

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

新穎同源箱基因 *Irx11* 在肌肉及軟骨細胞分化的功能研究 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 100-2320-B-040-011-
執行期間：100年08月01日至101年07月31日
執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系(所)

計畫主持人：潘惠錦
共同主持人：蕭光明
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：粘家華
大專生-兼任助理人員：林奕勳
大專生-兼任助理人員：李孟璋
大專生-兼任助理人員：潘宥君
大專生-兼任助理人員：陳建旭
大專生-兼任助理人員：楊君璋
大專生-兼任助理人員：曾珮萁
大專生-兼任助理人員：鍾旻倪
博士班研究生-兼任助理人員：莊函霓
博士班研究生-兼任助理人員：涂麗君

公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 101 年 10 月 30 日

中文摘要：Irx11 為一廣泛存在於各物種中的新穎 homeobox 基因，在 TALE 家族中其 homeodomain 與 IRO 最為相似。目前已知小鼠的 Irx11 表現在體節、間葉細胞、myoblast 及軟骨細胞中，在腳趾、腳掌中的表現與 Sox9、scleraxis 相似。我們以斑馬魚來探討 Irx11 在胚胎發育上的調控機制，先前已選殖出斑馬魚的 Irx11，並發現它在胚胎的表現位置主要為咽喉鰓弓，而在成魚組織則廣泛表現。Irx11 knockdown 後，胚胎頭部、肌肉及下顎軟骨組織嚴重缺失，顯示其可能與肌肉軟骨發育有關。進一步分析發現，Irx11 knockdown 導致肌肉和 myotendinous junction 結構異常，並使斑馬魚體內 myoD mRNA 的表現上升。大量表現 Irx11 於肌纖維母細胞可藉由下調 myoD 表現抑制細胞分化。另外，Irx11 在體外及體內可直接結合在 myoD promoter 序列上且直接抑制 myoD promoter 的活性。Irx11 序列上游有 Mef2c 和 Sox5 的結合位置，我們想進一步找出調控 Irx11 的機制。我們抑制斑馬魚內生性 Irx11 或 Mef2ca，發現下顎軟骨發育皆為異常，與利用不同胚層的 marker 觀察下顎，例如：Sox9b、Snail2、Dlx2、Sox9a，其 Morphants 型態也非常相似。此外也發現利用 Irx11 cRNA 無法回覆 Mef2ca Knockdown 造成之軟骨異常型態，但可以回覆 Mef2ca Knockdown 造成的肌肉異常。為了確認 Mef2ca 可直接調控 Irx11，我們將 Irx11 基因上游序列 -1342/+951 及其縮短片接於 Firefly Luciferase 報導基因前，與 Mef2ca MO 共同注射至斑馬魚胚胎分析 Luciferase 活性，並設計突變點以確認 Mef2ca 的結合位置。進一步藉由 Yeast one hybrid 的方法，我們證實 Mef2ca 與 Irx11 promoter 之間有直接結合。因此，Irx11 可以被 Mef2ca 直接調控而參與下顎肌肉的發育。另外，利用 RT-PCR 和 Whole-mount in situ hybridization，我們觀察到 Sox5 在斑馬魚胚胎發育時期的 18hpf、48hpf 與 Irx11 基因表現的位置有重疊。將內生性的 Sox5 進行 knockdown 後，會造成斑馬魚胚胎下顎軟骨的發育異常，以 Alcian Blue 染色可以發現 Sox5 morphant 其下顎軟骨異常與 Irx11 morphant 型態類似；且在胚胎發育過程中若抑制 Sox5 表現，Irx11 表現會上升，選殖不同長度的 Irx11 promoter 序列至 luciferase reporter 和 Sox5 MO 一同注射到斑馬魚胚胎，發現在 Sox5 knockdown 下，Irx11 promoter 的活性有上升的現象。若注射 pCS2+-Sox5 使其 overexpression，則 Irx11 promoter 的活性會下降。使用 ATDC5 細胞株藉由抑制內生性 Irx11 基因，我們探討 Irx11 對於 ATDC5 細胞增生及分化過程產生的影響，發現 knockdown 的細胞株，其細胞型態和正常的細胞有所差異，且其分化能力也受到抑制。而 MTT assay 的結果發現被穩定

抑制 Irx11 的 ATDC5 細胞的確會影響細胞早期增生的情況。另外，我們也觀察到 Irx11 會影響到細胞的貼附能力，可能因此影響到早期的細胞數目及分化能力。

中文關鍵詞： Irx11、myoD、Mef2ca、Sox5、肌細胞分化、軟骨細胞分化、基因表達調控、啟動子活性

英文摘要： Irx11/Mkx encodes a member of the TALE subfamily of homeodomain proteins. It is expressed in multiple mesoderm-derived tissues and has recently been shown to regulate tendon differentiation. Irx11 knockdown in zebrafish caused deficit in neural crest cells and deformation of craniofacial muscles/arch cartilages. Loss of Irx11 function also results in deformed somites with disordered muscle fibers and muscle-tendon junctions. Differentiation of C2C12 myoblasts overexpressing Irx11/Mkx was inhibited, accompanying with decreased myoD and myosin heavy chain (MHC) expression. By luciferase reporter assays we found Irx11 represses myoD promoter activity. The cis-elements required for Irx11 binding were elucidated by EMSA, yeast one hybrid and Chromatin-IP. Thus, Irx11 may inhibit muscle differentiation by repressing myoD through direct binding to its promoter. Next, we test whether Mef2c and Sox5 can regulate Irx11 and participate in pharyngeal muscle/cartilage development. The expression patterns of Mef2ca and Sox 5 are somewhat overlapping that of Irx11 temporally and spatially. Knockdown Mef2ca or Sox5 results in arch defects that resemble Irx11 morphants. With luciferase reporter assays and yeast one hybrid assays, we confirmed that Mef2ca directly binds to Irx11 promoter and positively regulates Irx11 expression. Whereas Sox5 appeared to negatively regulate Irx11 expression. Using ATDC5 cells, a mouse chondrogenic cell line that can be induced to differentiate to chondrocytes, we investigated the role of Irx11 in chondrocyte proliferation and differentiation by knocking down endogenous Irx11. Cells stably expressing shIrx11 showed altered morphology and poor differentiation capacity. The proliferation was also interfered. More cell death was found in shIrx11 cells. Cell attachment ability

and cytoskeleton assembly was decreased in these cells, which may be involved in cell proliferation and chondrogenic differentiation.

英文關鍵詞： Irx11； myoD； Mef2ca； Sox5； muscle differentiation； chondrocyte differentiation； gene expression regulation； promoter activity

行政院國家科學委員會專題研究計劃成果報告

新穎同源箱基因 *Irx11* 在肌肉及軟骨細胞分化的功能研究

Functional analysis of the novel homeobox gene *Irx11* in muscle and chondrocyte differentiation

計劃編號: NSC 100-2320-B-040 -011 執行期限: 100/08/01 至 101/07/31

一、中文摘要

Irx11 為一廣泛存在於各物種中的新穎 homeobox 基因，在 TALE 家族中其 homeodomain 與 IRO 最為相似。目前已知小鼠的 *Irx11* 表現在體節、間葉細胞、myoblast 及軟骨細胞中，在腳趾、腳掌中的表現與 *Sox9*、*scleraxis* 相似。我們以斑馬魚來探討 *Irx11* 在胚胎發育上的調控機制，先前已選殖出斑馬魚的 *Irx11*，並發現它在胚胎的表現位置主要為咽喉鰓弓，而在成魚組織則廣泛表現。*Irx11* knockdown 後，胚胎頭部、肌肉及下顎軟骨組織嚴重缺失，顯示其可能與肌肉軟骨發育有關。進一步分析發現，*Irx11* knockdown 導致肌肉和 myotendinous junction 結構異常，並使斑馬魚體內 *myoD* mRNA 的表現上升。大量表現 *Irx11* 於肌纖維母細胞可藉由下調 *myoD* 表現抑制細胞分化。另外，*Irx11* 在體外及體內可直接結合在 *myoD* promoter 序列上且直接抑制 *myoD* promoter 的活性。*Irx11* 序列上游有 *Mef2c* 和 *Sox5* 的結合位置，我們想進一步找出調控 *Irx11* 的機制。我們抑制斑馬魚內生性 *Irx11* 或 *Mef2ca*，發現下顎軟骨發育皆為異常，與利用不同胚層的 marker 觀察下顎，例如：*Sox9b*、*Snail2*、*Dlx2*、*Sox9a*，其 Morphants 型態也非常相似。此外也發現利用 *Irx11* cRNA 無法回覆 *Mef2ca* Knockdown 造成之軟骨異常型態，但可以回覆 *Mef2ca* Knockdown 造成的肌肉異常。為了確認 *Mef2ca* 可直接調控 *Irx11*，我們將 *Irx11* 基因上游序列 -1342/+951 及其縮短片段接於 Firefly Luciferase 報導基因前，與 *Mef2ca* MO 共同注射至斑馬魚胚胎分析 *Luciferase* 活性，並設計突變點以確認 *Mef2ca* 的結合位置。進一步藉由 Yeast one hybrid 的方法，我們證實 *Mef2ca* 與 *Irx11* promoter 之間有直接結合。因此，*Irx11* 可以被 *Mef2ca* 直接調控而參與下顎肌肉的發育。另外，利用 RT-PCR 和 Whole-mount in situ hybridization，我們觀察到 *Sox5* 在斑馬魚胚胎發育時期的 18hpf、48hpf 與 *Irx11* 基因表現的位置有重疊。將內生性的 *Sox5* 進行 knockdown 後，會造成斑馬魚胚胎下顎軟骨的發育異常，以 Alcian Blue 染色可以發現 *Sox5* morphant 其下顎軟骨異常與 *Irx11* morphant 型態類似；且在胚胎發育過程中若抑制 *Sox5* 表現，*Irx11* 表現會上升，選殖不同長度的 *Irx11* promoter 序列至 luciferase reporter 和 *Sox5* MO 一同注射到斑馬魚胚胎，發現在 *Sox5* knockdown 下，*Irx11* promoter 的活性有上升的現象。若注射 pCS₂⁺-*Sox5* 使其 overexpression，則 *Irx11* promoter 的活性會下降。使用 ATDC5 細胞株藉由抑制內生性 *Irx11* 基因，我們探討 *Irx11* 對於 ATDC5 細胞增生及分化過程產生的影響，發現 knockdown 的細胞株，其細胞型態和正常的細胞有所差異，且其分化能力也受到抑制。而 MTT assay 的結果發現被穩定抑制 *Irx11* 的 ATDC5 細胞的確會影響細胞早期增生的情況。另外，我們也觀察到 *Irx11* 會影響到細胞的貼附能力，可能因此影響到早期的細胞數目及分化能力。

