

## 論文審査の結果の要旨

氏名 新田和広

本論文は2章からなる。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について述べられている。

まず、第1章では *XSIPI* (*Xenopus* Smad-interacting protein-1)の機能解析であるが、これは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明らかにした。

次に、*XSIPI* 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、*XSIPI* に対するアンチセンスモルフォリノオリゴ (*XSIPI* 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。*XSIPI* 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。これを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、*XSIPI* 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、*XSIPI* 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。更により詳しく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 *XSIPI* 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 *XSIPI* 欠損領域において消失していることが示された。この他に、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 *XSIPI* の誘導が起きることを明らかにした。その中で新田氏は *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 *XSIPI* と比べると遙かに広範だが、発生が進むに従って *XSIPI* の発現パターンに重なるようになってくる。これらをもとに、*SoxD* による神経誘導に *XSIPI* 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 *XSIPI* MO を導入した。その結果、*SoxD* 単独では起こる神経誘導が *XSIPI* の欠損によって阻害されることを示した。このことから *XSIPI* は *SoxD* の神経誘導に必須の因子であることが分かった。

新田氏は第2章では *Sox1* の発現解析を行っている。*Sox* ファミリーは神経誘導に深く関わる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。そこで新田氏は、ツメガエルにおいて初めて、*Sox1* のクローニングを行った。

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。更に詳細に検討して、*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。*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、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。

このようにして新田氏、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* を誘導することを初めて明らかにした。

なお、本論文の第 1 章は、種子島幸祐、高橋秀治、浅島誠、第 2 章においては、高橋秀治、浅島誠との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が充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。