

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 一木順二

一木順二君は「ツメガエルの腎臓由来のA6細胞の模擬微小重力環境下での遺伝子発現と形態形成」を行って下記のような優れた結果を得ている。

一木君は両生類のツメガエルの腎臓由来細胞株であるA6細胞を用いて、この細胞の持つドーム形成などの形態形成運動と遺伝子発現を重力との関係において調べたものである。また対照群としてはドーム形成を行わない肝臓由来のA-8細胞を用いている。その結果、下記のようなことを明らかにした。

今回の一木君の実験では細胞に対する重力による変化を細胞数の増減、位相差顕微鏡観察によるドーム形成などの形態形成の影響、RT-PCR法による遺伝子の発現変化を調べた。今回の研究では模擬微小重力をつくるために3D-クリノスタットという装置を用いた。3D-クリノスタットはお互いに直行する2軸の回転軸をコンピューター制御により3次元的に回転させることによって搭載されたサンプルの積算重力をゼロにし、地上で長時間にわたり微小重力環境を模擬的に実現できる装置である。3D-クリノスタットの回転制御方式として生成軌道制御方式という新しい3D-クリノスタットの回転制御方式を採用した。今回、一木君が明らかにした第一の点は3D-クリノスタットによる模擬微小重力環境下での培養は満液化した液体培地で行われた。ここで問題となるのが液体培地の流動による細胞成長やドーム形成などの形態形成への影響である。そこで一木君が独自に考案したスターラーバー内蔵型液体培地人工流動システムによって、この液体培地の流動の影響を調査した。地上鉛直下向き1G環境を維持したまま、満液化プラスチック下面に付着細胞、上面にスターラーバーが来るようにスターラーを逆さまにして固定し、10mmのスターラーバーを120, 240, 480 rpmで回転させ、10日間培養した。その結果、120, 240, 480 rpmのいずれにおいても有意な細胞増殖への影響は認められず、その後のドーム形成においても影響は認められなかった。A6細胞の模擬微小重力環境下培養では地上1G対照群と比較して有意な細胞数の減少、および著しいドーム形成の阻害が認められた。また、A6細胞の模擬微小重力環境下培養では地上1G対照群と比較して有意な細胞数の減少が認められた。A6細胞の過重力7G環境下培養では地上1G対照群と比較して細胞数の増加傾向が認められた。ドーム形成については地上1G対照群と比較して促進傾向が認められた。遺伝子発現では地上1G対照群のドーム形成期に発現が増加し、ドーム形成の著しい阻害が認められた模擬微小重力群では発現が低下、ドーム形成の促進が顕著な過重力7G群で発現が増加した。それらの過重力によって増加する遺伝子として、細胞増殖のみならず形態形成に重要な多面的機能因子であるHGFファミリー遺伝子、細胞膜を介した Na^+ 及び K^+ の輸送に重要な $\text{X Na}^+, \text{K}^+-\text{ATPase}$ 、アミロライド遮断性 Na^+ チャネルのチャネル開口

率を制御するXCAP1 (*Channel activating protease 1*)の遺伝子群の活性化がみられた。このことから、模擬微小重力環境下でのドーム形成の阻害はアミロライド遮断性Na⁺チャネルのチャネル開口率を制御するXCAF1及びX Na⁺, K⁺-ATFaseの遺伝子発現の低下により、ドーム形成機構の行程が阻害されたために起きたためと考えられた。一方、過重力環境下でのドーム形成の促進はXCAF1及びX Na⁺, K⁺-ATFaseの遺伝子発現の増加により、ドーム形成機構が促進されたために起きた可能性が考えられる。さらに、模擬微小重力環境下での細胞成長の抑制及び過重力7G環境下での細胞成長の促進について主要な細胞成長因子を調べたところ、重力変化に伴って細胞増殖のみならず形態形成に重要な多面的機能因子であるHGFファミリー遺伝子の発現が変化していることを示した。

第2の成果はA6細胞と腎臓で発現が認められ、A8細胞で発現が認められない既知遺伝子群として、上皮性アミロライド遮断性Na⁺チャネルのチャネル開口確率を制御するXCAF1, Xms-actin, XENaC-alpha subunit, Xc-fos protooncogene, 尾芽胚のセメント腺特異的なXnp77が得られた。一方、A8細胞で発現が認められ、A6細胞で発現が認められない既知遺伝子としてXlimが得られた。ここでドーム形成及び重力レベルの変化に伴ってA6細胞で発現が変化する遺伝子群のうち、胚における発現時期や発現場所などが明らかとなっていない遺伝子群についてstage PCR法及びDIGラベルプローブを用いたホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法による解析を試みた。既知遺伝子としてXCAP1、新規遺伝子としてXHP-2-9について調べた。XCAP1は母性由来でmRNAとして存在し、原腸陥入の進行と共に減少し、ステージ10あたりから微かに発現が始まり、神経胚にかけて発現が増加し、その後はオタマジャクシに至るまで発現を示すことが分かった。さらに一木君が新しく見つけた新規遺伝子XHF-2-9のクローニングを行った。得られたcDNAの配列は2730bpで、861アミノ残基をコードする2583bpのORF配列をもつことがわかった。その後のホモロジー配列解析では相同性の高いホモログは検出されなかった。XHF-2-9は母性由来でmRNAとして存在せず、ステージ16あたりから微かに発現が始まり、後期尾芽胚に至るまで持続的な発現を示すことが分かった。ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションにより発現の分布状況を確認した結果、XHP-2-9は神経胚期には局在がみられないものの、後期尾芽胚では頭部及び腎臓域に局限した発現を示すことが分かった。

このように一木君はA-6細胞を用いて、重力とドーム形成を中心として細胞学的観察から遺伝子発現まで行って、それらの因果関係を明らかにすると共に、新規の遺伝子のXHF-2-9をクローニングし、その発現様式を明らかにした。

これらの研究の成果により審査員全員の評価を得た。よって本論文は博士（学術）の学位請求論文として合格と認められる。