

論文審査の結果の要旨

論文提出者 柴崎 友一郎

淡水産巻貝 *Lymnaea* 属のある種では、完全内臓逆位体である右巻と左巻が自然界に正常体として存在する。この場合、右巻が優性形質であり、巻型決定遺伝子は単一の座位、あるいは強く連鎖する少数の座位に存在することが古典的交配実験で示されている。右巻胚と左巻胚の形態差は、受精後まもなく起こるらせん卵割の第3卵割の旋性（右旋性または左旋性）に顕著に現われるが、1980年代に行なわれた細胞質移植実験により、その旋性は右巻の1細胞期胚に存在する母性因子によって制御されている可能性が示唆された。この母性因子については、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きたが、その実体は未だ不明のままである。このような背景のもと、柴崎氏は、主に *Lymnaea stagnalis* の鏡像体を用いて、卵割の旋性決定に関わるものが予想される細胞骨格について、卵割時の細胞骨格動態に注目した細胞生物学的解析、および、微小管の構成因子である α -チューブリンについての分子生物学的解析を行なった。

第一章では、まず、新たに確立した巻貝の胚の固定染色法や顕微鏡法を用いて、第3卵割期の微小管とF-アクチンの動態について、*L. stagnalis* 右巻胚と左巻胚の詳細な比較解析を行なった。その結果、優性である右巻胚では、分裂中期～後期に起こる、紡錘体の傾きと細胞形態変化(spiral deformation: SD)によって右旋化が起きているのに対し、劣性である左巻胚では、分裂中期～後期の紡錘体の配向と細胞形態は中立性を保ち、細胞質分裂時に生じる小割球の回転によって左旋化が起きていることが明らかとなった。これらのことから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互いに鏡像対称ではなく、らせん性が生じる時期と生じ方に大きな差が存在することが初めて示された。つづいて、細胞骨格の特異的阻害剤を用いて、右巻胚の右旋化（紡錘体の傾きとSD）と左巻胚の左旋化（小割球の回転）に対する微小管やF-アクチンの重合の関与について調べた。その結果、右巻胚の紡錘体の傾きとSD、左巻胚の小割球の回転は、ともにアクチン重合阻害剤で中立化したことから、両者にはアクチン重合が関与することを明らかにした。また右巻胚のSDは、微小管重合阻害剤で紡錘体の形成を阻害した場合でも顕著に起こったことから、紡錘体の構造や傾きには非依存的に起き

ていることが明らかとなった。さらに、細胞質分裂時に起こる左巻胚の小割球の回転方向は、微小管重合阻害剤で逆転（右旋化）したことから、小割球の回転方向の決定には微小管の重合が関与していることが示唆された。これらの知見は、未知の巻型決定遺伝子が細胞骨格依存的な卵割メカニズムに関わることを示しており、今後、巻型決定機構の解明への大きな糸口になっていくと考えられる。次に、左巻優性種 *Physa acuta* の左巻胚の第3卵割の細胞骨格動態を調べた結果、右巻優性種 *L. stagnalis* の右巻胚の場合の鏡像対称であり、アクチン重合依存的な紡錘体の傾きとSDが逆方向（左旋的）に生じていることが明らかとなった。この結果と前述の *L. stagnalis* 種内鏡像体の結果から、これまで単一遺伝子、もしくは強く連鎖する近接遺伝子の変異で生じたことが示されている種内鏡像体と、交配実験が不可能な種間鏡像体とでは、鏡像体が生じた過程が共通ではないことを示唆するものである。

第二章では、先行研究によって1細胞期胚の蛋白2次元電気泳動により右巻特異的スポットとして単離された α -チューブリン蛋白について、その遺伝子解析（遺伝子同定、発現解析、巻型決定遺伝子との連鎖解析）を行なった。まず、*Lymnaea stagnalis* の生殖腺及び肝臓に発現する6種類の新規 α -チューブリン遺伝子（*TUBA1-6*）のcDNA全長クローニングを行ない、1細胞期胚の蛋白2次元電気泳動による右巻特異的スポット（*TUBA4*）を同定した。*TUBA4* について、右巻と左巻の予想アミノ酸配列に相違はなかった。また発現解析により、*TUBA4* は1細胞期に母性に発現する遺伝子の1つであり、右巻と左巻でmRNA発現量に大きな差はないことが明らかとなった。さらに当研究室で既に確立されている戻し交配F2世代による巻型決定遺伝子の連鎖解析システムを用いて解析を行なったところ、*TUBA4* と未知の巻型決定遺伝子は遺伝学的に連鎖していないことが示された。これらのことから、*TUBA4* は巻型決定遺伝子そのものではないと考えられたが、1細胞期に右巻特異的な蛋白質として発現している事実から、翻訳レベルの調節や翻訳後修飾のパターンに巻型特異的な機構が存在する可能性が示唆された。

以上、本論文は、これまでほとんど解明されていなかった巻貝の巻型決定機構について細胞骨格を切り口とした解析をおこない、細胞骨格動態や細胞骨格の構成因子の重要性を初めて明らかにしたものであり、巻貝の巻型決定因子の同定へ向けた研究に重要な貢献をなすと考えられる。

従って、本審査委員会は博士（学術）の学位にふさわしいものと認定する。