關鍵詞：Irx11、myoD、Mef2ca、Sox5、肌細胞分化、軟骨細胞分化、基因表達調控、啟動子活性

ABSTRACT

Irx11/Mkx (*Iroquois homeobox-like 1/Mohawk homeobox*) encodes a member of the TALE subfamily of homeodomain proteins. It is expressed in multiple mesoderm-derived tissues and has recently been shown to regulate tendon differentiation during mouse embryonic development. Previously we showed that knockdown of *Irx11* in zebrafish caused deficit in neural crest cells which consequently resulted in deformation of craniofacial muscles and arch cartilages. Here, we further demonstrate that loss of *Irx11* function results in deformed somites with disordered muscle fibers and muscle-tendon junctions. Since *myoD* expression is increased in somites of *Irx11* morphants, we test a negative regulatory role of Irx11 upon *myoD* expression. When stable C2C12 myoblasts overexpressing *Irx11/Mkx* were induced to differentiation, myotube formation was inhibited and protein levels of myoD and myosin heavy chain (MHC) were decreased accordingly. By luciferase reporter assays we found Irx11 represses *myoD* promoter activity and the *cis*-elements required for Irx11 binding were elucidated by electrophoretic mobility shift assays (EMSA), yeast one hybrid assays and Chromatin-IP. These data indicate that Irx11 can repress myoD expression through direct binding to its promoter and may thus inhibit muscle differentiation. On the other hand, we test whether Mef2c and Sox5, whose binding sites are located in the promoter of *irx11*, can regulate Irx11 and participate in pharyngeal muscle/cartilage development. The expression patterns of Mef2ca and Sox 5 are somewhat overlapping that of Irx11 temporally and spatially. Knockdown *Mef2ca* or *Sox5* results in arch defects that are resemble of Irx11 morphants. However, the muscle defects can be rescued by Mef2ca cRNA but not the cartilage defects. We cloned different length of promoter sequences of Irx11, with or without point mutations in the putative binding sites, in front of luciferase reporter, microinjected with Mef2ca MO or Sox 5 MO into zebrafish embryos and assayed for luciferase activity. Together with yeast one hybrid assay, we confirmed that Mef2ca directly binds to *Irx11* promoter and positively regulates Irx11 expression. Whereas by RT-PCR and reporter analysis, Sox5 appeared to negatively regulate Irx11 expression. Using ATDC5 cells, a mouse chondrogenic cell line that can be induced to differentiate to chondrocytes, we investigated the role of Irx11 in chondrocyte proliferation and differentiation by knocking down endogenous Irx11 using siRNA approach. We found cells stably express shIrx11 showed altered morphology and inhibited differentiation capacity. The proliferation was also interfered by MTT assay. More cell death was observed in Irx11 stable knockdown cells. Cell attachment ability and cytoskeleton assembly was decreased in these cells, which may be involved in cell proliferation and chondrogenic differentiation.

KEYWORDS: Irx11; myoD; Mef2ca; Sox5; muscle differentiation; chondrocyte differentiation; gene expression regulation; promoter activity

二、緣由與目的

Irx11 為一新發現的 homeobox gene，廣泛存在於各物種間。先前實驗室利用斑馬魚來探討 *Irx11* 在胚胎發育的調控。利用全胚體原位雜交的方式，發現在胚胎時期主要表現在咽喉鰓弓。*Irx11* knock down 後，可以發現胚胎下顎軟骨組織嚴重缺失，且由 *Dlx2*、*Wnt1*、*Krox20*、*Nkx2.3*、*MyoD*、*Sox9a* 等基因的表現暗示這些基因可能直接或間接的受到 *Irx11* 的調控(Chuang et al., 2010)。在發育的過程中神經嵴細胞會遷移到咽喉鰓弓，神經嵴細胞對嵴椎動物的顱面發育很重要，它會產生頭部及咽喉鰓弓的結締組織及骨骼。利用 *Snail2* (*Snail1b*)和 *Sox9b* 當作早期神經嵴的標記，我們觀察到早期 *Irx11* morphants 胚胎的神經嵴細胞在形成和移動有異常，進而使咽喉鰓弓有缺失的情形(Chuang et al., 2010)。從實驗室先前的結果，我們推測斑馬魚 *Irx11* 會參與腦部型態及下顎肌肉與軟骨的發育。

我們已完成斑馬魚 *Irx11* 基因的表現與功能分析，因此我們想進一步了解 *Irx11* 上下游的調控機制。*Irx11* 可能為一調控基因的轉錄因子，在小鼠模式中發現 *Irx11* 扮演轉錄抑制的角色(Anderson et al., 2009)，而由斑馬魚全胚體原位雜交實驗中，我們初步發現 *Irx11* 與 *myoD* 有高度相關，因此我們想探討兩者間的調控關係，是否 *Irx11* 可直接轉錄調控 *MyoD*，以及 *Irx11* 位於 *myoD* promoter 上的結合序列為何。

從文獻已知 *Mef2c* 為一與咽喉鰓弓及下顎軟骨發育有關的基因。小鼠及斑馬魚的 *Mef2c*(*Mef2ca*) 都會在神經嵴的位置表現，且有類似的下游基因(Miller., 2007)。斑馬魚 *Mef2ca* knockdown 後，咽喉鰓弓的軟骨異常情形與我們觀察到的 *Irx11* morphant 表型極為相似，加上利用生物資訊的方法發現 *Irx11* promoter 的區域有 2 個 *Mef2c* 的結合位置，又藉由全胚體原位雜交法的結果，發現 *Mef2ca* 可以影響到 *Irx11* 的轉錄。我們推測 *Mef2ca* 可能是 *Irx11* 的一個上游調控因子，因此我們利用 yeast one hybrid、Dual-luciferase reporter assay、PCR 與全胚體原位雜交法等技術，進一步了解 *Irx11* 上游的調控機制。另外，利用目前已知 *Mef2ca* 調控下顎軟骨的途徑，進一步探討 *Irx11* 是否也參與其中或藉由調控肌肉生長去影響軟骨的發育。

骨骼的發育是從軟骨開始的，隨著發育漸進由硬骨取代，最後才形成骨骼。而軟骨是由間葉細胞聚集及分化而成，間葉細胞受到許多發育的基因調控(例如：*Sox5*、*Sox6*、*Sox9*)。*Irx11* promoter 分析發現其上有 4 個 *Sox5* 及 2 個 *Sox9* 的結合位置。*Sox5/6/9* 是屬於一個 *Sox* 轉錄因子家族的成員，此家族基因對物種組織發育影響很大，例如在性別決定、神經系統的發育及軟骨組織的分化都有相關。有文獻指出 *Sox5* 和 *Sox6* 在軟骨發育上扮演重要的角色，若把小鼠胚胎的 *Sox5*、*Sox6* 基因剔除，其胚胎的軟骨發育會有缺失，甚至在胚胎時期就死亡。*Sox9* 位在 *Sox5* 和 *Sox6* 的上游，*Sox9* 的功能是專司於間葉細胞的聚合，其也具有抑制軟骨細胞分化成肥大軟骨細胞的機制，*Sox5* 和 *Sox6* 則調控間葉細胞的分化形成軟骨細胞(Ikeda, 2005)。在 *Sox5* 剔除的小鼠中，可以發現小鼠胚胎出現顎裂，上顎軟骨也有異常的生長。在斑馬魚早期胚胎也有 *Sox5* 的表現，至於 *Sox5* 的表現位置以及其在斑馬魚胚胎發育調控角色目前並不清楚，因此我們想要探討在斑馬魚胚胎中，*Sox5* 是否會影響下顎軟骨的發育，以及 *Sox5* 是否會調控 *Irx11* 基因的表現進而影響下顎軟骨的發育。

