

論文審査の結果の要旨

氏名 甲斐 理武

本論文は2章からなり、第1章はS-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素 (SAMDC) の過剰発現が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・プログラムを活性化すること、第2章はそのアポトーシス・プログラムは発生における”fail-safe”機構と位置づけられるという仮説が述べられている。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。

まず第1章では、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、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に注目した。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。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、オタマジヤクシ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。

第2章では、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。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 注入胚では蛍光を発する SAMDC 過剰発現細胞は解離した状態で胞胚腔に集まり、そこでアポトーシスを起こすことが判明した。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、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 G₁ 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し、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という考え方を提示した。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。

なお、本論文第 1 章は肥後剛康，横須賀純一，垣内力，梶田恵理，深町博史，高山英次，五十嵐一衛，塩川光一郎との共同研究，第 2 章は垣内力，深町博史，高山英次，五十嵐一衛，塩川光一郎との共同研究であるが，論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので，論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって，博士（理学）の学位を授与できると認める。