠陥があった。

2. 研究の目的

本研究では、SOX2 とパートナー因子がつくる複合体が in vitro で高い親和性で結合する DNA 配列を収集し、各配列に対する複合体の結合強度やエンハンサー機能と対照しながら比較分析して、SOX2-パートナー因子複合体の DNA 結合モチーフ群の特性を明らかにする。また SOX2 とパートナー因子複合体が in vivo で転写制御機能を発揮するための条件を明らかにするために、in vivo での結合領域をゲノム全体にわたって解析する。これらのデータを比較しながら、機能ゲノム学を細胞分化の制御機構の研究に活用する。

3. 研究の方法

(1) Sox2 とパートナー因子との複合体の結合配列が、各々の因子の結合配列の和とは異なる顕著な例には、Sox2 と Pax6 の複合体がある。そこで、Sox2 の全長と Pax6 の全長を合成・精製して、EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) を用いた、新しい SELEX (Systematic Evolution of Ligands by

EXponential enrichment)の方法を開発したうえで、Sox2-Pax6 複合体の in vitro における結合配列群を明らかにする。また、それらを既知の Sox2-Pax6 複合体結合配列と比較しつつ、エンハンサーとしての特性を分析する。(2) 初期胚発生では、Sox2 の代表的なパートナー因子の一つは Pou5f1(Oct3/4)である。Sox2-Pou5f1 複合体が in vivo でどのようなゲノム上の配列と結合するのかを明らかにするために、in vivo でビオチン化した転写制御因子を用いた ChIP-seq 法を改良して汎用化し、それを体細胞系列の発生の出発点であるエピプラスト幹細胞に適用して、ゲノム全体における Sox2、Pou5f1、それらの複合体の in vivo での結合状況を分析する。

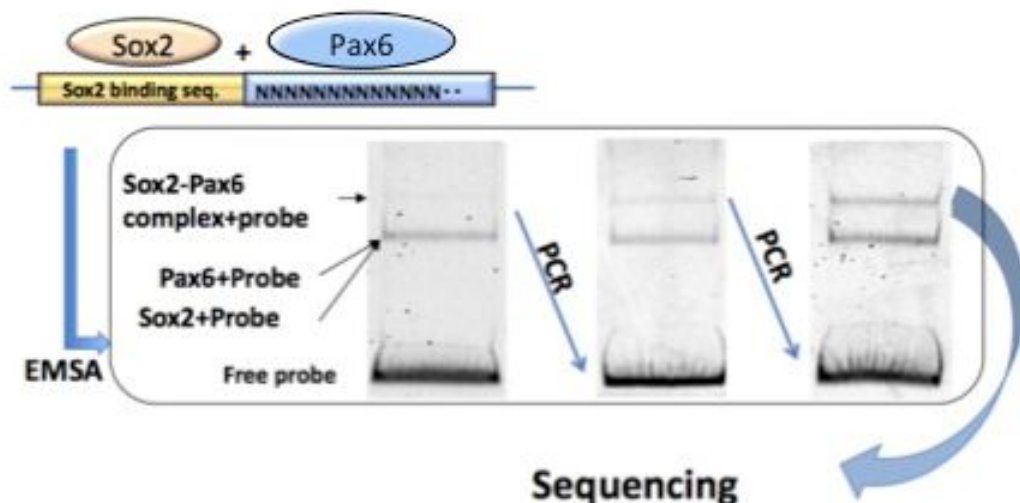
4. 研究成果

(1) まず、Pax6 が単独で in vitro 結合する配列、ならびに Sox2-Pax6 が結合する配列群を網羅的に収集した。これまでは、転写制御因子複合体の DNA 結合配列を網羅的に収集 (SELEX) する研究が行われたことはなく、新しい方法を開発する必要があった。そこで非 RI 標識 probe を使った EMSA による新しい SELEX 法を開発した。さらに、これまでの SELEX では、転写制御因子の DNA 結合ドメインだけを用いて実施するのがほとんどであったが、複合体による結合配列を解析するという目標のもとに、転写制御因子全長を用いるという難度の高い方法を採用した。この新しい方法はうまく稼働し、SELEX の繰返しによって複合体の結合配列を濃縮することができた (図 1)。

Pax6 あるいは Pax6-Sox2 複合体の結合によって濃縮された DNA 配列について、数 10 万の配列を、次世代シーケンサーを用いて決定し、その結合配列を分類した。その結果、Pax6 単独では、Paired domain のみによる結合、

SELEX using EMSA

図 1



Paired domain と Homeodomain の双方での結合という2つの結合パターンがあることが明らかになった。Sox2-Pax6 複合体による結合配列は、Sox2 の結合を担う HMG domain の結合配列と Paired domain の結合配列の複合になっているが、その paired domain の結合配列の向きは DC5 エンハンサーを代表とする既知の複合配列のものとは逆向きであった。その性質を持った配列のいくつかを選んで多量化し、Sox2、Pax6 の存在下でどのようなエンハンサー活性を示すのかを解析した。多量体が示すエンハンサー活性は次のようなユニークなものであった。Sox2 が全く存在しなければ低レベルの Pax6 だけで活性化されるが、Sox2 が少量存在するとその活性は抑制される。Sox2-Pax6 が共発現されている状況では、それらの発現量に依存してエンハンサー活性をあげる。

