

Title	PAX6 and SOX2-dependent regulation of the Sox2 enhancer N-3 involved in the embryonic visual system development
Author(s)	井上, 将
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47222
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照ください 。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	井 上 まさし 将
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 2 1 3 3 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 19 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 生命機能研究科生命機能専攻
学 位 論 文 名	PAX6 and SOX2-dependent regulation of the <i>Sox2</i> enhancer N-3 involved in the embryonic visual system development (眼の初期発生における <i>Sox2</i> 遺伝子 N-3 エンハンサーの PAX6、SOX2 依存的制御の研究)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 近 藤 寿 人 (副査) 教 授 濱 田 博 司 教 授 難 波 啓 一

論 文 内 容 の 要 旨

眼の発生過程における遺伝子発現の制御機構を理解するために、網膜を含む中枢神経系及び、水晶体を含む感覚器プラコードで発現を示す *Sox2* 遺伝子に注目した。ヒトでは *SOX2* 遺伝子に変異が生じる事で、無眼症、小眼症などの症状を引き起こす事が報告されている。これらの事実からも、眼の発生過程において、*Sox2* 遺伝子は非常に重要な役割を担っている事が示唆される。

Sox2 遺伝子は、発生初期過程から時間的に連続した発現を示すが、その発現は活性が異なる複数のエンハンサーにより制御されていることが明らかにされている。N-3 エンハンサーは水晶体プラコード、眼胞、間脳、中脳でエンハンサー活性を示す。特に、水晶体プラコードにおけるエンハンサー活性は、水晶体プラコードの形成に対応するような活性を示した。本研究では、時間的空間的な遺伝子発現の調節機構を理解する手がかりを得るために、眼の初期発生過程で働く *Sox2* 遺伝子の N-3 エンハンサーによる発現制御の仕組みを解析した。

N-3 エンハンサーは、ニワトリゲノム上で *Sox2* 遺伝子のおよそ 15 kbp 上流の位置に 639 bp の配列として同定された。そこで、N-3 エンハンサーの配列中で眼の初期発生過程で活性をもつ最小配列の同定を試みた。N-3 エンハンサーのさまざまな部分配列を持つ EGFP レポータープラスミドをエレクトロポレーション法を用いてニワトリ初期胚に遺伝子導入し、EGFP の発現を観察した。その結果、エンハンサー活性に必要な最小単位 (36 bp) の配列を同定し、N-3c と名付けた。N-3c 配列は 4 量体にすることで水晶体プラコード、眼胞だけでなく間脳、中脳でも 639 bp からなる N-3 エンハンサーの活性をほぼ再現できる。

次に、エンハンサーに作用し制御を行う因子の探索を行った。N-3c 配列中には、SOX 結合配列が存在した。N-3 エンハンサーが活性化される時期・領域において主要な SOX は SOX2 である。Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) を用いて、実際に SOX2 がこの SOX 結合配列に結合することを確認した。さらに、培養細胞を用いたトランスフェクションの実験により、N-3c 配列では SOX2 がエンハンサーの活性化において主導的な役割を果たしていることを明らかにした。SOX 転写因子群は多くの場合、パートナー因子と協同的に作用することで転写活性化を行うことが知られている。N-3c 配列上では、PAX6 が SOX2 のパートナー因子として協調的に働きうることを EMSA 及び、培養細胞を用いたトランスフェクションにより示した。

これらの結果は、N-3 エンハンサーの制御には、SOX2 自身による自己制御が関わる事を示している。また、N-3 エンハンサーが眼胞と水晶体プラコードにおいて共通する制御機構により活性化される事を示す。この事は、眼の初期発生における眼胞と水晶体プラコードの組織間相互作用を理解する手がかりとなると期待される。

論文審査の結果の要旨

申請者は、代表的な感覚器である眼について、その発生初期の転写制御機構を研究した。眼は、網膜の原基と頭部外胚葉の相互作用によって発生し、後者から水晶体が生ずる。転写制御因子 SOX2 をコードする *Sox2* 遺伝子がまず網膜原基で発現され、次いで網膜原基との相互作用によって外胚葉側の水晶体原基で発現されることから、*Sox2* 遺伝子の転写制御を詳細に研究した。

眼の形成過程で、*Sox2* 遺伝子はエンハンサーN-3によって制御される。申請者はニワトリ胚へのエレクトロポレーションによる遺伝子導入法を駆使して、(1)全長約 600 塩基対のエンハンサーN-3 の中の 36 塩基対のコア領域が、このエンハンサーN-3 の活性の特異性を決定していること、(2)コア領域自体のエンハンサーとしての活性は微弱であるが、4 量体化することによってエンハンサーN-3 の活性を再現することを示した。網膜原基と水晶体原基が、*Sox2* 発現に関しては同一の制御下にあることを結論した。

申請者はさらに、36 塩基対の N-3 コア領域が、転写制御因子 SOX2 と PAX6 の結合配列として機能すること、これらの結合によってエンハンサーN-3 が活性化されることを、生化学的な実験と細胞へのトランスフェクションによって示した。この結果から、*Sox2* 遺伝子は、眼の原基において、PAX6 依存的に自己活性化する制御ループを持つこと、その制御ループが、網膜原基との相互作用によって頭部外胚葉でも活性化されることを結論した。

本研究は、感覚器の初期発生過程の制御機構の理解に大きく貢献するものであり、博士（理学）の学位に値する。