

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 野口立彦

本論文は2章からなり。第1章は*Xenopus*卵第一分裂の分裂溝伸長端でのアクチン細胞骨格について、第2章は*Xenopus*卵の分裂溝に沿って伝搬するCa waveと細胞質分裂について述べられている。動物細胞の細胞質分裂においては、細胞分裂の後期の終わりから終期にかけて、分裂面の表層にアクチンとミオシンからなる収縮環が形成され、その収縮により細胞が二つにくびり切れる。細胞質分裂の機構に関する主な未解決の問題として以下の2つが挙げられる。(1)収縮環はどのような過程を経て形成されるか?(2)収縮環形成シグナルの実体は何か? *Xenopus*卵の分裂溝は、動物極から形成され始め、その伸長端では収縮環構造が常に新しく形成されながら伸長し、植物極で二つの伸長端が融合して環状となる。提出者はこの伸長端に注目し、収縮環形成の過程を詳しく解析した。

第1章では上記の(1)について検討している。最初に、*Xenopus*卵の分裂溝伸長端でのF-アクチン構造の変化をローダミン-ファロイジン染色で明らかにした。分裂開始直後には、分裂溝に沿ってF-アクチンのバッチが形成される。分裂溝が収縮を開始する時期になると、その伸長端ではまずF-アクチンバッチが形成され、次いでこれらが複数つながった”短いアクチンバンドル”が形成される。分裂溝の中央部分では、収縮環構造の構成単位と考えられる”長いアクチンバンドル”が形成される。分裂溝伸長端でのF-アクチンバッチから長いアクチンバンドルまでの再編成の過程は、ローダミン-アクチンを顕微注入した生きた卵の分裂溝の経時観察により確認された。

次に、収縮環のF-アクチンが、分裂溝周辺の表層アクチンに由来するのか、あるいは分裂面で新たに重合したアクチンに由来するのかを検証している。小麦胚芽凝集素(WGA)を結合した蛍光ビーズを卵表面に付着させ、その動きを追跡した結果、分裂溝伸長端の周辺領域で分裂面への表層の移動が観察された。FITC-WGAとローダミン-ファロイジンで2重染色し、それぞれの蛍光強度変化を分裂溝の長軸に沿って比較すると、分裂溝の先端ではまず表層の集合が起きるが、F-アクチンは少し遅れて急激に増加し最終的には表層の倍の割合まで増加することが判明した。強拡大すると分裂溝では蛍光WGAで認識される無数の泡状の構造(WGA-bleb)が集合し、F-アクチンバッチはそのneck部分で形成され成長していることが観察された。よってF-アクチンバッチ形成において新たなアクチンの重合がおきていることが示唆された。

蛍光抗体法より分裂溝伸長端でのミオシン II の局在をF-アクチン構造と比較した。分裂溝の伸長端ではF-アクチンパッチ形成に先行してミオシンが集合してスポット(ミオシンスポット)を形成した。後にミオシンスポットと共局在してF-アクチンパッチが形成され、互いに共同しながらタンデムに並び、長くつながった収縮環構造を形成する様子が観察された。以上の結果から*Xenopus*卵の分裂溝伸長端では、まず分裂面に向かう表層の移動が起こり分裂溝上にWGA-blebが形成され、同時にミオシンスポットを形成される。少し遅れてアクチン重合を伴ってF-アクチンパッチが形成される。これが長く連なって収縮環構造が構築されていくという過程が考えられた。

第2章では、*Xenopus*卵の収縮環形成に、分裂溝に沿ったCa waveが分裂シグナルとして働くかどうか、以下の点について検討している。1) 分裂溝の伸長端でCa waveが観察されるか? 2) Ca waveを抑制した場合に細胞質分裂は影響を受けるか?

アルビノ*Xenopus*卵にCalcium Green-1を顕微注入し、第一卵割中の $[Ca^{2+}]_i$ の変化を動物極側から共焦点レーザー顕微鏡を使って経時観察した。ローダミン-WGAで分裂溝を標識した上でCaイメージングを行ったが、分裂溝の伸長端では $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は観察されなかった。第一卵割を通して、分裂溝に沿って2度のCa waveが観察された(wave 1とwave 2と命名)。分裂が進行し分裂溝に新生細胞膜が付加される時期になると、wave 1は新生膜の領域内に限って伝搬した。wave 2は細胞質分裂が終了した後に既存の細胞膜と新生膜の境界を縁取るように伝搬することが判明した。 $[Ca^{2+}]_i$ 変化を追跡しながらEGTA、あるいはdibromoBAPTAを顕微注入し、Ca waveを抑制しても細胞質分裂は阻害されなかった。よって*Xenopus*卵の卵割において分裂溝に沿ってみられる2つのCa waveは、いずれも細胞質分裂には関与しないと結論した。更に*Xenopus*卵において単一のCaチャンネルからのCa放出のイメージングを試み、このイメージングの系を用いて分裂溝の伸長端を観察したが、シグナルは観察されなかった。よって分裂溝の伸長端で、収縮環形成を誘導するようなCaシグナルは存在しないことが明らかになった。

なお本論文第1章は馬淵一誠との共同研究であるが、論文提出者が主体となって研究を行ったもので、論文提出者の寄与が充分であると判断する。従って、博士(学術)の学位を授与できると認める。