

学 位 論 文 題 名

Studies on formation of the cell polarity in monospores
of the red alga *Porphyra yezoensis*(スサビノリ *Porphyra yezoensis* の単胞子における
細胞極性形成機構の研究)

学位論文内容の要旨

Establishment of cellular and subcellular asymmetries, which is directed by an oriented axis referred to as cell polarity, is a fundamental cell property essential for differentiation, development and morphogenesis in unicellular and multicellular organisms. The marine red alga *Porphyra yezoensis* has been proposed as a model marine plant for physiological and genetic studies in seaweed because of its biological and economical importance in East Asia. The asexual spores of *P. yezoensis*, monospores, represent amoeboid migration, for which an anterior-posterior axis must be established. However, the signal transduction pathways involved in the initiation of polarization and axis formation are still poorly understood, and the relationship between the polarization processes and early development has never been experimentally demonstrated in the red algae. In contrast, the molecular mechanisms concerning with establishment of cell polarity in migrating mammalian leukocytes and *Dictyostelium* cells have been studied extensively, in which phosphoinositide (PI) turnover regulated by phosphatidylinositol kinases and phospholipases is critical for the establishment of cell polarity through regulating cytoskeleton. For instance, polarized distribution of F-actin is well known to be important in providing the driving force for directional migration.

Based on the findings, I studied the cell polarization in monospores using a combined pharmacological and histochemical staining approach focused on the involvement of PI regulated cytoskeleton.

By observation with staining by phalloidin, F-actin localized asymmetrically at the leading edge of migrating monospores, while nascent cell wall also was gradually synthesized during the migration of monospores. Thus, these two phenomena were chosen to judge the involvement of cytoskeleton, cell wall, light irradiation, Ca^{2+} influx and PI signaling in the establishment of cell polarity in monospores. Results indicated that cytoskeleton elements, such as F-actin, microtubules and myosin, were involved in migration of monospores and affect the polarity establishment of monospores, although cell wall synthesis plays a role in the maintenance of anterior-posterior axis in migrating cells during the development of monospores. By further experiments focusing how F-actin asymmetry is regulated, I found that light triggered the establishment of cell polarity via photosynthetic activity but not its direction, whereas Ca^{2+} influx from extracellular space could counteract the absence of light. Thus, photosynthesis-dependent Ca^{2+} influx is thought to be involved in the initiation of the cell polarity establishment. Moreover, Ca^{2+} influx also subsequently activate downstream PI signaling cascades: phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase C establish the cell polarity through regulating asymmetrical distribution of F-actin, which is required for migrating monospores, whereas phospholipase D is involved in the maintenance of F-actin distribution. These findings indicate critical roles of PI signaling cascades in the regulation of F-actin asymmetry and evolutionary conservation of the Ca^{2+} - and PI signaling-dependent systems in terms of the establishment of cell polarity in migrating eukaryotic cells.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 嵯 峨 直 恆
副 査 教 授 川 合 祐 史
副 査 教 授 都 木 靖 彰
副 査 准教授 三 上 浩 司

学 位 論 文 題 名

Studies on formation of the cell polarity in monospores of the red alga *Porphyra yezoensis*

(スサビノリ *Porphyra yezoensis* の単胞子における
細胞極性形成機構の研究)

本研究で対象とした海産紅藻スサビノリ (*Porphyra yezoensis* Ueda) は、アジアで最も重要な水産生物資源の一つであり、その生産は大きな経済効果をもたらしている。その持続性を維持するためには、安全かつ確実な種苗生産方法の確立が望まれるが、現時点ではその基礎となる本種の生物学的知見が極めて少ない。本研究は、スサビノリの無性生殖を担う単胞子の細胞運動や細胞分化に必須な細胞極性形成機構について、特異的阻害剤および蛍光染色方法を用いて実験生物学的および細胞生物学的な解析を行なうことにより、新規の知見を得、スサビノリのクローン種苗の生産技術の確立に貢献することを目的としている。

