

## 論文内容の要旨

## 論文題目

Maternally preset program of apoptosis in *Xenopus* embryos.

アフリカツメガエル初期胚にセットされたアポトーシス・プログラム

氏名 甲斐 理武

アポトーシスは遺伝子レベルで制御された細胞死であり、真核生物の発生・分化や組織の恒常性の維持において必須な役割を果たしている。近年、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の初期発生において、卵割期に $\gamma$ 線の照射, hydroxyurea, cycloheximide,  $\alpha$ -amanitin などの薬剤による処理を行うと、中期胞胚変移 (MBT) 直後である初期囊胚期に特異的に、胚がアポトーシスによる細胞解離を起こし発生を停止するという現象が相次いで報告された (Stack and Newport, 1997; Anderson *et al.*, 1997; Sible *et al.*, 1997; Hensey and Gautier, 1997)。同様の MBT 直後に起こるアポトーシスについての報告は hydroxyurea, aphidicolin あるいは camptothecin によって処理したゼブラフィッシュ (*Zebra danio*) 胚においてもなされている (Ikegami *et al.*, 1999)。しかし、このような発生の早期に誘導されるアポトーシスの持つ意義についてはこれまであまり議論されてこなかった。それらの研究とは独立して、我々は S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素 (SAMDC) の mRNA をツメガエル初期胚に注入し、SAMDC を過剰発現させると、やはり初期囊胚特異的に細胞解離が起こり、発生停

止が起こることを見出した。特徴的なことに、注入する SAMDC mRNA の量を変動させても、発生停止の時期は囊胚初期に限られていた。また、SAMDC 過剰発現胚中では、SAMDC の基質である S-アデノシルメチオニン (SAM) が著しく減少し、さらにタンパク質合成が阻害されていることが分かった。

今回、私はまず、この SAMDC 過剰発現による発生停止がやはりアポトーシスによるのではないかと考え、この点を検討した。SAMDC 過剰発現胚の電子顕微鏡観察を行った結果、アポトーシスに特徴的なクロマチンの凝集や核の分断と考えられる像が認められた。SAMDC 過剰発現胚を TUNEL 染色により調べると陽性であり、DNA を抽出してゲル電気泳動を行うと「ラダー」状の泳動像が得られたことから、DNA がアポトーシス時にみられるような規則的な分解を受けていることが明らかになった。さらに、アポトーシス阻害分子である Bcl-2 の mRNA を SAMDC mRNA と共注入すると、囊胚初期における細胞解離は回避された。その時、注入する Bcl-2 の mRNA の量の増加に依存して、オタマジックンまで発生する胚の割合が増加した。以上より、SAMDC の過剰発現によって引き起こされる細胞解離は、アポトーシスによるものであると結論した。

次に、初期卵割期 (1~32 細胞期) のさまざまな時期の動物極側の一つの割球に SAMDC mRNA を注入する実験を行った (図 1)。1 細胞期あるいは 2 細胞期に注入を行った場合は、注入時期の差にかかわらず、すべての胚が同じ囊胚初期で発生を停止した。一方、注入時期が 8 細胞期以降であると、多くの胚が細胞解離を起こすことなく正常に発生した。これらの胚で SAMDC 活性を測定したところ、注入した割球の体積あたりに概算した活性は、mRNA の注入時期にかかわらずアポトーシスを引き起こすのに十分な値に上昇していた。そこで、8 細胞期の動物極側の一つの割球に SAMDC mRNA と GFP mRNA を共注入し、mRNA 注入を受けた細胞を GFP の蛍光により追跡した。その結果、SAMDC mRNA 注入胚

では胞胚期までは対照胚と同様に蛍光を発する細胞が細胞表面に広く分布していたが、初期囊胚期に至ると外見上蛍光が観察できなくなることが分かった。それらの胚のアニマルキャップを除去すると、蛍光を発する細胞は解離した状態で胞胚腔に集まっていることが判明した。さらに観察を継続すると、これらの蛍光を示す細胞はオタマジクシ期までに消失することが明らかになった。解離した細胞が胞胚腔に蓄積し消失していく様子は、胚切片の光学顕微鏡による観察によっても確認された。次に、SAMDC mRNA を 8 細胞期の予定腹側割球あるいは予定背側割球の一つにそれぞれ注入したところ、予定腹側割球に注入した胚からは尾部-腹側構造に異常を持つ胚が、予定背側割球に注入した胚からは頭部-背側構造に異常を持つ胚が、それぞれ高率で得られた。以上から、初期卵割期に SAMDC mRNA を受け取った細胞は、mRNA の注入時期にかかわらず常に胞胚後期で解離を起こし胞胚腔で消失すること、また SAMDC mRNA を受け取った細胞が少ない場合、胚全体は発生を継続することが明らかになった。

