

論文内容の要旨

論文題目 Analyses of Aldolase A,B,C gene expressions in early *Xenopus* embryos

(アフリカツメガエル初期胚におけるアルドラーゼ A,B,C 遺伝子発現の解析)

氏名 梶 田 恵 理

アルドラーゼは解糖系の鍵となる酵素で、高等動物では A (筋型)、B (肝型)、C (脳型) の 3 種の遺伝子が存在する。アルドラーゼは多くの脊椎動物で A,B,C 3 種のアイソザイム型が存在するが (円口類のヤツメウナギでは 2 種しか存在しない)、A,B,C 全ての cDNA クローニングがなされている生物は、ヒトとラットのみであった。これら 3 つはそれぞれ異なる遺伝子にコードされており、組織特異的に発現することが知られていた。私は、このアルドラーゼ A、B、C という同様の機能を持つ 3 つの遺伝子を材料にし、この 3 者が各々どのような調節を受けて、組織及び発生時期に特異的な発現をしているかを調べることは遺伝子発現調節のユニークなモデル系となると考え、この研究を行った。

アフリカツメガエルのアルドラーゼ cDNA は A、C 型が既にクローニングされ発現研究の報告がなされていたが、B 型についてはまだ報告がなかった。私はまず 2 種類の肝臓 cDNA ライブラリーから 2 つの B 型 cDNA (XALDB1; 2447bp 及び XALDB2; 1490bp) をクローニングし、その構造を明らかにした。XALDB1 及び XALDB2 は ORF 内にアミノ酸配列に影響を及ぼさない塩基置換が 2 ケ所、conservative なアミノ酸置換を引き起こす塩基置換が 1 ケ所あるのみで、UTR 部分においても非常に良く似ているが、XALDB1 は Poly-A tail の前に XALDB2 より余分な 3'-UTR を 1kb 持っている。サザンプロット解析により、この長い UTR 部分は、ライブラリー作成の際に別の RNA が結合してしまったものであると示

唆された。XALDB はラットアルドラーゼ B と比較してアミノ酸配列にして 73.4% のアイデンティティーを、ツメガエルアルドラーゼ A 及び C と比較して各々 70.0% 及び 70.9% のアイデンティティーを持っている。系統樹からは、他の生物種でも指摘されてきた通り、B と A 及び C が分岐した後に、この 2 者が分岐しことが、ツメガエルアルドラーゼにおいても示唆された。

ここで得られた cDNA をプローブとし、ツメガエル成体組織・卵細胞・初期胚の mRNA でノザンプロット解析を行った。成体組織では、アルドラーゼ B 型 mRNA は腎臓、肝臓、胃、腸において非常に強い発現、皮膚でも比較的強い発現が見られ、筋肉や脳 (A・C 型の主要な発現部位) を含む他の臓器ではあまり発現が見られなかった。腎臓、肝臓、胃、腸における発現はこれまで哺乳動物においても報告されているが、皮膚での発現は哺乳類では見られない。最近サケにおいても皮膚における B 型アルドラーゼ mRNA 発現が報告されているので、下等脊椎動物の特徴である可能性がある。卵細胞及び初期胚から抽出した RNA で行ったノザンプロット解析からは、XALDB の mRNA は卵巣、卵細胞、卵割期までの初期胚においては発現していないことがわかった。このことは A 及び C アルドラーゼが卵形成の間活発に転写され、母性 mRNA として卵に貯えられていることとは大きく異なっている。A 及び C 型は囊胚期までに母性 mRNA 量が一旦減少し、神経胚期から zygotic な発現量が増えはじめることが既に報告されていたが、B 型は囊胚期以降に、A、C 型と共に、zygotic に発現しはじめることがわかった。

更に cDNA を *in vitro* 転写したものをスタンダードにし、卵細胞・初期胚及び成体組織の mRNA 発現の絶対量を測定した。この結果、A、C 型 mRNA は受精卵一個当たり約 50pg の発現があり、この後囊胚期までに徐々に減少し、神経胚期から再び発現量が増加する。B 型は受精卵には殆ど発現しておらず (5pg 以下)、神経胚期から初めて発現量が増え始めることが分かった (図 1 a)。この時の発現量の変化を A:B:C の比で表すと、受精卵…56:1.5:42.5、囊胚期…54:10:36、神経胚…71:14.5:14.5、おたまじゃくし…73:20:7 となる (図 1 b)。成体組織では、B 遺伝子は肝臓、腎臓において約 90%・胃や腸において 60%~80%・皮膚において約 50%の発現があることが分かった。C は脳で約 65%・心臓で約 75%・卵巣で約 45%、A は筋肉で約 98%・卵巣で約 45%・皮膚で約 50%・更に調べた全ての組織で 10%以上の発現をしていることがわかった (図 2)。

