

## 論文内容の要旨

論文題目 Characterization of zinc finger protein Sall4 in mouse early embryogenesis

(ジンクフィンガータンパク質 Sall4 のマウス初期胚発生における機能解析)

氏名 湯本(榊) 真代

ジンク(Zn)フィンガータンパク質 Sall はショウジョウバエからヒトまで保存され、哺乳類で 4 種類(Sall1-4)が知られている。ノックアウトマウスの表現型より Sall1 は腎形成、Sall3 は神経系と口蓋周辺の形成に不可欠であること、また Sall2 欠失による表現型は正常であることが示されている。またヒトの SALL1 変異 (Townes-Brocks 症候群) では、上下肢の軸前性 (母指, 母趾側) 異常、直腸・肛門部、外耳の形成異常や難聴に加え、稀に心臓、腎臓の形成異常が報告されている。一方 SALL4 変異 (Okihiro 症候群) でも、上肢・親指の形成不全と眼球運動を司る神経の異常に加え、まれに直腸・肛門部や腎臓・心臓の形成異常、難聴が報告されている。ヒト SALL2、SALL3 の変異による疾患は報告されていないが、SALL3 の存在する染色体 18q23 領域周辺の欠損により起こる、18q deletion 症候群では、難聴、精神発達遅滞、成長ホルモン欠損による低身長、心臓・足・指の形成異常、自己免疫疾患など様々な症状が報告されている。これらのことから、この遺伝子ファミリーが様々な器官の形成に重要であることが示されているものの、その意義や作用機構は未だ不明である。そこで私は、Sall4 の機能解明と疾患モデルマウスの作製を目的として Sall4 ノックアウトマウスの作製・解析を行った。

Sall4 は 4 番目の新規 Sall 遺伝子として、精巢に高発現する 2 番染色体 (ヒト 20 番染色体) 上の遺伝子として 2000 年に登録された (Celera 社)。私はデータベースの情報を元に lambda genomic library のスクリーニングを行い、全ゲノム領域をクローニングした。約 20 kb にわ

たる配列には Sall1-3 に保存される遺伝子構造が存在し、8つの C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>型 Zn フィンガーが4つの exon に分かれてコードされていた (図 1)。このゲノム DNA を用いて、Zn フィンガーを全て欠失するβ-galactosidase (lacZ) knock-in 型のターゲティングベクターを作製、ES細胞に導入後、得られた recombinant ES 細胞をマウス受精卵に注入しキメラマウスを作製した。このマウスは C57BL/6J 及び 129/terSv の二系統と交配し、解析を行った。又 Sall4 cDNA は lambda cDNA library よりクローニングした。

ノックアウトマウスのヘテロ変異体では、約半数に外脳症、直腸・肛門部の形成異常 (鎖肛、直腸狭窄)、尾の湾曲が現れた。その結果ヘテロマウスの約半数が5週齢までに死亡したため、残る半数の正常なヘテロ変異体を使用してホモ変異体の解析を行った。ホモ変異体は胎生致死であり、E6.5 で既に胎児は吸収され、E5.5 でも形態的異常を来していた。そこで E5.5 胎児の凍結切片を作製し、胚体外胚葉マーカー(Oct4)及び胚体外外胚葉・栄養外胚葉マーカー(H19)の in situ hybridization を行った。すると Oct4 発現領域が著しく減少し、胚体外外胚葉が障害されていることが明らかとなった。次に胚盤胞の in vitro 培養を試みると、ホモ変異体では培養二日目頃より内部細胞塊の増殖が確認されず、五日目にはほぼ消失して栄養芽細胞のみが残った。immunosurgery 法により栄養外胚葉を除いて内部細胞塊のみを培養してもホモ変異体由来と思われる内部細胞塊はディッシュに付着後増殖せずに消失 (図 4) したことから、この現象は栄養外胚葉側の異常による二次的なものではなく内部細胞塊自体の異常によること、また Sall4 が内部細胞塊の生存・増殖に必須であることが示された。