これらの結果に基づき、初期発生に関する以下のモデルを提案したいと考える (図 2)。受精卵は胞胚期まで速やかな卵割を繰り返したのち、細胞周期に初めて G<sub>1</sub> 期が出現する中期胞胚期でそれぞれの細胞が何らかの機構を使って自己の状態をチェックする。その結果、発生の継続に不適格と判断された細胞では、アポトーシスが誘導され、その細胞は利他的な細胞死により胚から除かれる。除かれる細胞が多い場合、胚全体が発生停止を起こし、死に至る。除かれる細胞が少ない場合、場合によっては除かれた細胞の性質を反映し奇形となるものの、残った細胞群は除かれた細胞を埋め合わせて発生を継続する。すなわち、初期囊胚に働くアポトーシス・プログラムは、正常な初期発生を監視し、不適切な細胞を取り除く fail-safe 機構として機能していると考えられる。

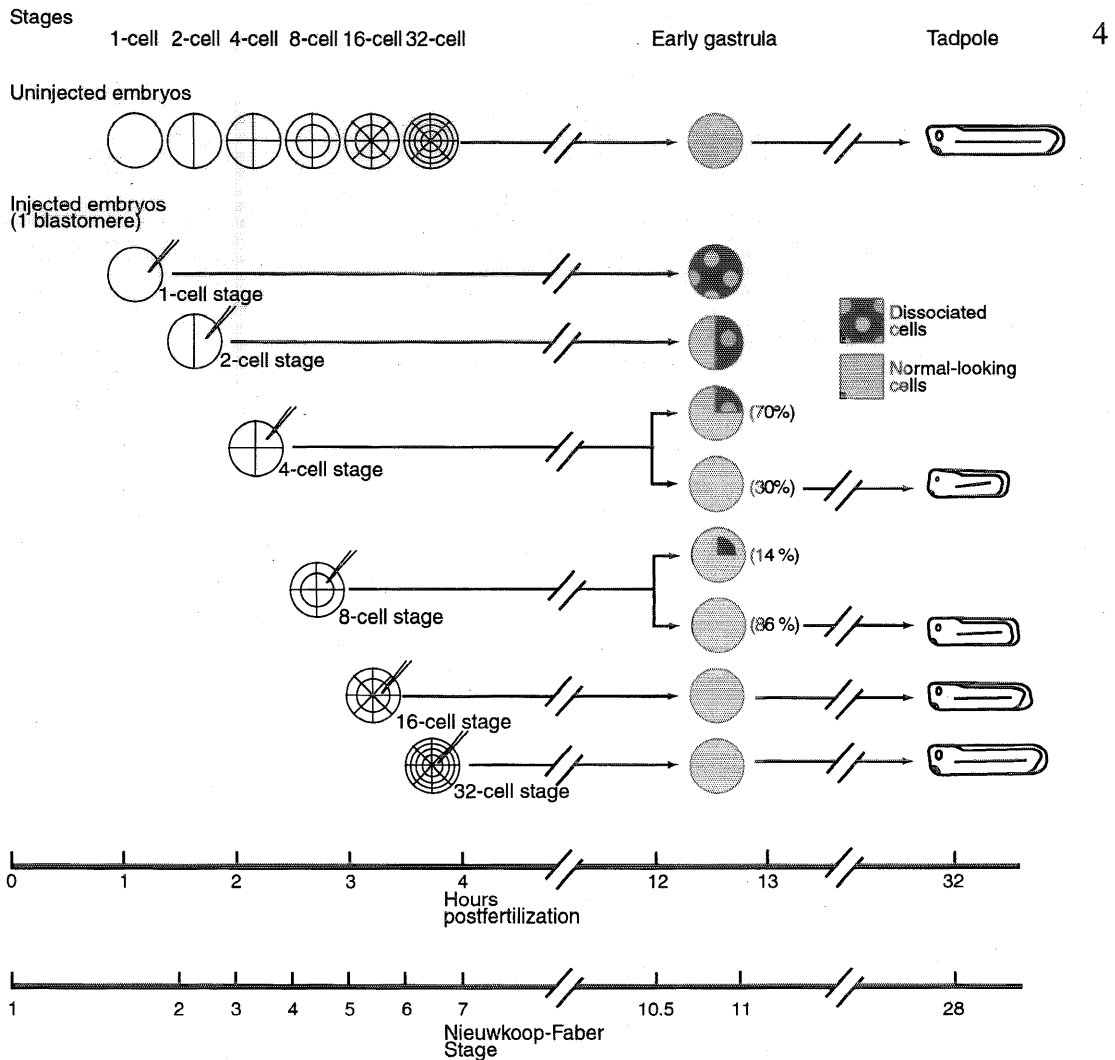


