

Title	ホヤ胚後極に局在する母性因子PEMは初期卵剖面の定位と連続した不等分裂に関わる
Author(s)	根岸, 剛文
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49740
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	ねがし たけあき 根 岸 剛 文
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 2 2 6 8 9 号
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	ホヤ胚後極に局在する母性因子 PEM は初期卵割面の定位と連続した不等分裂に関わる
論文審査委員	(主査) 教授 西田 宏記 (副査) 教授 常木和日子 教授 柿本 辰男

論文内容の要旨

(和文要旨)

たった一つの細胞である受精卵から複雑な構造が形成される発生過程において細胞分裂面の定位(すなわち、どの方向に、そしてどの場所に分裂面を生じさせるか)のコントロールはいくつかの重要な役割を持つ。その役割は局在因子の適切な分配、細胞の配置やサイズの調整などに必要であると考えられる。さらに、酵母から線虫・ショウジョウバエ・ウニなど多くの生物種において、胚細胞、表皮細胞や神経細胞など様々な細胞タイプに渡って細胞分裂面のコントロールが観察できる。しかしながら、分裂面の定位のメカニズムに関する分子レベル、細胞レベルでの研究は一部の生物種に限られている。

ホヤでも胚後方で不等分裂として細胞分裂面のコントロールが観察できる。ホヤの不等分裂では胚後極に局在する Centrosome-Attracting Body(CAB)と名付けられた細胞内構造が微小管束を介して中心体、及び核を後方へ引き寄せる。後極に偏った核と中心体により後極の CAB の近くに分裂装置がつくれ、結果として偏った分裂面が形成され、細胞は大と小の娘細胞に分裂する(下図[normal, 16 cell])。すなわち、前方に大きい細胞、後方に小さい細胞を生じる不等分裂が起こる。さらに、CAB の位置は胚内で変化しないため、次の分裂でも再び後方に小割球を形成する不等分裂が起こる。このようにホヤ胚の後極では後方に小割球をつくる不等分裂が 8 細胞期以降、3 回連続で起こり、その結果として 6 4 細胞期以降の最も後方の細胞は著しく小さいものになる。

上記の不等分裂を含むホヤ胚の初期卵割における分裂面のコントロールを研究するために本研究では、CAB、及び CAB 形成予定領域である卵の植物半球後方の表層/細胞質(Posterior Vegetal Cortex/Cytoplasm; PVC;下図[灰色太線])に mRNA が局在している母性因子である PEM に注目した。PEM は既知の機能ドメインをもたない新奇なタンパク質である。マボヤ(*Halocynthia roretzi*)の PEM ホモログである Hr-PEM の機能をアンチセンスモルフォリノオリゴ(MO)により特異的に阻害するとホヤ胚後方で見られる不等分裂が等分裂に変化した。さらに Hr-PEM 機能阻害胚では CAB の構造は存在するものの、CAB と中心体を結ぶ微小管束が消失していた(下図[Hr-PEM knock-down, 16 cell])。この結果から Hr-PEM は微小管束形成を介して、不等分裂に働いていることが考えられる。

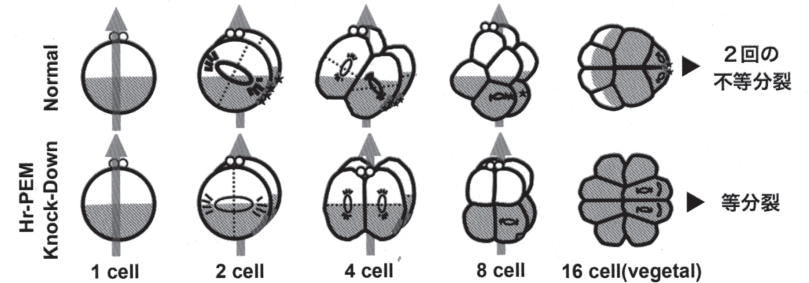
さらに以下の結果から、PEM は不等分裂がスタートする 8 細胞期以降以前にもホヤに特徴的な卵

割パターン形成に関わっていることが分かった。ホヤ胚の 8 細胞期胚は植物半球後方の割球が後方に突出するユニークな形態を示す。この後方割球の突出は直前の分裂時における分裂装置の傾き、さらには植物極側の中心体が PVC 側に引き寄せられることによってもたらされる。Hr-PEM 機能阻害胚では 8 細胞期胚のこの突出が見られなくなっていたので、分裂装置、及び中心体の観察をしたところ、中心体の PVC 方向への移動が見られず、分裂装置の傾きも起こっていなかった(下図[Hr-PEM knock-down, 4 cell])。この結果から、不等分裂以前の分裂においても PEM が中心体の位置及び、分裂面のコントロールに働いていると考えられる。また、極体の位置、mRNA の局在位置、CAB の位置という様々な情報から、第 2 分裂面が動植軸(下図[大矢印])に対して傾いており、その第 2 分裂面の定位には、やはり PEM が働いているという可能性が考えられた。さらに、蛍光標識したチューブリンを注入し、生きた胚において中心体の動態と分裂面形成の様子を観察したところ、第 2 分裂面は動植軸に対して確かに傾いており、このことから、ホヤでは第 2 分裂面が動植軸に対して傾いているというモデルの正しさが立証された(下図[2 cell])。

