

論文の内容の要旨

論文題目 巻貝鏡像体のらせん卵割に関わる細胞骨格の研究

氏 名 柴崎 友一郎

軟体動物、環形動物、紐方動物の多くと扁形動物の一部は、らせん卵割と呼ばれる卵割をおこなう。らせん卵割の特徴は卵割で生じる割球が動植物軸に対して斜めに配置することであり、たとえば第3卵割では、動物極側に生じる4つの小割球が対となる大割球に対して動物極側から見て時計回り（右旋的）、または反時計回り（左旋的）にずれて配置する。軟体動物である巻貝の場合、この第3卵割の旋性と貝の巻型の旋性は一致することが知られている。

同一種内で右巻と左巻の正常体が存在する淡水産巻貝 *Lymnaea peregra*（和名：ソトモノアラガイ）の巻型は、母親の遺伝型のみ依存すること（遅滞遺伝）、単一または強く連鎖する複数の遺伝子によって決定されること、右巻が左巻に対して優性であることが知られている。さらに細胞質移植の実験により、第3卵割の旋性は右巻の1細胞期胚に含まれる母性因子によって制御されている可能性が示唆されている。この母性因子は卵割形態変化を司る細胞骨格系に関わるものであることが予想されて

いるが、その実体は未だ不明のままである。

当研究室は近年、*L. peregra* の近縁種である *L. stagnalis* (和名：ヨーロッパモノアラガイ) の右巻・左巻各系統の大量飼育に成功し、これにより巻貝の巻型決定機構の解明に対する様々なアプローチが可能となった。本研究で私は、これらの巻貝を用いて、卵割の旋性に関わると予想される細胞骨格動態や細胞骨格の構成因子について、細胞生物学的手法と分子生物学的手法を用いて解析をおこなった。

第一章では、*L. stagnalis* 右巻胚・左巻胚の第3卵割の旋性決定に関わる細胞骨格系の動態とその機能について解析をおこなった。

チューブリンの抗体染色や蛍光ファロイジン染色によって、第3卵割期の紡錘体の配向や細胞形態を観察したところ、右巻胚では分裂中期から分裂溝形成期までの間、紡錘体の右旋的な傾き (図 1a) と細胞境界面の右旋的な変形 (spiral deformation: SD; 図 1c) が見られたが、同時期の左巻胚は紡錘体の配向 (図 1b) と細胞形態 (図 1d) は中立性を保っていた。左巻胚の細胞形態にらせん性が生じるのは分裂終期の分裂溝の進入過程であった。このように右巻胚と左巻胚では、胚にらせん性が生じる時期とその生じ方に大きな差が在り、これまで鏡像対称的に進行すると考えられていた右巻胚と左巻胚の卵割は、細胞形態レベルでも細胞骨格レベルでも鏡像対称性からの逸脱が起きていることが明らかとなった。

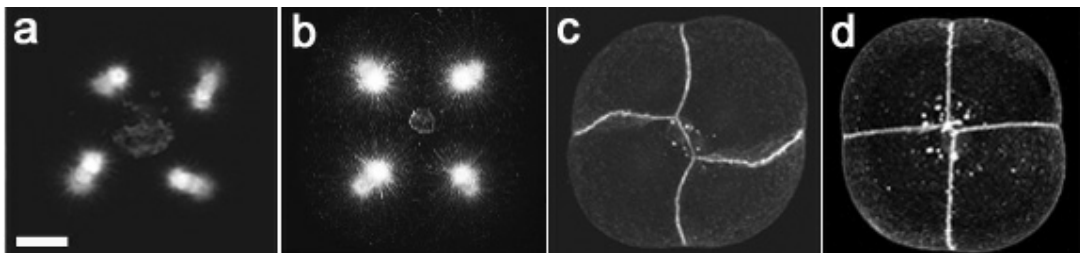


図1 *L. stagnalis* 右巻胚・左巻胚の第3分裂後期における紡錘体の配向と細胞形態

a, 右巻胚のチューブリン抗体染色像; b, 左巻胚のチューブリン抗体染色像

c, 右巻胚の蛍光ファロイジン染色像; d, 左巻胚の蛍光ファロイジン染色像

全て胚を動物極側から見た図。スケールバーは 20 μm 。

続いて、細胞骨格系の特異的阻害剤を用いて、らせん性の形成に対する細胞骨格の関与について調べた。右巻胚に対してアクチン重合阻害剤ラトランキュリンで処理をおこなうと、分裂中期～後期に起こる紡錘体の傾きと SD は阻害された。この時紡錘体の配向と細胞形態は中立化し、同時期の正常左巻胚とほぼ同じ様相を示した。このことは右巻胚におけるアクチン依存的ならせん性の形成が右巻遺伝子の制御下で起こっていることを示唆する。左巻胚にラトランキュリン処理をおこなうと、小割球の左旋的な回転は阻害されて最終的な小割球の配置は中立化した。これらのことから右巻胚・左巻胚ともに、らせん性が形成される過程にはアクチン重合が関わることを示唆された。

