

### 共同研究課題：Sox2 遺伝子 D1 エンハンサーの制御と機能の研究

共同研究分担者 1：京都産業大学総合生命科学部 客員教授 近藤寿人

共同研究分担者 2：徳島大学藤井節郎記念医科学センター 助教 竹本龍也

#### A. 共同研究の目的

転写因子 Sox2 は、初期胚の多能性幹細胞群、胚や成体脳の神経幹細胞、さらには、制がん剤耐性のがん幹細胞などで発現され、それらの制御に中心的な役割を果たしている。近藤のグループでは、Sox2 遺伝子を発生段階や組織ごとに差次的に制御する、多数のエンハンサーを研究してきた。Sox2 遺伝子の転写を、エンハンサーごとの特異性に従って活性化する制御が、特定の発生段階や組織の発生の制御を直接的に反映しているからである。また、それらのエンハンサーを活用すれば、多様な組織特異的な遺伝子操作が可能になると期待される。

最近発見した D1 エンハンサーが、Sox2 遺伝子発現全体の制御のなかで中心的な役割を果たすものと考えられることから、D1 エンハンサーをその制御 (近藤が担当) と機能 (竹本が担当) の両面から研究する本共同研究を計画した。

#### B. 研究成果

##### (1) D1 エンハンサーの制御機構の解析

D1 エンハンサーは、ニワトリゲノム上で Sox2 遺伝子の下流約 60 kb 下流に位置する 5 kb の D1 領域内に存在するエンハンサーとして同定された (Okamoto et al., 2015)。マウスなどを含む多数の動物種で塩基配列が強く保存される、約 450 bp の領域を選んで (図 1)、

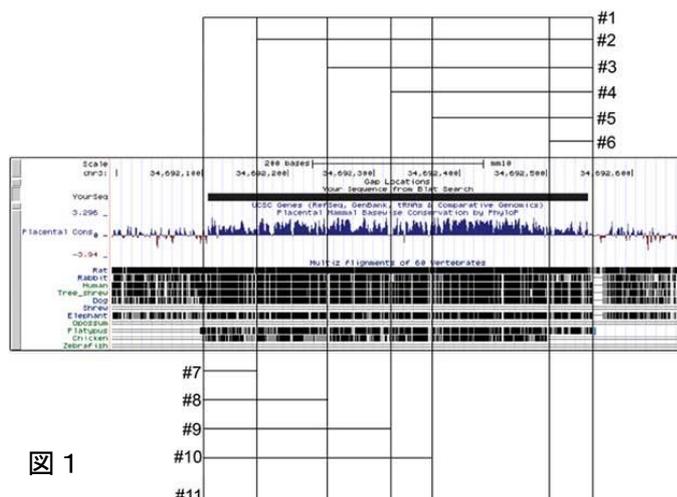


図 1

ニワトリ、マウスからその配列を取り出し、その領域が D1 エンハンサー活性を担っていることを確認した。この活性の検定には、次の方法をとっている。D1 あるいはその部分配列を tk-EGFP あるいは tk-mCherry レポーター・ベクターの上流にクローニングする。ニワトリ胚を New の方法で培養し、stage 4 の発生段階でエピブラスト側に electroporation でレポーターベクターを導入して、stage 6 以降での EGFP の発現を検定する (図 2)。



図 2

エンハンサーは、エンハンサーの特異性を決定する領域、エンハンサーの活性を増強する領域、エンハンサー活性を特定の組織で抑制する領域など、異なった制御領域の複合体として作用することが多い。動物種間での塩基配列の保存性が低下する領域が、それらの機能領域の

境界である可能性を想定して、D1 配列を D1-D6 の 6 個のサブ領域に分けた (図 3)。手始めに、これらの領域を 5'側、あるいは 5'側から順次欠失させた場合に D1 エンハンサー活性がどのように変化するかを解析する準備をしている。

