

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 後原 綾子

本研究では、アフリカツメガエル初期胚を用いて、試験管内で高率に眼を形づくる実験系を確立することを目的として実験を行った。

アフリカツメガエル初期原腸胚の原口上唇部の誘導能調べた結果、初期原口上唇部は、後期胞胚から切り出したアニマルキャップに対して前脳やセメント腺などの前方の構造を誘導する能力を持つこと、側方帯域を含む領域とともに切り出したアニマルキャップに対して前方構造だけでなく脊髄やヒレなどの後方の構造を誘導することを示した。

側方帯域が及ぼす原口上唇部に対する影響を調べるため、初期原口上唇部と側方帯域を組み合わせて培養し、部位特異的神経のマーカ―遺伝子の発現を RT-PCR 法によって調べた。その結果、原口上唇部のみを単独で培養したときには終脳の遺伝子マーカ―*BF1* の発現のみが見られ、神経網膜層の遺伝子マーカ―*Pax6* および *Xrx1* の発現は見られなかったのに対し、原口上唇部と側方帯域を組み合わせて培養したときには、終脳の遺伝子マーカ―*BF1* の発現に加えて、前脳と中脳の境界領域の遺伝子マーカ―*En2*、後脳の遺伝子マーカ―の *Krox20*、脊髄の遺伝子マーカ―*HoxB9* の発現がみられ、神経網膜層の遺伝子マーカ―*Pax6* および *Xrx1* の発現も見られることを示した。

ここまでの知見から、眼の誘導の中心となる間脳領域を試験管内で誘導するためには、原口上唇部と、後方化の活性をもつ側方帯域の量をうまくコントロールしてサンドイッチ培養することが必要なのではないかという仮説を立てた。

初期原腸胚から前方神経を誘導する原口上唇部を切りだし、これを後方化の活性をもつ側方帯域の細胞と組み合わせてから、後期胞胚から切り出した 2 枚の無処理のアニマルキャップでサンドイッチ培養を行うことにより、試験管内で高率に眼をつくる事に成功した。

原口上唇部と側方帯域を組み合わせてサンドイッチ培養することにより、中枢神経系のうち、前脳、後脳、脊髄のどの領域が形成されているのかを調べるため、サンドイッチ外植体を 1 日培養し、部位特異的神経のマーカ―遺伝子の発現を RT-PCR 法によって調べた。その結果、原口上唇部のみをアニマル

キャップでサンドイッチ培養したときには終脳の遺伝子マーカーである *BF1* の発現のみが見られたのに対し、原口上唇部と側方帯域を組み合わせでサンドイッチ培養したときには終脳の遺伝子マーカー *BF1* の発現に加えて、前脳と中脳の境界領域の遺伝子マーカー *En2*、後脳の遺伝子マーカーの *Krox20* の発現が確認された。何れのサンドイッチ外植体においても、脊髄の遺伝子マーカー *HoxB9* の発現は見られなかった。このことから、原口上唇部と側方帯域を組み合わせでサンドイッチ培養することにより、眼の誘導の中心となる間脳周辺の神経が誘導されていることがわかった。

試験管内でつくった眼を4日間培養し、分化した組織を観察したところ、正常な眼と同じように、レンズ、神経網膜層、色素網膜層が分化しているのを確認した。

RT-PCR 法によって分化したレンズ特異的遺伝子マーカーである *beta-crystallin* の発現を確認することにより、本研究で確立した実験系でのみレンズをふくむ完全な眼が形づくられることを示した。

背側の神経網膜層で発現する事が知られている遺伝子 *Xvent2* および腹側の神経網膜層で発現する事が知られている遺伝子 *Xvax2* の発現場所を Whole mount *in situ* hybridization により調べることにより、試験管内でつくった眼にも正常な眼と同様にして背腹軸を持つかどうかを明らかにした。

試験管内でつくった眼に分化した眼の細胞があることを調べるため、抗ロドプシン抗体（視細胞）、抗クリスタリン抗体（レンズ）、抗グルタミン合成酵素抗体（ミューラーグリア細胞）を用いて抗体染色を行い、分化した眼の細胞があることを示した。

試験管内でつくった眼を、発生の進んだステージ33幼生に移植することは可能かどうかについて検討した。その結果、未分化細胞から試験管内で作った眼球は幼生に生着し、正常発生と同様に移植された場でレンズや網膜に分化し、変態を終えた後も移植された眼が生着し続けることを示した。

試験管内でつくった眼をステージ33の幼生に移植すると、移植した眼から幼生の間脳領域に向けて視神経を伸ばすことが観察された。この移植した眼から再構成された視神経を DiI の結晶（脂溶性の赤い蛍光色素）で染色することにより、視神経が幼生の脳の視蓋に正しく投射していることを示した。

試験管内でつくった眼が光を受容する感覚器官として機能するかどうか調べるために、外科的手術により両眼を除去した幼生に試験管内でつくった

眼を一つ移植し、これを飼育し、変態したカエルの体色を観察した。その結果、両眼を除去したあと移植を受けなかった場合は、眼からの光の刺激がないために、皮膚の色素胞が開いたままになり、黒いカエルとなったが、移植を受けたカエルは、移植した眼から光の刺激をうけとるため、外界の明るさに合わせて体色を変化させ、明るい体色のカエルとなった。このことから、試験管内でつくった眼は、移植後、光を受容する感覚器官として機能することを示した。

本研究により、ツメガエル初期胚を用いて初めてレンズ・神経網膜層・色素網膜層の全てが揃った眼を高率に形づくる実験系を確立し、さらに試験管内でつくった眼を発生が進んだステージ33の幼生に移植する事に成功し、試験管内でつくった眼が移植後、光を受容する感覚器官として機能することを示した。

したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。