

## 論文審査の結果の要旨

杉本 薫

杉本氏はツメガエルの初期発生の中で、形づくりのセンターとなる脊索形成に関与する遺伝子の探索の中で、細胞周期調節因子 *XBtg2* をクローニングし、その解析を多角的に行った。*Btg2* (*B cell translocation gene2*)/*PC3*/*TIS21* は、培養細胞における研究から神経細胞の増殖抑制や細胞分化に関与する機能をもつことが示唆されているが、ノックアウトマウスではこれらの機能に関する影響は見られず初期発生における役割はいまだ明らかにされていない。

まず、杉本氏は第一章で *XBtg2* の単離及び脊索における解析を行っている。そのために、胞胚期の未分化細胞であるアニマルキャップをアクチビン処理することによって、試験管内で脊索組織を単一に誘導する実験系を用いた。この系を用いて、分化過程の脊索に発現する遺伝子の探索を行い、*XBtg2* を単離した。*XBtg2* の発現様式を解析した結果、*XBtg2* は脊索、神経、体節など分化過程のさまざまな組織に発現しており、特に尾芽胚期の脊索における発現が前後軸に沿って変化していることを明らかにした。次に、この *XBtg2* 遺伝子の翻訳を特異的に阻害する *XBtg2* MO (Morpholino antisense oligonucleotide) を用いて、脊索領域における *XBtg2* の翻訳阻害を行ったところ、*XBtg2* MO 注入領域の脊索細胞は、初期尾芽胚期 (stage 23) から細胞塊を形成し、その後発生段階が進んでも (stage 45) 空胞化しないことを明らかにした。*XBtg2* 翻訳阻害により形成された細胞塊の分化程度を調べるために、細胞塊における脊索分化マーカーの発現様式を検討した。その結果、初期の脊索に発現する遺伝子群 (転写因子 *Xnot*、分泌因子 *chordin*、細胞外マトリックス因子 *collagen type II*) は MO 注入領域においても、対照としている MO 非注入領域と同様の発現様式を示した。一方、後期の脊索に発現する細胞外マトリックス因子 (Tor70, 5-D-4 の抗原タンパク) は MO 注入領域においては発現が認められなかった。このようなことから、*XBtg2* は、脊索細胞の分化運命決定には関与しないが、空胞化を含む脊索細胞の後期分化に必須の因子であることを明らかにした。

次に第二章では、*XBtg2* の神経における解析を行った。*XBtg2* の神経領域における発現は、中期神経胚期 (stage 15) より前方神経外胚葉の縁と神経堤領域に認められた。前方神経領域において、MO による *XBtg2* 翻訳阻害を行ったところ、目の形成が阻害された。次に、*XBtg2* の翻訳阻害が発生過程の神経領域に影響を及ぼす時期と部域を特定するために、*XBtg2* MO 注入胚における神経遺伝子の発現様式を調べ、*XBtg2* 翻訳阻害により、初期神経遺伝子 *zic3*、*soxD* の発現の変化が中期神経胚期以降観察された。また、中期神経胚期において、前方神経遺伝子 *Otx2*、*En2*、*Rx1* の発現の抑制が観察され、一方、神経堤遺伝子 *snail*、*slug*、表皮遺伝子 *XK81* の発現には変化が認められなかった。これらのことから、*XBtg2* は神経の誘導及びその領域の決定には関与しないが、中期神経胚期以降の前方神経外胚葉の分化に必要な因子であることを明らかにした。更に *XBtg2* 注入胚における細胞分裂とアポトーシスの検出を行ったところ、中期神経胚期の前方神経外胚葉において細胞分裂、アポトーシスの増加することを明らかにした。

以上のように、杉本氏は *XBtg2* 遺伝子の全長クローニングを行って、脊索形成との関わり合いを明らかにし、又、神経形成にもこの遺伝子が深く関与していることを示した。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。