

論文審査の結果の要旨

小沼泰子

本論文は2章に分かれて構成されている。小沼氏はツメガエル胚を用いて、丸い受精卵からどのようにして形づくりや器官形成がなされるのかについての初期発生の研究を分子生物学的に行った。特に未受精卵に貯えられている母性因子と受精後に活性化される遺伝子である初期活性化遺伝子としての ノーダル関連遺伝子に注目し、その機能解析を行って新しい知見を得た。

受精後から形づくりのもととなる原腸胚形成までにおいては、背腹軸形成および三胚葉形成に関するスリー・シグナル・モデルが提唱されている。このモデルでは3つのシグナルがツメガエルの初期のパターン形成を担っているとされ、このうちの2つは内胚葉から外胚葉へ中胚葉を誘導するシグナルで、背側内胚葉（ニュークープ・センター）から発せられる背側中胚葉（オーガナイザー）を誘導するシグナルと、腹側内胚葉からの腹側中胚葉を誘導するシグナルに分けられる。残りの1つのシグナルはオーガナイザーからの背側化シグナルで、腹側中胚葉を段階的に背側化し背腹軸に沿って様々な中胚葉組織を分化させると考えられている。高橋らは β -catenin 蛋白質による背側化シグナルの直下で働く遺伝子の探索を行うため、塩化リチウム・シクロヘキシミド処理により β -catenin シグナルの初期応答遺伝子を多く含む cDNA ライブラリーを作成し、オーガナイザーの活性を模倣して腹側領域を背側化し、二次軸を誘導することができる遺伝子を探索した。その結果、2つの新規ノーダル関連遺伝子（*Xnr5* および *Xnr6*）が同定された。

第一章では小沼氏は上記のようにしてスクリーニングされたプールのうち、まだ解析されずに残っていた残り3つの活性のみられたプールについて、同様の遺伝子スクリーニングを行い活性のある遺伝子を単離した。その結果、ノーダル関連遺伝子に属すると考えられる2つの新規遺伝子、*Xnr5'* および *Xnr6'* が単離された。これらの2つの遺伝子は、それぞれ *Xnr5* と *Xnr6* に対して非常に高い相同性を持っていた。ツメガエル (*Xenopus laevis*) は偽四倍体の生物であるため、進化上でのゲノムの倍化の結果、ゲノム内に非常によく似た2つの遺伝子が存在していると考えられている。そのため、新たに単離された2つの遺伝子はそれぞれ *Xnr5* と *Xnr6* のコピー遺伝子であると結論した。小沼氏が新しくクローニングした *Xnr5'*、*Xnr6'* も2次軸誘導活性があることが確認された。

第二章では小沼氏は新しくクローニングした *Xnr5'*、*Xnr6'* も *Xnr5*、*Xnr6* と同じ活性をもつことが分かったので、より解析が進んでいる *Xnr5* と *Xnr6* を用いて更に一步進んだ研究に発展させた。小沼氏は *Xnr5* と *Xnr6* の胚内での働きを明らかにするため、*Xnr5* と *Xnr6* の機能阻害作用を持つと予想される優性ネガティブ型の *Xnr5* と *Xnr6* を作製した。変異型 *Xnr5* (*cmXnr5*)、変異型 *Xnr6* (*cmXnr6*) の合成 RNA をそれぞれ、*Xnr5*、*Xnr6* の合成 RNA と共にツメガエル胚にマイクロインジェクションしたところ胚の形態変化・遺伝子発現からこれら2つの mutant が *Xnr5*、*Xnr6* の活性を阻害し優性ネガティブ型の阻害因子として機能することを明らかにした。さらに他の TGF- β superfamily の内中胚葉誘導因子 (*activin* β B, *Vg1*, *Xnr1*, *Xnr2*, *Xnr4*, *derrière*) についても活性を阻害するかどうかを検討し、*cmXnr5* は *Xnr2*、*Xnr4*、*derrière*、*BVg1* の活性を阻害し、*activin* β B、

Xnr1 の活性は阻害しないことを示した。

更に *cmXnr5* を用いて初期胚においてアクチビン様シグナルの一部を阻害した場合の胚の変化について解析を行った。8細胞期のツメガエル胚の予定内胚葉領域に当たる植物半球4割球に *cmXnr5* の合成 RNA をマイクロインジェクションしたところ、陥入の遅延や頭部欠損、体軸の短縮が引き起こさせることに成功した。このことは、*cmXnr5* の阻害する *Xnr2*、*Xnr4*、*Xnr5*、*Xnr6*、*derrière*、*Vg1* が母性の VegT のシグナルの下流で働き、そのシグナルを伝える役割をしていることを示している。

その他に *cmXnr5* の合成 RNA をマイクロインジェクションした胚内で、内中胚葉の形成がおこる胞胚から原腸胚期までの遺伝子マーカーによる解析においては、内中胚葉のマーカー遺伝子の発現の顕著な減少や遅延がみられた。*cmXnr5* の合成 RNA をマイクロインジェクションした胚内で、個々のアクチビン様因子の発現が変化しているかを調べたところ、*Xnr1*、*Xnr2*、*Xnr4* の発現は著しく減少したが、*Xnr6*、*derrière*、*activin βB* の発現は顕著な減少を示さず、*Vg1* の mRNA 量にも変化をおこさないことも証明した。

このように *cmXnr5* の遺伝子を用いることによって、今まで未知のノーダル関連遺伝子間の相互作用を明らかにし、ノーダル関連遺伝子を中心にして、初期発生過程で最も最初におこる遺伝子調節機構を明らかにした成果は非常に大きいといえる。

したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。