In vitro SELEX で濃縮された配列群が、in vivo でどのような制御に関わっているのかを明らかにするために、Pax6 と Sox2 を共発現する細胞での ChIP-seq を、以下の方法で解析するための準備をした。

(2) Sox2 をはじめとした転写制御因子が結合するゲノム上の部位を、in vivo ビオチン化転写制御因子を用いた ChIP-Seq (Chromatin Immunoprecipitation- Sequencing) 解析によって明らかにすることを目指した。ビオチン化転写制御因子と結合 DNA の複合体を streptavidine beads で単離する方法は、旧来の特異抗体を用いる方法に比べて、次のような利点がある。 Biotin-streptavidine 間の強固な結合によって、特異抗体を用いる場合よりも複合体の収率が上がり、一つの ChIP 反応で多くの read 数を確保できる。 Biotin-streptavidine の結合は、SDS の存在下でも安定なので、SDS を用いた強い精製条件を用いることが可能で、その結果 ChIP-seq data の background を下げることができる。この方法は抗体の有無や性能などに依存せず、

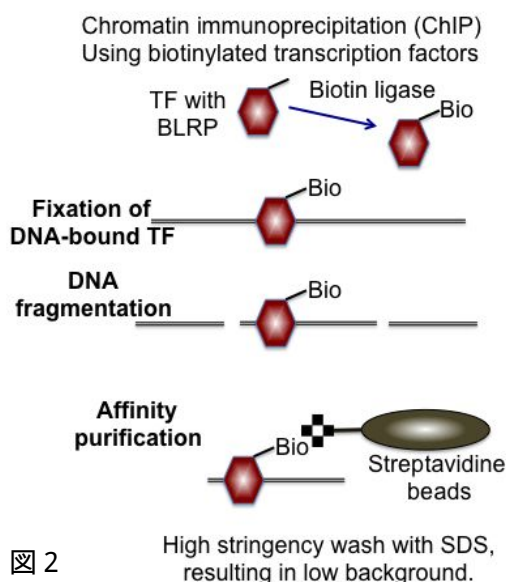


図 2

ビオチン化 tag を付加するための発現ベクターに挿入する ORF (Open Reading Frame) を置き換えるだけでどのような転写制御因子にも適用可能なので、同一条件で多数の転写制御因子のゲノム結合を平行して、そして体系的に解析することができる(図2)。

この方法を駆使して、エピプラスト幹細胞ゲノムにおける Sox2 と Pou5f1 などの転写制御因子の結合領域、その領域の大きさ、分布等を分析した上で、Sox2 と Pou5f1 の共通の結合領域を分析した。その結果を、他のグループから発表された ES 細胞、神経幹細胞における Sox2、Pou5f1/Pou3f2 の結合部位と比較したところ、次のことが明らかになった。

Sox2 は、ES 細胞では多くの場合 Sox2-Pou5f1 のペアとして作用するが、エピプラスト幹細胞や神経系幹細胞では、Sox2 は Pou 以外の多様な転写制御因子と複合体をつくり、ES 細胞とは大きく異なった制御標的をもつ。しかし、これらの異なった細胞種に共通した Sox2-Pou 結合領域も存在していて、近在遺伝子の Gene Ontology 解析からは、それらが初期胚発生に必須の遺伝子群を制御していることが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Y. Kamachi, H. Kondoh. Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development* 140, 4129-4244 (2013). doi: 10.1242/dev.091793. (査読有り)

H. Morimura, S. Tanaka, H. Ishitobi, T. Mikami, Y. Kamachi, H. Kondoh, Y. Inouye. Nano-analysis of DNA conformation changes induced by transcription factor complex binding using plasmonic nanodimers. *ACS Nano*. 7, 10733-10740 (2013). doi: 10.1021/nn403625s. (査読有り)

〔学会発表〕(計7件)

H. Kondoh, K. Matsuda, T. Mikami, M. Andrabi, S. Oki, K. Yamaguchi, S. Shigenobu: Dynamic changes in gene regulatory network during early stages of embryogenesis, as indicated by an efficient ChIP-seq analysis. 第37回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市、2014.11.25-27.

H. Kondoh: Regionally specific mechanisms of neural plate development. 18<sup>th</sup> International Conference of the International Society of Differentiation. London, UK, 2014.11.2-5.

H. Kondoh: An ensemble of Sox-partner interactions determines genomic targets and specify cell states. 4<sup>th</sup> International SOX Research Conference. Cleveland, Ohio, USA 2014.9.8-12.

T. Mikami, M. Andrabi, Y. Kamachi, H. Kondoh: Functional target sequence of the Sox2-Pax6 transcription factor complex. 第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場、

福岡市、2012.12.11-14.

M. Andrabi, H. Kondoh: Genome-wide prediction of POU/SOX factor dependent regulatory modules involved in the developmental processes. 第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市、2011.12.13-16.

T. Mikami, M. Andrabi, Y. Kamachi, H. Kondoh: Functional target sequence of the SOX2-PAX6 transcription factor complex. 第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市、2011.12.13-16.

H. Kondoh: Functional targets of Sox2-Pax complexes. The third international Sox Meeting, Grainau, Germany, 2011.9.11-14.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

近藤 寿人 (KONDOH, Hisato)  
京都産業大学・総合生命科学部・客員教授  
研究者番号：70127083

### (2)研究分担者

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