更に、Whole mount *in situ* hybridization により初期胚における mRNA の空間的発現を A,B,C 間で比較した。XALDB の mRNA は後期神経胚から発現しはじめる。その発現領域は肝臓原基、前腎、後腸領域、及び表皮であり、成体組織における発現と一致していた。C 型における Whole mount 解析はこれまで報告がなされていなかったが、神経胚後期より神経組織、心臓原基で強い発現が見られた他、前腎でわずかな発現が見られた。A 型もま

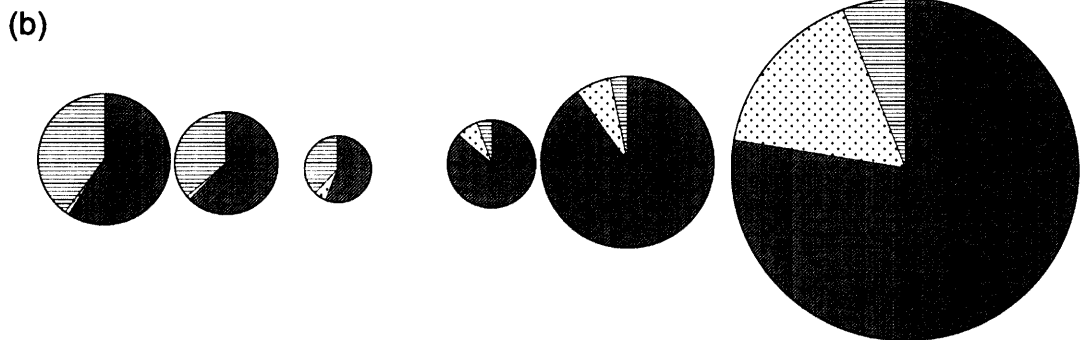
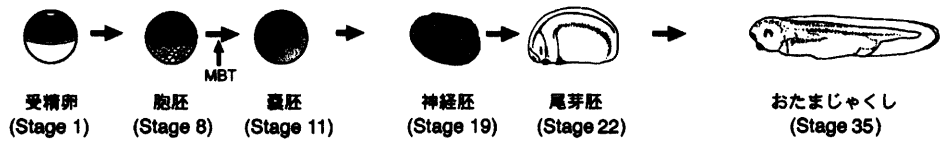
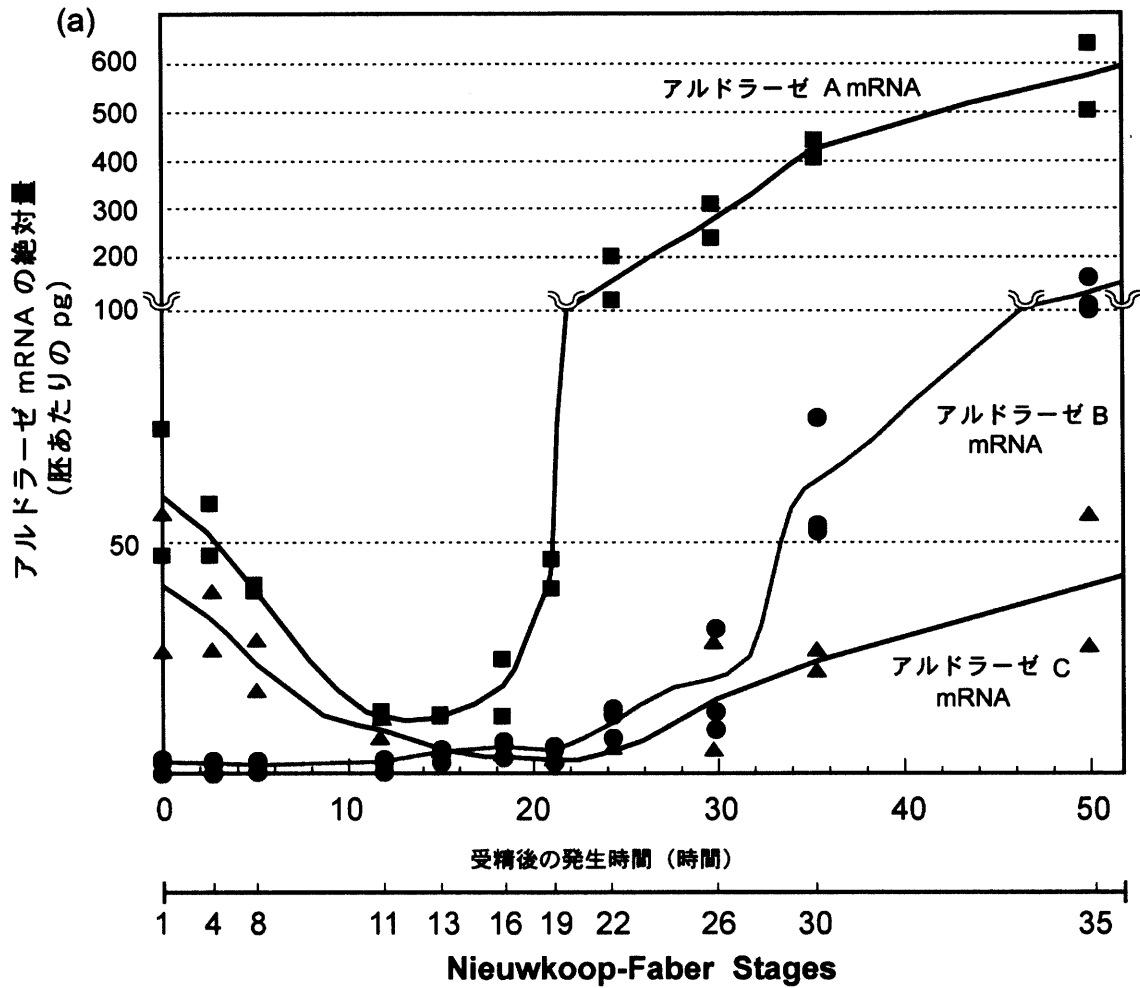


