

論文内容の要旨

巻貝 *Lymnaea stagnalis* 初期胚の左右形成における極性因子 Par6-aPKC の機能解析

Analysis of the polarity complex Par6-aPKC and its involvement in the left-right specification in the early embryo of the gastropod *Lymnaea stagnalis*.

本間 泰平

巻貝 *Lymnaea stagnalis* には、巻型が対になる左右両系統が天然に存在する。左右の巻型を規定している因子は、母性に働く単一遺伝子（座）であると考えられているが、その正体は未だ解明されていない。*L. stagnalis* の巻型は胚発生のごく初期に決定される。左右巻型の違いは、第 3 卵割の時点でらせん卵割の旋性方向に現れてくる。このときの旋性は左右非対称な割球配置に反映され、これが胚左右軸並びに個体の左右性形成に決定的に重要であることを当研究室が実験的に証明している。また、第 3 卵割の詳細な観察により、右巻胚特有の細胞事象である細胞形態変化（Spiral deformation）および紡錘体の傾き（Spindle inclination）が見出された。これらより、巻貝の左右決定にとって第 3 卵割の細胞骨格動態がきわめて重要であることが指摘されている。本研究では、*L. stagnalis* の巻型決定機構および左右性形成機構を解明することを目的とし、細胞骨格制御因子の候補として細胞極性タンパク質に焦点を合わせた解析を行った。

先行して行われた研究により、*L. stagnalis* から極性因子 Par6 および atypical PKC (aPKC) のホモログ遺伝子がクローニングされた。Par6-aPKC の複合体は、真核生物に高度に保存された細胞極性モジュールであり、非対称分裂時のスピンドル配向制御や細胞移動・細胞形態変化時の細胞骨格制御など、方向性を持った細胞骨格動態における機能が多く報告されている。Par 極性因子は、前後軸をはじめとした体軸形成との関わりも有名であり、とくに線虫の初期胚における研究では、胚左右性の変異体原因遺伝子 *spn-1* と *par* 遺伝子 (*par3*,

par4, par6) との遺伝的相互作用が示された。ここから、*L. stagnalis* においても、左右形成プロセスに関連した Par 極性因子の機能の存在が期待された。

本研究ではまず、抗 *L. stagnalis* Par6 抗体を用いた Par6 の局在解析を行った。初期胚の免疫染色において、*L. stagnalis* の Par6 局在は M 期の分裂装置および G2、S 期の中心体・スピンドルミッドボディに観察された。これらはいずれも微小管からなる構造体であり、Par6 の微小管細胞骨格への局在が予想された。そこで Par6 とチューブリンの共染色を行い、実際に両者が細胞周期を通して共局在することを示した。Par6 の微小管局在は、1 細胞期からトロコフォア期まで、観察した全ての発生ステージで確認された。なお、Par6 のアミノ酸配列は左右の巻型系統で共通しており、局在調査においても左右両系統の胚で同一の染色パターンが得られた。

Par6 と微小管の相互作用を検証するため、胚ライセートを用いた微小管共沈降アッセイを行った。*L. stagnalis* 内在性 Par6 はライセート中の微小管と共沈降を示し、Par6-微小管の間の物理的相互作用が証明された。内在性 Par6 はライセートに添加したウシ微小管とも共沈降を示したことから、チューブリンの生物種を問わず *L. stagnalis* Par6-微小管の間に物理的相互作用が働くことが示唆された。さらに、GST 融合タンパク質を利用したプルダウンアッセイおよび微小管共沈降アッセイを行い、*L. stagnalis* Par6 が *in vitro* でチューブリンあるいは微小管と直接結合することを明らかにした。この直接的相互作用は、他生物種を含め、本研究が初めての報告例である。チューブリン結合部位は Par6 N 末側に存在し、独立した 2 か所の領域がチューブリン結合能を持つことが分かった。

Par6-微小管の相互作用が明らかになったことから、次に GST 融合タンパク質を用いて Par6 の微小管調節機能の検証を行った。まずは、Par6 存在下での微小管重合を調査する *in vitro* 微小管重合アッセイを行った。この重合アッセイでは、Par6 が微小管重合を促進することが明らかになった。その際、重合した微小管には顕著な束化 (bundling) が観察された。そこで、予備重合させた微小管を用いた *in vitro* 微小管束化アッセイを行った。束化アッセイにより、Par6 が *in vitro* で微小管束化活性を持つことが証明された。これらの微小管アッセイにより、*L. stagnalis* の Par6 が単に微小管に結合するだけでなく、微小管動態を調節する機能を持っていることが示唆された。

次に Par 極性因子のキナーゼである aPKC の解析を行った。aPKC の場合も、左右系統から同一のアミノ酸配列をコードする遺伝子が単離されており、遺伝子情報の上での左右差はない。*L. stagnalis* 初期胚の免疫染色では、M 期分裂装置やスピンドルミッドボディへ

の aPKC の局在が観察された。これは Par6 の免疫染色で観察されたものとほぼ同じ染色パターンであり、微小管上で Par6 と aPKC が協調して機能していることが推測された。第 3 卵割において、分裂装置の配向やミッドボディの配置はらせん卵割の旋性と強くリンクしている。それらの構造に極性タンパク質である Par6 および aPKC が局在していることは非常に興味深い。一方、G2、S 期には aPKC は Par6 と異なり核膜を中心に局在が観察され、これらの時期には Par6 と aPKC が別々に働いていることが示唆された。

局在調査の次に、極性モジュール Par6-aPKC の機能解析のため、キナーゼ aPKC の阻害剤を用いた機能阻害アッセイを行った。aPKC には偽基質領域 (PS) とよばれる生物種間で保存された配列があり、この配列を持つペプチドが aPKC の特異的阻害剤として機能する。*L. stagnalis* の aPKC においても PS の配列は保存されており、阻害剤が作用することが期待された。細胞膜透過のためのミリストイル化修飾を受けた阻害ペプチド (Myr-PS) を *L. stagnalis* 初期胚に処理し、aPKC の機能阻害を試みた。結果、Myr-PS 処理により、右巻胚の第 3 卵割旋性のランダム化が観察された。このランダム化は、コントロールとして用いたミリストイル化ランダム配列ペプチドでは観察されなかった。細胞骨格の染色により、左旋化した右巻胚は割球配置やスピンドルミッドボディの配置が完全に左巻型のものに変わっていることが分かった。巻型のランダム化は左巻胚への Myr-PS 処理でも観察された。また、より広範囲な PKC 阻害剤である Gö6983 の処理でも低頻度ながら右巻胚の第 3 卵割左旋化が起こることが分かった。これらの結果は、*L. stagnalis* 胚の第 3 卵割のキラリティ形成に aPKC の機能が関与している可能性を示唆している。

左右巻貝の遺伝子情報比較および免疫学的・生化学的解析から、Par6、aPKC が左右決定因子そのものである可能性は否定された。しかし、本研究で観察された細胞極性因子と微小管細胞骨格の高い親和性、およびその機能阻害による胚旋性のランダム化は、左右性決定以降の左右極性確立、体軸形成に極性タンパク質が重要な役割を果たしていることを示唆している。本研究成果は、左右決定因子の下流に位置する、胚の左右形成 (左右性確立) 機構の解明に発展していくものと考えている。