

氏名(本籍)	山本雅哉(千葉県)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	博甲第1,209号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	Studies on function of <i>Xenopus</i> thymosin β 4 in development (発生期におけるツメガエルサイモシン β 4の機能に関する研究)
主査	筑波大学教授 農学博士 村上和雄
副査	筑波大学教授 理学博士 平林民雄
副査	筑波大学教授 農学博士 祥雲弘文
副査	筑波大学助教授 農学博士 星野貴之

論文の要旨

発生現象を分子レベルで解析するためにアフリカツメガエル初期胚において発見されているペプチドをHPLCで調べたところ、原腸陥入以降増加するペプチドを認めた。原腸陥入期はダイナミックな形態変化と、その結果生じる神経誘導、心臓誘導から発生過程でも特に重要な時期と位置付けられている。このペプチドを単離し、その構造を決定したところ、43アミノ酸からなる、哺乳動物で報告されているサイモシン β 4と極めて相同性の高いペプチド(ツメガエルサイモシン β 4)であることが判明した。サイモシン β 4は、当初胸腺から単離され、リンパ球の分化に関与するホルモンとしての機能が想定されていたが、近年の研究により、様々な臓器に広く存在していること、また、シグナルシーケンスを持たないために分泌されずに細胞質に留まることなどから細胞内での機能が予測されていた。最近、血小板由来のアクチン結合因子、Fxがサイモン β 4と同一物質であることが明らかにされ、アクチンの重合調節ペプチドとしての機能も示唆されている。

精製したツメガエルサイモシンのアクチン結合能を調べたところ、ツメガエルサイモシン β 4もアクチンと1対1のモル比で結合することが確認できた。また、ツメガエルサイモシン β 4のcDNAを単離して塩基配列を明らかにしたところ、やはりシグナルシーケンスは存在せず、626bpのcDNAは転写開始のメチオニンを含む44アミノ酸のみをコードしており、前駆体ではなく活性型サイモシン β 4として翻訳されることがわかった。さらに、発生過程におけるサイモシン β 4の発現をノザンブロットングにより解析したところ、このmRNAは母性因子として未受精卵から存在し、原腸陥入期以降、特に神経形成期に蓄積することが明らかになった。

続いて、この神経胚期に増加するmRNAは、特定の器官形成に伴うものか、胚全体として発現が増

加した結果なのか、*in situ hybridization* 法により検討した。その結果、神経胚期に増加する mRNA は主として神経系組織に由来することを明らかにした。さらに尾芽胚以降の発生過程で知覚系の神経細胞に強い発現が認められることを示した。

ペプチドの存在を確認するために、免疫組織化学法による解析を試みた。サイモシン β 4 の C 末端より 28 残基のアミノ酸を合成し、KLH とコンジュゲートしたものを抗原としてウサキに免疫し抗血清を得た。吸収実験により抗血清の特異性を確認した後、免疫組織化学を行った。免疫陽性反応はまず尾芽胚期に第五脳神経節（三叉神経節）に現われ、発生が進むに従って知覚神経系を中心に神経系の他の部位にも認められるようになった。更に発生が進み前変態期に至ると運動神経系にも免疫陽性反応が認められた。変態後の個体で調べたところ、神経系における mRNA の発現、免疫陽性反応とも著しく低下しており、変態の間に発現が制御されることが明らかになった。さらに成体においては、腸間膜神経叢などを末梢に広く分布する神経組織とマクロファージに存在が認められた。また、神経細胞の内部で細胞体から、軸索などの末梢へサイモシン β 4 が移行する傾向がうかがえた。

これらの結果からツメガエルサイモシン β 4 は発生過程の神経系組織において、アクチンへの結合を介し、神経組織の形態形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

審 査 の 要 旨

近年分子生物学の著しい発展により、発生現象の分子レベルでの解析が盛んに進められている。この発生という高度にして複雑な生物の形成プロセスを、特定の分子と結び付けて考察する上で、形態学的な解析は重要で欠くべからざるものである。このような状況の中、新たにツメガエルサイモシン β 4 を発生過程で著しく発現する因子として同定し、おのおの発生段階において詳細に分布を解析し、神経系組織での特異的な局在、ならびにその消長を明らかにしたことは大変意義のあることと思われる。また、既に知られている他のサイモシン β ファミリーについてはほとんど組織学的な解析がなされておらず、組織抽出液を用いた実験が多くを占めている。その結果、サイモシン β ファミリーは広く成体内に分布すると考えられ、特異的な機能を予測することは困難であった。当論文の中では、成体においてツメガエルサイモシン β 4 が、末梢に広く分布する神経組織に、特異的に強く発現していることも明らかにし、元来のサイモシン β ファミリーに対する概念に一石を投じ、今まで不明瞭であった生理機能に迫るものとして高く評価すべきと思われる。

よって、著者は博士（学術）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。