

## 審査の結果の要旨

氏名 李 東輝

本研究は初期ツメガエル胚の前腎発生過程において重要な役割を演じる遺伝子を探索するために、whole-mount *in situ* hybridization screening 法を用い、初期ツメガエル胚の前腎に発現している遺伝子の単離及び同定を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. ツメガエルの神経胚の予定腎管域を材料に由来する cDNA ライブラリーの一部を、単鎖の cDNA プラスミドライブラリーに変換し、この単鎖の cDNA ライブラリーと stage 7 のツメガエル胚由来の mRNA の間でサブトラクションを行った。そして、得られたライブラリーをプレートに移して、シーケンスを解析した後、whole-mount *in situ* hybridization を行い、ツメガエル胚での発現様式を調べ、その結果 *XTRAP-γ* を単離した。
2. *XTRAP-γ* は新生タンパク質が細胞の膜を貫通する際に貫通用のトランスロコンに関連するタンパク質である。*XTRAP-γ* は 153 個のアミノ酸から構成され、4 つの膜貫通領域を持つ膜タンパク質であることが、マウスやラットの *TRAP-γ* の解析報告から判明している。*XTRAP-γ* は未受精卵の中にも存在し、ツメガエルの原腸胚の神経板中軸に局在が見られた。また、尾芽胚期ツメガエル胚の前腎細管域に発現の局在が確認された。
3. *XTRAP-γ* の前腎への作用を調べるために、*XTRAP-γ* の mRNA を合成し、初期ツメガエル胚に注入したが、注入されたツメガエル胚の発生に変化が見られなかった。ツメガエル胚では近年、遺伝子の機能欠損の方法として生体内でも安定なモルフォリノオリゴヌクレオチドの微量注入が行われている。このオリゴヌクレオチドを翻訳開始点より上流の 5'UTR 領域または翻訳開始点を含む領域に設計すると、遺伝子特異的な翻訳阻害が可能である。そこで *XTRAP-γ* の胚内での機能を解析するため、*XTRAP-γ* に対するモルフォリノオリゴヌクレオチドを作製した (*XTRAP-γ*MO)。このオリゴヌクレオチドをツメガエルの予定前腎領域に注入すると、ツメガエル胚の前腎形成が阻害され、前腎構造中の前腎細管の形成が強く抑制されることを確認した。
4. 浅島研究室では、ツメガエルの後期胞胚から切り出した予定外胚葉片 (アニマルキャップ) を、誘導因子であるアクチビンとレチノイン酸で処理する

と、アニマルキャップの中に前腎管が誘導され、機能も正常のツメガエル胚の前腎と同様であることが確認された。さらに前腎形成における役割を確認するために、*XTRAP-γ*MO を初期胚に注入し、アニマルキャップ誘導系を使って、前腎形成について検討した。その結果、ツメガエルのアニマルキャップの中に、前腎を誘導できなかつた。以上の結果から、*XTRAP-γ*の機能の維持は前腎形成に必要であることが示唆された。

5. さらに *XTRAP-γ*MO を予定前腎領域に微量注入した胚を前腎のマーカー遺伝子の whole-mount *in situ* hybridization で解析したところ、前腎のマーカー遺伝子である *Xpax-2* と *Xwnt-4* の発現の著明な減少が見られた。この結果から *XTRAP-γ*MO は *Xpax-2* と *Xwnt-4* の発現を阻害することによって、前腎形成を阻害すると考えられた。このことを確認するために、*Xpax-2* と *Xwnt-4* の mRNA を合成し、*XTRAP-γ*MO と一緒に初期胚の予定前腎領域に注入すると、*XTRAP-γ*MO による前腎形成の阻害が見られなくなった。推測したように *Xpax-2* と *Xwnt-4* の合成 mRNA によって、*XTRAP-γ*MO による前腎形成の阻害がレスキューされた。

以上、本論文は前腎形成の機構を解明するために、前腎形成関連の遺伝子 *XTRAP-γ* を単離した。そして、この遺伝子について解析の結果から、*XTRAP-γ* が前腎形成に必要不可欠であり、またこの遺伝子はマーカー遺伝子である *Xpax-2* と *Xwnt-4* を通じて、前腎形成に深く関与すると考えられた。そのことによって前腎形成の機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。