

学 位 論 文 題 名

Identification and analysis of genes related
to myosin II -independent and adhesion-dependent
cytokinesis in *Dictyostelium discoideum*(細胞性粘菌におけるミオシン II 非依存／接着依存性の
細胞質分裂に関わる遺伝子の同定と解析)

学位論文内容の要旨

細胞質分裂とは有糸分裂や減数分裂に引き続いて起こる細胞質の分配の事である。細胞質が娘細胞に分けられる事により細胞は正常な機能や大きさを維持できるので、細胞は増殖を続ける事ができる。これまで多くの種類の細胞において、細胞質分裂の初期段階で actin や myosin II が細胞の赤道面の皮層に集合する様子が観察されている。これらの分子が集合した赤道面において分裂溝が次第に陥入することにより、細胞はダンベル状にくびれ、最終的に二つの娘細胞に分断される。この過程の間、actin や myosin II は常に分裂溝へリング状の局在をする事から、分裂溝においてリング状に組み合った actin-myosin II 複合体 (収縮環) が myosin II のモーター活性により収縮していき、次第にリングの直径が小さくなっていく事により細胞質分裂が起こると考えられてきた。

細胞性粘菌(*Dictyostelium discoideum*) は増殖期には単核のアメーバとして活動している。このアメーバの形態学的、生化学的な特徴は動物細胞や白血球と多くの共通点を持つ。また、このアメーバは高等動物とは異なり単相であるため、分子生物学的、細胞生物学的手法に加えて古典的な遺伝学的手法を用いた研究が可能である。以上の性質から *Dictyostelium* は高等動物の基本的な機能 (走化性、分化、細胞移動、細胞分裂など) を知るためのモデル生物として用いられてきた。さらに *Dictyostelium* は多くの生物と異なり myosin II 重鎖遺伝子 (*mhcA*) が 1 種類しかなく、簡単に myosin II 欠損細胞 (*mhcA*⁻) を作り出すことができるため、様々な生体機能における myosin II の役割が解析されてきた。

その中でも特に細胞質分裂における *mhcA*⁻ 細胞の影響の解析は非常に驚くべき結果をもたらした。*mhcA*⁻ 細胞は懸濁液中では細胞質分裂できずに多核化し最終的に溶解してしまうのにも関わらず、基質上に接着した場合には正常に細胞質分裂を行うことができるのである。懸濁液中での細胞質分裂の失敗は前述の myosin II が赤道面の収縮に必須であるという仮説と一致する。しかし *mhcA*⁻ 細胞が基質上では細胞周期に同調した細胞質分裂を能率的に行うことができるという事実から、*Dictyostelium* には 2 つの異なった細胞周期に同調した細胞質分裂様式が存在すると言える。1 つはこれまでに一般的に考えられてきた myosin II 依存型の細胞質分裂様式 (cytokinesis A) であり、もう一つが *mhcA*⁻ 細胞の解析により浮かび上がってきた myosin II 非依存型の細胞質分裂様式 (cytokinesis B) である。さらにこの他にも、或

る条件下で見られるもう一つの細胞質分裂様式が存在する。懸濁液中で巨大に多核化させた *mhcA*⁻ 細胞を基質上に接着させると即座に先端端を伸ばし始めて結果的に細胞質が細かく断片化する。この様式の細胞質分裂は接着に依存するという点で cytokinesis B に似ているが、cytokinesis B とは異なり細胞周期には拘束されない。Spudich はこの過程を "cytofission" と名づけたが、cytofission と細胞周期の関係については定義していない。そこで我々は細胞周期と無関係な接着依存性の細胞質分裂を "cytokinesis C" と新たに定義した。

cytokinesis B による細胞質分裂をする際には細胞が基質に接着する必要がある事から牽引力が深く関わっていると考えられているが、そのメカニズムについてははっきりとした事は分かっていない。しかし近年 *amiA*、*corA* 等の cytokinesis B 関連遺伝子がいくつか見つかってきている。*amiA*⁻ 細胞、*corA*⁻ 細胞と *amiA*⁻/*corA*⁻ 細胞では懸濁培養中ではほぼ正常に細胞質分裂できるが、基質上では cytokinesis B ができないために徐々に多核化していく。さらに *amiA*⁻/*mhcA*⁻ 細胞、*corA*⁻/*mhcA*⁻ 細胞では cytokinesis A と B が共に阻害されるために、基質上においてもほとんど分裂することができずに非常に巨大な多核細胞となる。しかしそれでも *amiA*⁻/*mhcA*⁻ 細胞、*corA*⁻/*mhcA*⁻ 細胞はゆっくりではあるが増殖することができるため致死にはならない。この事実は明らかにこれらの細胞を分裂させる事のできるバックアップ機構が存在することを物語っており、どうやら cytokinesis C がこの役割を担っているらしい。