まず、スサビノリから放出される単胞子の初期発生を観察したところ、放出された単胞子は基質上に付着する前に、白血球や粘菌細胞に見られるアメーバ運動を行うことが判った。次にこれらの細胞の運動には細胞骨格が重要な役割を果たしていることがすでに知られているため、単胞子の運動における細胞骨格の重要性とその細胞極性形成との関わりについて解析した。その結果、細胞骨格タンパク質である F-アクチンが放出直後の単胞子では細胞内に均等に分布するが、運動開始後の細胞の前後軸形成に伴って細胞の先端側に局在することを見出した。また、この細胞運動および F-アクチンの局在は細胞骨格に関わる各種の阻害剤 (Cytochalasin B, Latrunculin B および Nocodazole) により抑制された。これらのことから、単胞子は、白血球や粘菌細胞の走化性と同様に、進行方向側に局在する F-アクチンが運動の原動力を提供して移動を可能にしていることが明らかになった。このような F-アクチンの局在は単胞子の移動中の前後軸の確立と維持により形成される細胞極性に基いて行われると考えられ、細胞運動と極性形成における細胞骨格 (F-アクチン) の重要性が示された。

さらに、細胞極性の形成における細胞内のカルシウムイオン (Ca^{2+}) およびホスファチジルイノシトール (PI) リン脂質代謝の関わりが多く、真核生物で報告されているため、 Ca^{2+} 流入および PI 代謝が単胞子の細胞運動や細胞極性形成にどのように関わっているかを解析した。まず、単胞子の運動がカルシウムキレート剤 (EGTA) とカルシウムチャネル阻害剤 (LaCl_3) により完全に抑制されることを見出した。この場合、同時に F-アクチンの極性分布が抑制されたことから、細胞運動における細胞外からの Ca^{2+} 流入の重要性が示された。また、ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K) とホスホリパーゼ C (PLC) およびホスホリパーゼ D (PLD) は Ca^{2+} 依存的な活性調節を受けるが、単胞子においても、PI3K 阻害剤 (LY294002) および PLC 特異的阻害剤 (U73122) は運動および F-アクチンの局在を抑制した。一方、PLD 阻害剤 (1-butanol) は影響を及ぼさないが細胞運動を阻害した。以上の結果より、単胞子の細胞運動時における細胞極性の形成とそれに基づく F-アクチンの極性分布は、他の移動性真核細胞の走化性と同様に、PI3K, PLC および PLD が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらにこのとき、F-アクチンの極性分布が Ca^{2+} の細胞内への流入とそれに続く PI3K と PLC の活性化で制御されること、さらに形成された極性の維持に PLD が関わっていることが確かめられた。

本研究では、単胞子の極性形成と細胞運動における F-アクチンと PI 代謝系の重要性が示され、このシステムが移動性の真核生物における細胞極性形成機構として進化的に保存されることが示された。本研究で得られた結果は、最近海苔業界で期待されている単胞子による種苗生産に関する技術の確立に大きく寄与するものと思われる。

主論文は平成 22 年 1 月 18 日 15 時から 16 時まで第二研究棟特別講義室において、審査員および関連教員 14 名および一般聴講 47 名のもと発表された。一般聴講においては、使用した 3 種の細胞骨格阻害剤のそれぞれの効果、単胞子における光照射の方向と極性形成の関わりを解析するときの方法、そして栄養細胞と単胞子嚢の差異についての質問がなされた。また、審査員および関連教員においては、単胞子のアメーバ運動における走光性および走化性の有無、生化学的・分子生物学的な手法を用いた取り組みの重要性、そして単胞子内へのカルシウムイオンの取り込みの可視化について質疑応答がなされた。また、本研究は今後進められる水産植物学に関する種々の研究の基礎的な知見として十分な価値があり、本研究で得られた知見や技術は海藻の種苗生産の効率化に貢献し、海藻の増養殖産業の更なる振興に寄与できるなどのコメントがなされた。得られた結果は本種に関わる基礎生物学の充実のみならず、今後の海藻類、特に紅藻類の応用研究の発展におおいに寄与するものと評価できる。よって審査員一同は申請者が博士 (水産科学) の学位を授与される資格のあるものと判定した。