

論文の内容の要旨

論文題目

Functions of *inv* (*inversion of embryonic turning*), the Gene Involved in the Establishment of Left-right Asymmetry of Vertebrates, in *Xenopus* Embryos

(左右非対称性の形成に関わる遺伝子 *inv* のアフリカツメガエル胚における機能)

氏名 安彦 行人

脊椎動物の体は外見的には左右相称であるが、体内の器官の形態、配置には左右非対称性が見られる。近年、*nodal* など、発生過程において胚の左右で異なる発現を示し、左右非対称な形態形成に関わる遺伝子が数多く発見されてきている。しかしながら、これらの遺伝子の左右非対称な発現をもたらす最初期の機構はいまだ解明されていない。また現在までに明らかになった左右非対称性形成の初期過程には、生物種間で様々な違いがあることも知られている。左右非対称性の形成において、背腹軸、前後軸の形成と同じく生物種を超えて保存された機構が存在するのには興味のある課題である。

マウス *inv* 変異体は、ホモ接合体のほぼ100%で内臓逆位が観察され、*nodal* などの遺伝子発現部位も左から右へと逆転することが知られている。このことから *inv* 遺伝子は、左右非対称な発現を示す遺伝子群の上流で働くことが示唆される。マウス *inv* 変異の原因遺伝子 *inv* はすでにクローニングされているが、その機能は不明である。遺伝子の左右非対称な発現をもたらす機構を解明するうえで、*inv* 遺伝子産物の上流/下流の分子的仕組みを明らかにすることは有効な戦略のひとつと考えられる。またマウス *inv* 変異体においては、左右非対称性の逆転に加えて腎臓に嚢胞が生じて腎機能が阻害されることも知られており、*inv* 遺伝子産物の機能や左右非対称性形成の初期過程とのかかわりを考える上で興味深い。

すでにマウスおよびヒトにおいて *inv* 遺伝子がクローニングされているが、私はアフリカツメガエルの *inv* 関連遺伝子をクローニングした。得られたアフリカツメガエル *inv* 遺伝子の塩基配列をもとに morpholino oligonucleotide を合成し、その microinjection による機能阻害実験を行った。また、アフリカツメガエル初期胚に対し *inv* mRNA の microinjection を行い、*inv* の下流で働く分子的仕組みを明らかにすることを試みた。さらに、Yeast two hybrid screening および Gel overlay assay により、Inv タンパク質に calmodulin が結合することを示し、Inv タンパク質の活性が calmodulin を経由して Ca^{2+} により制御されていることを示唆する結果を得た。

アフリカツメガエル cDNA ライブラリーから、2種類の *inv* 関連遺伝子 (*Xinv-1*, *Xinv-2*) を単離した (Chapter I)。アフリカツメガエル *inv* (*Xinv*) とマウス *inv* の推定アミノ酸配列を比較した結果、15個のアンキリンリピートと呼ばれる motif に加え数カ所、相同性の高い領域が見出された。これらのうち2ヶ所は、IQ motif と呼ばれる calmodulin 結合配列に約70%の similarity を持ち、calmodulin 結合に必須とされるイソロイシン-グルタミン(IQ)配列も保存されていた。さらに、mouse Inv タンパク質を用いて、これらの領域が実際に calmodulin との結合活性を持つことを Yeast two hybrid assay、Gel overlay assay により確認した (Chapter IV)。さらに、IQ motif に隣接して塩基性のアミノ酸残基、疎水性アミノ酸残基が集合した領域が種を超えて保存されていることが判明したが、この領域の生物学的な機能は現在のところ不明である。

RT-PCR による解析の結果、アフリカツメガエル初期胚において *Xinv-1* mRNA は受精卵からすでに存在し、発生過程で大きな量的変動なく存在し続けることが示された。また、Whole mount *in situ* hybridization により、*Xinv* mRNA は卵割期から孵化にいたるまで、*Xnr-1* (*nodal* のアフリカツメガエルホモログ) などと異なり左右に均等に発現していることが観察された。これらの結果はマウス *inv* で既に得られていた結果と矛盾しない。また、RT-PCR による解析では *Xinv-2* の発現は *Xinv-1* に比べて非常に弱いことが示唆された。