ATDC5 是一種小鼠的軟骨前驅細胞，具有可以分化成軟骨及硬骨的能力，其分化過程大概可以分為四期，第一期增生，此階段細胞數目會大量增生且 *Col I* 基因會表現；

第二期細胞則會接近肥大前的階段，且*Col II*、*Col IX*基因會表現，之後肥大期會產生隨著時間增多及體積變大的cartilage nodules，並且大量表現*Col X*及*Runx2*基因(同時*Col II*表現量下降)，最後會藉由mineralization慢慢被硬骨取代 (Challa et al. 2010)。我們想要研究當*Irx11* knock down時，是否會影響到軟骨的發育，因此使用此細胞株，藉由抑制內生性*Irx11*基因，以探討*Irx11*對於ATDC5早期的細胞增生及軟骨分化過程產生的影響。

三、結果與討論

1. 探討 *Irx11* 參與在肌肉細胞發育的角色

A. *Irx11* 下調斑馬魚體內 *myoD* mRNA 的表現

以 whole-mount in situ hybridization (WISH)及 RT-PCR 分析，發現 *Irx11* knockdown 的胚胎軀幹 somite 位置的 *myoD* 表現量上升，而 overexpress *Irx11* 則會使 *myoD* 表現量下降(Fig 1)。

B. *Irx11* knockdown 導致肌肉和 myotendinous junction 結構異常

在顯微鏡下觀察肌肉細胞的型態，*Irx11* morphant 有較不平整的紋路。以 phalloidin 染 actin fiber，*mylz2* 和 F59 染快肌和慢肌，p^{Y397}FAK 染 myotendinous junction，都可以看到 morphant 有異常的情形 (Fig 2)。

C. *Irx11* 可藉由下調 *myoD* 表現抑制肌纖維母細胞分化

我們轉染斑馬魚和人類 *Irx11*/*Mkx* 到 C2C12 肌纖維母細胞，選殖穩定細胞株後，觀察其分化時期的影響。分化第 7 天的轉染細胞在型態上沒有明顯的 myotube 形成，分析 Myosin heavy chain 分化指標的蛋白表現量，轉染細胞明顯減少。正常細胞 *myoD* 在分化第 3 天上升，之後逐漸下降，而 *Irx11* 在分化第一天表現量最高，第 3 天則下降。轉染細胞的 *myoD* 在分化第 3 天沒有明顯上升(Fig 3)。

D. *Irx11* 可抑制 *myoD* promoter 的活性

將不同長度的 *myoD* promoter 選殖到 pGL3-basic，和 pCS2+*Irx11* 共同注射至斑馬魚胚胎，分析 luciferase 活性，發現 *Irx11* 可抑制 *myoD* promoter 活性，直到 promoter 長度-144/-39 (Fig 4)。

E. *Irx11* 在體外及體內都可直接結合在 *myoD* promoter 序列上

以酵母菌單雜合及 EMSA 實驗，我們確認 *Irx11* 可以結合在 *myoD* promoter 序列上。此序列位於-101/-78。利用 Chromatin IP 實驗，我們驗證了此序列在細胞內的確會被 *Irx11* 結合(data not shown)。

2. 探討 *Irx11* 在軟骨發育的調控

A. *Mef2a* 與 *Irx11* 的調控關係

先前的研究指出 *Mef2ca* 與 *Irx11* 都會影響咽喉鰓弓的發育，而我們進行 *Mef2ca* 和 *Irx11* 的雙色原位雜交實驗觀察到此兩基因表現位置有重疊現象(Fig 5)。利用 MO knockdown *Mef2ca* 後，咽喉鰓弓的軟骨異常情形與 *Irx11* morphant 表型極為相似(Fig 6)。由於神經嵴細胞在建構脊椎動物之咽喉鰓弓扮演很重要的角色，我們藉由神經嵴細胞 marker *Sox9b*、*Snail2b* 以及 *Dlx2* 和下顎軟骨的 marker *Sox9a* 來進行 WISH 實驗，發現神經嵴細胞數目於 18hpf、24hpf、48hpf 都有減少的狀況(*Sox9b*、*Snail2b*) (Fig 7)，而構成咽喉鰓弓第一對及第二對的細胞數目也會有下降的情形(*Dlx2*) (Fig 8)。另

外，利用下顎軟骨 marker *Sox9a* 觀察，缺少 *Irx11* 和 *Mef2ca* 的胚胎其第一對及第二對下顎軟骨組織細胞都會有減少的形態(data not shown)。以上結果顯示 *Mef2ca* 和 *Irx11* 對於神經嵴細胞形成咽喉腮弓的發育是必需的，且其缺失表型極為相似。另外，文獻指出 *Mef2ca* 會藉由抑制 *Dlx3* 與促進 *Dlx4* 再去影響 *Hand2*，共同調節顱面生長發育，我們觀察在 *Mef2ca* 和 *Irx11* morphant，*Dlx3* 表現量較多而 *Dlx4* 有被抑制的現象(data not shown)，這與文獻報告(Craig T. Miller, 2007)有符合，因此推測 *Irx11* 可能參與和 *Mef2ca* 相同或平行的途徑去調控咽喉腮弓軟骨的發育。

我們將 *Irx11a* cRNA 與 *Mef2ca*-MO 共同注射到斑馬魚胚胎中，利用 Alcian blue 染色觀察 120hpf morphant 軟骨的發育情形，發現 *Irx11* cRNA 無法回復 *Mef2ca* knockdown 所造成下顎軟骨的異常，表示 *Irx11* 與 *Mef2ca* 在軟骨發育不是直接調控。但是注射 *Irx11a* cRNA 以及 *Mef2ca*-MO 到肌肉螢光的轉殖基因魚(TgMLC:EGFP^{+/+})，發現 800 pg/per embryo *Irx11a* cRNA 會使 72hpf *Mef2ca* morphant 造成肌肉缺失的情形恢復(Fig 9)。此外，利用 *MyoG* 作為 marker，我們觀察到在 48hpf *Mef2ca* morphant 其 *MyoG* 表現量也因為 *Irx11a* cRNA 的加入而有回復作用，顯示 *Mef2ca* 在肌肉發育上可能與 *Irx11* 有直接調關係。

以 RT-PCR 分析顯示，*Irx11* knockdown 的胚胎其 *Mef2ca* 表現量不改變，但反過來將 *Mef2ca* knockdown 的胚胎其 *Irx11* 表現量有降低現象(Fig 10)。利用 WISH 也可以發現同樣的結果(Fig 10)。因此我們分析斑馬魚 *Irx11* 基因上游 1kb 序列，發現有四段可能為轉錄因子結合區域，其中有 2 個 *Mef2c* 的結合位置，分別位於 -1120/-1110 與 -450/+440，參考此轉錄因子結合位置我們選殖出不同長度片段的 *Irx11* pr.，分別接到含有 firefly Luciferase 的 pGL3-basic 與 pGL3-pr. 質體(data not shown)，使用 Dual-luciferase reporter assay 來探討 *Mef2ca* 是否可藉由 *Irx11* pr. 上的 putative *Mef2c* binding site 調控 *Irx11* 基因的轉錄。結果發現 *Irx11* pr. -1342/+249 活性比 -1342/+951 高出 7 倍，初步判定 *Irx11* pr. +249/+951 之間可能有抑制 *Irx11* pr. 活性的抑制子結合位(data not shown)。為了探討 *Irx11* 與 *Mef2ca* 調控關係，我們將 *Mef2ca*-MO 和 *Irx11* pr. 一起顯微注射到胚胎內，結果發現 *Irx11* 與 *Mef2ca* 之間的關係主要為正調控的現象，但如果選殖出來的 *Irx11* pr. -452 左右的區域被截斷就會形成負調控的趨勢(Fig 11)，因此猜測 *Irx11* 與 *Mef2ca* 之間直接結合調控的區域可能在附近，因此我們做了兩組點突變，分別位在預測的 *Mef2ca* 結合位 C450A G448T A446C 以及不包含結合位的 T452G A451C(data not shown)，之後將此兩種質體顯微注射至胚胎內進一步探討 *Irx11* pr. 上 *Mef2ca* 有意義的結合位置，目前結果推測 *Mef2ca* knockdown 會抑制 *Irx11* pr. -517/-389 表現。

所以我們利用 Yeast one hybrid 進一步探討 *Mef2ca* 和 *Irx11* pr. -517/-389 是否可以直接結合。首先將製備好 *Mef2ca* pYoh-1/pRS313 與 *Irx11* promoter-pYoh366 的質體並分別 transform 到酵母菌 W303 α strain 和 W303a strain，接著利用缺乏 -Ura/-Trp /-His 三種胺基酸的培養基進行篩選，結果發現 *Irx11* promoter 與 *Mef2ca* 之間可以直接結合(Fig 12)。

