

学 位 論 文 題 名

Studies on the Mechanisms for the Generation of Asymmetric Mitotic Spindle in the First Cleavage of *Tubifex hattai*

（イトミミズ第一卵割における非対称分裂装置形成機構に関する研究）

学位論文内容の要旨

初期発生における不等割は多くの動物で知られており、胚軸の決定や細胞の多様性を準備する重要な過程である。これまで不等割機構の解析は数種の軟体動物で行われてきたが、その詳細は不明である。本研究は、古くから不等割として知られている環形動物イトミミズ（*Tubifex hattai*）の第一卵割の機構を分裂装置の非対称構造に注目して解析したものである。

論文の第一部では、表層アクチン細胞骨格の再構築、収縮環及び分裂装置の形成に注目して卵割溝形成過程の詳細な記載を行い、第二部では分裂装置構造と卵表層及び中心体の関係に注目して、分裂装置構造に非対称性をもたらす要因について調べた。また第三部では中心体が不等第一卵割の最も重要な因子であることを明らかにし、更に中心体複製の制御機構を解析した。

〔Ⅰ〕卵割溝及び収縮環の形成過程

第一卵割の卵割溝形成は連続する二つの段階から成っている。まず第一段階では経線方向に走る二本の溝が赤道部の約 90° 離れた位置に生じ、卵軸に向かって深く進入する。第二段階ではこれら二本の溝が動物極側及び植物極側に新たに生じた溝によってひと続きのリング状の溝となり、卵軸と赤道部の中間点で卵を大小の割球に分割する。卵割溝形成過程は cytochalasin D 及び nocodazole いずれによっても阻害されることからアクチン微細繊維と微小管に依存したプロセスであることが明らかとなった。

単離した卵表層を平面に展開し、アクチン繊維を蛍光染色する方法を用いて卵割溝形成前後での表層アクチン細胞骨格の構造変化を調べた。卵割溝形成前の赤道部では、表層アクチン繊維はほぼ一様に分布し、溝形成を示唆する特別な構造は観察されない。卵割溝の出現とともに表層には赤道部を経線方向に走る二本のアクチン繊維の束（収縮弧）が出現する。このアクチン繊維束は卵割溝を裏打ちしており、卵割第二段階にはリング状の収縮環を形成している。表層アクチン繊維の分布密度の調査から、収縮弧は既存の表層アクチン繊維の再編成によってつくり出されることが明らかとなった。

〔Ⅱ〕分裂装置の構造及びその構築過程

免疫細胞化学的に微小管を可視化する方法を用いて、第一卵割分裂装置の形成過程を全載標本で調べた。分裂中期の分裂装置は双極性の紡錘体の一方の極にのみ星状体を備えた構造を示し、他方の極には星状体が欠如している。紡錘体の形成は星状体極から始まり、星状体を備えた半紡錘体が形成された後、前期核の表面で形成（重合）された微小管の再配列によって星状体欠如極の形成が起こる。抗 γ -チューブリン抗体で染め出される中心体は星状体極にのみ存在し、欠如極には存在しない。しかし星状体欠如極には γ -チューブリンが紡

錘体の他の部分よりも高濃度に存在している。

分裂装置は第一卵割の間つねに卵の中央に位置する。星糸の伸長は分裂後期に起こり、発達した星状体は大きい方の割球領域にほぼ対応した範囲に広がる。星状体欠如極から微小管が伸長するのは分裂終期である。

〔Ⅲ〕分裂装置非対称構造の要因

不等割の分裂装置が非対称構造を示すことは古くから知られており、卵表層の関与が指摘されている。イトミミズでは、卵を細長く引き伸ばす、あるいは圧迫して扁平に押しつぶす操作を加えても、形成される分裂装置はつねに単星構造を示し、正常卵のそれと区別できない。更にこれらの変形卵はその状態で不等割を行う。これらの結果は、表層が星状体の形状に影響を及ぼしている可能性の低いことを示唆する。

この可能性を更に調べるために、2個の中心体が第一卵割に参加するように操作を加えた卵の第一卵割時の動態を解析した。2個の中心体を含む卵では両極に星状体を備えた単一の紡錘体（双星分裂装置）が形成される場合と二つの独立した単星分裂装置が同時に形成される場合がある。前者は卵を等分裂に導き、後者は三極性の分裂を惹き起こす。双星分裂装置は分裂中、つねに卵の中央に位置し、両極の星状体は形、大きさともに同じ程度に発達しており、非対称性の兆候は全く認められない。以上のことから第一卵割周期にあるイトミミズ卵では双星分裂装置の構造に非対称性を作り出す機構が作動していないことが明らかとなった。このことは他の動物で示唆されている表層機構が欠如していることを強く示唆する。

