

## 論文の内容の要旨

論文題目    **Molecular Analysis of Pronephrogenesis in Early *Xenopus laevis* Development**

「ツメガエルの初期発生における前腎形成の分子生物学的解析」

氏名    詹 徳 川

中胚葉誘導、形態形成と器官形成の現象は、脊椎動物の発生過程でのもっとも重要な現象である。その中で、器官形成のメカニズムの解明は形態形成に続いて、発生生物学の重要研究課題である。現在器官形成の研究モデルとして使われているのは、心臓、腎臓、すい臓と肝臓がもっとも一般的である。脊椎動物の腎臓は最初に前腎が分化し、それに続いて中腎・後腎が分化することにより形成される。前腎、中腎、後腎では腎臓を構成する腎元の数などに大きな違いがあるが、基本構造はほぼ同じである。また、その形成の過程は、最初に前腎が出現し、それに続いて中腎、後腎が分化するというほぼ同じ形成現象の繰り返しという独特の発生機構であるため、腎臓は器官形成研究の良きモデル器官として古くから利用されてきた。

腎臓の器官形成を研究するのに私はアフリカツメガエルを実験材料にし、実験を行ってきた。前腎は両生類の幼生期での排出器官であり、水分を集める前腎細管と水分を排出する前腎導管、糸球小体によって構成される。ツメガエルの前腎予定域は体節と側板中胚葉原腸胚期の後期に決定され、尾芽胚期の初期に他の組織から分離されて形態形成を進め、発生から三日目に前腎全体の管化が完成されてからはじめて排出器官として機能する。前

腎分化の初期段階の理解のためにはなかでも前腎の発生分化機構を分子レベルで調べる  
ことが重要である。今まで数多くの前腎関連遺伝子が報告されてきたが、初期前腎形成を決  
定する誘導機構はまだ解明されていない。これまで私がツメガエルの後期胞胚から切り出  
した予定外胚葉片（アニマルキャップ）を、誘導因子のアクチビンとレチノイン酸によっ  
て処理された後、ツメガエルのアニマルキャップは前腎管を形成し、さらにこの処理され  
たアニマルキャップが正常のツメガエル胚内で機能しうることを示した。しかし、現在の  
既知の前腎関連遺伝子が予定外胚葉片中に前腎構造を誘導することはまだ報告されていな  
い。そこで、私はまず現在報告されている前腎関連遺伝子の機能解析を行い、得られた結  
果は初期前腎形成機構を解明するヒントになるのではないかと考えた。マウスの腎臓形成  
研究から得られた知見から、現在知られている腎臓形成の最も早い段階に関与する遺伝子  
は LIM class homeobox 遺伝子の *lim-1* と *Pax-2* であることがわかった。ツメガエルでも、*lim-1*  
のホモログである *Xlim-1* は *Xpax-8* と同じ、ツメガエルの前腎形成においてもっとも早期に  
発現する遺伝子として知られている。以上のことから、私は *Xlim-1* を選び、*Xlim-1* が前腎  
形成における役割を解析した。

ツメガエルの *Xlim-1* が前腎領域だけでなく、オーガナイザー領域にも発現がみられ、ツ  
メガエルの体軸形成に関与していることが知られている。また、前腎誘導が確認されてい  
ないアクチビンやレチノイン酸で処理されたアニマルキャップの中も、*Xlim-1* の発現が報告  
されている。前腎形成における役割を確認するために、私はアニマルキャップ誘導アッセ  
イを使って、*Xlim-1* の発現様式と前腎形成の関連と調べた。まず、アクチビンやレチノイ  
ン酸単独で処理されたアニマルキャップの中では、報告された通りに *Xlim-1* の発現が確認さ  
れたが、その発現を長時間維持することができなく、処理から 12 時間で発現が程度に減  
少した。これに対して、前腎を誘導できるアクチビンとレチノイン酸共同処理されたアニ  
マルキャップの中に、*Xlim-1* の発現が維持されることがわかった。また、アクチビンとレチ  
ノイン酸によって時間差処理されたアニマルキャップでは、処理条件によって前腎管の形  
成率が低下するに伴い、*Xlim-1* の発現が減少することも確認された。以上のことから、持続  
的に強く発現する *Xlim-1* が前腎形成に重要であることがわかった。

次に、*Xlim-1* が前腎形成における役割を調べるために、私はマイクロインジェクション  
法を用いて、*Xlim-1* の活性型変異体とドミナントネガティブ変異体が前腎形成に対する影響  
を調べた。私は *Xlim-1* の活性型変異体とドミナントネガティブ変異体の mRNA を合成し、  
初期ツメガエル胚に注入し、アニマルキャップ誘導アッセイとツメガエル胚の前腎形成率  
を調べた。その結果、ツメガエルのアニマルキャップに活性型の *Xlim-1* を注入しても、前  
腎を誘導できなかった。また、活性型の *Xlim-1* が注入されたツメガエルのアニマルキャ  
ップをアクチビンやレチノイン酸で処理しても、前腎形成を確認できなかった。しかし、ド