近年アフリカツメガエルにおいて、morpholino antisense oligonucleotide を用いて遺伝子特異的な翻訳阻害が可能であることが示されている。私は *Xinv-1*、*Xinv-2* の 3'非翻

訳領域に相補な配列を持つ morpholino oligonucleotide をアフリカツメガエル2細胞期胚に注入した (Chapter II)。その結果、注入胚は外見上正常に発生し孵化するものの、遊泳オタマジャクシ期に至って頭部および胸部に浮腫を生じ、大きく膨らんだ外見を呈した。これらの胚の血流は正常であり、浮腫は水分の排出に関わる循環器系、おそらく腎臓の異常によるものと推定された。光学および電子顕微鏡による切片の観察の結果、*Xinv* morpholino 注入胚の腎臓細胞中には、正常胚では見られない未消化の卵黄顆粒が大量に残存していた。このことから、細胞が正常に分化を完了できず、腎細胞が機能していないことが示唆された。以上の結果はマウス *inv* 変異体で腎臓形成に異常が見られることと一致し、アフリカツメガエルにおいても *Xinv* 遺伝子産物が腎臓の形成に関与していることを示唆する。

しかし、*Xinv* morpholino 注入胚においては、マウス *inv* 変異体に見られる左右非対称性の逆転はほとんど見られなかった。アフリカツメガエルにおいて *Xinv* が母性因子として存在することを考慮すると、左右非対称性の形成という早期の過程には卵内に蓄積された *Xinv* タンパク質が主に利用され、新たに合成される *Xinv* タンパク質は主に腎臓形成など、後期の発生過程で働く可能性が示唆される。

Xinv 遺伝子のクローニングおよび機能阻害実験と並行して、主にマウス *inv* を用いて、*Inv* タンパク質の過剰発現がアフリカツメガエルの発生におよぼす影響を調べた。マウス *inv* cDNA から *in vitro* 転写により合成した mRNA をアフリカツメガエル2細胞期胚に微量注入したところ、将来の右側となる割球に注入を受けた胚は左右が形態的に、また遺伝子発現パターンにおいても random になることを見出した (Chapter III)。この効果は C 末端側の IQ motif (IQ2) を欠損させると失われた (Chapter IV)。これに対し、アフリカツメガエルの *inv* 関連遺伝子 (*Xinv*) から合成した mRNA を、アフリカツメガエル初期胚に注入しても左右の randomize は見られなかった (Chapter III)。しかし IQ motif を改変した *Xinv* mRNA は、アフリカツメガエル2細胞期胚への注入により、マウス *inv* mRNA と同じく左右の randomize を引き起こした (Chapter IV)。

以上の結果は、*inv* 遺伝子がアフリカツメガエルにおいても保存されており、*Nodal* 関連遺伝子等の上流に位置して左右非対称性の形成の最初期の機構に関わることを示

唆する。また、Inv タンパク質の活性制御に calmodulin の結合が関与していることが推測される。

過去の研究において、遺伝子の左右非対称な発現に先立つ左右非対称性形成の初期過程には、細胞骨格やイオンチャンネル、ギャップ結合を介した物質移動、繊毛運動など、細胞生物学的な現象が関わっていることを示す様々な所見が集積されている。しかしこれらの所見には、生物種を超えて一貫して観察されるものではなく、現在までのところ断片的な記載に留まっている。今回、*inv* 遺伝子が種を超えて保存されており、かつ腎細胞の形成と左右非対称性の形成の両方に関わっていることが示唆された。今後、*inv* のさらなる解析が、左右非対称性形成の初期過程に関わる過去の知見を相互に関連づけ、カルシウムシグナル、細胞内輸送など細胞生物学的な現象と、左右非対称性の形成という個体レベルのパターン形成との関係を明らかにすることが期待される。