

氏名	阿形清和 あがたきよかず
学位の種類	理学博士
学位記番号	論理博第899号
学位授与の日付	昭和60年3月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	Further detection of transcripts of crystallin genes in neural retina of chick embryos (ニワトリ胚神経性網膜におけるクリスタリン遺伝子の転写産物のRot解析法及びノーザンプロット法による検出)

(主査)
論文調査委員 教授 岡田節人 教授 高浪満 教授 柳田充弘

論文内容の要旨

1個の受精卵が分裂を繰返し、特有の形態と機能をもった組織を形成し、複雑な器官より構成された動物の個体を形づくる。動物のある種の組織の一部が損傷を受けたときに、再生と呼ばれている修復する機構が生物体に備わっている。特に、イモリの眼の水晶体は、その全組織が失われたときに、別の組織から再生されることが知られている。この現象は、種々の生物体の組織細胞を生体外の細胞培養系に移したときにも観察され、「分化の転換」と呼ばれ、多くの組織細胞にみられる。特に、ニワトリ胚の神経性網膜細胞から水晶体への転換は、その典型的な例として広く知られている。

申請者は、水晶体に特異的なクリスタリン mRNA を指標にして、この「分化の転換」の機構を、転写調節のレベルで調べた。水晶体に特異的なクリスタリン mRNA に対する1本鎖DNAプローブを得るために、poly A RNA を抽出し、 Cs_2SO_4 糖密度勾配遠心で純度約95%の δ -クリスタリン mRNA を得て、これを鋳型として、 ^3H ラベルされたcDNAを作製した。このプローブと、3.5日と8.5日目胚の神経性網膜細胞より得られたpoly A RNAを再会合させて、Rot解析を行った。両者のpoly A RNAの約0.0028%が δ -クリスタリンcDNAと会合しうることが判明した。このことは、水晶体に特異的に発現しているクリスタリン遺伝子が、他の初期胚の組織でも低頻度(1細胞当たり10~20分子程度)に発現していることを示唆している。

これまでに得られている知見では、組織特異的に発現している遺伝子の転写産物が、別の組織に存在することは知られていない。上記の事柄を、より正確にするために、遺伝子工学の手法でクローン化された δ -クリスタリンと α -クリスタリンcDNAを用いて以下のような、ノーザンプロット法で検討した。3.5日目胚の神経性網膜細胞より分離したpoly A RNAをアガロースゲル電気泳動で、RNAのサイズに応じて分離したのち、フィルターに固定し、 ^{32}P ラベルされた δ -クリスタリンcDNAをプローブとしてハイブリダイズさせた。成熟mRNAに相当する17Sのバンド以外に、より分子量の大きいRNAの位置にもいくつかのバンドが検出された。同様の実験を、 α -クリスタリンcDNAを用いて行った結果、成熟

mRNA のバンドは検出できなかったが、より分子量の大きい precursor RNA と思われるバンドが検出された。これらの DNA プローブを用いた、ニワトリ全 DNA のサザンブロット解析の結果は、 δ - と α -クリスタリン 遺伝子だけがハイブリダイズすることが知られているので、初期胚の神経性網膜細胞には、分化転換したのち形成される水晶体に特異的に発現している転写産物が、非常に少量ではあるが確かに含まれていると結論づけられる。

論文審査の結果の要旨

動物の発生の初期の胚の各部分は、将来、正常に発生を続ける場合の予定運命よりは広い予定能力をもっている。このことは、生物の発生現象における最も特徴的で、しかも基本的な性質である。この事実は、古典的な発生研究において、実験形態学的な手法を用いて繰返し確かめられてきたところであるが、どうしてそのようなことが起こるのか、その分子的な背景は全く明らかにされていない。しかし、1950年代の研究において、胚の各部分は成体においてそれに匹敵する部分よりは、じつは多様な蛋白質を少量ながら合成していて、これが広い予定能力の基礎になるのではないかと、という考え方があった。この考え方を、当時とは全く別の、より進んだ技術を導入しつつ検討したのが本申請者の論文である。

若いニワトリの胚では脳、網膜などの組織にはレンズに分化する能力のあることがすでに明らかにされている。レンズという組織細胞は形態的に際立った特徴があるだけでなく、その分子組成においても著しく他の組織とは異なっていて、特にニワトリにおいては、成体になるとレンズ以外には存在しない δ -クリスタリンと呼ぶ蛋白質が大部分を占めている。この論文の主題は、この δ -クリスタリンというレンズに特異的な蛋白質をコードする δ 遺伝子の活性が、胚においてもやはりレンズに限られるのか、それともレンズ以外の脳や網膜にもあるのか、という問題を分子間雑種の技術を駆使して検討することである。

得られた結果は、 δ -クリスタリンの遺伝子の転写活性は若い胚ではレンズに止まらず、ごく低くはあるが脳、網膜その他いくらかの組織にもあることを示している。しかし、発生が進むにつれてこの転写活性はレンズの部分に限られてくることになる。特に興味深いのは、レンズ以外の部分における転写産物は未成熟で、分子量の大きなメッセンジャー RNA であることを明らかにした点である。実際に δ -クリスタリンという蛋白へのほん訳可能な転写産物は、若い胚においてでも、レンズだけで作られることが示されたのである。

これらの結果は、発生生物学の方法と分子生物学の方法とを合一することによって初めて得られるものである。特にニワトリの若い胚から充分な量のサンプルを得ることは頗る困難であるが、申請者は技術的に熟達して信頼のおける結果を得ることに成功している。分子間雑種による実験結果の解釈を妥当なものとして判定された。

従って、この研究は発生生物学上の最も古典的で基本的な、広い発生能力という概念の分子的背景がどのようなものであるかをうかがう上で、重要な貢献をなしたものと考えられ、理学博士の学位を受ける価値のあるものと結論されるのである。

なお、主論文及び参考論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。