

## 論文の内容の要旨

論文題目 Cloning and characterization of the *Xenopus laevis* *p8* gene  
(ツメガエルの *p8* 遺伝子のクローニングと  
その性質について)

氏 名 五十嵐 智女

ツメガエル胚の予定外胚葉域であるアニマルキャップの細胞を解離させ、アクチビン処理して再集合させると、濃度依存的に異なる組織を誘導できることが知られている。この系でアクチビン濃度を 10ng/ml として 1 時間処理すると、高率で再集合体に内胚葉を誘導することができる。近年、内胚葉の形成には T-box 遺伝子である VegT が関与していることがわかってきたが、内胚葉の形成にはまだ未知の部分が多い。

そこで、私はアクチビンで内胚葉を誘導した再集合体を用いて、内胚葉特異的な新規遺伝子の探索を試みた。内胚葉を誘導する条件でアクチビン処理した再集合体の cDNA に対して、T-box の共通配列(GRRMFP と VTAYQN)をもとに設計した degenerate primer を用いて PCR を行い、そこからランダムに選んだコロニーの sequence を行った。その結果、既知遺伝子が 35 個 (うち T-box を含むもの 14 個)、*Xenopus* においての新規の遺伝子が 24 個得られた。BLAST search により、新規遺伝子の中に ラット *p8* と相同性が高い遺伝子断片が存在することを明らかにした。

これまでの研究によると、ラット *p8* は急性膵炎の際に膵臓腺房細胞で発現が増加する遺伝子として 1997 年に単離された遺伝子であり、現在マウスとヒトでも見つかっている。*p8* は膵臓において急性膵炎時や再生・発生過程で発現しており、basic helix-turn-helix (bHTH)モチーフと nuclear targeting sequence をもつ核タンパク質であることがわかっている。さらに、*p8* タンパク質は DNA 結合活性をもち、高移動度タンパク質群 HMG (High mobility group protein) の

1つである HMG-I/Y と性質が類似していることが報告されている。*in vitro* において、*p8* の発現はアポトーシス誘導因子によって一時的に上昇することや、*p8* の過剰発現が細胞増殖が促進することが報告されている。さらに、*p8* は癌転移に関わる *com1* (candidate of metastasis) と同一で、乳癌や膵臓癌の組織で発現していることもわかっている。また膵臓以外の多くの臓器においても *p8* の発現が確認され、*p8* は膵臓特異的な因子ではないことがわかってきた。

しかし、哺乳類以外において *p8* は詳しく調べられておらず、発生過程における詳細な発現パターンやその機能は報告されていなかったが、*p8* は多様な機能をもつ核内因子であることや、内胚葉を誘導した系からとれてきたことから、発生過程において重要な役割を果たしている可能性があると考えた。

そこで、3日目胚の cDNA library から PCR を用いて全長をクローニングし、塩基配列を決定した。ツメガエル *p8* (*Xp8*) は 82 アミノ酸をコードする 677bp の短い遺伝子で、bHTH モチーフをもっていた。ツメガエル、ヒト、マウス、ラット、ゼブラフィッシュ、シヨウジョウバエにおける *p8* 関連因子のアミノ酸配列を比較したところ、*Xp8* とその他の因子の間には全長では 36-60% の相同性しかなかった。しかし、bHTH 領域内は非常によく保存されており、51-75% の相同性があることを明らかにした。さらにリン酸化される可能性のあるアミノ酸はよく保存されていることを示した (図 1)。

まず、蛍光タンパク質 (Enhanced Green Fluorescent Protein; EGFP) を用いて *Xp8* タンパク質の細胞内局在を調べた。mRNA の微量注入によってアニマルキャップの細胞に EGFP と *Xp8* の融合タンパク質を強制発現させ、蛍光顕微鏡で観察することによって、*Xp8* タンパク質は哺乳類の *p8* と同様に核に局在することを明らかにした。

次に *Xp8* の発現パターンを調べた。RT-PCR 解析を行い、*Xp8* の発現は原腸陥入期より始まり、その後幼生期になっても続くことを示した。さらに、成体では哺乳類の *p8* と同様に多くの臓器で発現していることを示した。ただし、脾臓では発現が確認できなかった。原腸陥入期における詳しい発現パターンを調べるために、stage 10.25 の胚から animal, vegetal, dorsal, ventral 領域を切り出して RT-PCR を行った。vegetal における発現は比較的弱いだが、他の領域間ではほとんど差がないことを示した。なお、stage 10 の胚では *p8* の発現は見られなかった。またこのとき、各領域を単独培養して RT-PCR を行い、それぞれの外植体において胚葉間の相互作用なしに *Xp8* の発現が上昇してくることを明らかにした。また、全長をプローブとして whole-mount *in situ* hybridization を行ない、*Xp8* の空間的発現パターンを調べた (図 2)。*Xp8* の発現は神経胚期

から予定神経領域で始まり、幼生期になると中枢神経と脳神経で発現していることを示した。特に脳の dorsal top と ventrolateral 領域、脳から伸びる三叉神経（第 5 脳神経）と内耳神経（第 8 脳神経）、鼻原基、後交連や松果体の位置で強く発現していることを明らかにした。これらのことから *Xp8* が神経形成に関与していると考えられたため、神経誘導因子の一つである *chordin* の mRNA を顕微注入することにより神経化されたアニマルキャップにおける *Xp8* の発現が増加するかを RT-PCR で調べた。しかし、*Xp8* の発現の増加は見られなかった。中枢神経の中で強い発現が見られた領域では他の領域に先行してニューロンの分化が起きていることが知られており、*Xp8* は神経細胞への分化自体ではなく、神経の機能に関係していると考えられる。