B. Sox5 與 *Irx11* 的調控關係

首先在早期斑馬魚胚胎(18、24、48hpf)利用 WISH 來偵測 *Irx11* 與 *Sox5* 的表現，在 18hpf 的胚胎可以觀察到其兩者表現在 notochord，24hpf 則主要表現在腦部，而 48hpf 則明顯的集中在下顎的部分，由此觀察 *Irx11* 與 *Sox5* 在早期斑馬魚胚胎發育有時間與空間重疊的現象。另外，在 RT-PCR 也可以看到在早期胚胎兩者都有表現(Fig 13)。

我們將 *Sox5* MO 顯微注射到斑馬魚胚胎，分別做了 RT-PCR 定量分析、Whole-mount in situ hybridization、Alcian Blue 染色觀察其下顎軟骨發育情形。在注射過 *Sox5* MO(0.25pmol+1.5X p53 MO)的全胚胎在 48 小時，其 *Irx11* 的表現量是上升的(Fig 14)。利用 Alcian Blue 染色觀察 120hpf 胚胎其下顎軟骨的發育，發現在注射過 *Sox5* MO 的胚胎，下顎軟骨發育有異常的情形，可以將異常情形分為兩種，在第二對軟骨可以觀察到與 STD 比較有角度的異常(mild)，更為嚴重的還可以觀察到生長方向相反(sever)，*Sox5* morphant 其下顎軟骨發育與 *Irx11* morphant 一樣有異常的型態(Fig 15)。

之後我們選殖 *Irx11* promoter -1342/+249 序列，接入 pGL3 basic，同時也選殖斑馬魚 *Sox5*, *Sox6*, *Sox9* cDNA 至 pCS2+，將不同組合的 *Sox* 與 promoter 序列一同注射到斑馬魚胚胎，經過 48 小時取出頭部萃取出來做冷光分析。發現在 *Sox5* knockdown 下，*Irx11* promoter 活性會上升，而 overexpression *Sox5* 其 *Irx11* promoter 活性是明顯受抑制。另外，*Sox5* 和 *Sox6* 同時表現會加強抑制效果，如果再加上 *sox9* 則反而會促進 *Irx11* promoter 的活性(Fig 16)。因此，*Sox5* 對 *Irx11* 可能扮演抑制的角色，而 *Sox* trio genes 會共同調節 *Irx11* promoter。

C. *Irx11* 在軟骨細胞分化扮演的角色

ATDC5 為小鼠的軟骨前趨細胞，具有分化成軟骨和硬骨的能力。它被廣泛的作為 monolayer culture system 來研究軟骨的分化，當它還未分化時，它會維持纖維母細胞的型態，加入 ITS 可以讓 ATDC5 開始進行分化，剛開始細胞會先以拉長的梭狀型態短暫的濃縮在一起，然後形成 nodules。這些 nodules 隨著分化時間增長數量和大小也會逐漸增加，可以被 Alcian blue 染色(Fig 17)。所以，我們使用此細胞株，藉由抑制內源性 *Irx11* 基因，以探討 *Irx11* 對於 ATDC5 細胞增生及分化過程產生的影響。我們從中研院 RNAi core 購得針對老鼠內生性 *Mkx* 基因三個不同目標序列(target sequence)的 shRNA 質體(shIrx11-43 / shIrx11-44 / shIrx11-47)，而 scramble shRNA control (pLKO.1-shLuc) 則作為控制組。利用質體製成慢病毒(lentivirus)來感染 ATDC5 細胞株，以 puromycin 的培養液進行篩選，得到 3 株 stable-shRNA knockdown 細胞株：sh43、sh44、sh47。

利用定量 PCR 去檢查 shIrx11-43 及 shIrx11-44 及 shIrx11-47 knockdown 效力，發現 shIrx11-43 及 shIrx11-47 是有下降的趨勢，shIrx11-43 下降到剩 13%，而 shIrx11-47 則下降到剩下 20%，但是 shIrx11-44 反而增加表現達 8 倍之多(Fig 18)。初步觀察細胞型態，發現 shIrx11-43 的細胞觸角沒正常細胞多且形狀較圓，shIrx11-44 的細胞較扁平且緊貼，最後 shIrx11-47 的細胞觸角明顯變得很少且更不易貼盤(Fig 19)。經由 ITS 的誘導分化後，可以發現 WT 的細胞會隨著時間的增加形成 nodules，進而分化成軟骨，但是 shIrx11-43 及 shIrx11-47 的細胞在分化的能力上似乎受到抑制，nodule 較分散且較小

(Fig 20)。利用免疫螢光染色來觀察其細胞骨架(actin)，發現shIrx11-44細胞株其骨架延伸能力比WT更好，而shIrx11-43及shIrx11-47細胞株的細胞骨架明顯縮短，且骨架延伸能力不太好，推測此現象可能影響到細胞分化的能力(Fig 21)。

藉由MTT assay測量細胞的生長情形，在未分化的狀況下，各組細胞生長差異不大，在誘導分化後，發現shIrx11-43及shIrx11-47細胞數目顯著減少。將進一步以軟骨細胞分化指標基因如ColI, ColII, ColX, runX2, Sox9等的表現情況分析Irx11 knockdown對軟骨細胞分化的影響。其他如N-cad, pFAK等與細胞附著及細胞骨架形成相關，也是軟骨細胞分化所須活化之路徑的探討，也會依序分析。

