

## 論文審査の結果の要旨

氏名 佐藤 礼子

本論文は3章からなる。第1章では佐藤礼子氏がツメガエルから初めてクローニングし、自ら命名した遺伝子”Dullard”の性質と神経形成について述べ、第2章では腎臓形成における Dullard 遺伝子と frizzled8 遺伝子の役割について述べ、第3章では Dullard 遺伝子がホスファターゼであって、BMP シグナルを負に制御していることについて述べられている。

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。

第1章では、前腎領域に発現する遺伝子のスクリーニングを行い、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*) をとり、*Dullard* と命名した。まず、*Dullard* の全長配列を決定した。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。

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。

*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された。

次に予定外胚葉領域に *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、更に実験を進めた。これについては、第3章でふれる。

第2章では *Dullard* 遺伝子の腎臓形成における研究を行った。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。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。

佐藤氏は *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。

そこで、*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。*Dullard* と Wnt 系との関係も新しく見つけられたのである。

第3章では第1章の結果からの発展研究を行った。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 シグナルの伝達の中で、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* は Activin typeII 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ことを示した。

このように、佐藤氏は自ら *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とした。

なお、本論文の第1章はセン徳川、浅島誠、第2章はセン徳川、浅島誠、第3章は栗崎晃、浜崎辰夫、セン徳川、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。