次に内部細胞塊から樹立された培養細胞である ES (Embryonic Stem) 細胞で Sall4 を欠失させ、表現型の解析を行った。Sall4 の欠失は neomycin 及び hygromycin 耐性遺伝子を含むベクターを用いて二段階の薬剤選択により行い、合計 282 クローンのうち 3 クローンが Sall4 を欠失していた。出現頻度の低さからも Sall4 欠失が ES 細胞の生存に不利に働くことが予測されたが、得られたクローン全てにおいて増殖速度の遅延と形態的变化 (平たくやや分化したような形態) が確認された。そこで ES 細胞の生存・増殖に関わる遺伝子の発現量変化を northern blot 法で調べてみると、Sall4 欠失 ES 細胞では Oct4, Nanog, Eras といった未分化性維持や増殖能に必須な遺伝子の発現低下と細胞周期制御遺伝子 p16(Cyclin-dependent kinase(Cdk) inhibitor 2A)の発現上昇が確認された。この現象が Sall4 依存的であることを示すため、Sall4 発現ベクターを導入して表現型の回復を調べると、増殖速度及び形態的特徴の両面において回復し、上記の遺伝子群の発現変化も正常レベルへ戻ることが確認された。この結果を受け、網羅的に Sall4 標的遺伝子群を探索するため、Sall4 (Sall4(+))または vector(Sall4(-))を導入した Sall4 欠失 ES細胞を用いて DNA microarray 解析を行った。Sall4(-)と比較して Sall4(+)で顕著に発現量の上がっている遺伝子群には、northern blot で明らかとなった Oct4, Nanog, Eras が含まれていた。また、Sall4(-)で発現量の上がっている遺伝子群には Cdk inhibitor 1C (p57), H19, IGF(insulin-like growth factor)2, Mash2 が存在した。これらの遺伝子は全て 7 番染色体上にコードされるインプリンティング遺伝子であり、そのインプリンティングが損なわれた結果、胎児組織の正常な分化が起こらず胎生致死となることが知られている。よって Sall4 ホモ変異体の表現型の一端はこれらの

遺伝子の発現制御不能が原因で引き起こされている可能性が示唆された。この結果は、着床前後の胎児成分で発現が抑制される遺伝子群を、ヘテロクロマチン局在タンパク質としての Sall が何らかの機構で制御している可能性を示す初めての報告である。

また、Sall4 ヘテロ変異体では、ヒト疾患 (Okihiro 症候群) の症状の一つである直腸・肛門部の形成異常が確認されたが、代表的な症状である上肢・指の異常は確認されなかった。よって Okihiro 症候群の症状のうち直腸・肛門部の異常は Sall4 の haploinsufficiency により説明されるが、他の異常は別の機構による可能性が残された。そこで、四種の Sall ファミリー遺伝子のうち二種が半減もしくは欠失した場合の影響を、Sall1,2,3,4 のすべての組み合わせの二重ヘテロ変異体を用いて解析した。驚いたことに Sall4/Sall1 二重ヘテロ変異体を除く二重ヘテロ変異体は正常に生まれたが、この変異体のみ出生時まで全例死亡し、Sall4 ヘテロ変異体より高頻度に外脳症、直腸・肛門部の異常を呈した。又それぞれ単独のヘテロ変異体ではほとんど現れない腎臓欠損も高頻度に出現し、Sall4 と Sall1 の *in vivo* での相互作用が示唆された。途中で終止コドンが入った短い Sall1 を発現する Townes-Brocks 症候群モデルマウスでは、Sall1 の null 変異体よりも重い表現型 (指、手根骨、腎臓、直腸・肛門部の形成異常や外脳症、難聴) が報告されていることや、*in vitro* での Sall1 と Sall4 の結合 (免疫沈降法) および Sall1 変異タンパク質強発現による Sall4 のヘテロクロマチン局在の乱れ (NIH3T3 細胞) 等のデータ (私信) と合わせると、Townes-Brocks 症候群の症状の一部 (直腸・肛門部の異常など) は、Sall1 遺伝子の haploinsufficiency ではなく、変異 Sall1 タンパク質が引き起こす Sall4 の機能阻害によって起きている可能性が示唆された。また上肢や指など他の部位においては、他の Sall タンパク質の機能阻害がその症状の原因である可能性が残された。

以上より、本研究では Sall4 がマウス初期発生において必須な遺伝子であると同時に、発生後期には神経管閉鎖や直腸・肛門部の形成に関わることを示した。前者においては、その遺伝子機能として、ヘテロクロマチンにおける遺伝子発現制御、特に、原腸陥入期前後に胎児組織で抑制されるべき遺伝子群の厳密な制御を担うことを示し、Sall 遺伝子がエピジェネティクス調節因子として特定の遺伝子領域をクラスターごとに制御する可能性を初めて報告した。また後者においては、SALL1 変異で起こるとされる Townes-Brocks 症候群の病態の一端が SALL4 の機能阻害に起因する可能性を *in vivo* データとして初めて示した。ヒト疾患の多様な症状の発症機構解明の一助となることを期待したい。