

審査の結果の要旨

氏名 長井 陽子

LIMドメインタンパク質 Ajuba は zinc finger 構造をもつ LIMドメインと核外移行配列を有するタンパク質で、細胞の増殖、移動、分化に関わることが報告されていたが、初期胚形成における役割は不明であった。「メダカ初期発生における LIMドメインタンパク質 Ajuba の機能解析」と題した本論文においては、初期形態形成の解析に有用な小型魚類メダカを用いて遺伝子発現抑制実験を行うことにより、Ajuba が内臓器官の左右性の決定に関与するクッパー胞上皮細胞の繊毛形成に重要な役割を果たすことを見出している。

1. Ajuba 発現抑制胚は内臓器官の位置異常を示す

発生期における Ajuba の機能を明らかにするため、*ajuba* 遺伝子を標的とした翻訳阻害型モルフォリノアンチセンスオリゴ (*augM0*) およびスプライス阻害型モルフォリノアンチセンスオリゴ (*spM0*) を野生型胚にそれぞれインジェクションした。Ajuba *spM0* および *augM0* 導入胚ともに、一部の個体において左右非対称な構造を示す心臓の逆転、胚の左側に形成される肝臓・脾臓の逆位が観察された。

2. Ajuba 発現抑制胚では左側特異的遺伝子の発現異常を示す

Ajuba の発現抑制によって内臓器官の左右位置異常が観察されることから、内臓器官の左右性を決定する左側特異的遺伝子 *southpaw* および *pitx2* に注目した。TGFファミリー遺伝子である *southpaw* は、胚の尾部に存在するクッパー胞（哺乳類のノードに相当）近傍で発現が認められ、時間経過と共に左側の側板中胚葉全体にシグナルが広がり、左側の側板中胚葉および間脳においてホメオボックス遺伝子 *pitx2* の発現を誘導することにより、内臓器官や脳の左右性が決定される。そこで、*southpaw* および *pitx2* に対するプローブを用いて *in situ* hybridization を行ったところ、本来左側特異的な *southpaw* および *pitx2* の発現が、Ajuba 発現抑制胚では胚の両側あるいは右側に異所発現を示した。これらの結果から、Ajuba は左側特異化遺伝子の左右非対称な発現を制御することが示唆された。

3. Ajuba 発現抑制胚において左向きのノード流は消失する

southpaw 遺伝子の左右非対称な発現は、クッパー胞内のノード流の方向性によって制御されることが知られている。そこでクッパー胞内に蛍光マイクロビーズをインジェクションし、ノード流の検出を行った。この検出法では、クッパー胞への物理的ダメージおよび蛍光日ビーズ注入量を最小限にすることで、ノード流および内臓器官の左右性に影響を与えないことを確認している。Control M0 導入胚ではビーズが右側から左側に移動し、左向きの動きが観察されるのに対し、

Ajuba 発現抑制胚に打ち込んだビーズは小刻みに動くが、左から右へのダイナミックな移動は観察されなかった。したがって、Ajuba はノード流の形成に必須であることが示唆された。

4. Ajuba 発現抑制胚のクッパー繊毛の長さは短縮する

ノード流はクッパー繊毛と呼ばれる運動性の繊毛が回転運動を行うことにより生じるため、Ajuba の発現抑制によって繊毛の形成に影響を与える可能性を検討した。繊毛マーカーであるアセチル化チューブリン抗体を用いて whole mount の免疫染色を行ったところ、Ajuba 発現抑制胚の繊毛は Control 胚と比べ短かった。Control 胚では平均 $3\mu\text{m}$ の繊毛が形成されるのに対し、Ajuba augM0 および spM0 導入胚では $2\mu\text{m}$ 以下の短い繊毛の数が増え、有意に短縮していることが明らかとなった。以上の結果より、Ajuba はクッパー繊毛の形成に必須であることが示唆された。

5. Ajuba は繊毛の土台となる基底小体に局在する

これまで Ajuba は M 期において中心体に局在することが報告されていたが、繊毛が形成される時期における Ajuba の局在は不明であった。繊毛は細胞周期依存的に形成される構造で、M 期において細胞分裂を制御する中心体が、 G_0/G_1 期に移行するとアピカル膜とドッキングして繊毛の土台となる基底小体となり、繊毛の構築を行うことが知られている。そこで G_0 期において Ajuba がどこに存在するか検討を行ったところ、Ajuba の一部が繊毛の土台となる基底小体に存在することが明らかとなった。この結果から、Ajuba は中心体だけでなく基底小体においても機能する可能性が示めされた。

本論文では、Ajuba の発現抑制により、内臓器官の左右位置異常が生じること、左側特異化シグナルが異所発現を示すこと、さらに、左右性を生み出すクッパー上皮細胞の繊毛が短縮することを明らかにした。また、繊毛が形成される G_0/G_1 期において、Ajuba が繊毛の土台となる基底小体に存在することを見出した。したがって、Ajuba は繊毛の形成制御を介して、器官の左右性の決定に関与することが示めされた。以上を要するに、本論文は、初期発生期における Ajuba の機能解析により、左右軸の決定という Ajuba の新規の機能を明らかにしたことに加え、繊毛形成機構の解明における有用な知見を提供しており、博士（薬学）の学位として十分な価値があるものと認められる。