

論文審査の結果の要旨

氏名 五十嵐智女

本論文は 1 章からなり、*p8* 遺伝子について、哺乳類以外では初めて、これをツメガエル胚からクローニングし、その性質について述べたものである。*p8* はラットで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。五十嵐氏がこの研究を開始するまでに、*p8* は basic helix-turn-helix (bHTH)モチーフと核移行配列が存在すること、核に局在することから、転写制御因子であることが予想されていた。*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いるが、他の多くの臓器においても発現が確認され、膵臓特異的な因子ではないことがわかっていた。しかしながら *p8* 遺伝子は哺乳類で上述のような研究があるのみであり、哺乳類はもとよりそれ以外の種でも、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。

五十嵐氏はこの *p8* 遺伝子をツメガエル胚から以下のような方法でクローニングした。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解離細胞を、内胚葉を誘導する条件でアクチビン処理して再集合させ、再集合体の cDNA から哺乳類 *p8* と高い相同性をもつ遺伝子断片を単離した。その断片をもとに 3 日目胚の cDNA library から PCR を用いて全長をクローニングし、*Xp8* と名付けた。全塩基配列を決定し、*Xp8* は 82 アミノ酸をコードする 677bp の短い遺伝子で、bHTH モチーフをもつことを示した。この新規にクローニングされた *Xp8* 遺伝子のアミノ酸配列の比較において、ツメガエルと哺乳類では約 40%の相同性しか示さないが、bHTH 領域内は非常によく保存されており、75%の相同性をもつことを示した。

次にこの遺伝子の性質を調べるために、mRNA を微量注入してアニマルキャップの細胞に蛍光タンパク質 EGFP と *Xp8* の融合タンパク質を強制発現させ、蛍光顕微鏡による観察を行い、*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示した。このことは *Xp8* が細胞質から核内に移行していることを初めて示したことになる。更に *Xp8* mRNA 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。stage 10.25 の胚から animal, vegetal, dorsal, ventral 領域を切り出して RT-PCR を行い、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。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。次に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。*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。一方、*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、特徴的な表現型を得ることはできなかった。しかし、*Xp8* モルフォリノオリゴヌクレオチドを注入して *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するが、stage 46 では腎臓形成に関係すると考えられる浮腫や、腸の巻きの遅滞が起こることを観察した。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。

上記のように五十嵐氏は哺乳類以外では初めてツメガエルで *Xp8* 遺伝子の全長をクローニングし、この遺伝子が細胞質から核へ移行すること、また初期発生では中枢神経形成部位で強い発現を示すことや、阻害実験では腸管形成に関与することなどを明らかにした。

なお、本論文は黒田裕樹、高橋秀治、浅島誠との共同研究であるが、論文提出者が主体となって全般的に遺伝子のクローニング、分析、及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が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。