

## 論文審査の結果の要旨

佐藤 朗

佐藤朗氏は「Sall ファミリー遺伝子の機能解析」を行って優れた結果を得ている。

佐藤氏は、Sall ファミリー遺伝子の機能を解析することを目的として、1) Sall2 遺伝子の欠失マウスの作製とその表現型の解析 2) Sall1 タンパク質の分子生物学的手法を用いた機能解析という2つの面からのアプローチを試みて、つぎのような事実を明らかにした。

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、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 領域において発現していることが判明した。すなわち、Sall2 の発現パターンは、Sall1 のそれと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、129Svj 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2個体独立に作製できた。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。以上の結果は、Sall2 遺伝子が発生過程において必要不可欠な因子ではないことを表している。

二番目は、Sall1 タンパク質の分子生物学的手法を用いた機能解析を行った。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、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 シグナル応答性のレポーターが、Sall1 の過剰発現によって、さらに活性化されることを見出した。

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、 $\beta$ -catenin を単独に発現させた場合と比較して、Sall1 と  $\beta$ -catenin との共発現においてもレポーターの活性化が有為に上昇した。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 が核内で斑点状に見える転写が抑制されている領域（ペリセントロメリック・ヘテロクロマチン領域）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が報告された。そのため、Sall1 の転写活性化能と核内における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 応答性のレポーターが活性化されることが観察できた。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を見出した。

このように佐藤氏は、Sall ファミリー遺伝子の機能解析を、遺伝子欠失マウスの解析と分子生物学的手法を用いたタンパク質レベルでの解析という2つの面からのアプローチし、数々の新しい知見を得ており、この分野への大きな事実を明らかにした。

したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するに相応しいものと認定する。