

論文審査の結果の要旨

氏名 十亀麻子

本論文は2章からなる。第1章は膵臓形成における遺伝子スクリーニングとその解析を行い、第2章では内胚葉形成に関与する遺伝子のクローニングと機能解析について述べられている。

脊椎動物の卵は卵割を繰り返した後、外胚葉・中胚葉・内胚葉と呼ばれる三種類の胚葉を形成する。外胚葉からは表皮や神経系が、中胚葉からは筋肉や脊索、血管、腎管などが、内胚葉からは主に消化器官や呼吸器官が分化し、さらに消化管上皮の異なった領域から胃や腸、肝臓、膵臓などの付属器官が分化する。

第1章では、まず内胚葉性器官である膵臓に注目し、膵臓が分化する際に発現している遺伝子の探索を行った。既にアフリカツメガエルの予定外胚葉片(アニマルキャップ)はアクチビンとレチノイン酸で処理すると膵臓に分化する事が報告されている。試験管内で誘導された膵臓は、形態的及び機能的にも十分な構造であることが確認されているが、前腎管など他の組織の混入という問題があった。そこでアクチビンの濃度について検討を重ね、アニマルキャップ中に誘導される前腎管の形成率を抑える条件を確立した。この系を用い、膵臓特異的遺伝子が発現していると考えられる時期を選択して cDNA ライブラリーを作成し、スクリーニングを行った。その結果、ツメガエル胚の膵臓に特異的に発現する既知の消化酵素をコードする遺伝子が数多く単離できた。近年、ほ乳類と比較して両生類の膵臓形成に関する研究は未だ少ない。今回得られた遺伝子は有用なマーカーになりうると考えられる。以上の結果より、膵臓形成の分子機構の解明に、アニマルキャップを用いた系が有用であることが示された。

そこで膵臓形成の初期段階において重要な役割をもつことが知られている *XIIBox8* に注目し、mRNA の時間的な発現の変化を確認したところ、処理したアニマルキャップ中では処理後 18 時間から発現が開始していた。また内分泌マーカーである *insulin* や、外分泌細胞のマーカーである *carboxypeptidaseA* の発現時期は正常発生における発現開始時期とほぼ一致していた。このことから、アニマルキャップ中での発生過程は正常胚とほぼ平行して進んでいることを明らかにした。

第2章ではこのような条件下、処理後 18 時間のアニマルキャップを用いて cDNA ライブラリーを作成し、ディファレンシャルスクリーニングを行った。その結果、全長 1,366 bp、392 アミノ酸からなる遺伝子が得られた。この遺伝子はヒトの PAI-1 mRNA-binding protein (PAI-RBP1)と DNA レベルで 65%、アミノ酸レベルでは 72%の相

同性があった。その遺伝子を *Xenopus* PAI-1 mRNA-binding protein (XPAI-RBP1) と名付け、解析を行った。

各発生段階の胚を用いた RT-PCR 法による解析の結果、*XPAI-RBP1* の転写は神経胚期から幼生期まで持続していた。また Whole mount *in situ* hybridization 法による解析で *XPAI-RBP1* は神経胚期から神経領域周辺において弱く発現が開始し、尾芽胚期には眼や鰓弓、弱いながらも前方内胚葉に発現が見られた。発生の進んだ幼生期には前方内胚葉における *XPAI-RBP1* の発現は十二指腸及び膵臓原基に局限していた。*XPAI-RBP1* と EGFP の融合タンパク質をアニマルキャップ中に発現させた結果、*XPAI-RBP1* タンパク質は核移行シグナルがあるにもかかわらず細胞質に存在することが示された。

XPAI-RBP1 の mRNA を顕微注入によって前方内胚葉の予定域である背側帯域に過剰発現させた結果、尾芽胚後期から初期幼生において前方内胚葉組織の肥大が観察された。内胚葉性器官への影響を調べる為に、機能阻害効果をもつ *XPAI-RBP1* のアンチセンスモルフォリノオリゴ (*XPAI-RBP1* MO) を 8 細胞期の背側植物割球に顕微注入した結果、消化管の回転が始まり膵臓や肝臓の原基が観察できる時期には、消化管の回転及び伸長が妨げられ、各原基は形成されているが正常な構造をとるには至らなかった。さらに *XPAI-RBP1* の機能を阻害した胚では、尾芽胚期において *XlHbox8* 及び *Ptfla* の発現の遅れが示された。

これらの結果より、*XPAI-RBP1* は発生初期には膵臓や肝臓といった前方内胚葉の領域で、膵臓原基ができた後には各組織での遺伝子発現を維持することで、前方内胚葉性器官の分化に関与していることを明らかにした。

なお、本論文第 1 章は早田および浅島との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証を行ったものであり、第 2 章は論文提出者が全て主体的に行ったものであり、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。