

論文審査の結果の要旨

詹徳川

ツメガエルの初期発生において、卵からどのようにして各器官が出来るのかという器官形成のメカニズムの解明は重要な研究課題である。そのような中に詹氏は排泄器官として重要な働きをもつ前腎がどのようにしてできるかということをも分子生物学的に解析を行った。脊椎動物の腎臓発生では最初に前腎が出現し、その後、前腎内の導管から中腎が誘導され、最後に導管から出現した尿管芽と周辺の間充織との相互作用により後腎が誘導される。

この論文は2章に分かれて、前腎形成がどのようにしてなされるかについて書かれている。まず序論で詹氏が修士学位論文で行った前腎移植についてのべられている、これは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、前腎構造が誘導される。詹氏はこの方法で処理したアニマルキャップを前腎が除去されたツメガエル胚に移植し、アニマルキャップ中に誘導された前腎がツメガエル胚内で正常の前腎と同様に機能することを示していた。

第一章では前腎発生分化の初期段階の理解のためにはその機構を遺伝子レベルで解析することが必要であるので、腎形成に関与していると言われている *Xlim-1* 遺伝子の前腎形成における役割の解析をいくつかの手法で行った。第一は *Xlim-1* の発現が前腎形成に必要であることを確認するために、アニマルキャップ誘導アッセイ法を使って、*Xlim-1* の発現様式と前腎形成の関連を調べた。前腎が誘導できる条件であるアクチビンとレチノイン酸共処理したアニマルキャップでは、*Xlim-1* の発現が長時間維持されることを明らかにした。また、アクチビンとレチノイン酸処理に時間差を設けたアニマルキャップでは、時間差の条件によって前腎管の形成率が低下するに伴い、*Xlim-1* の発現も減少することが確認した。第二は *Xlim-1* の前腎形成における役割を調べるために、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 *Xlim-1* の機能を抑制するドミナントネガティブ型変異体が前腎形成に与える影響を調べた。活性型の *Xlim-1* を注入したア

ニマルキャップや、活性型の *Xlim-1* を注入したアニマルキャップをアクチビンやレチノイン酸で単独処理しても、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* を注入し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形成率の低下があることを示した。また、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、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抑えられることも確認し、*Xlim-1* は前腎全体の誘導ではなく、前腎細管の形成に必要であることが明らかにした。その後、*Xlim-1* と *Xpax-8* 遺伝子などの関係についても調べた。

第二章では *Whole-mount in situ* ハイブリ法を用い、初期ツメガエル胚の前腎に発現している新規遺伝子の探索を行った。ツメガエルの予定腎管域に由来する 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 ライブラリーとツメガエル桑実胚由来の mRNA でサブトラクションを行った。その後、得られたライブラリープールのクロンの 5'側の塩基配列を解析した後、既知でなく配列上から機能が推測できそうなクロンを対象に *Whole-mount in situ* ハイブリ法を用い、ツメガエル胚の前腎での発現を調べた。その結果、前腎に発現するクロン 9 個を単離した。特にその中から *XC3H-3b* に着目し、この遺伝子の前腎形成における役割を調べた。*XC3H-3b* は二つの CCCH zinc finger モチーフを持ち、364 アミノ酸のタンパク質をコードする遺伝子である。この遺伝子の C 端領域が欠損した変異体を作製し、mRNA を初期ツメガエル胚の予定前腎領域に注入すると、前腎細管の形成が阻害されることを初めて明らかにした。

このように詹氏はツメガエルの初期発生における前腎形成にかかわる既知および未知の遺伝子の解析を分子生物学的に研究を行った。そのことによって前腎形成の機構の解明に大きく寄与したといえる。

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