

「 論文内容の要旨 」

***XSIP1*, a member of two-handed zinc finger proteins, induced anterior neural markers in *Xenopus laevis* animal caps**

Two-handed ジンクフィンガータンパク質に属する *XSIP1* はツメガエルのアニマルキャップに前方神経マーカーを誘導する

永崎 暁

1. -----
Xenopus の胞胚期の外胚葉片は未分化な細胞の集団で、様々な誘導因子により分化を引き起こすことが知られている。なかでも TGF- β superfamily に属するアクチピンは、外胚葉片を処理する時間と濃度に応じて腹側から背側の中胚葉組織を誘導することができる。また高濃度のアクチピンで処理をした外胚葉片は organizer (形成体) を模倣することが知られており、この処理をした外胚葉片を正常胚の胞胚腔へ移植することにより、2次軸をもった胚が形成される。また、アクチピンで処理をした外胚葉片を前培養時間をおいたのち、無処理の外胚葉片でサンドイッチすることにより、前培養時間に応じて頭部構造から尾部構造を形成する。この濃度でアクチピン処理したものをそのまま培養しつづけても頭部構造は形成されない。このサンドイッチする系においては、アクチピン処理後培養時間をおいたものから、頭部を形成するための何らかの因子がサンドイッチする側の外胚葉片に働きかけ、全体として頭部構造を形成すると考えられる。これにより、初期発生においてアクチピンシグナルの下流において外胚葉に対して神経を誘導できる因子の存在が考えられ、このような因子の探索を試み解析を行った。

[方法・結果・考察]

いくつもの遺伝子断片が単離されたが、そのうちで WISH により神経形成時に発現し

ている遺伝子についてしらべた。この遺伝子の配列は *mouse* の *SIP1* (Smad interaction protein 1) と相同性が非常に高い。*mouse* の *SIP1* は Smad に結合するタンパク質を two-hybrid 法で探索することにより見つけられたものであり、今回の実験のアプローチ方法とは異なっている。機能部位の保存度も高いことから *homologue* と考えられたので、*XSIP1* とした。この *XSIP1* には *isoform* が 2 種類あり、両者の差は全アミノ酸配列中に占める割合で 98% とくに N 末端側の 30 残基に集中していた。*XSIP1* は約 1200 アミノ酸で、N 末端側に 3 つの C₂H₂ タイプの zinc finger と 1 つの C₃H タイプの zinc finger をもち、C 末端側に 2 つの C₂H₂ タイプの zinc finger と 1 つの C₃H タイプの zinc finger をもつ。また配列中に SBD (Smad binding domain) と homeodomain like region をもつ。他のグループによる *in vitro* における実験から、SBD はリン酸化された Smad の MH2 domain に結合するために必須の部分であり、また gel shift による実験でこの zinc finger が *Xbra2* の転写開始領域に結合することがわかっている。また、homeodomain like region は、実際に機能する homeodomain に必須なアミノ酸がかけている。また、*XSIP1* の 2 つの *isoform* のうち、アミノ酸の N 末端が *mouse* の *SIP1* と相同性の高いものを *XSIP1-a*、アミノ酸 30 残基ほど違うものを *XSIP1-b* とした。

XSIP1 の発現をステージ別の RT-PCR と whole mount *in situ* hybridization 法 (WISH) をもちいて解析した。RT-PCR の結果、*XSIP1-a* は神経形成の始まるごく初期の段階から発現をはじめ、その後も神経形成を通して発現が維持されることがわかった。WISH においては、*XSIP1-a*、*XSIP1-b* の両者の配列の差が小さいことから、それらを区別して調べることができなかった。*XSIP1-a* をプローブとして WISH を行ったところ、後期原腸胚の背側中胚葉領域において発現を始め、続いて神経板の側方に位置する神経摺、そして尾芽胚においては前脳から神経管、そして目において発現が見られた。*XSIP1* の正常胚での働きを調べるためにインジェクションを行った。*XSIP-a* を正常胚の外胚葉領域に過剰発現させてみたところ、神経胚においては神経板が拡大し、尾芽胚においては頭部領域で神経細胞が大きく占めその影響により目の形成が阻害されるなどの影響が見られた。また、背側植物極領域に過剰発現させると dominant negative *xbra* のインジェクションのように、腹側植物極領域に過剰発現させると短尾胚がみられた。*XSIP1-b* についてはインジェクションによる変化は見られなかった。

つぎに *XSIP1-a* が神経形成のごく初期の段階に発現しているので、アニマルキャップにインジェクションすることによりそのほかの proneural gene を誘導できるか、また神経のマーカ―遺伝子を誘導できるかの実験を行った。Proneural gene に関しては、*XATH3*、*XASH3*、*neurogenin*、*neuroD*、*zic3*、*opl* など誘導することはできなかった。神経のマーカ―遺伝子に関しては pan-neural marker の N-CAM、前方の神経マーカ―の *XAG1*、*Xotx* を誘導することはできたが、後方の神経マーカ―遺伝子は誘導できなかった。また、*XSIP1* が同時期に発現する

神経・頭部誘導因子により発現が誘導されるかどうかをみたところ、*chordin*、*XATH3* によって強く発現が誘導された。

XSIP1-a は 1) 発現が神経形成のごく初期から神経の形成期を通して見られ、2) 正常胚の外胚葉に異所的に発現させると神経細胞の増大を引き起こし、3) アニマルキャップに対して神経マーカー遺伝子を誘導し、4) アクチビンや *chordin* によって誘導される。これらの結果から、*XSIP1-a* は神経形成において何らかの役割を担っていると考えられる。しかし、*XSIP1-a* それ自身ではアニマルキャップに対して神経細胞を誘導できないことや、他の proneural gene を誘導できないこと、*mouse* の *XSIP1* を *Xenopus* にインジェクションすることにより *xbra* の発現が減少することを考えると、外胚葉における中胚葉の形成を押さえ神経の場の形成に対して働きを持ち他の因子とで神経細胞を誘導できると考えられる。また、モチーフ領域がおなじである *XSIP1-b* がインジェクションによる正常胚やアニマルキャップへの効果が見られないことから、*XSIP1-a* の N 末端の約 30 アミノ酸残基を含む部分がシグナルシーケンスだと考えられる。