

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 7 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460252

研究課題名(和文) 感覚器プラコード前駆領域の属性と形態形成原理

研究課題名(英文) Genetic and cellular characteristics of the pre-placodal region

研究代表者

佐藤 滋 (SATO, Shigeru)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70306108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は感覚器プラコードとその前駆領域(PPR)というユニークで重要な細胞集団の特徴、分化、頭頸部形成における機能の解明を目指して行った。1) PPRにおけるSix1標的遺伝子同定の準備が整った。2) Six1のPPR特異的エンハンサーの特徴を明らかにした。3) 別のSix1エンハンサーを利用し、プラコードを遺伝的に標識できるマウス系統を樹立した。4) プラコード特異的な細胞の除去実験を行った。以上は、Six1とSix1を発現する細胞に関する新たな知見であり、感覚器形成の理解に重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to understand genetic and cellular characteristics of the sensory placodes and their precursor domain (PPR). 1) All materials required for the identification of Six1-target genes were prepared. 2) The PPR-specific enhancer of Xenopus Six1 was characterized. 2) Two new mouse lines expressing Cre under the control of two placode-specific Six1 enhancers were developed. 4) Cell ablation experiments were carried out using the two Cre-expressing mouse lines. The above results provided novel information on the regulation and function of Six1 and Six1-expressing cells, and should advance our understandings on the sensory organogenesis.

研究分野：発生生物学

キーワード：感覚器形成 プラコード 転写制御 マウス ニワトリ アフリカツメガエル 内耳 嗅上皮

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物頭部の感覚器は、主に感覚器プラコードに由来し、嗅覚や聴覚等の特殊感覚、顔面や口腔の体性感覚を受容する。驚くべきことに、多様なプラコードは全て単一の外胚葉領域であるプラコード前駆領域 (PPR) から生じる。私たちは、マウス初期胚でホメオボックス遺伝子 *Six1* を発現する PPR を発見し、脊椎動物で保存された PPR 誘導メカニズムを解明した。また、*Six1* 欠損マウスが内耳や嗅上皮をはじめとする感覚器の広範な形成異常を示すことも報告した。一方、ニワトリやカエルでは、プラコードへの分化には PPR マーカー (*Six1* と *Eya1/2*) を発現する分化段階を経る必要があること、また、*Six1* の機能が PPR マーカーの発現維持と感覚ニューロンへの分化に必須であることが示された。以上より、感覚器形成は段階的に進み、そこでは *Six1* が不可欠な機能を果たしている、と考えられるようになった。最近、幹細胞から PPR 様細胞を経て、段階的に内耳有毛細胞様細胞を誘導できたという報告もある。しかし、PPR の特徴を決定・維持し、さらに、その後の感覚器形成を主導する *Six1* の具体的な機能は不明であり、感覚器を含む脊椎動物頭部の発生の本質的な理解には至っていない。

2. 研究の目的

Six1 は PPR/プラコード特異的に発現する転写因子である。したがって、*Six1* が制御する標的遺伝子の同定が、「将来感覚器に分化する」という PPR の特徴や、PPR から多様なプラコードが生じる原理の解明に直結すると考えた。また、PPR/プラコードを遺伝的に除去し、その再生能力 (調節能力) や、神経堤の発生に及ぼす影響、周囲組織の発生を制御するシグナル源としての役割を問うた研究はない。そこで、*Six1* 標的遺伝子と除去実験を 2 本の柱とする本研究を着想した。具体的には、(1) PPR における *Six1* 標的遺伝子のレポーターと機能を同定することで、PPR の特徴とプラコード分化の原理を解明する。(2) PPR/プラコードを除去し、周囲の形態形成に及ぼす影響を観察することで、頭頸部形成における PPR/プラコードの役割を解明する。

3. 研究の方法

) *Six1* 標的遺伝子同定による PPR/プラコードを規定する分子基盤の解明: *Six1* は PPR/プラコードの特徴を規定する転写因子だと考えられる。そこで、*Six1* 特異的な抗体を用いたクロマチン免疫沈降により、PPR/プラコードにおいて *Six1* が結合する標的遺伝子を同定するゲノム科学的解析、実験発生の解析を組み合わせて、標的遺伝子のレパー

