

論文内容の要旨

論文題目

Molecular analysis of early neural genes, *XSIPI* and *Sox1*, in *Xenopus* development

(ツメガエルの初期発生における初期神経遺伝子 *XSIPI* 及び *Sox1* の分子生物学的解析)

理学系研究科生物科学専攻

氏名:新田和広

指導教官:浅島誠

序論

脊椎動物の体細胞は外胚葉、中胚葉、内胚葉の三つの胚葉のいずれかに由来する。両生類では、外胚葉の細胞は表皮細胞へと自立分化するが中胚葉の原口上唇部(オーガナイザー)からのシグナルにより神経組織へと分化誘導される。両生類の一種アフリカツメガエルの外胚葉では骨形成因子 (Bone morphogenetic protein; BMP) のシグナルが細胞に伝えられており、このシグナルを阻害することで神経への分化誘導が始まる事が知られる。この BMP シグナルを阻害する分子は Chordin, Noggin, Follistatin 等の分泌因子であり、これらは BMP に直接結合し、その受容体との会合を阻害する。BMP シグナルの入らなかった外胚葉細胞では初期神経遺伝子が発現し神経分化を引き起こすと考えられている。しかしその過程には不明な点が多く、現在報告されている遺伝子の相互関係もその多くが明らかになっていない。私は第1章で、今まで未解明であった初期神経遺伝子のうちの1つである *XSIPI* の機能解析を行った。第2章ではツメガエルで報告の無かった *Sox1* を単離し、その発現パターンの解析を通して神経誘導との関係を考察した。

第1章 *XSIPI* の機能解析

XSIPI (*Xenopus* Smad-interacting protein-1)は δ EF1/ZFH ファミリーに属する転写抑制因子

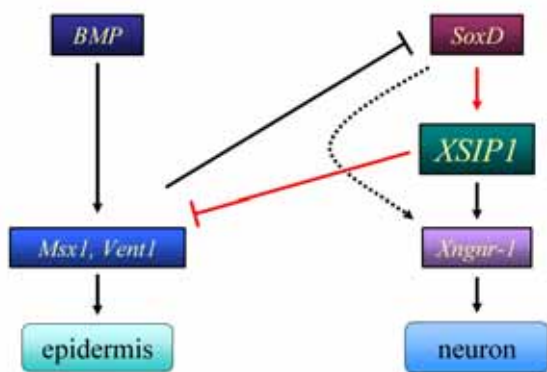
であり、原腸胚期から予定神経領域に発現が始まり、過剰発現すると神経を過形成することが表現型及び分子マーカーによって示された。また *XSIP1* が BMP のシグナル伝達物質である *XSmad1* に結合することや中胚葉遺伝子である *Xbrachyury* プロモーターの上流に結合して転写抑制することが知られている。しかし *XSIP1* の神経形成機構に対する役割については不明な点が多い。

私はまず *XSIP1* が欠損した時に胚がどのような影響を受けるのかを検討するため、*XSIP1* に対するアンチセンスモルフォリノオリゴ (*XSIP1* MO) を作製した。MO は標的 mRNA に相補的に結合し翻訳を阻害する。*XSIP1* MO を顕微注入されたツメガエル胚は神経が正常に形成されないことが外形及び組織切片から示された。次にこの胚は神経細胞が形成されていないのか、あるいは神経細胞は誘導されているがパターン形成に異常が起きているのかを検討するために神経全体の分子マーカーである *N-CAM* とニューロンの分化マーカーである *N-tubulin* の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法で確認したところ、*XSIP1* 欠損領域でこれらの神経分化マーカーの発現が消失していることが確認された。このことから、*XSIP1* は過剰発現することによって神経組織を過剰に誘導するだけでなく、神経組織を誘導するために必須の分子であることが示された。*XSIP1* は初期原腸胚期から発現する遺伝子である。この時期は神経誘導が始まる頃と考えられており、*XSIP1* は神経誘導の初期から関与すると考えられる。そこで *XSIP1* が神経誘導の初期過程において必須なのかを調べるため、既に知られている初期の神経遺伝子をマーカーとして用いて神経誘導に対する *XSIP1* 欠損の影響を調べた。その結果、初期神経遺伝子である *SoxD*、*Zic3* の発現が *XSIP1* 欠損領域において消失していることが示された。この結果は *XSIP1* がこれらの遺伝子の発現を誘導・維持している可能性を示している。次に、*XSIP1* の過剰発現がどのような遺伝子発現の変化を経て神経誘導を引き起こすのかを調べるために、*XSIP1* を過剰発現したアニマルキャップを経時的にサンプリングし、遺伝子発現を RT-PCR 法により調査した。その結果、*XSIP1* の過剰発現は BMP シグナルの下流遺伝子である *Msx1*、*Vent1*、*Vent2* といった遺伝子の発現を抑制し、初期神経遺伝子と呼ばれる *Sox2*、*SoxD*、*Zic3* の発現を維持した。このことから、*XSIP1* の過剰発現によるアニマルキャップの神経誘導は BMP シグナルを阻害し、初期神経遺伝子の発現を維持させることにより達成されていると考えられる。