図1 卵割期の異なる時期に SAMDC mRNA を注入した実験のデザインと結果。

mRNA 注入は各ステージの動物極側の1割球に割球辺り 2 ng/μl となるように行った。1細胞期および2細胞期に注入を行った場合すべての胚が囊胚初期で発生を停止した。4細胞期、8細胞期で注入を行ったものは、それぞれ30%、86%の胚が囊胚を超えて発生を継続した。16細胞期、32細胞期に注入を行うと、すべての胚がオタマジャクシまで発生した。

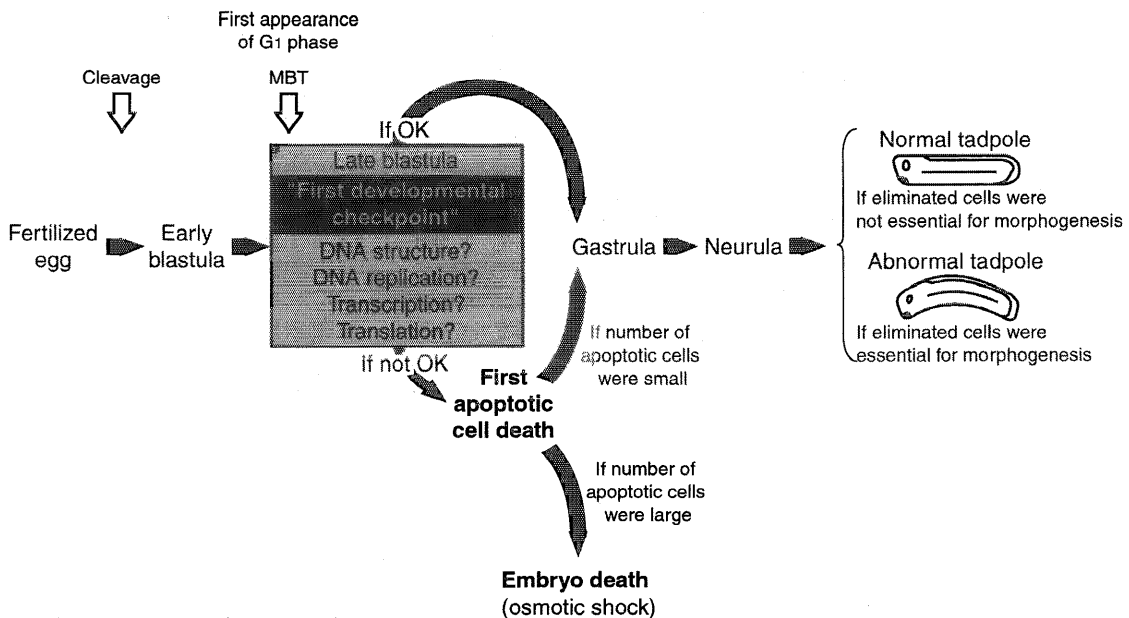


図2 初期発生の進行に関するモデル。

速やかな卵割を行う初期胚は、細胞周期に初めて G<sub>1</sub> 期が出現する中期胞胚変移 (MBT) 期においてなんらかの機構で細胞の状態をチェックし、障害のある細胞をアポトーシスによって胚から除く。除かれる細胞の数が少ない場合、胚全体は残った細胞を使って発生を継続する。