〔Ⅳ〕中心体複製の制御機構

上記の如く、イトミミズ第一卵割の不等性は、それに参加する中心体の数によって決定される。第一卵割が不等割になるための最も重要な要件は、中心体が一個だけ参加することである。このことは、卵由来（第二成熟分裂）の中心体が複製することなく第一卵割周期に移行することで保障されている。ところが、同じ中心体が第一から第二卵割周期に移行する時に複製することが指摘されている。中心体が成熟分裂終了時に複製しない原因を明らかにするために、第一卵割期の卵と第二成熟分裂期の卵を電氣的に融合し、中心体を取りまく細胞質環境を変更する実験を行った。融合後、両卵の細胞質は均一に混合される。同一の融合卵の中で卵割期の中心体は予定時刻に複製するが、第二成熟分裂期の中心体は複製の兆候を全く示さない。この結果は、卵割期の中心体が複製する条件下でも成熟分裂期の中心体は複製できないことを示唆する。従って、成熟分裂期中心体の複製の有無が中心体に内在的な要因によって決定されていることは明白である。

以上の結果から、イトミミズ第一卵割の不等性は、単星分裂装置の非対称構造によってもたらされ、中心体がこの非対称構造を決定していると結論できる。このような卵表層に依存しない不等割機構はイトミミズ卵で初めて発見されたものである。このことは、動物初期発生における不等割が表層機構と極葉形成のいずれかによって惹き起こされるという従来の考え方が不十分なものであることを明白に示している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 片 桐 千 明

副 査 教 授 鈴 木 範 男

副 査 助 教 授 清 水 隆

学 位 論 文 題 名

Studies on the Mechanisms for the Generation of Asymmetric Mitotic Spindle in the First Cleavage of *Tubifex hattai*

(イトミミズ第一卵割における非対称分裂装置形成機構に関する研究)

大きさの異なる2つの割球を生ずる不等割は多くの動物の初期発生で知られており、胚軸の決定や細胞の多様性を準備する重要な過程である。これまで不等割機構の解析は数種の軟体動物卵で行われており、卵表層と分裂装置の相互作用が不等割をもたらす主要な要因であることが示されている。しかし、この表層が関わる機構が不等割に普遍的か否かはなお検討を要する。石井竜一提出の学位論文は、古くから不等割卵として知られている環形動物イトミミズ (*Tubifex hattai*) の第一卵割の機構を分裂装置の非対称構造に注目して解析したものであり、以下の諸点から評価される。

まず申請者は、卵割溝形成過程の詳細な記載を行う過程で、卵割溝形成をもたらす収縮構造が既存の表層アクチン細胞骨格の再編成によって作り出されること、さらに分裂装置が紡錘体の一方の極にのみ星状体を備えた単星構造を示すことを見出した。この分裂装置の形態は動物界でこれまで報告のない新発見であったが、申請者はこの分裂装置と不等割の因果関係について綿密な実験によって慎重に解析し、分裂装置の単星構造形成がイトミミズの第一卵割を不等割にするための唯一の仕組みであることを証明している。ついで申請者は、中心体が1個だけ分裂装置形成に参加することによって分裂装置の非対称構造が作りだされることを明らかにした上で、2個の中心体を卵に導入することによって等割を誘導するという巧妙な

実験から、イトミミズ卵には分裂装置の構造に非対称性を作り出す表層機構が欠如しているという注目すべき事実を明らかにしている。最後に申請者は、中心体の数が中心体自体に内在的する要因によって決定されていることを、卵の融合実験で証明している。

以上の研究成果は、動物界でこれまで知られていない単星分裂装置の発見、中心体の動態が不等割機構の根幹を成している事実の発見、さらにほかの動物で示唆されている表層機構がこの動物では欠如していることの実験的証明など、卵割に限らず細胞分裂機構一般の研究の発展に寄与するところ極めて大きいと評価される。申請者に対する最終試験は、平成10年1月28日に多数の大学院担当教官の出席のもとに論文の口頭発表と質疑応答の形で行われ、満足すべき結果であった。したがって、審査員一同は申請者が博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認める。