Figures

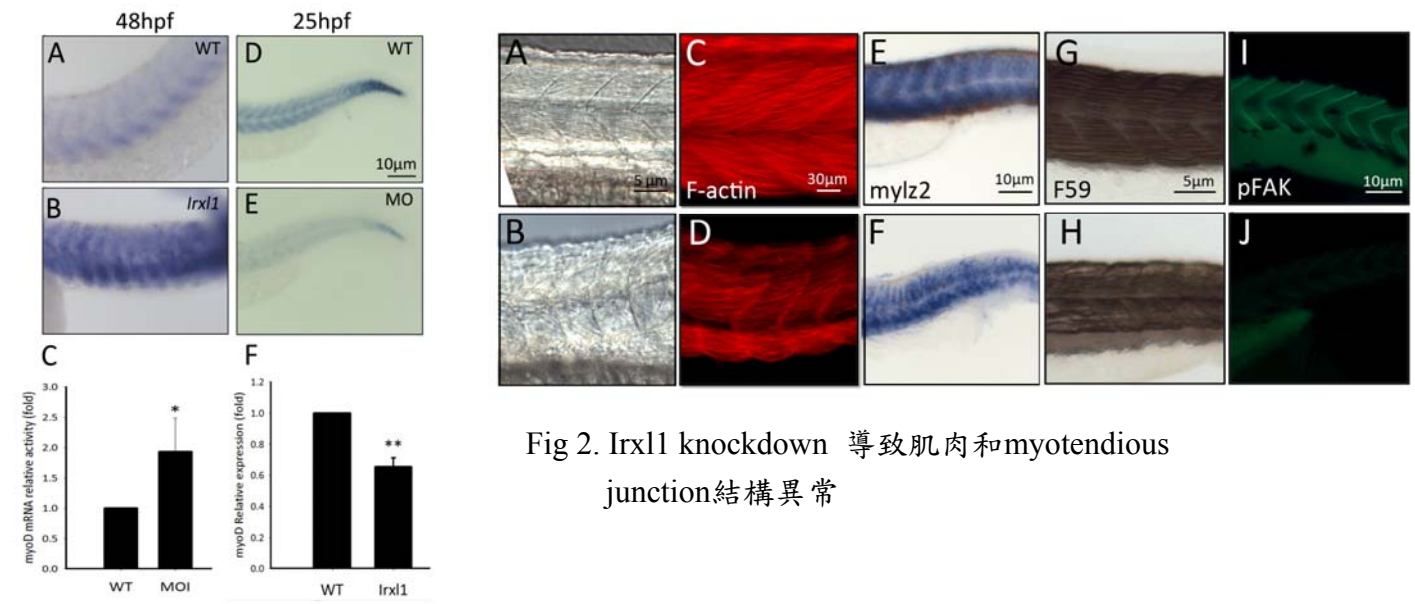


Fig 2. Irx11 knockdown 導致肌肉和myotendinous junction結構異常

Fig 1 Irx11下調斑馬魚體內myoD mRNA的表現

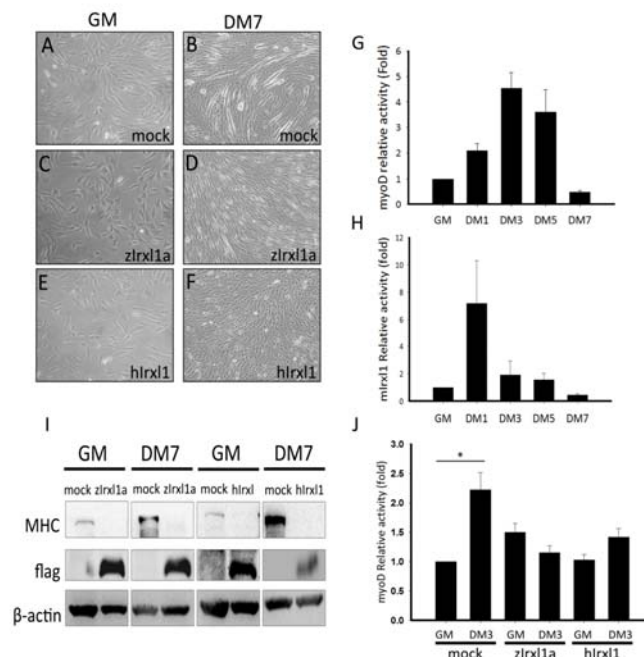


Fig 3 Irx11可藉由下調myoD表現抑制肌纖維母細胞分化

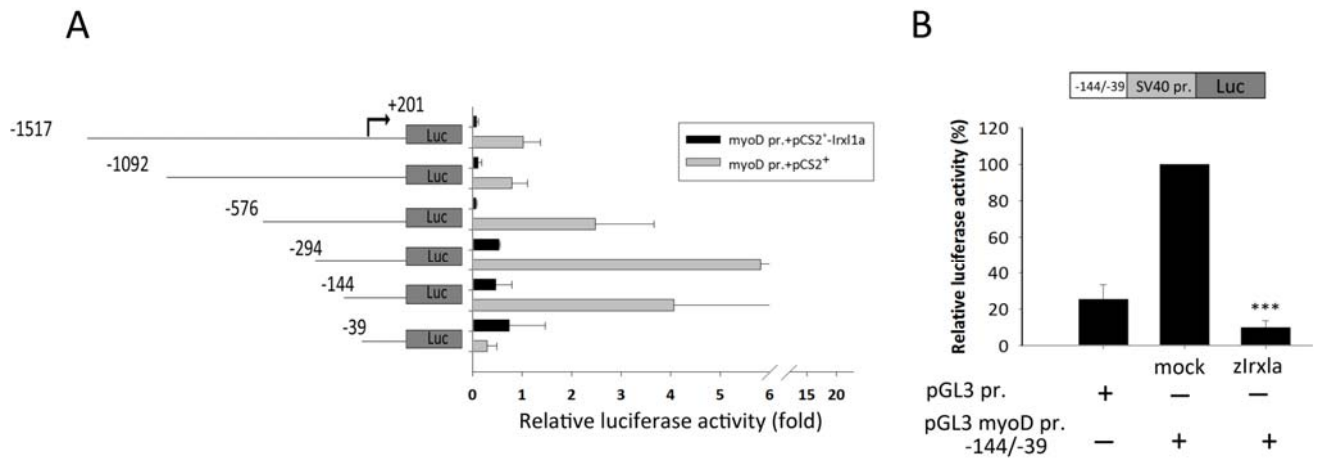


Fig 4 *Irx1* 可抑制 *myoD* promoter 的活性

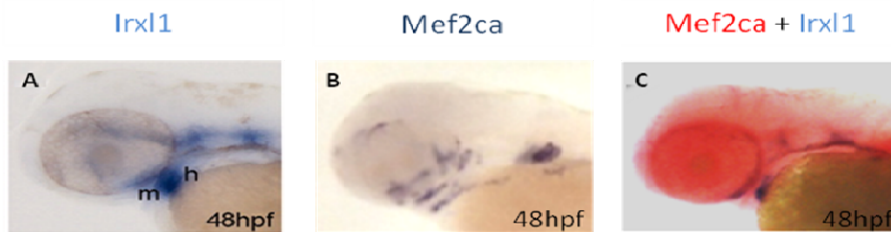


Fig 5 *Irx1* 和 *Mef2ca* 表現位置有重疊的現象

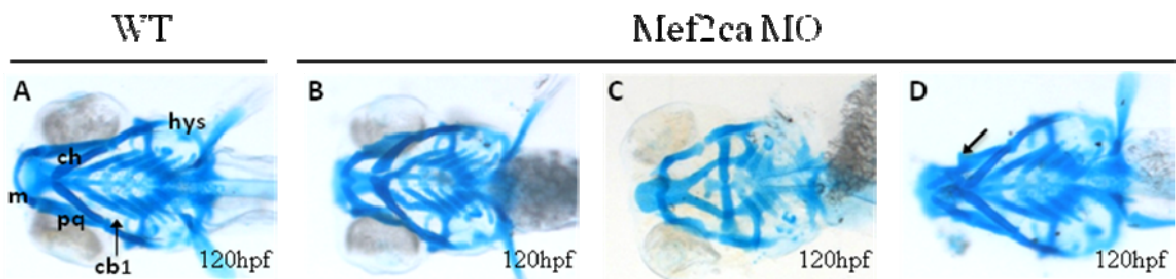


