

論文審査の結果の要旨

氏名 乾 雅史

本論文は 2 章からなる。第 1 章では心循環器に発現する新規の遺伝子で自ら命名した”Ami” 遺伝子のクローニングと発現を示した。第 2 章では、循環器形成に伴っての X アペリン遺伝子と Xmsr 遺伝子の機能解析について述べられている。

第 1 章において、乾氏は DNA マイクロアレイの手法を用いてアフリカツメガエルの循環器系組織において発現する新規遺伝子を探索した。

Stage 12.5 (後期原腸胚)、20 (後期神経胚)、26 (尾芽胚) のツメガエル胚を外科的に予定心臓血管領域とそれ以外に切り分け、それぞれから RNA を抽出してプローブを作成した。これらのプローブを *Xenopus* 8k マイクロアレイにハイブリダイズさせて遺伝子の発現を比較した結果、予定心臓血管領域における発現量がそれ以外の領域よりも 2 倍以上高い遺伝子を 172 見出し、そのうち既知の配列との相同性の低い 15 遺伝子の部分配列を単離した。Whole-mount *in situ* hybridization (WISH)法によりそれらの遺伝子の発現領域を検討した結果、そのうち 3 遺伝子が発生過程の循環器系の組織で明らかな発現を示した。この 3 遺伝子の中で最も興味深い発現パターンを示した遺伝子について、論文提出者はその尾芽胚期における発現パターンから *Ami* と命名し、詳細な発現パターンと発生における役割について解析した。発生過程の *Ami* の mRNA は神経胚の前方腹側及び沿軸領域、尾芽胚期の前方腹側領域に発現し、幼生期には形成過程の血管に沿った発現が観察された。この幼生期の血管に沿った発現はこれまでに知られているいずれのマーカージ遺伝子よりも明瞭であり、この遺伝子の発現パターンから血管形成の前方から後方への経時的な進行や、腹側における左右非対称性を観察することができた。

第 2 章においては、アフリカツメガエル胚において最も早期から発現する血管マーカーとして知られているにもかかわらずその機能が不明であった *Xenopus mesenchyme associated serpentine receptor (Xmsr)* に着目し、そのリガンドである *Xapelin* とともに発生における役割を解析した。

今まで未同定であったツメガエルの *apelin (Xapelin)* を単離し、その mRNA の発現パターンを *Xmsr* のものと比較した。今回単離した *Xapelin* の mRNA は母性因子として存在し、胞胚期以降にその発現量が増加した。WISH 法により空間的発現パターンを観察したところ、神経胚期以前の空間的発現パターンを特定することは困難であったが、尾芽胚期以降の発現領域は *Xmsr* mRNA の発現領域と重なるあるいは隣り合うものであった。このことは今回単離した *Xapelin* が発生過程において *Xmsr* とリガンド - 受容体の関係にあることを示している。

発生過程における *Xapelin*、*Xmsr* の役割を観察するため、合成した *Xapelin* の mRNA を卵割期の胚に顕微注入した。その結果、stage 45 のオタマジャクシ胚において浮腫の表現型が見られ、またこれらの胚における心臓の構造はコントロール胚に比べて未発達であり、拍動の頻度、強度ともに減少していた。神経胚期において血管前駆細胞マーカーである *XIFli* や血球前駆細胞マーカーである *XSCL* の発現領域の拡大が観察されたが、心筋前駆細胞マーカーである *Nkx2.5* の発現には変化が見られなかった。また、尾芽胚期において心筋マーカー *Cardiac Troponin I (cTnI)* の発現を観

察したところ、本来胚の中心線上で融合しているべき左右の心臓原基が左右に分かれており、融合の過程に遅延があることが示された。このことがオタマジャクシ期における心臓形成不全を導いていることを示した。

MO を用いて内在性の Xapelin、Xmsr の機能を欠損させた胚を観察した。Xapelin MO (aMO)、Xmsr MO (mMO) を顕微注入した胚では過剰発現の際と同様オタマジャクシ期において浮腫及び心臓の形成不全の表現型が見られた。これらの表現型は aMO と mMO に共通しており、また二つの MO の顕微注入には相乗効果が見られたことから、Xapelin と Xmsr が同じ経路で機能していることを示した。また、これらの胚では神経胚期において *XIFI* の発現が、尾芽胚期において *cTnI* の発現が低下しているという過剰発現とは異なる結果が得られた。

また、Xmsr の下流で働く G 蛋白質を同定するため、mMO の顕微注入による浮腫の表現型を *i/o*, *s*, *q/11*, *12/13* の 4 つのファミリーの G 蛋白質 α サブユニット ($G\alpha$) の共注入によってレスキューすることを試みた。その結果、*i/o* タイプの $G\alpha$ によって mMO の影響が高い確率でレスキューされたことから、Xmsr の下流では *i/o* タイプの $G\alpha$ がシグナルを伝えていることが示された。

新規遺伝子 *Ami* の同定や、血管、血球と心筋の分化に G 蛋白質シグナルが関与すること、またそれらの分化が相互に関係していることへのデータおよび研究結果は、ツメガエルにおける循環器形成に新しい知見を加える物である。

尚、本論文の第 1 章は浅島誠、第 2 章については福井彰雅、伊藤弓弦、浅島誠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、論文提出者の寄与が充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。