さらに詳しくミオシン II 非依存/接着依存性の細胞質分裂の機構を知るためには cytokinesis B と C の鍵となる遺伝子の同定が不可欠である。Cytokinesis A, B, C はそれぞれ多くの重複した機能を含んでいるため、残念ながら cytokinesis B または C のみが阻害された変異株を単離することは難しい。第 1 章では cytokinesis A を行うことができない *mhcA*⁻ 細胞に REMI (Restriction Enzyme Mediated Integration) 法を適用し、基質上でひどく多核となる変異株をスクリーニングした事について述べる。これまでに我々は約 12,000 株をスクリーニングしたうち、基質上で常に多核の表現型を示す変異株を 7 つ得ることができた。さらに 7 つの変異株のうち 1 つについて解析を進めたところ、脊椎動物のアクチン結合タンパク質の 1 種である talin の *Dictyostelium* におけるホモログである *talA* 遺伝子中に変異が入っている事が分かった。

第 2 章では *talA* と細胞質分裂の関わりについて詳しく解析を進めた。*talA*⁻ 細胞は基質上では野生型とほとんど同様に細胞質分裂する事ができるのにも関わらず、*talA*⁻/*mhcA*⁻ 細胞では細胞質分裂に失敗して非常に巨大な多核細胞となるものが数多く見られた事から REMI 変異株の表現型の再現性を確認することができた。また共焦点レーザー顕微鏡による GFP-TalA の局在の観察結果より、TalA が細胞皮層全体に均一に局在する事と、さらに基底面では TalA が斑点状に局在する事が分かった。この斑点状構造は動物培養細胞で見られる TalA といくつかの分子からなる複合体である adhesion complex に非常によく似た形態と特徴を持っている事から、*Dictyostelium* にも同様な構造が存在する事を明らかにした。この adhesion complex 様構造は細胞と基質の接着力を制御することで cytokinesis B の効率を上げていると考えられるが、cytokinesis B に必須なものではない様である。

talA⁻/*mhcA*⁻ 細胞が多核化する第一の原因はこの細胞が cytokinesis C を全く行う事が出来ないからであった。しかしその役割はどうやら接着に関するものだけではないらしい事が分かった。この様な TalA の新たな機能を探るため、GFP-TalA を発現する *mhcA*⁻ 細胞を多核化した後基質に接着させ、cytokinesis C の際の GFP-TalA の局在を観察した。面白いことに cytokinesis C の際、細胞皮層に分散していた GFP-TalA が分裂溝領域の皮層に高度に集中し、最終的に intracellular bridge に凝集する様になる事が分かった。さらに分裂溝の一方の皮層

にのみ GFP-TalA が不均衡に局在した細胞を観察したところ、GFP-TalA の濃度の低い皮層から高い皮層へ分裂溝が陥入していく様子が確認できた。

以上の結果より TalA は細胞皮層において先導端が伸張する活性を抑制する機能を持ち、その結果 TalA が存在しない部位での細胞質の伸張活性を相対的に高め、最終的に分裂溝を受動的に陥入させるという cytokinesis C のモデルを提案する。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 勲

副 査 教 授 山 岸 皓 彦

(東京大学大学院理学系研究科)

副 査 主任研究員 上 田 太 郎

((独) 産業技術総合研究所ジーンファ
ンクション研究ラボ)

副 査 教 授 川 端 和 重

副 査 助教授 高 橋 正 行 (化学専攻)

学 位 論 文 題 名

Identification and analysis of genes related to myosin II -independent and adhesion-dependent cytokinesis in *Dictyostelium discoideum*

(細胞性粘菌におけるミオシンII非依存／接着依存性の
細胞質分裂に関わる遺伝子の同定と解析)

動物細胞型の細胞質分裂は、アクチンとミオシンIIによる収縮環の能動的収縮に基づくくびれ切れにより駆動されると考えられてきた。この分裂機構は一般には「巾着機構」とよばれるが、上田等はこれをcytokinesis Aと称することを提唱している。しかし最近の細胞性粘菌を用いた研究により、ミオシンIIに依存しない分裂経路もあることが明らかとなってきた。これらは、cytokinesis BおよびCとよばれ、cytokinesis Aと区別されている。Cytokinesis BおよびCはともにミオシンII非依存性かつ基質接着依存性である点では共通だが、細胞周期に共役しているか否かで区別される。つまり cytokinesis Bは核分裂の直後におこり、cytokinesis Cは分裂間期の細胞が行うものである。様々な状況証拠から、cytokinesis A, BおよびCはそれぞれかなり異なる分子機構に基づく分裂様式であると考えられているが、詳細は明らかになっていない。本学位論文は、細胞質運動に関する分子遺伝学的モデル実験系として注目を集めている細胞性粘菌を用いて、タリンというタンパク質が特定のタイプの細胞質分裂に必要不可欠であることを示したものである。この論文には、大別して3つの重要なポイントが含まれている。