Fig 6 *Mef2ca* morphant 其下顎軟骨發育不全

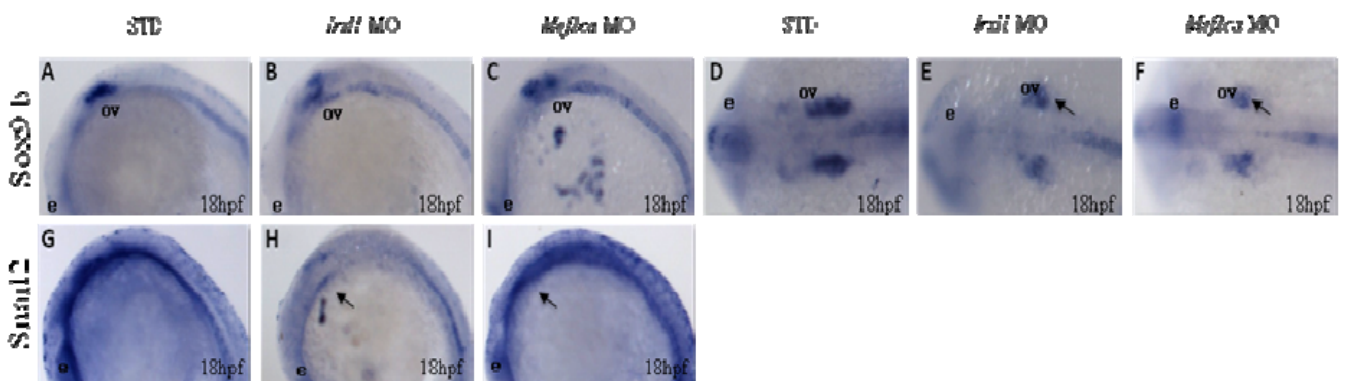


Fig 7 偵測 *Irx1* 以及 *Mef2ca* morphant 在早期胚胎的神經嵴細胞

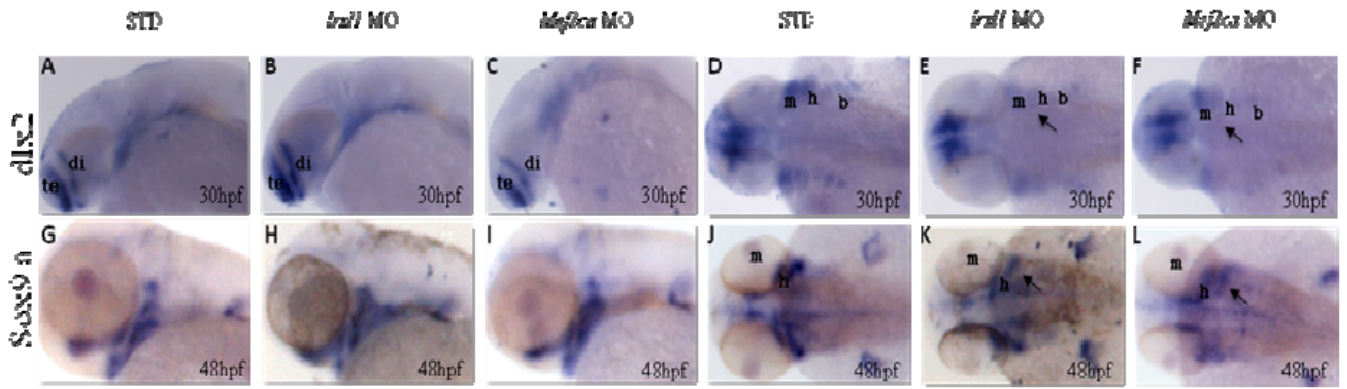


Fig 8偵測*Irx1*以及*Mef2ca* morphant在神經嵴細胞遷移至咽喉腮弓的情形

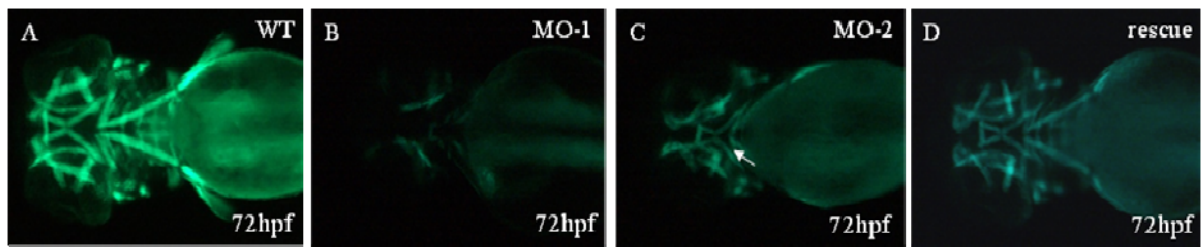


Fig 9 *Irx1a* cRNA會使72hpf *Mef2ca* Morphant 造成肌肉缺失的情形恢復

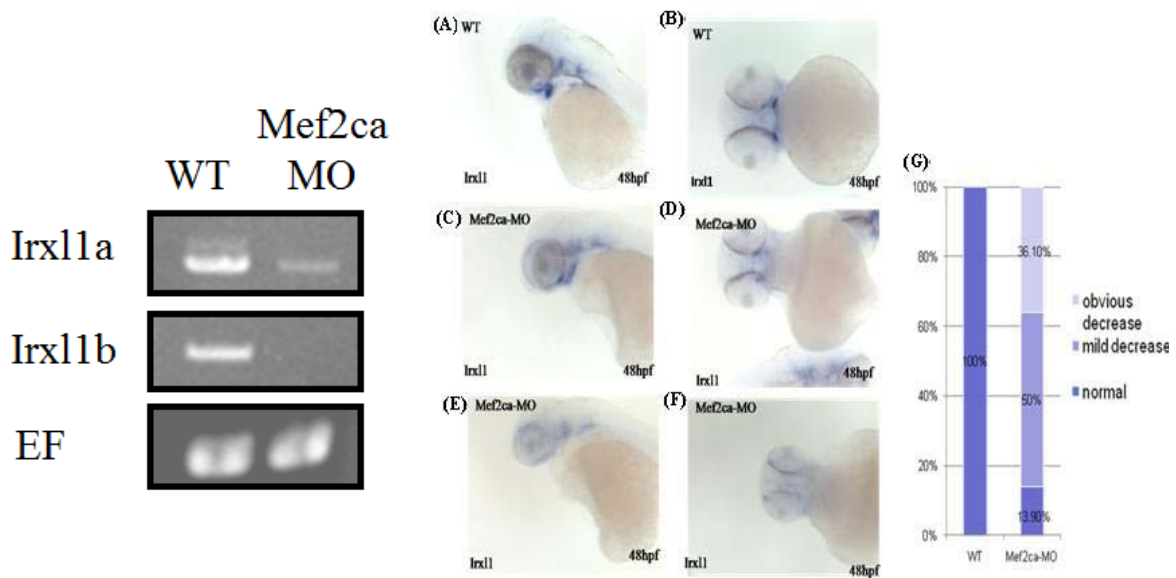
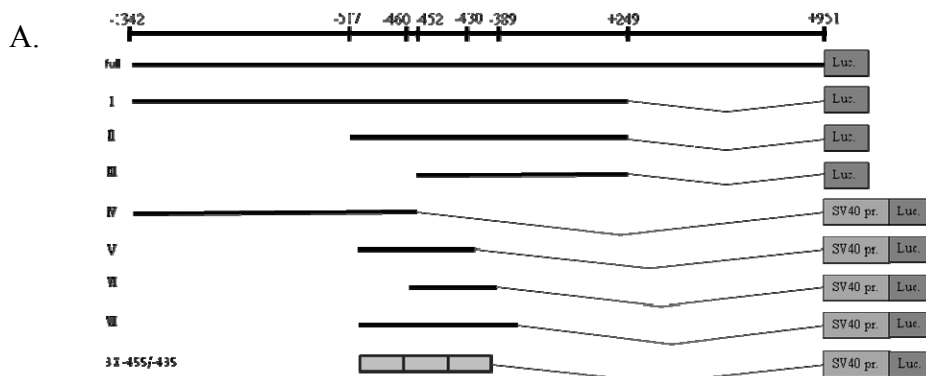