XSIP1 はアニマルキャップにおいてアクチビンによって誘導される事が分かっているが、実際に生体内ではどのようにしてその転写が制御されているのであろうか。神経誘導遺伝子である *Chordin* または初期神経遺伝子である *SoxD*、*Zic3* をアニマルキャップに過剰発現させると、同調胚が初期原腸胚期達するまでには *XSIP1* の誘導が起きることが明らかになった。その中で私は *SoxD* に注目した。なぜなら、*SoxD* は原腸胚期における発現領域は *XSIP1* と比べると遙かに広範だが、発生が進むに従って *XSIP1* の発現パターンに重なるようになってくる。このことから *Chordin* や *Zic3* よりも両者には深い関係があるのではないかと考えられた。そこで *SoxD* に対する MO を作製し、*SoxD* 欠損時の *XSIP1* の発現への影響を調べた。その結果、*SoxD* が欠損した領域で *XSIP1* の発現が低下することが分かった。次に *SoxD* による神経誘導に

XSIP1 が必須の因子であるかを確認するため、*SoxD* を過剰発現させた部位に同時に *XSIP1* MO を導入した。その結果、*SoxD* 単独では起こる神経誘導が *XSIP1* の欠損によって阻害されることが示された。このことから *XSIP1* は *SoxD* の神経誘導に必須の因子であることが分かった。

これらの結果から次のように考えることができる。*XSIP1* は原腸胚期に背側の予定神経領域に発現して BMP のシグナル伝達を阻害する。*SoxD* は始め広範に存在するが、発生が進むにつれて *XSIP1* による BMP シグナル抑制下以外での発現が減少し、神経領域で発現が限局するようになる。実際、BMP の下流遺伝子である *Msx1* は *SoxD* の発現を抑制することが知られており、*XSIP1* が *Msx1* の転写を抑制することは *SoxD* の転写抑制の回避につながる可以考虑ができる。これらのことから *XSIP1* は BMP シグナルを阻害することにより、*SoxD* などの初期神経遺伝子の発現を維持し、*SoxD* は *XSIP1* を発現誘導して BMP シグナルを遮断していると考えられる(図 1)。



(図 1)本研究から予想される初期神経誘導モデル図。

腹側外胚葉では BMP のシグナルにより、BMP 応答遺伝子が誘導され、表皮が誘導される。一方背側外胚葉では *SoxD* 等によって *XSIP1* が誘導される。*XSIP1* は BMP の応答遺伝子の発現を抑えることによって *SoxD* 等の抑制を防ぐことにより、神経運命へと外胚葉を誘導する役割を果たす。黒実線は既に報告されている経路。赤実線は今回報告した経路。破線は存在が予想される経路を示す。

第2章 *Sox1* の発現解析

ニワトリやマウスにおいて、*Sox* ファミリーは神経誘導に深く関わるということが知られている。*Sox* ファミリーは HMG-box をコードする転写因子であり、生物界においてショウジョウバエからヒトまで広く保存されている。その中で神経誘導に関与する *Sox1*, *Sox2*, *Sox3* は B1 サブグループと総称される。その中で、*Sox1* の報告は未だなされていなかった。私は、初期の神経誘導のメカニズムを考察する上で *Sox* B1 グループの働きを確認する必要があると考えた。そこで本研究ではツメガエル *Sox1* を単離し、初期の神経誘導に関与するかという観点から発現パターンの解析を行った。

クローニングの結果から得られたツメガエル *Sox1* はアミノ酸レベルでイモリの *Sox1* と 71%、ニワトリと 69%、マウスと 68%、ヒトと 69% の相同性を示した。次に時間的な発現を RT-PCR 法により解析した結果、*Sox1* の発現は原腸胚期から始まり、その後の発生を通して少なくとも幼生期までは発現があることを確認した。次に空間的な発現パターンを *in situ* ハイブリダイゼーション

法により解析した。その結果、原腸胚期では発現が確認できなかったが(検出感度以下の発現量であると考えられる)、初期神経胚において前方神経板での発現が認められ、神経胚後期以降では脳構造及び眼の領域で発現が確認された。より詳細な発現パターンの解析を行うため尾芽胚期及び幼生期の胚を頭部領域で切断した上で *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、*Sox1* は尾芽胚期では前脳領域及び眼胞で発現が確認され、幼生期では前脳領域において強い発現が認められた。一方眼の領域での発現は減少していた。他の *Sox* も前脳領域での発現が確認された。眼での発現にはそれぞれ違いが見られ、*Sox2* は幼生期においてもレンズ及び神経網膜層での発現が確認された。一方、*Sox3* は神経胚後期では発現が確認できず、発生が進むにつれて眼の表面で発現が開始し、幼生期においてはレンズで強い発現が起きることが明らかになった。次に、*Sox1* が他の初期神経遺伝子と同様に BMP シグナルの阻害によって発現が誘導されるかを調べるため、BMP 阻害因子である *Chordin* をアニマルキャップに発現させて培養し、Semi-quantitative RT-PCR 法及び QPCR 法によって *Sox* の発現を確認した。その結果、*Sox1* も他の初期神経遺伝子と同様 BMP シグナルの阻害により発現が上昇することが確認された。これは *XSIP1* をアニマルキャップに過剰発現させても同様の結果が得られた。これらの結果から、*Sox1* は原腸胚期の発現レベルは低く、主に発生の後期で機能していることが予想された。

私は本研究において、今まで中期胞胚遷移以降に発現すると考えられていた *SoxD* が未受精卵から存在すること、かつ初期神経遺伝子である *XSIP1* を誘導することを報告した。*SoxD* 及び今回は調べていない *Sox3* は神経誘導が起きる以前から発現している。神経誘導には BMP シグナルが抑制されることが必要だと考えられてきた。この BMP シグナルの抑制下では、何らかの因子が神経分化を促進していると考えられる。これらの遺伝子はその BMP シグナルの抑制下での最初の神経遺伝子誘導に関わっている可能性を示唆していると考えられた。