

## 論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 種子島 幸祐

種子島幸祐氏は「アフリカツメガエル胚の初期発生におけるアクチビン応答性遺伝子 *Xantivin* の分子生物学的解析」においていくつかの優れた結果を得ている。

中胚葉誘導はアクチビンシグナルによって制御されており、アクチビンシグナルによって転写が誘導される遺伝子は中胚葉誘導において、重要な役割を担っていると考えられる。しかし、この研究が始まる前の段階では、アクチビンシグナルで誘導される遺伝子で中胚葉誘導において働いている遺伝子はいくつか知られているものの、中胚葉誘導における複雑な遺伝子発現を説明するには不十分であった。

種子島氏の成果は第一に、アクチビンシグナルによって、直接転写が誘導される遺伝子と探索する目的でスクリーニングを行い、実際に中胚葉誘導のパターニングに関与して、アクチビンシグナルに応答して発現する遺伝子である *Xantivin* をツメガエル胚で、始めてクローニングしたことにある。このスクリーニングでは、ツメガエル予定外胚葉片を蛋白質合成阻害剤であるシクロヘキシミド ( CHX ) とアクチビンで共処理するという独自の系を用いて、cDNA ライブラリーを作製し、クローニングをした。この遺伝子は目的通り、中胚葉誘導の起こる時期と場所に一致して発現がみられた。また、ツメガエル予定外胚葉片をアクチビン処理する実験により、*Xantivin* は当初の目的どおりアクチビン処理に対して早期に応答することが確認された。さらに、胚内での発現を制御している遺伝子を解析したところ、初期中内胚葉形成に必須でありアクチビンシグナルを活性化できる *nodal* 関連遺伝子 (*nodal-related gene*) によって制御されていることが示唆された。*Xantivin* はマウス左右軸形成に関与している *lefty* に高い相同性を持つ遺伝子であるが、種子島氏の実験から、この遺伝子ファミリーが中胚葉誘導の際にも働いていることが明らかとなった。

また、第二の成果は、この遺伝子を過剰発現系および機能欠失系によってその胚内における機能について詳細に調べ、*Xantivin* が胚内でアクチビンシグナルを担っている因子であるノーダル関連遺伝子の制御に関与して、中胚葉のパターニングに関与していることを明らかにしたことにある。*Xantivin* mRNA を過剰発現した胚は、中胚葉形成が阻害されており、*Xantivin* mRNA を *activin* mRNA や *Xnr1* mRNA といったアクチビンシグナルを活性化できる遺伝子と共発現させると *activin* mRNA や *Xnr1* の過剰発現による二次体軸の誘導を阻害した。このことから *Xantivin* はアクチビンシグナルで誘導されるにもかかわらず、アクチビンシグナルを阻害するフィードバックインヒビターであることが示唆された。ツメガエル胚では最近、遺伝子の機能欠損の方法として生体内でも安定なモルフォリノオリゴヌクレオチドの微量注入が使われるようになったが、種子島氏はこのオリゴヌクレオチドを用いた実験を取り入れ、*Xantivin* 特異的な翻訳阻害による機能欠損実験を行った。すると、*Xantivin* に対するモルフォリノアンチセンスオ

リボヌクレオチド(XatvMO)を微量注入した胚では中胚葉性の組織が肥大しており、たとえば、脊索は胚の前端まで拡張していた。さらに XatvMO を微量注入した胚を初期中胚葉および内胚葉マーカー遺伝子の whole-mount *in situ* hybridization で解析したところ、中胚葉マーカー遺伝子の発現が上昇しており、特に初期の中胚葉領域すべてに発現する *Xbra* は、本来、帯域全体に限局する発現が動物極側まで広がっており、中胚葉領域が拡大していることが示唆された。また、XatvMO 微量注入胚でのアクチビンシグナルの過剰な活性化が確認されたことから、胚内で *Xantivin* はアクチビンシグナルの過剰な活性化をおさえて、中胚葉が正しい領域に限局して形成されるのに必要な因子であることが明らかになった。このようなフィードバック制御による領域の制御が、中胚葉誘導に必要なことは、このような種子島氏の実験により、明確になった。

このように種子島氏の行った研究は、アクチビンという強い中胚葉誘導能をもつ遺伝子によって直接誘導される遺伝子がむしろそのシグナルを抑制的に制御することにより正確なパターンニングに関与していることを示した研究であり、このような系の分子メカニズムを明らかにしたことは学問上大きな価値がある。

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