

氏名・（本籍）	関 谷 國 男
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理 第 5 5 3 号
学位授与年月日	昭和 5 3 年 4 月 2 6 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
最 終 学 歴	昭和 4 4 年 3 月 東北大学大学院理学研究科 （修士課程）生物学専攻修了
学位論文題目	アフリカツメガエル細胞の細胞遺伝学的研究
論文審査委員	（主査） 教 授 樋 渡 宏 一 教 授 小 西 和 彦

## 論 文 目 次

- 第 1 章 序 論
- 第 2 章 アフリカツメガエル体細胞の核型分析
- 第 3 章 アフリカツメガエル株細胞の細胞遺伝学
- 第 4 章 アフリカツメガエル胚細胞の細胞遺伝学
- 第 5 章 論 議
- 第 6 章 要 約
- （ 謝 辞 ）
- （ 文 献 ）

# 論文内容要旨

## 第1章 序 論

ある種の動物の染色体に存在する2次狭窄部位は、核小体形成部域(NOR)であることが知られている。近年、染色体標本の上の染色体DNAと、ラジオアイソトープで標識した18S-28SrリボゾームRNA(18S-28SrRNA)とで、分子雑種を形成させた結果、染色体の上のNORの上で18S-28SrRNAシトロン位置が確認できた(Gallら, 1969)。一方、NORは、組織化学的な方法でも特異的に染色されるようになり(Howellら, 1975)、さらに、Millerら(1976, 1977)は、この染色法をヒトとマウスの融合雑種細胞に応用することにより、NORへの染色性と、18S-28SrRNA遺伝子の転写活性とが平行関係にあると論じている。

本研究は、アフリカツメガエルを用いて、まず細胞遺伝学解析の基礎となる体細胞の核型分析を種々のバンド染色法や、オートラジオグラフの手法を用いて行い、更に染色体構成に変異のみられる株細胞でのNORや2次狭窄の子孫への伝わり方、およびこれら二つの間の関連性を調べた。また、18S-28SrRNA合成を行っていない事が知られている胞胚期細胞の染色体からは、NORを特異的に染色するAgAS法(Goodpastureら, 1975)でNOR部位、即ち18S-28SrRNAシストロン部位が染色されるか否かを調べた。

## 第2章 アフリカツメガエル体細胞の核型分析

アフリカツメガエルは $2n=36$ の染色体数を持ち、それぞれの染色体は類似している。これらの染色体を1本1本固定するために、3種のバンド染色法と、後期DNA合成のパターンでそれぞれ染色体分析を行った。

Gバンド法からは、約半数、Cバンド法からは、全ての染色体で特徴のあるバンドを得た。したがって、Cバンド法によって大半の染色体を同定することができるようになった。NORを染めるAgAS法染色では、第12番目の染色体の短腕の2次狭窄部位のみが特異的に染められ、他の染色体は、染色されない。この事は、AgAS陽性によって、NOR(18S-28SrRNAのシストロン領域)を直接染色体地図に把握できることを示している。

染色体上の後期DNA合成像と、Cバンド染色像とは、ある程度対応していた。哺乳動物などで知られるような、染色体全体、あるいは染色体腕の単位でみられる後期DNA合成のパターンは、顕著ではないが、第6番目の染色体の長腕で観察された。

## 第3章 アフリカツメガエル株細胞の細胞遺伝子

長期にわたり培養されている種々の株細胞では、それぞれ染色体の変異が見られる。2次狭窄を

含む第12番目の染色体は、正常細胞に於ては特徴的であるが、A8細胞株に於ては、全く見られない。その上、正常細胞には全くみられない2次狭窄を含んだ染色体が存在し、これらは、6個の型に分けられ種々の組合せで広くA8細胞集団の中に分布している。

さらに、A8細胞の染色体上にAgAS染色を施すと、正常細胞では見られない、染色体の端部で、濃染されるものが多く観察され、A8細胞特有の2次狭窄は、染色されない。A8細胞のクローンを得てAgAS染色を行うと、クローン内ではほとんどの細胞は同じ型の2次狭窄を含む。また、AgAS染色陽性部位も同じく、クローン内では、同じ型が観察された。これらは共に偶発的に生じているものではなく、子孫に伝わるものと思われる。染色体の端部で染色されるこのA8細胞の染色体端部を詳細に観察すると、このAgAS陽性部位には小型のサテライトと思われるものが観察され、更に、この部分どうしてサテライト集合を起こす像が往々にして観察された。

