

# 論文審査の結果の要旨

氏名 湯本(榊) 真代

本論文は二章からなり、第一章ではジーンターゲティング法による *Sall4* ノックアウトマウスを作製とその解析結果が、第二章ではES細胞を用いた *Sall4*の機能解析とその標的遺伝子の網羅的探索結果が述べられている。

*Sall* はショウジョウバエの *Sal* (*Spalt*) 遺伝子のマウスホモログであり、これまでに4種 (*Sall1-4*) が報告されている。ノックアウトマウスの解析から *Sall1* は腎形成に、*Sall3* は口蓋や神経の形成に必須であること、また *Sall2* 欠失では表現型に異常のないことが報告されていたが、その作用機構は不明であった。一方、ヒト *SALL1* 変異により引き起こされる Townes-Brocks 症候群では、腎臓のみならず、心臓、外耳、肛門、泌尿生殖器の形成異常や聴覚異常などの広範な症状が現れ、ノックアウトマウスの表現型との差異から、変異 *SALL1* 蛋白質が他の *SALL* 蛋白質の機能を阻害する可能性が示されている。本研究は、新規遺伝子である *Sall4* の機能解析と *Sall* ファミリー遺伝子の機能的重複性や相互作用について調べることを目的とし、*in vivo* と *in vitro* の実験を組み合わせで解析を行っている。

第一章では、*Sall4* ノックアウトマウスを作製し、*Sall4* がマウス初期発生、特に、着床前後の時期の胚体外胚葉の増殖・維持に必須であるという、*Sall* ファミリー遺伝子としては、新規かつ予想外の機能を明らかにした。この結果は、第二章の胚性幹 (ES) 細胞を用いた実験で更に詳細に解析されている。また、ヘテロ変異体の一部に見られた外脳症、直腸・肛門部の形成異常、尾の湾曲については、症状の現れる時期の *Sall4* 発現を調べるとともに、次に4種の *Sall* 遺伝子全ての組み合わせの二重ヘテロ変異体の解析を行い、これらの器官では特に *Sall1* と *Sall4* が協調的に機能する可能性を示す結果を得た。また、免疫沈降実験も両者の相互作用を示した。従って、ヒト疾患は、これらの部位における *Sall1/4* ヘテロダイマーの異常による可能性が考えられる。*Sall4* は初期発生のみならず器官形成に重要な機能を果たすという本章の結果は、発生過程に共通な *Sall* 遺伝子の作用機構を提案しうる可能性を秘めている点で非常に意義深い。

第二章ではES細胞における *Sall4* 欠失の表現型の解析を試みている。マウスの解析結果から予測される通り *Sall4* ホモ欠失変異はES細胞の増殖に不利に働き、*Sall4* 欠失ES細胞株の樹立は非常に困難であったが、様々なターゲティングベクターを用いて3クローンを得ている。これらの *Sall4* 欠失ES細胞は、野生型ES細胞に比べ、倍加時間が二倍程度に伸び非常に扁平な形態のコロニーを形成した。また、発現が変動する遺伝子の網羅的探索を目的としたマイクロアレイ解析から *Sall4* 欠失ES細胞で発現の低下している遺伝子群として、ES細胞の性質維持に必須の遺伝子 (*Oct4*, *Nanog*, *Eras* 等) が、亢進している遺伝子群として、本来胎児成分では発現抑制さ

れている遺伝子 (*H19*, *IGF2*, *p57kip2*, *Ascl2*等)が同定された。これらの *Sall4* 欠失細胞の表現型は *Sall4* 発現ベクターの導入により回復することから、*Sall4* 欠失は本来発現制御している遺伝子群の無秩序な発現を引き起こし、結果として ES 細胞の増殖遅延につながることを示唆された。また、マウス胚の発生においても同様な現象から致死に至る可能性は高く、ES 細胞での実験結果から *Sall4* ホモ変異体の表現型の一端が説明できる点は高く評価されるものである。

以上より、本研究ではショウジョウバエから哺乳類まで保存された *Sall* ファミリー遺伝子の一つである *Sall4* がマウス初期発生において必須であるとともに、発生後期には器官形成に関わることを初めて示した。さらに、この個体レベルでの *Sall4* 欠失の表現型を ES 細胞の利用によって更に詳細に解析し、標的遺伝子群の網羅的解析も行った。この結果は、ヘテロクロマチン局在タンパク質としての *Sall4* が転写抑制因子として機能することを強く示唆し、これまで未知であった他の哺乳類 *Sall* 遺伝子群 (*Sall1-3*) の機能を予測し解析する端緒となる結果である。

なお、本論文は佐藤朗、松本祐子、高里実、片岡由起、油谷浩幸、児玉龍彦、吉田進昭、西中村隆一との共同研究であるが、論文提出者が主体となって実験、解析を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士(理学)の学位を授与できると認める。