

氏 名	岸 将 史
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2191 号
学位授与の日付	平 成 12 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 生 理 系 専 攻
学位論文題目	Requirement of Sox 2-mediated Signaling for Differentiation of Early <i>Xenopus</i> Neuroectoderm (アフリカツメガエル初期神経外胚葉の分化における Sox 2 の必要性)
論文調査委員	(主 査) 教 授 影 山 龍 一 郎 教 授 西 川 伸 一 教 授 塩 田 浩 平

論 文 内 容 の 要 旨

シュペーマン・オーガナイザー由来の神経誘導因子である Chordin は未分化外胚葉から神経組織を誘導する。Chordin によって未分化外胚葉に発現が引き起こされる 2 つの神経特異的転写因子 SoxD 及び Sox 2 のうち、前者については前脳の形成に必須な因子であることが示されていたが、後者の神経分化における機能は明らかでなかった。今回、Sox 2 が胚発生過程で果たす役割を明らかにするため、ドミナントネガティブ Sox 2 (dnSox 2) を作製し、アフリカツメガエル胚における RNA 微量注入法によってその機能を検討した。

まず、Sox 2 について 2 つの変異体、(1) DNA 結合領域を欠失させた Sox 2 BD (-), 及び (2) Sox 2 DNA 結合領域とショウジョウバエ Engrailed 遺伝子の転写抑制領域を融合させた Sox 2-EnR, を作製し、両者が野生型 Sox 2 とそのサブファミリーのみを特異的に抑制する dnSox 2 であることを示した。

次に、in vitro で外胚葉が神経に分化する際の、Sox 2 の必要性を未分化外胚葉外植体 (アニマルキャップ) を用いて検討した。内因性 BMP 活性の遮断によって引き起こされる神経分化は dnSox 2 の共発現によって強く抑制された。このことから Sox 2 の機能は未分化外胚葉の神経分化に必須であることが明らかとなった。

発生中の胚における役割についても解析を行った。dnSox 2 の強制発現は神経胚においてあらゆる神経マーカー (汎神経: N-CAM, 前脳: Otx・Xanf, 中脳-後脳境界: En 2, 後脳: Krox 20, 脊髄: HoxB 9, ニューロン: Xngnr-1・N-tubulin, 神経堤: Slug・Forkhead 6) の発現を抑制した。このことは Sox 2 が広く神経組織の分化に必須な因子であることを示しており、前脳の形成にのみ必要である SoxD とは異なる役割を果たしていると結論した。

更に、発生段階に応じた Sox 2 の必要性を検討した。神経外胚葉を形成しつつある原腸胚の時期に dnSox 2 の影響を調べたところ、Zic 2 等の初期神経マーカーは、発現開始時には正常であったが、その後徐々に抑制された。また、神経外胚葉が既に形成された中期原腸胚以降に dnSox 2 を作用させた場合でも、N-CAM の発現は強く抑制された。これらのことから Sox 2 は神経組織の分化開始ではなく分化維持に必要な因子であると考えられた。

最後に、Sox 2 の機能障害により分化抑制された予定神経組織の運命を解析した。dnSox 2 を強制発現させた神経上皮領域には N-CAM も、表皮マーカー Keratin も共に発現しなかった。また、その領域の細胞形態を GFP の共発現により観察すると、神経組織の特徴である円柱上皮でも表皮組織の特徴である重層扁平上皮でもなかった。これらのことは、Sox 2 の機能障害により神経分化を抑制された予定神経組織が、代償的に表皮分化の運命をとることもない、ということを示している。

以上の結果より、Sox 2 の機能について (1) 外胚葉の神経分化に不可欠であること、(2) in vivo では SoxD と異なり、全領域の神経分化に必須であること、(3) 神経分化の開始ではなく維持に必要であること、が結論され、初期神経発生に果たす役割が明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

神経誘導因子により初期から発現が引き起こされる神経特異的転写因子, Sox 2 について, ドミナントネガティブ Sox 2 (dnSox 2) を作製し, アフリカツメガエル神経初期発生における役割を検討した。

in vitro において dnSox 2 の強制発現は, BMP 活性の遮断による未分化外胚葉の神経分化を強く抑制した。このことは Sox 2 が外胚葉の神経分化に不可欠であることを示している。また, in vivo での dnSox 2 の強制発現はあらゆる神経マーカーの発現を抑制した。このことは Sox 2 が全領域の神経組織発生に必須な因子であることを示しており, 前脳形成にのみ必要である Sox D とは異なる役割を果たしていると結論された。

次に, 神経外胚葉の形成期に dnSox 2 の影響を調べたところ, 初期神経マーカーは, 発現開始時には正常であったがその後徐々に抑制された。更に, 神経外胚葉形成後に dnSox 2 を作用させても, 神経分化は強く抑制された。このことから Sox 2 は神経分化の開始ではなく維持に必要な因子であると考えられた。Sox 2 の機能を阻害された神経上皮領域は, 表皮組織にもならなかった。このことは, 神経分化を抑制された組織が代償的に表皮へ分化することもない, ということを示している。

以上の研究は, 初期神経分化機構の解明に貢献し, 発生学の進歩に寄与するところが多い。

したがって, 本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお, 本学位授与申請者は, 平成 12 年 1 月 18 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け, 合格と認められたものである。