トリーや機能を特定する。これが PPR/プラコードの特徴とプラコード分化の原理解明に直結する。

) PPR/プラコードの頭頸部形成における機能の解析: PPR/プラコードの再生能、頭頸部の発生での役割は不明である。そこで、PPR/プラコード特異的な *Six1* エンハンサーを利用し、Cre-lox システムによりジフテリア毒素 (DTA) を発現させ、PPR/プラコード細胞を除去する。PPR/プラコード再生の有無、頭部全体や神経節に起こる形態変化、中胚葉や神経堤での各種マーカーの発現変化を明確にし、PPR/プラコードの頭頸部形成における役割を解明する。

4. 研究成果

Six1 標的遺伝子同定による PPR を規定する分子基盤の解明: ステージ 5-7 のニワトリ胚から前端部を除く PPR を切り出し、ホルムアルデヒドでクロスリンクを行った。ソニケーションと磁気ビーズの洗浄条件の検討を行い、抗ニワトリ *Six1* 抗体および抗 H3K27ac 抗体を用いて ChIP を行う準備を整えた。ステージ 5-7 の多数のニワトリ胚から前端部を除く PPR を切り出し、クロスリンクの処理後 -80 度で保存する、という作業を続けている。十分な量のサンプルが集まり次第、ChIP を行い、*Six1* 標的遺伝子同定を目指す。

PPR 特異的な *Six1* の発現制御機構に関する解析: *Six1* は単一の PPR から全てのプラコード、そして感覚細胞・感覚ニューロンまで発現し、その感覚器特異的な発現パターンは 5 種類のエンハンサーによって制御されている。マウスの PPR 特異的なエンハンサー (*mSix1-14*) の活性は PPR の前側部分に局限されているが、ゼノパスの *Six1-14* エンハンサー (*XSix1-14*) がマウスやニワトリの配列に比べ、ニワトリ胚において非常に強いエンハンサー活性を示すことがわかった。*XSix1-14* の重要な特徴は、後方の PPR においても転写を活性化でき、エンハンサー活性が強いこと、また、4 個並べたコンストラクトでも、神経板前端部での活性がほとんど見られないことであった。そこで、1、2、4 個の *XSix1-14* の下流にレポーター遺伝子として LacZ を繋げ、両端にインスレーターを付加した 3 種類のトランスジーンを作製し、マウス受精卵へのインジェクションを行った。その結果、E8.5 において *XSix1-14* は期待通り、より後方の PPR でも転写を活性化することがわかった (図 1)。ただし、その活性はさらに後方の神経板境界部 (神経堤) まで続く場合があること、4 個並べた場合には神経板の前端部での活性が出現する。また、*mSix1-14* と同様に内胚葉でのエンハンサー活性があることもわかった。

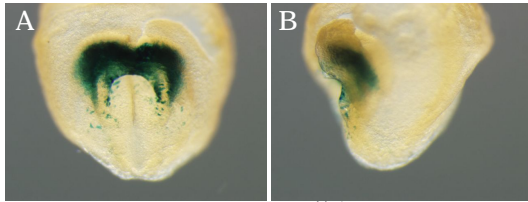


図1. XSix1-14(1x)-LacZを導入したE8.5マウス胚の染色パターン。XSix1-14はPPRと内胚葉において強いエンハンサー活性を示した。前側(A)と左側(B)から撮影した写真。

現在、XSix1-14に種々の変異を導入することで、よりPPRに特異的なエンハンサーに改変し、PPRの細胞系譜等の解析を開始すべく解析を続けている。

2種類のSix1エンハンサーの制御下でCreを発現するマウスの詳細な解析: Six1のブラコードエンハンサーの1つであるSix1-21を利用したSix1-21-NLSCreマウスをR26R-LacZレポーターマウスとかけ合わせ、Creによる遺伝的組換えのパターンを解析した。最も早い時期のLacZの発現は、E8.5において、耳と上鰓ブラコードの前駆領域(OEPD、Pax2で標識される)で検出された。興味深いことに、この時期にはSix1-14エンハンサーが主に前側のPPRで転写を活性化する時期であり、一続きに見えるE8.0-E8.5でのSix1の発現は、Six1-14とSix1-21という2つのエンハンサーによって規定されている可能性が浮上してきた。その後、E9.5-E13.5においては、Six1-21-NLSCreによって発現するLacZは、OEPDに由来する耳胞と脳神経節に加え、嗅上皮、下垂体前葉、咽頭嚢、耳管、耳介で、さらには、涙腺、だ液腺、生殖結節等でも検出された。

