

## 論文の内容の要旨

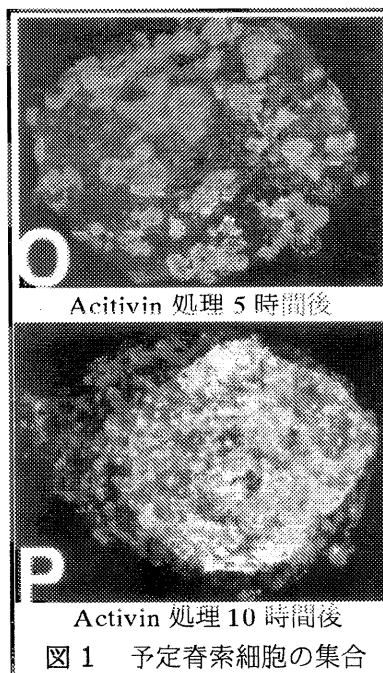
### Changes in the adhesive properties of *Xenopus laevis* pre-notochord cells

論文題目 ツメガエル予定脊索細胞における細胞接着性の変化

氏名 黒田裕樹

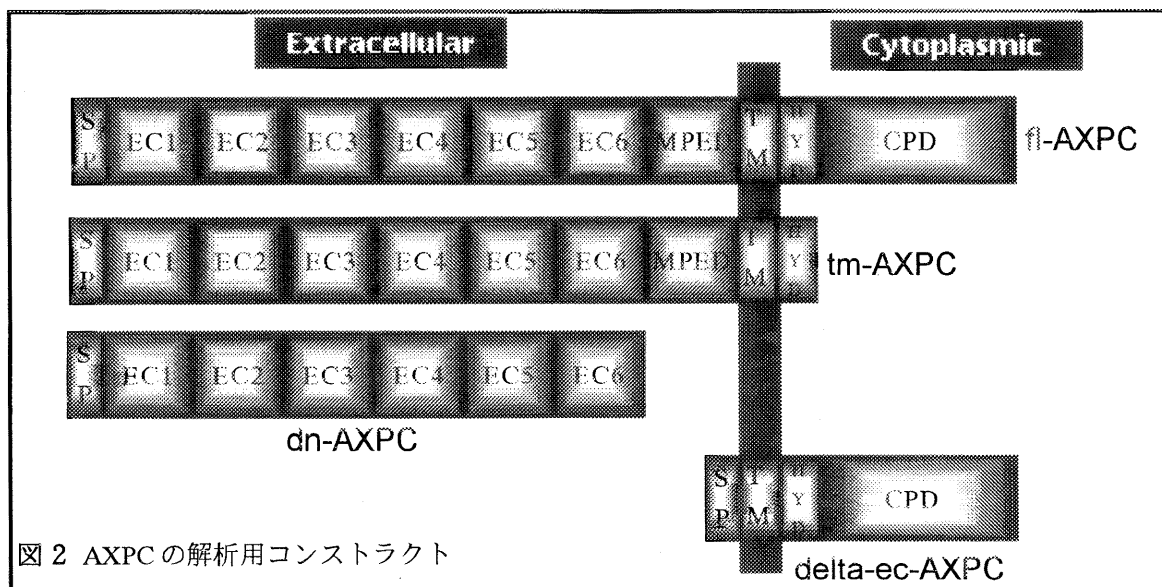
脊椎動物の初期発生に非常に重要な役割を持つ脊索の形成過程に関する報告は多数存在するが、未解明な点も残されている。特に「予定脊索細胞が集合機構」についての報告は少ない。

我々はまずツメガエルを実験動物に用いて予定脊索細胞が集合する様子を *in vitro* で再現することに挑戦した。まず予定脊索細胞だけを胚から分離することは技術的に困難であるため、特別な誘導系を作成し予定脊索細胞のみを分離する方法を検討し、「ツメガエルの胞胚期の予定表皮領域の解離細胞に対して中胚葉誘導因子 Activin A (濃度 1 ng/ml) で処理する」ことが予定脊索細胞だけを得る至適条件だと判定した。この予定脊索細胞を蛍光色素で標識し、予定表皮細胞または予定内胚葉細胞らと混ぜ合わせた再集合体を作成して培養した結果、アクチビン処理後約 5 - 10 時間の間に集合が行われた (図 1 の白い細胞)。この Time-course は *in vivo* で実際に脊索が形成される時間に準じている。また予定脊索細胞が強い集合能を持つことを初めて示したことになる。



しかし、次の疑問が生じた。「予定脊索細胞の集合に関わる細胞接着因子は何なのか?」。我々はいくつかの実験や文献を通して、その有力な候補として Axial protocadherin (AXPC) を挙げた。この分子は

他のグループによって、その断片配列が分離され脊索特異的に発現することが示されていた(文献1)。我々は断片配列を参考に原腸胚の cDNA library に対して Screening を行い AXPC の全長 (5644 bp, 1001 aa) を分離した。この分子は N 末よりシグナルペプチド (SP)、6 つの細胞外領域 (EC1-6)、細胞外基部領域 (MPED)、膜貫通領域 (TM)、水溶性領域 (HYD)、細胞内領域 (CPD) から構成されていた。そして次の実験結果から「予定脊索細胞は AXPC を用いて集合している」との結論を得た。結果 1) 細胞内のシグナルを削った tm-AXPC (SP, EC1-6, MPED, TM, HYD から成る) を強制発現した細胞は脊索と同じ接着性を持った。結果 2) tm-AXPC を *in vivo* で強制発現させると、脊索周囲の組織の細胞が脊索と同じ接着性を獲得した。結果 3) 分泌型つまり dominant negative 型にさせた dn-AXPC (SP, EC1-6 から成る) は脊索細胞が集合するのを阻害した (図 2 参照)。



さらに全長クローンを強制発現させると細胞集合と共に多くの細胞が死亡することが判った。我々は細胞内に Toxic なシグナルが存在することを想定し、細胞内だけのクローン delta-ec-AXPC (SP, TM, HYD, CP から成る) を作成した。delta-ec-AXPC を強制発現させたところ、胚は stage 13-14 あたりで Apoptosis して死亡することが判った。脊索領域の周りでは Apoptosis が検出されることが知られており、脊索領域に集合できなかった細胞が AXPC の細胞内シグナルによって自殺しているのかもしれない。

AXPC は既にヒト (Protocadherin-1, 文献 2)、マウス (我々が分離, data not shown) にも存在することが確認されている。脊椎動物にとって脊索形成は正常発生に必須な現象であり、AXPC はそれを直接的に支配する分子である可能性が高い。

文献 1) Kim, S. H., *et al.*, *Development* **125**, 4681-4690 (1998)

文献 2) Sano, K., *et al.*, *EMBO J.* **12**, 2249-2256 (1993)