

論文審査の結果の要旨

氏名 柴田 幹士

本論文は2章からなり、第1章は、頭部オーガナイザー遺伝子の網羅的検索と発現解析、第2章は、*crescent* 遺伝子の構造、発現、機能解析について述べられている。

両生類のオーガナイザー（背側内中胚葉）は周囲の組織から神経や筋肉を誘導しかつそのパターン形成を行う。オーガナイザーはさらに頭部オーガナイザー（脊索前板および前部内胚葉領域）と胴部オーガナイザー（脊索領域）に分けられ、それぞれ前部神経板と後部神経板を誘導する。近年の分子レベルでの研究から、オーガナイザーからの分泌性因子が神経化阻害因子を結合阻害することで神経誘導を引き起こされ、さらに頭部オーガナイザーからの分泌性因子が後方化因子を遮断することで前方神経組織を誘導すると考えられている。しかしどのような遺伝子が頭部オーガナイザーを規定し、また前方神経組織の誘導とパターン形成に関与しているかは依然明らかとなっていない。本論文は、これらの点の解明を目標としている。

第1章では、頭部オーガナイザー遺伝子の網羅的検索と発現解析を行った。後期原腸胚の前方内中胚葉（anterior endomesoderm, 以下 AEM）を切り出し AEM cDNA ライブラリーを作成した。その中から高発現の遺伝子をブランク・ハイブリダイゼーションで選別して除き、残りの約 70%のクローンについて部分的塩基配列を決定し、その結果 1039 クローンについて 5'側からの ESTs (expressed sequence tags)を作成した。クラスタリングの結果、756 個の独立クラスターに分けられ、その中で発生制御遺伝子と予想されるものは 48 クラスター、未知の遺伝子と予想されるものは 315 クラスターであった。そのうち現在まで 198 クローンに関して発現パターンを全胚 *in situ* ハイブリダイゼーション法で解析し、オーガナイザー領域に発現するアフリカツメガエルの新規遺伝子 9 個を同定した。その中で頭部オーガナイザー領域に発現する遺伝子は、P4F1、P7E4、P8F7、P17F11 の 4 遺伝子であった。

P4F1 はニワトリ *crescent* と、P7E4 はヒト EST クローン KIAA0952 と、P17F11 はシロイヌナズナの未知の遺伝子と相同性があった。P8F7 はどの遺伝子とも相同性はなかった。これら遺伝子の発現パターンを更に詳細に検討した結果、オーガナイザー領域の中において P4F1/*crescent* は前部内中胚葉に、P7E4 は脊索前板にリング状に、P8F7 は前方内胚葉に、P17F11 は AEM 領域に広く発現していた。このように頭部オーガナイザー領域がこれらの遺伝子の発現によりさらに幾つかの領域に分けられることが示された。

第2章では *crescent* 遺伝子の構造、発現、機能解析につて述べている。P4F1/*crescent* (以下

crest) は初期原腸胚のオーガナイザー領域に特異的に発現を開始し、発生の進行に従い頭部オーガナイザー領域に局限した。尾芽胚期ではこの発現が減少し、一方で前腎での特異的発現が認められた。*crest* の初期オーガナイザー領域での発現制御をアニマルキャップを用いて検討したところ、転写活性化因子 *Siamois*、*Xlim-1* と *Xlim-1* の活性化補助因子 *Ldb1* により協調的に発現が活性化されることを見出した。しかし中胚葉化因子アクチビンでは発現上昇は認められなかったことより、*crest* は、背側化因子 *Siamois* とアクチビン/*Nodal* の下流遺伝子 *Xlim-1* の両方のシグナルによって活性化されることが示唆された。

Crescent は *frizzled* 様ドメインをもつ分泌性因子であることから *Wnt* の阻害因子として頭部誘導に関与することが予想された。mRNA 微量注入法により *Crescent* を前方神経外胚葉領域に異所発現させたところ、眼とセメント腺の肥大が認められた。また腹側中胚葉領域に *BMP* 阻害因子である *Noggin* と共発現させると眼とセメント腺をもつ2次軸形成が認められた。さらに腹側中胚葉領域に *Xwnt-8* と共発現させると、*Xwnt-8* の2次軸形成能が阻害された。これらの実験結果は *Crescent* が後方化因子 *Xwnt-8* に結合して阻害することを示唆している。この作用に加えて、*Crescent* が体軸の伸長を阻害することを見出した。このような活性は他の *Wnt* 阻害因子である *Dkk-1* では見られなかったものであることより、*Crescent* は *Dkk-1* とは異なる特異性で *Wnt* を阻害することが考えられた。最近、後方中胚葉と外胚葉の収斂伸長運動にある種の *Wnt* が関与することが示唆されており、*Crescent* がこれらの *Wnt* の活性を阻害する可能性が考えられた。

本研究は、AEM 特異的 ESTs と発現パターン解析により、効率良く頭部オーガナイザー特異的遺伝子が単離できることを示した。機能解析では、*Crescent* が後方化と収斂伸長運動に関与する種々の *Wnt* を阻害する可能性が示された。単離されたこれらの遺伝子が各発現領域において、頭部オーガナイザーの規定や神経誘導、パターン形成などに関して独自の役割を果たしているのではないかと考えられる。

なお、本論文第1章は平良真規との、第2章は日笠弘基、小野裕史、平良真規との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析と検証を行ったもので、論文提出者の寄与は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。