

論文審査の結果の要旨

論文提出者名 黒田 裕樹

黒田 裕樹君は「ツメガエル予定脊索細胞における細胞接着性の変化」の研究を行って、下記のような優れた結果を得ている。

黒田君は大きく分けて2つの成果を得ている。その第一番目は「ツメガエル予定脊索細胞が強い集合能力をもつことを直接示した」ことであり、第二番目は「予定脊索細胞の集合能力は接着分子 Axial Protocadherin によることを明らかにした」ことである。

第一番目の成果についての詳細を述べる。彼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。予備実験として、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。それから、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ることを示した。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た。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った。

第二番目の成果についての詳細を述べる。第一番目の成果から「予定脊索細胞の集合に関わる細胞接着因子は何なのか？」という疑問が生じた。彼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。この分子は他の研究グループによって、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。彼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。AXPC は既にヒト、マウス (これも彼

自身が分離)にも存在することが確認されているが、いずれも未解析な状況であった。彼の実験結果からこの分子は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)から構成されていることがわかった。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。1つ目は、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、ことである。2つ目は、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、ことである。3つ目は、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、ことである。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。彼は細胞内に 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可能性が高いことが示されたことになる。

このように黒田君は、脊椎動物の初期発生にとって必要不可欠な現象である脊索形成について、そのダイナミックな動きが、実際に可視化するだけでなく、メカニズムまでも解明した。これは非常に大きな成果であり、かつ彼の実験技術の高さ、その背景に関する知見の多さ、高い考察力、粘り強く実験する忍耐力によって、このような難しい問題を解き明かすことに成功したといえる。そのため、彼の研究は審査員全員から非常に高い評価を得た。

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。