図1
胚発生時における A, B, C アルドラーゼ mRNA 発現の絶対量の変化を表したグラフ。
円グラフの面積は発現量の比を表す。

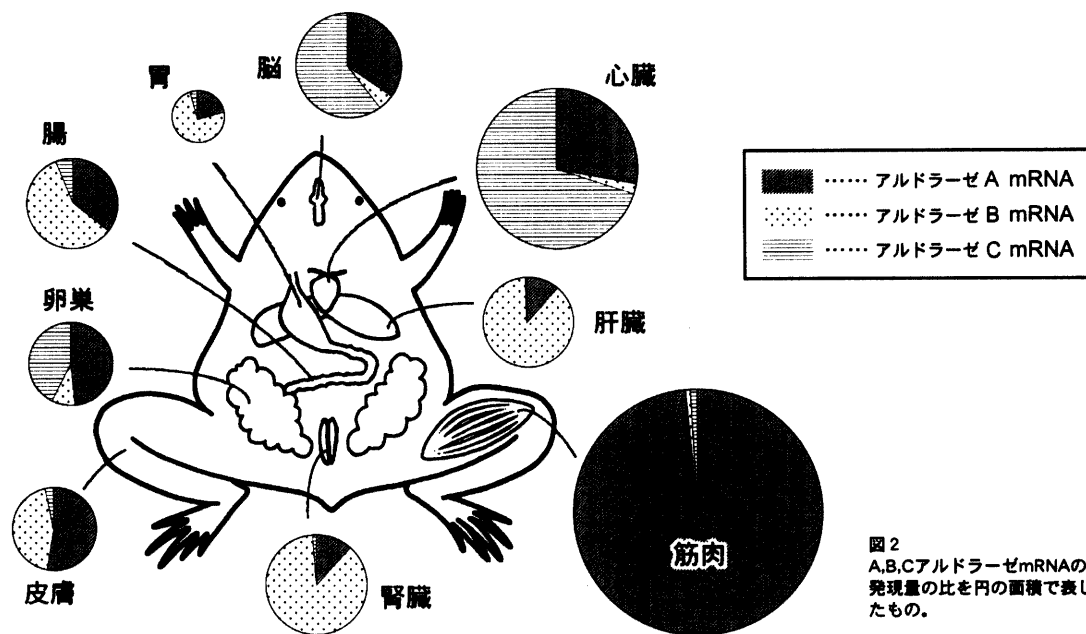


図2
A,B,CアルドラーゼmRNAの
発現量の比を円の面積で表し
たもの。

た前腎で発現することが既に報告されているから、前腎は A,B,C の3種が全て発現する臓器であることが示唆され、興味深い。

アルドラーゼはフルクトース-1,6-2リン酸をジヒドロキシアセトンリン酸及びグリセルアルデヒド3リン酸に開裂する反応とフルクトース-1-リン酸をジヒドロキシアセトンリン酸及びグリセルアルデヒドに開裂する反応を行う酵素である。フルクトース-1,6-2リン酸の開裂は解糖系に必須の反応であるが、フルクトース-1-リン酸の開裂は果糖を代謝する時に必要な反応である。アルドラーゼ B 型に比べ A 及び C 型は、フルクトース-1,6-2リン酸の開裂を非常に効率的に行うが、フルクトース-1-リン酸の開裂に対する効率是非常に悪い為、生理学的条件下ではフルクトース-1-リン酸の開裂はアルドラーゼ B に担われている。果糖は卵黄には含まれない為、ツメガエル幼生は摂餌が可能なステージに至って、初めてフルクトース-1-リン酸の開裂を必要とする。我々は、ツメガエル卵は卵割期までは卵黄に依存して発生するため、A 及び C アルドラーゼのみによって代謝をまかなうが、摂餌が始まるまでの間に B が発現しはじめ、果糖の摂取に備えるのではないかという結論に達した。この発現調節が、いかなる機構によって為されているのかの解明が、今後の研究課題である。

これを解明する一歩として、今回私は腎形成時におけるアルドラーゼ発現の変化を調べ、アニマルキャップにアクチビン+レチノイン酸を作用させる系を用いた解析を行ったので、これについても報告する。