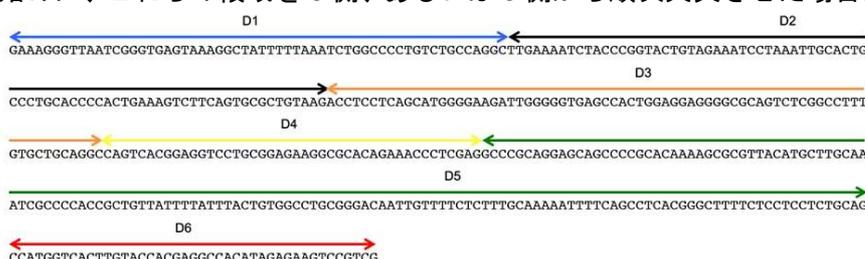


図 3

## (2) D1 エンハンサーの除去による、D1 エンハンサーの制御機能の評価

Sox2 エンハンサーD1 の神経板発生に対する役割を解明するため、エンハンサーD1 を時期 (あるいは胚領域) 特異的に欠損させるコンディショナル (条件的) ノックアウトマウス (Sox2 flox D1)、また、単純なエンハンサーD1 ノックアウトマウス (Sox2 ΔD1) の作製を試みた。以下に示す作製計画 (図 1) のとおり、Sox2 flox D1 を目指した作製実験によって、単純なエンハンサーD1 ノックアウトマウスも得られると考えられた。

本共同研究では、図 4 のマウス作製計画の通り、Sox2 エンハンサーD1 (約 5 kb) 領域の上流側と下流側をそれぞれ切断するようなガイド RNA (gRNA) を作製した。この gRNA と Cas9 タンパク、loxP 配列挿入のためのオリゴ DNA をエレクトロポレーションによって、マウス受精卵に導入した。エレクトロポレーションした胚のうち、2 細胞期まで発生した胚を、偽妊娠マウス (仮親マウス) の卵管に移植した。仮親マウスから、7 匹の仔マウスが生まれ、このうち 4 匹が D1 が欠失したマウスであった。当初予定していた loxP が導入されたマウスは得られなかった。得られた D1 欠失マウスはモザイクである可能性があり、全ての細胞で D1 が欠失していない可能性がある。そこで、現在、次世代のマウスを産ませ、均一なゲノム状態で胚を解析する予定である。一方で、Sox2 flox D1 を作製するための準備を行っている。

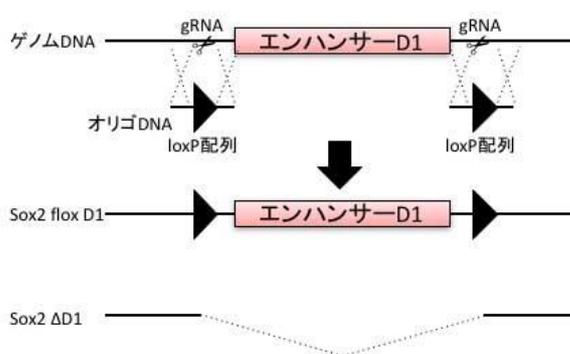


図4: マウス作製計画

Cas9による切断後、オリゴDNAに依存した相同組換えが2箇所と同時にloxPを挿入しSox2 flox D1アレルを得る。しかしながら、相同組換えが起こらない場合、切断によってエンハンサーD1が欠損したSox2 ΔD1アレルが得られる。相同組換えの効率が低い場合、ΔD1アレルが得られる可能性が高い。

## C. 今後の研究の計画と展望

D1 エンハンサーを構成するサブ領域の制御機構や相互作用する転写因子を詳細に解析することによって、広範な神経系における Sox2 遺伝子の基本的な制御機構が明らかになるだろう。また、時期特異的な欠損を可能にする、D1 エンハンサーの floxed allele を作製すると共に、他のエンハンサーとの二重欠損マウス系統を作製することを計画している。本研究から、複数エンハンサーが関与して成立する協同的な遺伝子制御についても明らかにすることができるかと期待している。