次に紡錘体形成前の右巻胚に微小管重合阻害剤ノコダゾールで処理をおこなうと、紡錘体が形成されないまま、通常よりも大きな SD が生じた。このことは SD が紡錘体の傾きに非依存的に起こることを示す。また小割球が生じる前の左巻胚のノコダゾールで処理をおこなうと、一部の胚で小割球の回転方向の逆転が起こった。このことは分裂溝の進入時に起こる小割球の回転の方向は、微小管の重合・脱重合によって制御されている可能性を示唆する。以上の結果より、*L. stagnalis* 右巻胚と左巻胚の第 3 卵割では、細胞質分裂前から右巻胚特異的に働くアクチン依存的な卵割右旋化メカニズムと、細胞質分裂時に働く微小管依存的な小割球の回転方向制御メカニズム、という 2 つのメカニズムによって卵割の旋性が制御されている可能性が考えられた。

第二章では、巻型決定因子の候補の 1 つである α -チューブリン遺伝子アイソタイプについて解析をおこなった。

1 細胞期の右巻胚と左巻胚で発現している蛋白質について二次元電気泳動法による比較解析をおこなった結果、右巻胚特異的に現れたスポット 3 個のうちの 1 個 (以降 spot#1 と呼ぶ) が α -チューブリンと同定された (当研究グループ遠藤による)。前章の結果で *L. stagnalis* の第 3 卵割過程では、紡錘体の傾きが右巻胚だけで見られることや左巻胚の卵割時に微小管重合阻害剤を施すと卵割方向の逆転が起きることから、微小管やその構成因子であるチューブリンは何らかの形で卵割の旋性の決定に関わっている可能性が考えられた。

まずspot#1の α -チューブリンの性質を明らかにするために、*L. stagnalis* 右巻系統と左巻系統で発現する6種類の α -チューブリン遺伝子の全長塩基配列の決定をおこなった (*LSD-TUBA1*~6, *LSS-TUBA1*~6, LSDは右巻系統、LSSは左巻系統由来であることを示す)。その結果、spot#1の α -チューブリンは*LSD-TUBA4* の遺伝子産物であった。*LSD-TUBA4* と*LSS-TUBA4* の塩基配列を比較するとコード領域に1箇所の1塩基多型が存在したが、アミノ酸の相違をもたらすものではなかった。

当研究室では、巻型決定遺伝子に関して優性ホモの個体と劣性ホモの個体の戻し交配から、同じ両親をもつヘテロの個体群と劣性ホモの個体群 (F2 世代) を得ている。*LSD-TUBA4* 遺伝子が巻型決定遺伝子そのもの、もしくはその近傍にある遺伝子であるかどうかを検定するために、*LSD-TUBA4* 特異的プライマーを用いた完全欠失検出法 RT-PCR により遺伝子連鎖解析をおこなった。その結果、*TUBA4* と巻型決定遺伝子の連鎖は見られなかった。

次に、1細胞期胚における各アイソタイプの発現をRT-PCRにより調べた。その結果、*TUBA3*, *TUBA4*, *TUBA6*の発現が確認されたが、*TUBA4* は発現レベルに右巻胚と左巻胚で大きな差は見られなかった。

以上の結果から spot#1 が右巻特異的に検出された原因が、*TUBA4* の遺伝子レベルの違いである可能性は低いと考えられた。そのため、蛋白質レベルの違い、すなわち *TUBA4* mRNA の翻訳が左巻胚で抑制されている可能性や *TUBA4* 蛋白質が右巻胚 (または左巻胚) 特異的な翻訳後修飾や分解を受ける可能性が考えられた。これらの可能性を検討するためには、今後、*TUBA4* 特異的な抗体の作製とそれを用いた解析をおこなっていく必要がある。

第一章、第二章をまとめると、本研究では、私はこれまでメカニズムが不明であった巻貝の卵割における旋性決定メカニズムには、細胞骨格系の蛋白質が関与することを初めて明らかにした。さらに巻型決定因子の候補の1つである α -チューブリンのアイソタイプを同定し、それが二次元電気泳動で右巻胚特異的なスポットとして現われる機構の解明のための基盤を作った。これらの成果は、発生学の重要課題の1つである巻貝の巻型決定メカニズム解明への新たな突破口を開くものである。