

## 論文の内容の要旨

論文題目      Functional analysis of *Sall* family genes

### Sall ファミリー遺伝子の機能解析

氏名          佐藤 朗

Zn finger 蛋白 *Sall* は、ショウジョウバエからヒトまで種間を超えて保存された核内因子である。ショウジョウバエでは2種類 (*spalt*, *spalt-related*)、マウスやヒトでは4種類 (*SALL1*, *SALL2*, *SALL3*, *SALL4*) 報告されている。ヒトにおいて *SALL1* は、主として多指症、外耳や内耳の異常、時に腎臓や心臓の形成異常を伴う遺伝病 Townes-Brocks 症候群の原因遺伝子である。また、最近になって *SALL4* が、Okhiro 症候群と呼ばれる主として眼や腕に疾患の生じる遺伝病の原因遺伝子であることも報告されている。マウスにおいては、唯一 *Sall1* のノックアウトマウスが、現在までに共同研究者である西中村ら (医科研幹細胞シグナル分子制御) によって報告されている。このノックアウトマウスは生直後に死亡し、その原因が腎臓の形成異常であることが判明しているが、その表現型が腎臓のみに現われる点において、完全にはヒトの遺伝病とは一致していない。その理由として、一つは、ヒトでは *Sall1* の変異が常染色体優性遺伝、つまり対になっている *Sall1* 遺伝子の一方にのみ

変異が入っていて、ノックアウトマウスと違って完全に欠失した状態ではないということ、二つ目として、Sall はファミリーを構成しているため、マウスでは他の Sall 因子群が Sall1 の機能を補っていることが考えられる。そのため、Sall family の機能解析を通して発生過程における器官形成のメカニズムを解明することを目的として、当研究は二部構成で報告する。第一部は、Sall2 ノックアウトマウスの作製とその表現型の解析であり、第二部は、分子生物学的手法による Sall1 蛋白の機能解析である。

### 【第一部】 Sall2 ノックアウトマウスの作製とその解析

Sall family の各因子の構造は、Sall1、Sall3 が10個の Zn finger から成り、Sall2、Sall4 は8個の Zn finger から構成されている。まず、発生過程の個体において、Sall2 がどのような発現パターンを示すのかを確認するため、PCRより単離した Sall2 cDNA を鋳型に RNA probe を合成して、マウスの胎生 11.5 日と 13.5 日胚の切片を用いて *in situ* hybridization を行った。その結果、Sall2 の発現は 11.5 日胚において、脊索の subventricular 領域と後腎間葉に、13.5 日胚でも後腎間葉、また脳室の subventricular 領域においても発現していることが判明した。その結果、Sall2 の発現パターンは、Sall1 のそれとかなりの割合で重複していることが判明した。

次に Sall2 ノックアウトマウスを作製する目的で、STRATAGENE 社の 129-Svj マウス由来の Lambda Genome Library より Sall2 genomic DNA を単離した。Sall2 は、2つの exon と intron から構成されており、8つの Zn finger は全て exon2 に含まれている。そのため、N 末端側の 5つの Zn finger 領域を欠失させ、且つネオマイシン耐性遺伝子を組み込んだターゲティングベクターを作製した。このベクターを E14.1 embryonic stem cell (ES cell) に導入し、ネオマイシン存在下で培養することによって、Sall2 遺伝子座で相同組み換えを生じた ES clone を選別した。そして、独立に単離したこれらの ES cell clone をマウス胞胚に導入することによって、Sall2 キメラマウスを作製した。その結果、相同組み換え細胞由来の生殖器官を持つキメラマウスが独立に2個体作製できた。これらマウスの子孫をかけ合わせることによって、最終的に Sall2 ノックアウトマウスを作製した。産まれてきた Sall2 ヘテロマウス、ノックアウトマウスは、生直後も生存しており、外見上の異常は認められなかった。また、

発生過程における腎臓、心臓、耳などを組織学的に観察してみたが、どれも異常は認められなかった。そのため、さらなる表現型が現われることを期待して、*Sall1/Sall2* のダブルノックアウトマウスを作製した。このダブルノックアウトマウスは生直後に死んで産まれてくるが、外見上とも組織学的にも *Sall1* ノックアウトマウスと同様の異常しか認められなかった。以上の結果から、*Sall2* は発生過程において必要不可欠な因子ではないことが判明した。