Fig 10 *Mef2ca* Morphants裡*Irx1*的表現量下降



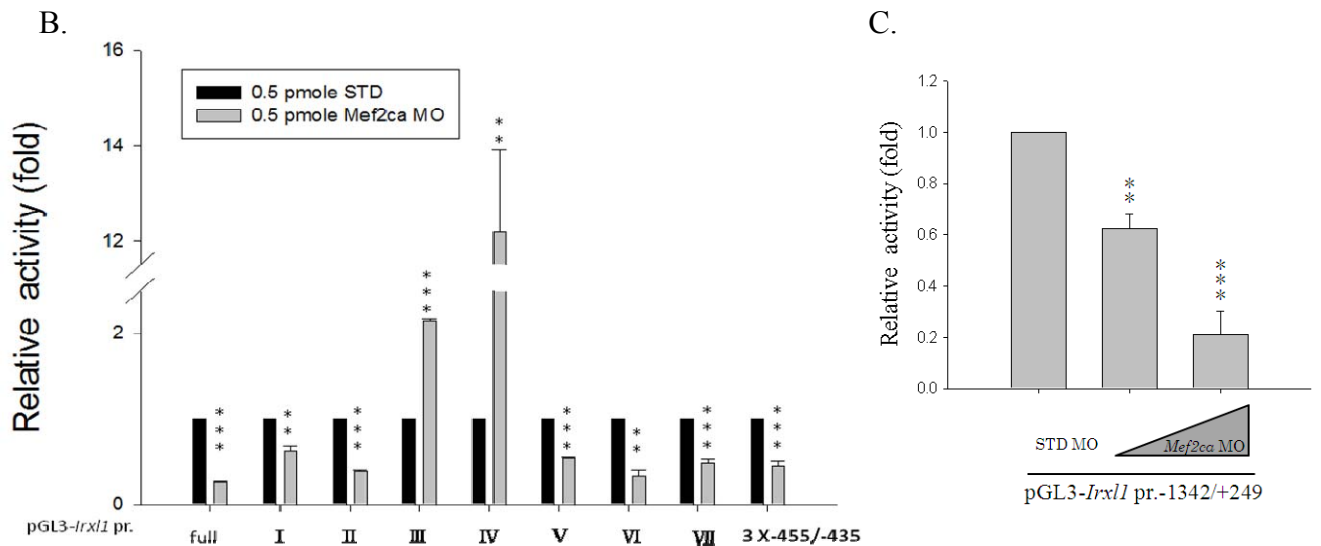


Fig 11 Dual-luciferase reporter assay 證明 Mef2ca 調控 *Irx11* pr

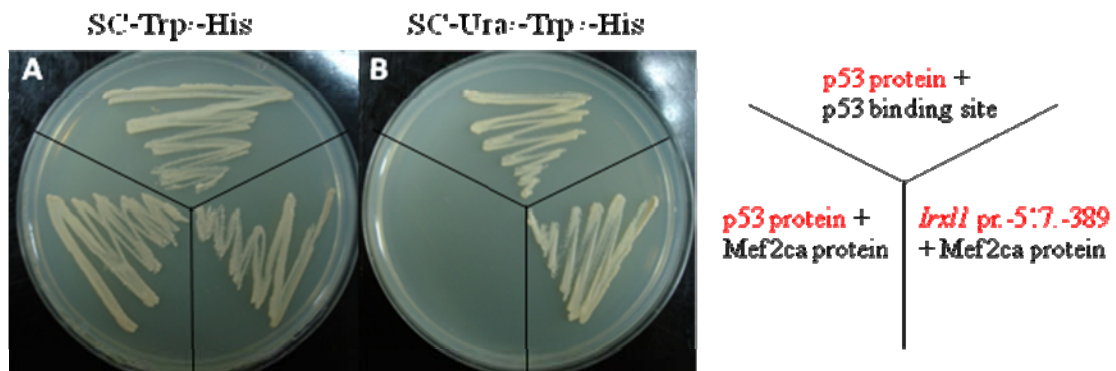


Fig 12 利用 Yeast one hybrid 證明 Mef2ca 蛋白會和 *Irx11* pr. -517/-389 結合

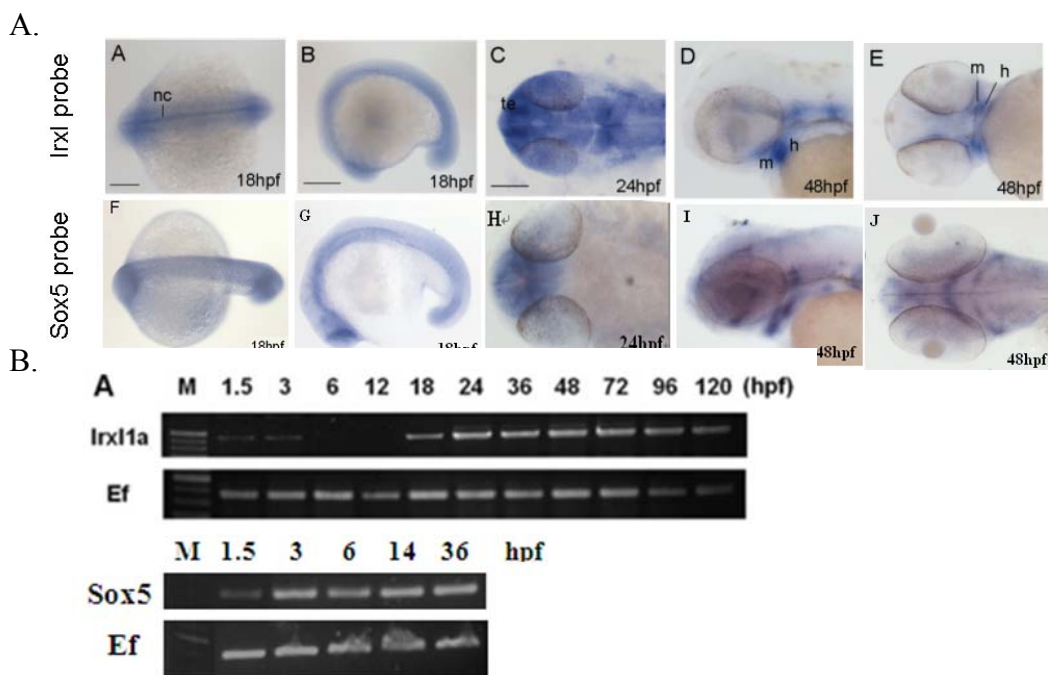


Fig 13 斑馬魚的胚胎 Sox5 的表現和 *Irx11* 基因表現重疊 (A) WISH (B) RT-PCR

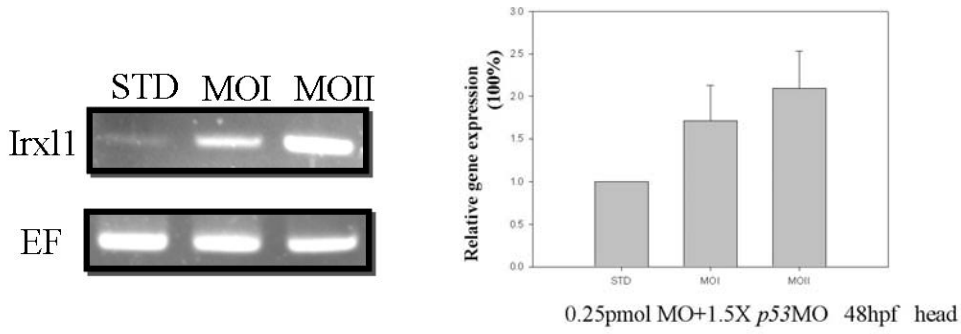


Fig 14 Sox 5 knockdown的胚胎中Irx11表現量上升

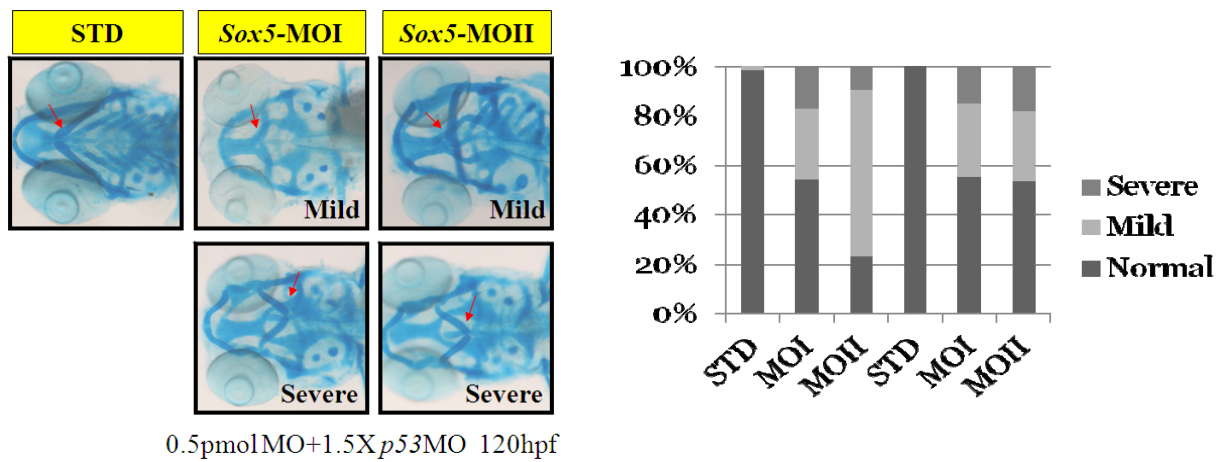


Fig 15 Sox5 morphant 其下顎軟骨其形態有異常

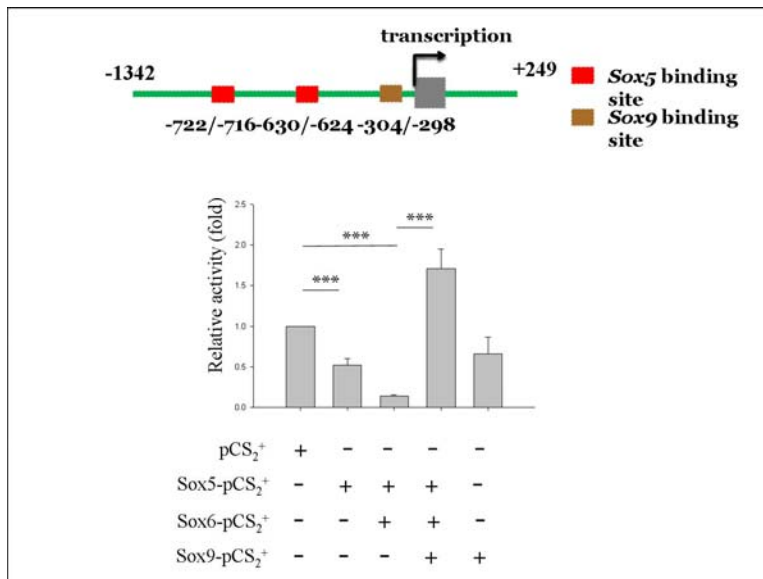


Fig 16 Sox trio genes (Sox5,Sox6,Sox9) 一同調控Irx11 promoter的活性

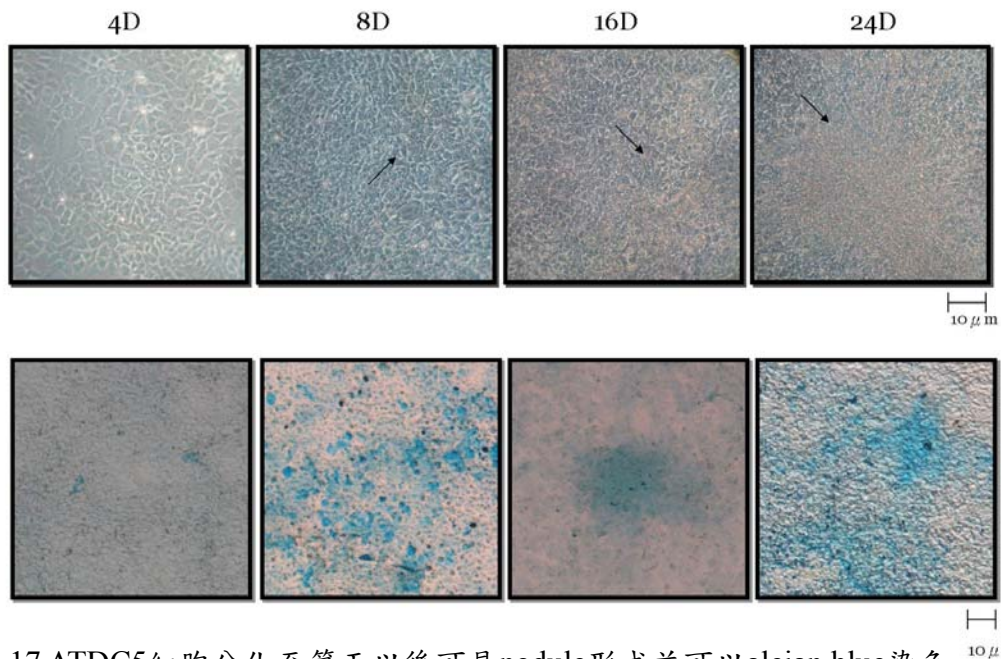


Fig 17 ATDC5細胞分化至第天以後可見nodule形成並可以alcian blue染色 10 μm

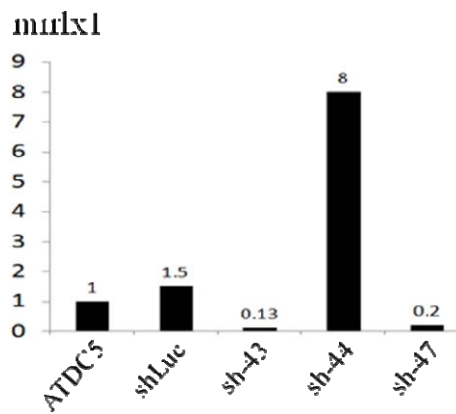


Fig 18 定量PCR檢查Irx11 RNA 在shIrx11-43、shIrx11-44及shIrx11-47的表現

GM

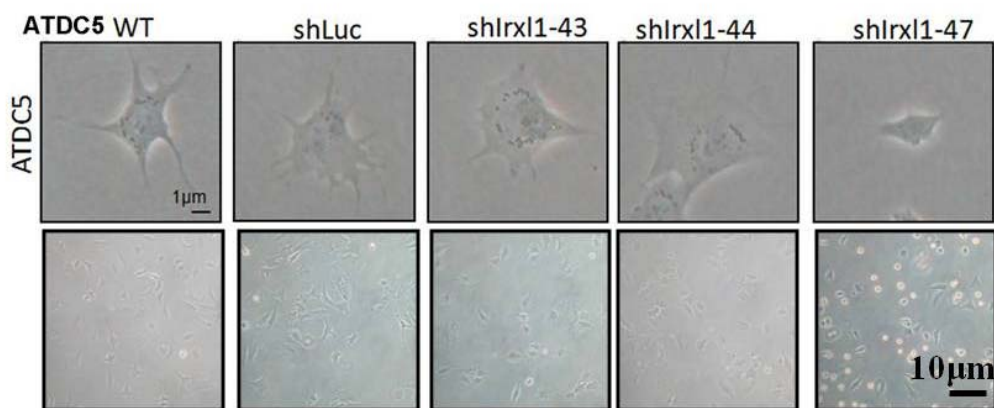


Fig 19 Irx11 knockdown的細胞其細胞型態與WT ATDC5不同

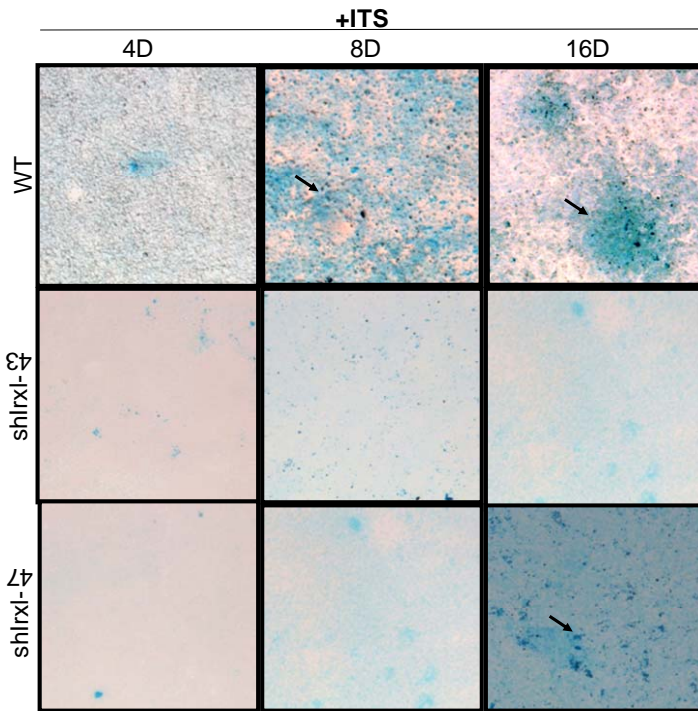


Fig 20 Irx11 knockdown的細胞形成軟骨nodule的能力較差

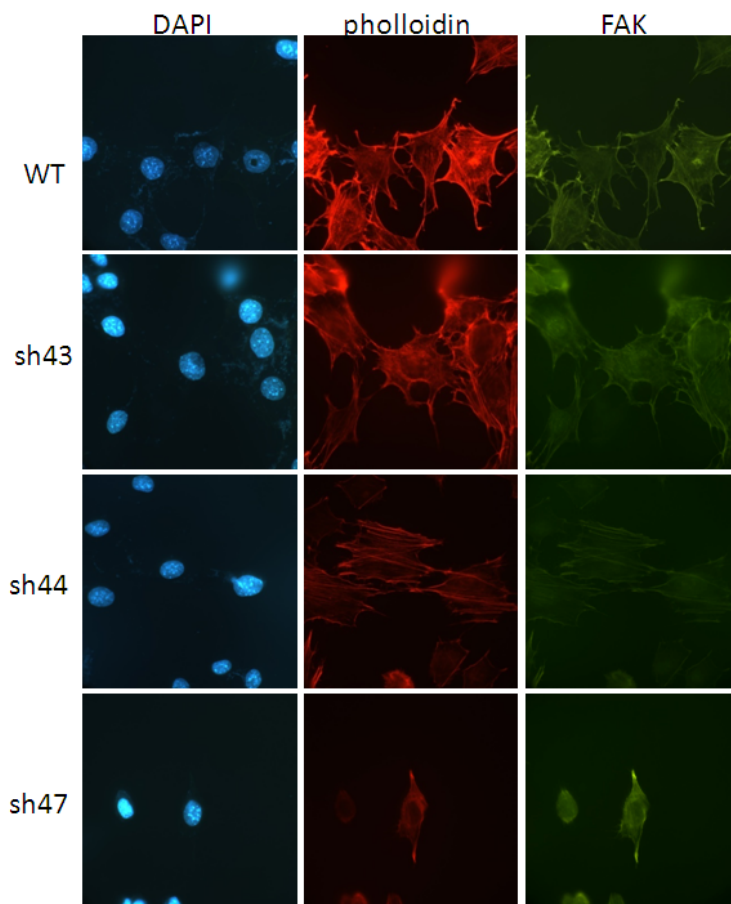


Fig 21 利用免疫螢光染色觀察細胞骨架

四、成果自評

本年度原本提出三年期計畫，想要做一較全面而完整之探討，因期限被刪減至一年，經費也大幅減少，在此情況下，我們仍按原訂計畫盡力完成大部分的實驗。在第一部份，Irx11與MyoD的調控關係，目前已確認Irx11可抑制MyoD promoter的活性both in vitro and in vivo，且已找到Irx11可以結合的DNA序列，這部份的結果已在撰寫論文，預計今年投稿。第二部份關於Irx11與Mef2ca的調控關係，也已完成絕大部分，預計明年撰寫及投稿。第三部份，Irx11與Sox家族成員的調控關係，以及第四部份，Irx11在軟骨細胞分化的調控，還需一段時間才能完成較完整的內容。參與此計劃研究的大學部學生，有三位得到大專生國科會專題計畫獎助，其中一位更得到國科會大專生研究創作獎。這三位學生都已畢業，有一位留在實驗室繼續其碩士研究，可望完成剩餘的第三、第四部份的實驗。另有一位博士生參與第一部份研究，此成果為其博士論文的一部份。另外還有多位大二、大三的大學部同學，在參與計畫的過程得到實驗操作的訓練，未來可以執行其他的研究。

五、參考文獻

Anderson DM., Beres BJ., Wilson-Rawls J, and Rawls A (2009) The homeobox gene mohawk represses transcription by recruiting the sin3A/HDACCo-repressor complex. *Dev Dyn.* **238**: 572–580.

Challa, T.D., Y. Rais, and E.M. Ornan (2010) Effect of adiponectin on ATDC5 proliferation, differentiation and signaling pathways. *Mol Cell Endocrinol*,2010. **323**(2): 282-91.