もう1つのブラコードエンハンサーであるSix1-8を利用したSix1-8-NLSCreマウスについても同様に解析を行った。その結果、LacZは脳神経節(ブラコード由来)および脊髄神経節(神経堤由来)の感覚神経特異的に発現していることがわかった。また、驚いたことに、主要な嗅上皮エンハンサーであるSix1-21を利用したSix1-21-NLSCreマウスの場合よりも早期に、E9.0の鼻ブラコード内の少数の細胞でLacZが発現していることもわかった。その後、LacZの発現は嗅上皮を構成する細胞で検出されるのに加え、前脳に向かって移動する一群の神経細胞(パイオニアニューロン)で優先的に検出された。即ち、前脳に向かって移動するパイオニアニューロンと初期に分化する嗅神経細胞におけるSix1の発現はブラコードの段階でSix1-8が規定しており、一方、嗅上皮全体でのSix1の発現はSix1-21エンハンサーが担っていることが示唆された。耳胞においても、Six1-8のエンハンサー活性は、耳胞から移動し前庭内耳神経節を形成する感覚神経に局限されていた。今後、Six1-8の活性化メカニズムの解析を進めることで、均一に見える鼻ブラコ

ードや耳胞を構成する一部の細胞がパイオニアニューロンあるいは前庭内耳神経節の感覚神経として決定され、移動する、というプロセスのより深い理解が可能になる。

Six1-8およびSix1-21エンハンサーを利用したブラコード細胞の除去実験: まず、Six1-8-NLSCreマウスを利用し、嗅上皮の発生においてSix1-8の制御下でCreを発現する細胞の役割を解明すべく解析を行った。R26R-DTAマウスとの交配によって得られた胚の嗅上皮の形態を調べたが、E10.5およびE11.5においてコントロール胚と比べて嗅上皮の形成が停止する等の劇的な変化はなかった。嗅上皮における神経マーカーの発現も調べたが、嗅上皮内での神経細胞の分化、軸索の伸長、さらには、パイオニアニューロンの形成にも大きな変化は見られなかった。Six1-8-NLSCreマウスによる鼻ブラコードでのCreによる組換えの効率は高くない可能性があり、嗅上皮の発生におけるパイオニアニューロンの役割を解明するためには、Six1-8エンハンサーを複数個使った新たなCre発現マウスやSix1-8エンハンサー特異的なノックアウトマウスを用いた解析が必要かもしれない。耳胞からの前庭内耳神経節の形成への影響については解析中である。また、Six1-21-NLSCreマウスを利用した細胞除去実験も進めている。

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4件)

Sato S, Yajima H, Furuta Y, Ikeda K, Kawakami K. (2015). Activation of Six1 expression in vertebrate sensory neurons. PLoS One 10:e0136666.

Ikeda K, Onimaru H, Takahashi M, Sato S, Igarashi H, Ishizuka T, Yawo H, Arata S, Southard-Smith EM, Kawakami K. (2015). A Phox2b BAC transgenic rat line useful for understanding respiratory rhythm generator neural circuitry. PLoS One 10:e0132475.

Yajima H, Suzuki M, Ochi H, Ikeda K, Sato S, Yamamura K-I, Ogino H, Ueno N, Kawakami K. (2014). Six1 is a key regulator of the developmental and evolutionary architecture of sensory neurons in craniates. BMC Biology 12:40.

Ono K, Kita T, Sato S, O'Neill P, Mak SS, Paschaki M, Ito M, Gotoh N, Kawakami K, Sasai Y, Ladher RK. (2014). FGFR1-FRS2/3 signalling maintains

sensory progenitors during inner ear hair cell formation. PLoS Genet 10:e1004118.

〔学会発表〕(計 3 件)

Sato S, Yajima H, Shioi G, Kiyonari H, Furuta Y, Ikeda K, Kawakami K. Activation of Six1 expression in vertebrate sensory neurons. 日本発生生物学会第 48 回大会, つくば国際会議場, つくば, 2015 年 6 月 2 日-5 日.(ポスター発表)

佐藤 滋, 矢嶋 浩, 川上 潔. Six1 遺伝子の感覚神経系における役割とその発現制御. 日本遺伝学会第 86 回大会, 長浜バイオ大学, 長浜, 2014 年 9 月 17 日-19 日.(口頭発表)

佐藤 滋, 川上 潔. Six1 ホメオボックス遺伝子と脊椎動物の発生と進化. 第 4 回 Tokyo Vertebrate morphology Meeting, 東京慈恵会医科大学南講堂, 東京, 2014 年 7 月 12 日.(口頭発表)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔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・准教授

研究者番号: 70306108

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: