

論文審査の結果の要旨

氏名 関崎裕幸

本論文は2章からなる。第1章はアフリカツメガエル (*Xenopus tropicalis*) の生殖細胞関連遺伝子 *Xtdazl* のクローニングと pPGC の可視化について、第2章は *Xtdazl* 遺伝子のプロモーター探索と解析について述べられている。

生殖細胞は初期発生においてまず予定始原生殖細胞 (presumptive primordial germ cell: pPGC) として生殖巣原基に移動し、始原生殖細胞に分化する。その後、精原細胞または卵原細胞として分化し、減数分裂を経てそれぞれ精子または卵子に最終分化する事で受精能を獲得する。*Xenopus laevis* (*X. laevis*) の近縁種でありゲノムの倍数性が2倍体 ($2n = 20$) である *Xenopus tropicalis* (*X. tropicalis*) において生殖細胞系譜の可視化ができれば、これらの生殖細胞分化機構の解明につながる。

第1章では生殖細胞系譜について、*X. tropicalis* の pPGC を特異的に可視化する事を目的とした。しかしながら、*X. tropicalis* における生殖細胞系譜の発生様式は遺伝子発現も含めほぼ未知であったため、近縁種である *X. laevis* の生殖細胞質を含む pPGC に特異的に発現する *DAZ* 遺伝子 (*Xdazl*) に注目した。*X. tropicalis* における *DAZ* 遺伝子を探索するため、*Xdazl* の部分的 DNA 断片をプローブとし、*X. tropicalis* cDNA・ライブラリーをスクリーニングした結果、*X. tropicalis* *DAZ-like gene* (*Xtdazl*) の単離に成功した。全長配列の決定により、*Xtdazl* は *X. laevis* の *Xdazl* と比較するとアミノ酸レベルで75%、塩基レベルで61%の相同性があり、*DAZ family* 特有の *DAZ-motif* と *RNP (RNA-binding protein) -domain* が存在する事がわかった。各発生段階における *X. tropicalis* 胚から mRNA を抽出し、RT-PCR により *Xtdazl* mRNA の発現を調べた結果、受精卵、胞胚、原腸胚、神経胚、尾芽胚、初期幼生期において発現が確認できた。成体組織においては脳、心臓、肝臓、脾臓、小腸、膵臓、筋肉、腎臓には発現が見られず、生殖巣である精巣と卵巣にのみ発現が見られた。加えて、WISH (Whole-mount *in situ* hybridization) により *Xtdazl* mRNA の空間的発現を追跡した結果、*X. laevis* での知見における pPGC の局在と *Xtdazl* mRNA の発現は一致していた。具体的に述べると、*Xtdazl* mRNA は St. I 前卵黄蓄積期卵母細胞から発現しており、METRO (message transport organizer) 領域から植物極に局在後、受精による卵割を経て胞胚腔へ発現が移行する。その後、*Xtdazl* mRNA 発現細胞は神経胚形成期を通じて原腸直下に停滞しているが、尾芽胚期から初期幼生期に至るまでに背側腸間膜に移動する。これらの結果より、*Xtdazl* は *X. tropicalis* の pPGC におい

て特異的に発現する遺伝子であると結論付けられるため、*X. tropicalis* の生殖細胞系譜を追跡する最初の遺伝子マーカーとなることを明らかにした。

第2章では、*Xtdazl* が *X. tropicalis* の pPGC に特異的に発現する事から、個体を生存させたまま pPGC を可視化するために不可欠な *Xtdazl* プロモーターを探索した。*Xtdazl* の部分的 DNA 断片をプローブとして、*X. tropicalis* ゲノム・ライブラリーをスクリーニングした結果、*Xtdazl* の転写開始点を含む推定プロモーター領域（約 5kbp）を得る事に成功した。Luciferase Assay によりプロモーター活性を確認後、この推定プロモーター領域にレポーター遺伝子（EGFP: enhanced green fluorescent protein）と mRNA の局在化に必要な事が判明した *Xtdazl* の 3'UTR（untranslated region）を組み込んだプラスミド（*Xtdazl::EGFP-3'UTR*）を構築した。pPGC を特異的に可視化する目的で *Xtdazl* 推定プロモーター領域の単離に成功し、更に *Xtdazl* 部位特異的エンハンサー領域の必要性に関する解析の一部が示された。

なお、本論文の第1章は、高橋，種子島，小沼，原本，浅島らとの共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったものである。第2章については論文提出者が全て主体的に行ったものである。それゆえ、本論文は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。