これらの事から、A8細胞のNORは、元来存在していたNORとは別の形態を示し、複数個の決った染色体の端部に存在機能しているものと思われた。

#### 第4章 アフリカツメガエル胚細胞の細胞遺伝学

まず、アフリカツメガエルの発生初期胚から染色体標本を作製するのに、後のAgAS法処理の必要性などを考慮すると、自然乾燥法が必要となる。卵黄の多い胞胚からこの種の標本作成は例がなく、作成法を開発した。胞胚期の胚を用いた際の標本作成の要点は、解離割球を用いる；コルヒチン濃度を0.1%と高濃度のもを用いる；細胞に対する低張処理固定は全てスライドガラスの上でマイクロピペットの操作で行なうなどである。

得られた染色体標本を用いてギムザ染色および、AgAS染色を施した際、ギムザ染色に於ては、体細胞で顕著に出現する第12番目染色体の2次狭窄が認められなかった。AgAS法染色に於ては、約70個の観察での結果陰性であった。

#### 第5章 論 議

染色体の同定には、Cバンドが最も、各染色体の特徴をとらえていて明確であった。しかし個々の染色体に含まれるバンド模様は少ない為、染色体内に変異がおきると、同定しにくくなるであろう。

正常なNORを含む染色体(第12番目の染色体)が観察されないA8細胞株は、染色体構成に変異がみられ、AgAS染色陽性部分が染色体の端部に移って見える。

この端部には、小型サテライトが観察される場合があり、サテライト集合も観察されることがあるので、この部位にNORが存在し、機能していることが考えられる。

染色体の端部にNORがあり、機能している染色体がA8細胞の中には複数個の染色体で生じている。これは、もともと第12番目の染色体にあったNORが転座したとも考えられるが、元来18S

— 28 S r RNA シストロンは端部にもあり、機能の度合いが弱い、被覆されていて全く機能していない可能性がある。

18 S—28 S r RNA 合成を行っていないことが知られている、胞胚期細胞から得た染色体は2次狭窄が不明瞭であった。この時期の細胞では核小体も認められず 18 S—28 S r RNA 合成と平行して染色体に形態的な変化があると推測される。

胞胚期の染色体は、AgAS法染色で染色されなかったので Miller らの推測を支持する結果となった。しかし更に、胞胚期以後発生が進み 18 S—28 S r RNA 合成を行っている胚からの染色体での観察や、胞胚期ですでにこの r RNA 合成を行っている別種の動物の胚などの結果を得てから最終的な結論を出したい。

## 論文審査の結果の要旨

関谷國男提出の論文はアフリカツメガエルの染色体が初期発生の過程で、機能分化に伴って形態的な変化をおこすことを明らかにしたものである。まづアフリカツメガエルの各染色体を同定するため、幼生の細胞の初代培養を行い、種々の染色法で染色体を処理した。その結果G-バンド法では一部の染色体のみが同定できたにすぎなかったが、C-バンド法ではすべての染色体の同定が可能であった。またAgAS法では第12番目の染色体の二次狭窄のみが特異的に染められることがわかった。この部位は18S-28SrRNAの遺伝子部位であり、この染色法によって18S-28SrRNA部位が特異的に染められることが示された。次に確立した培養株細胞でも同様に種々の染色法を試みた。株細胞ではかなり染色体のみだれが見られ、特にAgAS法によって染められる部位が染色体の端部にある細胞も観察された。この株細胞からさらにクローニングを行って、その子孫をしらべたところ、AgAS濃染部位は比較的安定に子孫へ伝えられることが示された。

アフリカツメガエルの初期胚では18S-28SrRNAが合成されていないことが知られているが、この研究では初期胚の割球を用いて良好な染色体標本を得る方法を開発し、染色体分析を行った。その結果胞胚期の割球の染色体では体細胞の染色体で見られるような二次狭窄が認められず、またAgAS法で染められる部位も見られなかった。したがって、アフリカツメガエルの染色体では18S-28SrRNA合成の活性変化とともに形態的な変化が起きていることが示唆された。この成果は提出者が自立して研究活動を行うのに必要な高度の研究能力を有することを示すものである。よって関谷國男提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。