## 【第二部】腎臓形成に必須な因子 *Sall1* の機能解析

ショウジョウバエの発生過程では、*Sall* (*spalt*, *spalt-related*) が頭尾部体節、翅や気管、神経の形成に重要であることが報告されている。また、その発現は様々なシグナル伝達系によって制御されている。例えば、翅原基においては *spalt* の発現は *Dpp* (脊椎動物における TGF- $\beta$  super family 因子群の一つ *BMP-4* のホモログ) によって制御されており、気管原基では、*wingless* (*Wnt* ホモログ) によって制御されている。しかし、*Sall* 分子そのものの生物学的機能は、ショウジョウバエにおいても依然として不明な点が多い。マウスにおいては4種類ある *Sall* family のうち、現在までに唯一 *Sall1* が発生過程(腎臓形成)において必須であることが判明している。そのため、*Sall1* を通して *Sall* family 因子群の機能解析を行うことにした。

解析するにあたって、*Sall* が Zn finger motif をもつ核内因子であること、またショウジョウバエの知見から様々なシグナル伝達系によって、その発現が制御されていることを考慮して、私は *Sall* がシグナル伝達系において核内で機能するネガティブもしくはポジティブフィードバック因子であると仮定した。そのため、TGF- $\beta$ 、BMP、STAT(LIF)、レチノイン酸、Wnt シグナル伝達系における個々のルシフェラーゼ・レポーターに *Sall1* を一過性に導入することによって、*Sall1* の発現が特異的に影響をおよぼすシグナル伝達系を選別した。その結果、Wnt シグナル伝達系が、*Sall1* によって相乗的に活性化されることを見出した。つまり、内在性に *Sall1* を発現していない NIH3T3 細胞に、一過性に Wnt 応答性レポーター(TOP flash)と *Sall1* 発現ベクターを導入した後、Wnt3a で刺激することによって、*Sall1* が存在する場合にのみ Wnt 刺激によるレポーター活性が有為に上昇することが判明したのである。また、内在性に *Sall1* を発現している HEK293 細胞でも同様の結果が得られた。

次に、Sall1 が転写活性化因子であると仮定して、Wnt シグナル伝達系の核内因子  $\beta$ -catenin とで再度レポーター活性を検討した。その結果、Wnt 刺激そのものではなく、 $\beta$ -catenin と Sall1 存在下でレポーターの活性化が観察された。そのため、Sall1 と  $\beta$ -catenin との間の相互作用の有無を免疫沈降法によって検討した。その結果、確かに両者の間に相互作用が認められ、特に Sall1 欠失変異体を用いた免疫沈降の結果から、Sall1 の C 端側半分の領域が強く相互作用することが判明した。しかし、同様の変異体を用いたレポーターアッセイでは、Sall1 の N 端側半分の領域、つまり  $\beta$ -catenin との相互作用が無い領域でも依然として転写活性化能をもつことから、Sall1 が従来の転写活性化因子とは作用機序の異なる転写因子である可能性が出てきた。

最近になって、Sall1 が核内の転写が行われない領域に局在する転写抑制因子であるという知見が2つのグループによって報告された。つまり、Sall1 は、ペリセントロメリック・ヘテロクロマチンと呼ばれる斑点状に存在する核内領域に局在し、他の転写抑制因子群と複合体を構成することによって、転写の抑制化に関わるという知見であった。私が観察しているのは逆の現象であるため、Sall1 の転写活性化能と核内の局在に相関があるのかどうかを、Sall1-GFP 融合タンパクを用いて観察した。様々な欠失変異体 Sall1-GFP 融合タンパクを用いた解析から、確かに Sall1 が斑点状（ペリセントロメリック・ヘテロクロマチン領域）に局在する場合にのみ、Wnt 応答性レポーターの活性化が観察できた。

以上の結果から、Sall1 が Wnt シグナル伝達系の活性化因子として機能し得ることと結論づけた。