*Xp8* 遺伝子の growth factor に対する応答能をアニマルキャップ・アッセイを用いて調べた。アニマルキャップを basic fibroblast growth factor (bFGF)、アクチビンまたは BMP-4 で処理して RT-PCR を行ったが、未処理のアニマルキャップ自体が *Xp8* を強く発現しているため、これらの処理による *Xp8* の発現の変化を検出することはできなかった。

さらに詳しく *Xp8* の機能を調べるために *Xp8* mRNA を微量注入して過剰発現させたが、特徴的な表現型は得られなかった。しかし、*Xp8* モルフォリノ (MO) を注入して *Xp8* の機能阻害を試みたところ、外形上は stage 42 まではほぼ正常に発生していたが、stage 46 では軽度の浮腫や腸の巻きの遅滞が観察された。この時期の消化管はダイナミックな細胞のインターカレーションによって厚くて短いチューブから薄くて長いチューブへと変化し、複雑な腸の巻きを形成することが知られている。コントロール MO を注入された胚ではこのような腸の発生が正常に進んでいたが、*Xp8* MO を注入された胚では腸の発生が遅れていた。Stage 40-46 の内胚葉で *Xp8* mRNA が発現していることを RT-PCR で確認しており、*Xp8* の機能阻害によって腸の形成不全が引き起こされることを示した。切片を作製して組織学的に詳しく観察し、*Xp8* MO を微量注入したオタマジャクシでは、腸の形成不全と内蔵の配置異常が起きているが、心臓、脾臓、肝臓の形成は起きていることを示した。他に、浮腫が見られるので前腎管の形成不全が起きていることも示した。また、最近 *Xp8* の関連遺伝子が見つかっており、その配列の違いより今回用いた MO ではこの機能を抑えることができないことが予想される。従って *Xp8* MO により強い表現型が得られなかったのは *Xp8* 自体の redundancy に起因することも考えられる。以上、これらの結果から、新規にクローニングされた *Xp8* は多様な組織において存在し、腸の発生に関与する核内因子の一つであることを示した。

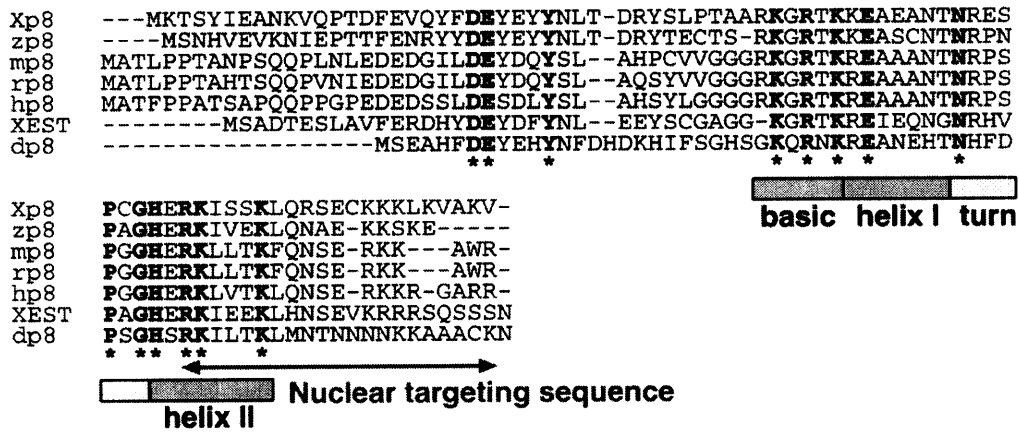


図1 p8 関連遺伝子から予想されるアミノ酸配列の比較

ツメガエル(Xp8)、ゼブラフィッシュ(zp8)、マウス(mp8)、ラット(rp8)、ヒト(hp8)、ツメガエル EST (XEST)、シヨウジョウバエ(dp8)における p8 関連遺伝子のアミノ酸配列を比較した。すべての p8 関連遺伝子において保存されているアミノ酸は太字で示した。p8 は bHTH 領域と Nuclear targeting sequence をもつ。bHTH 領域は異種間で比較的良好に保存されている。

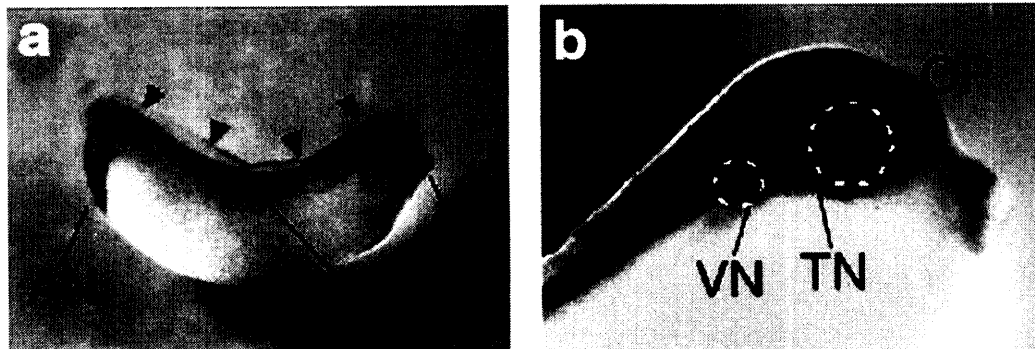


図2 Whole-mount *in situ* hybridization による Xp8 の発現パターンの解析

(a) Stage 30 の側方からの全景と (b) 頭部の拡大写真を示した。中枢神経 (赤い矢頭で示す) と脳神経で強いシグナルが見られた。点線は眼と耳胞の位置を示している。AN, 肛門; NC, 脊索; CG, セメント腺; VN, 内耳神経 (VIII 脳神経); TN, 三叉神経 (V 脳神経); OP, 鼻原基