第一に、ミオシンIIを遺伝的に欠く変異細胞性粘菌に対して突然変異処理を行い、ミオシンII非依存性の細胞質分裂経路に関する変異体の探索を行うというアプローチの新規性である。

cytokinesis A, BおよびCの分子機構を解明するため、分裂に障害がある変異体の単離と解析が待たれていたが、それぞれのcytokinesisが機能的に重複しているため、形質に基づいて変異体を単離することは困難であると考えられた。そこで申請者は、あらかじめミオシンIIを欠失して cytokinesis Aができない変異体を出発材料とし、これにランダムな突然変異処理を行

い、cytokinesis BまたはCに障害が生じて多核化した細胞を探索・回収するというアプローチをとった。その結果、本論文で特に詳しく解析を進めたタリンAを含む7つの変異体が単離された（うち一つは既知）、このアプローチがきわめて有効で将来性のあるものであることが実証された。

第二のポイントは、タリンAが cytokinesis Bに関与することを示した点である。具体的には、ミオシンIIとタリンAを欠失した細胞性粘菌細胞は、ミオシンIIのみを欠失した細胞に比べてcytokinesis Bプロセスが顕著に遅滞することを見出した。タリンは従来動物細胞および細胞性粘菌で細胞接着に関与する因子として知られていたもので、cytokinesis BにおけるタリンAの機能も、基質接着を強化するものとして理解できることを申請者は本論文で実験的に示した。その根拠として、動物細胞におけるタリンと同様に、タリンAが基質面上でfocal adhesionとよばれる構造に類似した分布を示すこと、および接着性の強い基質を用いるとミオシンII・タリンA二重欠失細胞はミオシンII欠失細胞と同じ速度で cytokinesis Bを行えることをあげている。これらの新知見はそれぞれ、細胞性粘菌の基質接着機構を考えるうえで重要であるし、cytokinesis Bが基質接着に依存したものであることを再確認したという点でも有意義である。

最も重要なのは、タリンAがcytokinesis Cに必須であるという第三のポイントである。ミオシンII・タリンA二重欠失細胞は cytokinesis Cをほとんど行うことが出来ず、そのためいったん多核化するとそのまま巨大多核細胞化していくことが示され、これが、ミオシンII・タリンA二重欠失細胞のコロニー中に高頻度で巨大多核細胞が見出される主因であると結論された。さらに興味深い点は、このcytokinesis Cの欠損が基質接着と直接関連がないように思われる点である。これは、cytokinesis Bの場合と異なり、接着性の強い基質を用いても cytokinesis Cの欠失が回復しないこと、およびcytokinesis C中はタリンAが収縮中の領域の細胞表層に大量に存在することなどから結論されたもので、cytokinesis CにおけるタリンAの機能は、基質接着ではなく、表層の収縮活性の制御を介していると示唆された。とくに、cytokinesis Cの分裂溝の片側にタリンAが局在するケースでは、タリンA濃度の低い側が高い側に向かって収縮していくため、表層のタリンAは収縮を直接活性化するのではなく、その部分の仮足形成を抑制することにより他の部位の仮足形成を誘導し、結果的にタリンA濃度の高い部分が受動的に収縮する可能性が高いと考えられた。Cytokinesis C経路はまだ分子機構がほとんど解明されていないので、タリンAが必須の機能を果たすという本論文の結論は、今後のより詳細な研究に重要な役割をはたすものと期待される。

また、アメーバ運動にともなって極性化した細胞性粘菌において、細胞の後部でタリン活性が高くなり、細胞膜と表層の物理的カップリングが強化されるという報告があり、これが細胞後部での仮足形成の阻害に関与すると推測されている。したがって、そうした知見や本論文で明らかになったcytokinesis CにおけるタリンAの機能と局在を考えあわせると、伸長活性や仮足形成活性に対する負の制御因子としてのタリンの一般的機能を想定することも可能である。タリンは従来基質接着因子としての機能ばかりが強調されていたが、動物細胞においても基質接着では説明の困難な局在も知られてきた。したがって本論文の成果は今後、表層の活性制御因子としてのタリンのより一般的な機能とその分子機構解析を進めていく基盤になると期待される。一方、研究手法としては、ゲノム情報を利用した遺伝子解析、GFP融合タンパク質と共焦点顕微鏡の利用など、最先端の分子遺伝学的・細胞生物学的手法を取り入れており、現時点での学位論文として標準的なものである。また、自ら変異体を作製して原因遺伝子を同定し、さらに様々な観点からその機能解析を行っており、具体的な実験手法の幅の広さという観点からも不足はない。

以上のように、本論文は、得られた研究成果の新規性・重要性という点でも、研究内容・手法という点でも、学位論文として十分なレベルに達していると考ええる。また、これらの結果は現段階で、国際誌に1報の原著論文として印刷中である。以上のことより、審査員一同は本研究が博士（理学）の学位に値する内容であると結論した。