

[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 小藪 芳男

本研究は高等動物初期発生過程において重要な役割を演じていると考えられる Zn フィンガー蛋白質 Zic、Gli、NKL の分子メカニズムを解明するために、培養細胞を使った実験系およびアフリカツメガエル胚に mRNA を注入して蛋白質を過剰発現させる系にて、Zic、Gli、NKL 蛋白質の蛋白質間相互作用および神経堤発生における役割を検討しており、下記の結果を得ている。

1. Zic、Gli の蛋白質間相互作用を検討するため、293T 細胞に Zic と Gli を発現させ、その細胞溶解液で免疫沈降反応を行った結果、Zic と Gli とは互いの Zn フィンガー領域で分子間相互作用することが明らかになった。大腸菌で発現精製した蛋白質どうしでの結合実験の結果、この Zic と Gli の結合は他の因子を介さない直接的なものであることが示唆された。従って、試験管の中では、Zic と Gli が互いの Zn フィンガー領域を介して結合することが示された。

2. NIH3T3 細胞に Zic と Gli を発現させ、細胞内での Zic と Gli の局在を観察した。その結果、単独では Zic は核に局在し、GLI3 は細胞質に優位に存在した。同一の細胞で GLI3 と Zic とが発現している場合には、核に局在して発現する GLI3 の細胞数の割合が増加した。また、Zn フィンガー領域を除いた GLI3 で同様の実験を行ったところ、単独発現または Zic との共発現に関わらず、細胞内の局在に変化は認められなかった。従って、細胞内でも Zic と Gli が相互作用する可能性が示された。

3. Thymidine kinase(TK)プロモーターの 5'上流に Gli の最適結合塩基配列(GBS)を 6 つ付けたルシフェラーゼ発現レポーター遺伝子(pGBS-TK-luc)を使って、Zic1 と GLI3 の転写活性における影響を調べた。その結果 GLI3 結合性蛋白質 CREB-binding protein(CBP)、GLI3 の 2 者に比べ Zic1、CBP、GLI3 の 3 者を発現させたときには、GLI3 による GBS 依存性の転写活性をおよそ 6 倍増加させた。この転写活性増加の可能性として、Zic と

の共発現によって核に局在する Gli が増加するなどの Zic による Gli の転写活性への影響が示唆された。

4. NKL はツメガエル胚の中期神経胚において、神経堤が生じる神経板境界部で、Zic の発現部位と一部重なって発現している。そこで、2 細胞期のツメガエル胚の片側割球に NKL または Zic3 の mRNA を注入して、蛋白質を過剰発現させ、中期神経胚での神経堤マーカーの変化を観察した。その結果、NKL は神経堤マーカーの発現を抑制し、Zic3 の神経堤マーカー拡大の作用に拮抗することが示された。また、NKL の様々な変異蛋白質で同様の実験を行ったところ、最終的に神経堤発生の抑制および Zic3 との拮抗作用には Zn フィンガー領域が必要かつ充分であることが示された。

5. Gel shift assay の結果 NKL は GBS に特異的に結合することが報告されている。そこで NKL の転写活性を検討した。ツメガエル胚に pGBS-TK-luc と NKL mRNA を同時に注入し、胞胚期に animal cap explants を切り取り、中期神経胚に相当する時期まで培養し、ルシフェラーゼの発現を測定した。その結果、NKL は GBS 依存的に転写を抑制することが示唆された。また、NKL の様々な変異蛋白質で同様の実験を行ったところ、最終的に転写の抑制には Zn フィンガー領域が必要かつ充分であることが示された。

6. NKL の Zn フィンガーモチーフは Gli の Zn フィンガーモチーフに非常に似ていることから、Zic と NKL の分子間相互作用について検討した。293T 細胞に Zic と NKL を発現させ、その細胞溶解液で免疫沈降反応を行った結果、Zic と NKL とは分子間相互作用することが明らかになった。さらに、実験を進めた結果、Zic と NKL との分子間相互作用には互いの Zn フィンガー領域が重要であることが明らかとなった。

以上、本論文は培養細胞およびツメガエル胚を用いた実験系において、Zic、Gli、NKL 蛋白質が互いの Zn フィンガー領域で蛋白質間相互作用すること、Zic と NKL とは神経堤発現において拮抗的に働き、NKL の作用には Zn フィンガー領域が必要かつ充分であることを明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、発生初期に働くと考えられる、Zic、Gli、NKL 蛋白質の関わる発生現象の分子メカニズムの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。