

## 論文内容の要旨

論文題目 Identification and characterization of *Xenopus laevis* NDRG1  
(ツメガエル NDRG1 の同定と解析)

氏 名 久野 順一

A6 細胞は、アフリカツメガエルの腎臓に由来する上皮性の培養細胞であり、コンフルエントに達すると自発的にドーム構造を形成する。ドームは、細胞内極性の形成による一定方向への物質輸送、細胞間の緊密な接着による細胞間隙を介した物質透過性の制御といった上皮細胞としての性質を反映するものであり、腎臓の管腔構造の形成を模倣すると考えられる。これまでに当研究室における先行研究によって、三次元クリノスタットを用いた培養(クリノローテーション)により A6 細胞のドーム形成が阻害されることが明らかになっていた。本研究では、ツメガエルの前腎発生に関わる遺伝子を得ることを目的として、クリノローテーション時の A6 細胞において発現量の変化する遺伝子の探索を試みた。

まず、A6 細胞の形態を詳細に観察するためにアクチン繊維を染色したところ、クリノローテーション時の A6 細胞では、上皮性細胞の特徴である表層アクチン・バンドが部分的にしか形成されていないことが示された。この時、静置培養時では、表層アクチン・バンドが細胞の頭頂側に、ストレス・ファイバーが基底側に観察されたのに対して、クリノローテーション時では、表層アクチン・バンドとストレス・ファイバーが同時に観察され、細胞内極性の形成が不完全であることが示唆された。この結果は電子顕微鏡による観察でも確認され、クリノローテーション時の A6 細胞では静置培養時に比べ、接着帯が貧弱になっており、そこに付着したアクチン繊維も少ないことが示された。そこで、細胞の形態変化や前腎発生に関わる遺伝子を得ることを目的として、10 日間の静置培養とクリノローテーションを行った A6 細胞の間で、マイクロアレイを用いて遺伝子発現を比較した。発現量に変化する遺伝子の候補として EST クローン XL043e17 が得られ、その塩基配列を決定したところ、マウス、ヒトではすでに報告されている N-myc

downstream-regulated gene-1 (NDRG1)と高い相同性を示す遺伝子であった。そのアミノ酸配列をマウスとヒトの NDRG1 と比較すると、XL043e17 は N 末端の 47 アミノ酸残基を欠くものの、その他の部分では、それぞれに 75.0 %、75.9%と高い相同性を示した。そこで、私は XL043e17 を *Xenopus laevis* N-myc downstream-regulated gene-1 (xNDRG1)と名付けた。Northern blot analysis により、xNDRG1 の発現量はクリノスタートを用いて 10 日間培養した A6 細胞で顕著に増加し、培養 15 日目でも発現量の増加が維持されることが示された。この発現量の増加は、形態変化が観察される時期と一致した。xNDRG1 の発現量の増加は、遠心機を用いた 7xg, 3xg の加重力条件での培養、培地交換を行わない静置培養では起こらず、クリノローテーションに依存していることが示された。また、NDRG1 の発現を活性化することが知られている hypoxia inducible factor-1  $\alpha$  (HIF-1  $\alpha$ ) の発現量が 10 日間のクリノローテーションによって増加することが示され、クリノローテーション時の xNDRG1 の発現量の増加は HIF-1 を介していることが示唆された。

ヒト、マウスにおける先行研究により、NDRG1 は N-myc によって発現が抑制される遺伝子であり、肢芽、肺、胃、肝臓、心臓、腎臓、中枢/抹消神経系などの器官に異常が見られる N-myc 変異マウスにおいて過剰に発現することが明らかにされていた。しかし、その生体内での機能的役割についての報告はなかった。そこで、xNDRG1 の生体内での役割を探るため、ツメガエル初期胚における発現パターンと機能の解析を試みた。ツメガエルの発生過程における xNDRG1 の発現は、RT-PCR によってステージ 15 より検出され、ステージ 20 までに顕著に増加し、その後は発生過程を通して維持されることが明らかになった。また、Whole-mount *in situ* hybridization によって、xNDRG1 の発現は前腎、目、鰓弓、尾芽において認められ、前腎では尾芽胚期から強く発現し、前腎が機能し始める Stage37/38 以降になると発現量が低下することが示され、xNDRG1 が分化決定後の分化、形態形成期の前腎において強く発現する遺伝子であることが明らかになった。

xNDRG1 の前腎発生における役割を調べるために、ツメガエル胚の予定前腎領域へ mRNA を微量注入することによって、xNDRG1 を過剰発現させたところ、前腎と体節の形態に異常が観察され、xNDRG1 が前腎の形態形成に関わることが示唆された。また、モルフォリーノ・オリゴマーの微量注入による xNDRG1 の翻訳阻害によって、前腎の形成が阻害され、xNDRG1 が前腎の形成に必要とされる事が明らかになった。

以上の研究を通して、クリノローテーション時の A6 細胞で発現量が変化する xNDRG1 が前腎発生に必須であることが示された。また、クリノローテーション時の A6 細胞では、形態、遺伝子発現の変化を伴う分化状態の遷移が起こっていることが示唆された。このことから、A6 細胞のクリノローテーションを、前腎発生に関わる遺伝子を探索するための新しい実験系として用いることができる可能性が示された。