Chuang, H.N., et al. (2010) The zebrafish homeobox gene irx11 is required for brain and pharyngeal arch morphogenesis. *Dev Dyn.* **239**(2): 639-50.

Ikeda, T., et al., Distinct roles of Sox5, Sox6, and Sox9 in different stages of chondrogenic differentiation. (2005) *J Bone Miner Metab.* **23**(5): 337-40.

Miller CT., Swartz ME., Khuu PA., Walker MB., Eberhart JK., Kimmel CB. (2007) Mef2ca is required in cranial neural crest to effect Endothelin1 signaling in zebrafish. *Developmental Biology* **308**: 144–157.

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2012/10/22

國科會補助計畫	計畫名稱: 新穎同源箱基因Irx11在肌肉及軟骨細胞分化的功能研究
	計畫主持人: 潘惠錦
	計畫編號: 100-2320-B-040-011- 學門領域: 醫學之生化及分子生物
無研發成果推廣資料	

100 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：潘惠錦		計畫編號：100-2320-B-040-011-					
計畫名稱：新穎同源箱基因 Irx11 在肌肉及軟骨細胞分化的功能研究							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	1	1	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	1	1	100%	人次	
		博士生	1	1	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	1	1	100%		
		專書	0	0	100%		章/本
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>一位國科會大專生研究創作獎</p>
--	----------------------

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

原先提出計畫為三年期，內容較多，無法在核定的經費及刪減成一年的時間內完成。但已完成絕大部分的實驗。

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

本年度原本提出三年期計畫，想要做一較全面而完整之探討，因期限被刪減至一年，經費也大幅減少，在此情況下，我們仍按原訂計畫盡力完成大部分的實驗。在第一部份，Irx11 與 MyoD 的調控關係，目前已確認 Irx11 可抑制 MyoD promoter 的活性 both in vitro and in vivo，且已找到 Irx11 可以結合的 DNA 序列，這部份的結果已在撰寫論文，預計今年投稿。第二部份關於 Irx11 與 Mef2ca 的調控關係，也已完成絕大部分，預計明年撰寫及投稿。第三部份，Irx11 與 Sox 家族成員的調控關係，以及第四部份，Irx11 在軟骨細胞分化的調控，還需一段時間才能完成較完整的內容。參與此計劃研究的大學部學生，有三位得到大專生國科會專題計畫獎助，其中一位更得到國科會大專生研究創作獎。這三位學生都已畢業，有一位留在實驗室繼續其碩士研究，可望完成剩餘的第三、第四部份的實驗。另有一位博士生參與第一部份研究，此成果為其博士論文的一部份。另外還有多位大二、大三的大學部同學，在參與計畫的過程得到實驗操作的訓練，未來可以執行其他的研究。