

論文内容の要旨

論文題目

Molecular Analysis of a Novel Gene “*Dullard*” in Neural and Pronephros Development of *Xenopus laevis*

(アフリカツメガエルの神経および前腎形成における新規遺伝子 “*Dullard*” の分子生物学的解析)

氏名 佐藤 礼子

私は主にアフリカツメガエルを用いて初期発生における新規遺伝子の機能解析を行った。神経及び前腎に発現する遺伝子として単離された新規遺伝子 (*Dullard* と命名した) について主に研究を行い、この遺伝子の神経および前腎形成における役割を解明することを目的として研究を行った。

当研究室において、前腎領域に発現する遺伝子のスクリーニングがおこなわれ、いくつかの新規遺伝子が単離された。その内の一つであり、前腎領域および神経領域に発現が認められた新規遺伝子 (*Dullard*) について解析を行うことにした。私はまずブランクハイブリダイゼーションスクリーニングにより *Dullard* の全長配列を決定した。データベース検索を行ったところ、この遺伝子の C-末端側は保存されたホスファターゼドメイン及びホスファターゼの活性中心が存在することが明らかとなった。相同性検索の結果、機能の未知なホモログがヒト、マウス、ハエ、線虫において存在しており、ヒト、マウスのホモログとはアミノ酸レベルで92%と非常に高い相同性を示した。

RT-PCR 法および全胚ハイブリダイゼーション (WISH) を行い、アフリカツメガエル初期胚における *Dullard* の時間的、空間的発現パターンを詳細に調べたところ、*Dullard* の転写産物は未受精卵から恒常的に存在し、神経胚期までは胚全体に、神経胚期になると神経領域に、尾芽胚期になると神経領域、さい弓、前腎に局在していた。

発生過程における役割を調べるために、アンチセンスモルフォリノオリゴ (Mo) による機能阻害実験を行った。アンチセンスモルフォリノオリゴ (Mo) は mRNA の翻訳開始点付近に結合するこ

とで、その翻訳を阻害する。*Dullard* 特異的 Mo を設計し、微量注入したところ、神経分化マーカー遺伝子の発現が減少するなど、神経組織に異常が見られた。このことより *Dullard* は神経形成に関与することが示唆された。

次に *Dullard* の作用機構についての解析を行った。予定外胚葉領域に *Dullard* mRNA を微量注入し、その領域を切り出して RT-PCR を行った(アニマルキャップアッセイ)結果、*Dullard* の過剰発現により初期神経遺伝子の発現が上昇していることが分かった。アフリカツメガエルの正常胚では予定外胚葉領域において BMP シグナルが阻害されることによって神経誘導が起こることが知られている。したがって私は BMP シグナルの抑制に *Dullard* が関与しているのではないかと推測した。

アニマルキャップアッセイを行った結果、*Dullard* は BMP シグナルを負に調節することが示された。BMP4 を過剰発現させることで誘導される BMP ターゲット遺伝子の発現が、*Dullard* を過剰発現させることで抑制されたからである。さらにその活性には *Dullard* の持つホスファターゼモチーフが重要であることが分かった。ホスファターゼモチーフに変異を入れたコンストラクトでは BMP シグナル抑制能力がなく、さらに *Dullard* のドミナントネガティブ型として作用した。

BMP シグナルは、リガンドである BMP が細胞膜に局在する BMP 受容体(タイプ I とタイプ II)と結合するとキナーゼドメインをもつタイプ II 受容体がタイプ I 受容体をリン酸化し、その結果活性化されたタイプ I 受容体が細胞内に存在する Smad1/5/8 をリン酸化し、このリン酸化 Smad1/5/8 が核内に移行してターゲット遺伝子の発現が誘導される。どの段階で *Dullard* が作用しているのかを調べるため Western 解析を行い、BMP シグナルの細胞内メディエーターである Smad1/5/8 のリン酸化について調べた。その結果、*Dullard* は Smad1/5/8 のリン酸化を減少させていることが明らかとなった。*Dullard* のこの作用は哺乳類の培養細胞においても同様であることを免疫染色および Western 解析を行い確認した。この活性にも *Dullard* の持つホスファターゼモチーフが必須であった。対照として、アクチビンによって誘導される Smad2 のリン酸化についても検討したが、*Dullard* は Smad2 のリン酸化状態に対しては変化を及ぼさなかった。さらに解析を進めたところ、constitutive active 型の BMP タイプ I 受容体の過剰発現による Smad1/5/8 のリン酸化は *Dullard* の存在下においても減少しないことが分かった。これらのことと *Dullard* が細胞質内に存在していることを加味すると *Dullard* はレセプターレベルで BMP シグナル経路に関与していると推測できる。実際、これらの実験を行う中で私は *Dullard* の過剰発現により BMP レセプターの存在量が減少していることに気がついた。このことをさらに検証した結果、*Dullard* は Activin type II レセプターの存

在量には変化を与えなかったが BMP typeI レセプターおよび BMP typeII レセプターの存在量を減少させた。このことから Dullard は BMP レセプターの存在量を減少させることで BMP シグナルを負に調節していることが示唆された。

さらに Dullard がホスファターゼであることを広範囲の基質である p-nitrophenyl phosphate を用いてホスファターゼアッセイを行い確認した。これらのことから Dullard はホスファターゼとして機能し、BMP シグナルの調節に関与しているということが示唆された。

次に、実際の胚発生においても Dullard が BMP シグナルの制御因子として働いているか確かめるため Dullard の機能阻害後、BMP ターゲット遺伝子の発現の変化を観察した。その結果、*Dullard* の機能阻害により BMP ターゲット遺伝子の発現が上昇していることが確認された。さらに初期神経遺伝子の発現についても検討したところ、これらの発現は減少していた。このことから、Dullard は BMP シグナルを負に調節することで初期神経遺伝子の誘導に関与していると考えられる。

今回一連の実験において私は *Dullard* と命名した新規遺伝子の単離と機能の解析を行った。哺乳動物にも高度に保存されているこの遺伝子がホスファターゼとして機能し、さらに初期発生を含め様々な生命現象に関与することが知られている BMP シグナルを負に調節することを明らかにした。

また、腎臓形成においても研究を行った。腎臓は発生過程において前腎、中腎、後腎と順に形成されていく。私はアフリカツメガエルにおいて前腎の形成について研究を行った。前腎は糸球体、細管、導管から成るが、導管は後期の腎臓の誘導に必須である。

私が *Dullard* の解析を行う中で、Dullard と Wnt シグナルとの関連を示唆する実験結果が得られた。しかしさらなる解析の結果、Dullard と Wnt シグナルの *in vivo* における関連は明らかにできなかった。私は *Dullard* と Wnt レセプターである *frizzled8* が前腎導管に強く発現していることに着目し、それらの機能解析を行った。Mo による機能阻害実験、WISH、抗体染色、切片観察などから Dullard および *frizzled8* が導管の分化、特に細胞の形態に影響を与えていることを明らかにした。