ミナントネガティブ型の *Xlim-1* を注入されたアニマルキャップをアクチビンとレチノイン酸で処理すると、予定外胚葉片中の前腎の形成率が低下した。ドミナントネガティブ型の *Xlim-1* をツメガエルの予定前腎領域に注入すると、ツメガエル胚の前腎形成が阻害され、前腎構造中の前腎細管の形成が強く押さえられることを確認した。以上の結果から、

*Xlim-1* は前腎形成を決定するものではなく、前腎細管の形成に重要であることが明らかになった。しかし、前腎形成過程での早期マーカー遺伝子である *Xlim-1* が前腎管形成を誘導できないという結果から、*Xlim-1* や既知の遺伝子以外に、初期前腎形成にはさらに未知の遺伝子が前腎の形成に関与していることが考えられる。

前腎形成を誘導する遺伝子を探索するために、私はツメガエルの神経胚期の予定腎管域を材料に cDNA ライブラリーを作製し、Expression screening というスクリーニングを使って、前腎遺伝子の発現を誘導できる遺伝子の探索を行った。まず、この cDNA ライブラリーを 100 クローンずつプール化し、これらの cDNA ライブラリーを鋳型に mRNA を合成した。その後、合成された mRNA を初期ツメガエル胚の動物極に注入し、切り出したアニマルキャップを 24 時間培養した後、RT-PCR によってアニマルキャップ中に前腎遺伝子、*Xlim-1*、*Xpax-2*、と *XSMP-30* の発現を調べた。この手法で 100 プール、約 10,000 クローンのマイクロインジェクションを行ったが、*Xlim-1*、*Xpax-2*、と *XSMP-30* の発現を誘導できるプールは単離できなかった。

次に私が Whole-mount *in situ* hybridization screening 法を行い、初期ツメガエル胚の前腎に発現している遺伝子分化の単離及び同定を行った。ツメガエルの神経胚期の予定腎管域を材料に由来する cDNA ライブラリーの一部 (約  $10^7$  クローン) を、単鎖の cDNA プラスミドライブラリーに変換し、この単鎖の cDNA ライブラリーをと stage 7 ツメガエル胚由来の mRNA とサブトラクションを行った。サブトラクションを行った後、得られたライブラリーを 96 クローンずつプレートに植してそのシーケンスを解析した後、既知の遺伝子や機能が推測できないまったく新規の遺伝子を除いて、最終的に 38 クローンに対して Whole-mount *in situ* hybridization を行い、ツメガエル胚での発現様式を調べた。その結果、の前腎管に発現する遺伝子 9 個を単離した。その中に *XC3H-3b* と *XTRAP- $\gamma$*  二つの候補を選び、この二つの遺伝子が前腎形成に対する影響を調べた。

*XTRAP- $\gamma$*  は 153 アミノ酸から構成され、4 つの膜貫通部域を持つ膜タンパクであることを、マウスやラットの *TRAP- $\gamma$*  の解析報告からわかった。*XTRAP- $\gamma$*  は未受精卵の中にも存在し、ツメガエルの後期原腸胚の神経板中軸に局在が見られた。また、尾芽胚期のツメガエル胚の前腎細管の領域に発現がみられ、その後目、耳胞、肝臓などでの発現が確認された。この遺伝子が前腎への影響を調べるために、私は *XTRAP- $\gamma$*  の mRNA を合成し、初期ツメガエル胚に注したが、注入されたツメガエル胚の発生に変化がみられなかった。*XC3H-3b* は二

つの CCCH zinc finger モチーフを持ち、364 アミノ酸から構成される遺伝子である。ツメガエルやほかの動物の CCCH zinc finger 遺伝子の報告から、この遺伝子は mRNA の AU rich ドメインに結合する mRNA 結合タンパクであることが考えられる。この遺伝子はツメガエルの未受精卵から存在し、原腸胚期に原口の側腹部に局在がみられ、その後、中脳と後脳の間や顔面神経冠組織、そして前腎周辺の中胚葉組織に発現がみられた。この遺伝子の C 端領域が欠損した変異体の mRNA をツメガエル胚に注入すると、頭部や顔面の形成異常が観察された。また、変異体の mRNA を初期ツメガエル胚の前腎領域に注入すると、前腎細管の形成が阻害された。以上の結果から、*XC3H-3b* はツメガエルの前腎細管の形成に必要であることがわかった。

私は前腎形成の機構を解明するために、以上の実験を行った。これらのデータから、前腎形成の決定は、初期の *Xlim-1* や *XPax-8* の発現より早い時期で起こり、その後 *XC3H-3b* や *Xlim-1* も含め、*XPax-8*、*Xpax-2*、*XWnt4*、*XWT1*、そして *Notch* などの遺伝子の相互作用によって前腎の分化が決定され、前腎細管や前腎導管、糸球体の構造が形成されることが考えられる。