以上の結果から、PEM が微小管束形成を介して、中心体を CAB 方向に引き寄せることで後方に偏った分裂面を形成させ不等分裂が起こること、さらに、不等分裂以前の第 2、3 卵割においても PVC の方向へ中心体の位置の引き寄せが起こり、分裂面の定位に働いていることが分かった。これらをまとめると PEM は自身の局在位置(下図[灰色太線: mRNA, ★: タンパク質の局在])である PVC 及び CAB 方向へ何度も繰返し中心体を引き寄せることで、分裂面の定位を制御し続け、ホヤの初期卵割パターンを産み出しているといえる(下図)。

また、第 2 卵割面が PEM の働きにより動植軸に対して傾いているという発見は従来のホヤの動植軸の考えを覆すもので、割球の位置と動物—植物半球の位置関係における新しいモデルの提案も行った。

図 本研究で提案したホヤ胚の初期卵割パターンが産み出されるモデル(右側が後方、16 cell を除いて側面図)



(欧文要旨)

Orientation and positioning of the cell division plane is essential for generation of invariant cleavage patterns and for unequal cell divisions during development. Precise control of the division plane is important for appropriate partitioning of localized factors, spatial arrangement of cells for proper intercellular interactions, and size control of daughter cells. Ascidian embryos show complex but invariant cleavage patterns mainly due to three rounds of unequal cleavage at the posterior pole.

The maternal PEM (posterior end mark) mRNA is localized within the egg and embryo to the posterior region. PEM is a novel protein that has no known domain. Here we show that PEM of *Halocynthia roretzi* is required for correct orientation of early cleavage planes and subsequent unequal cell divisions by repeatedly pulling a centrosome towards the posterior

cortex and the centrosome-attracting body (CAB), respectively, where *PEM* mRNA is localized. When *PEM* activity is suppressed, formation of the microtubule bundle linking the centrosome and the posterior cortex did not occur. Immunostaining showed that the protein is present in the posterior cortex and the CAB, and the localization is extraction-resistant. *PEM* possibly plays a role in anchoring microtubule ends to the cortex. In our model of orientation of the early cleavage planes, we also amend the allocation of the conventional animal-vegetal axis in ascidian embryos, and discuss how the newly proposed A-V axis provides the rationale for various developmental events and the fate map of this animal.

In conclusion, the complex cleavage pattern in ascidian embryos can be explained by a simple rule of centrosome attraction mediated by localized *PEM* activity. *PEM* is the first gene identified in ascidians that is required for multiple spindle positioning events.

論文審査の結果の要旨

発生過程において細胞分裂面の定位(すなわち、どの方向に、そしてどの場所に分裂面を生じさせるか)のコントロールはいくつかの重要な役割を持つ。その役割は局在因子の適切な分配、細胞の配置やサイズの調整などに必要であると考えられる。この分裂面の定位の制御は多くの生物種の胚細胞、表皮細胞や神経細胞など様々な細胞タイプに渡って観察できる。しかしながら、分裂面の定位のメカニズムに関する分子レベル、細胞レベルでの研究は一部の生物種に限られている。

申請者は細胞分裂面の定位のメカニズムを明らかにするためにホヤの一種であるマホヤ (*Halocynthia roretzi*)を用いて研究を行った。ホヤでも胚極において、前方に大きい細胞、後方に小さい細胞を生じる不等分裂として細胞分裂面のコントロールが観察できる。ホヤの不等分裂では胚後極に局在する Centrosome-Attracting Body (CAB) と名付けられた細胞内構造が微小管束を介して中心体、及び核を自身の方向へ引き寄せることで、ホヤ胚後方の不等分裂に深く関わっていることが明らかにされている。さらに、CAB の位置は胚内で変化しないため、次の分裂でも再び後方に小割球を形成する不等分裂が起こる。このようにホヤ胚の後極では後方に小割球をつくる不等分裂が8細胞期以降、3回連続で起こり、その結果として6-4細胞期以降の最も後方の細胞は著しく小さいものになることが知られている。

申請者はCABに局在する母性因子であるPEM(Posterior End Mark)に注目して実験を行った。PEMの機能を特異的に阻害すると、ホヤ胚後方で見られる不等分裂が等分裂へ変化した。すなわち、申請者はPEMが不等分裂に働いていることを示した。さらに、PEMは不等分裂において中心体を引き寄せる際に生じる微小管束の形成に働いていることを示した。すなわちPEMは自身の局在する方向に中心体を引き寄せることで不等分裂を起こすといえる。また、PEMが不等分裂以前の分裂である第2、3卵割の分裂面の制御にも働いていることも申請者によって示された。さらにこのステージにおける分裂面の制御も中心体の位置をPEMの局在している方向へ引き寄せるというメカニズムで行われていることが示された。申請者はこれらの結果をまとめ、PEMは自身の局在方向へ何度も繰返し中心体を引き寄せることで、分裂面の定位を制御し続け、ホヤの初期卵割パターンを産み出しているというモデルを提案した。一つの動物種の卵割パターンの生成メカニズムが詳細に解析された例はほとんどなく、本論文の重要な成果の一つである。また、第2卵割面がPEMの働きにより動植軸に対して傾いて形成されるという発見をもとにホヤ胚における正しい動植軸の提案も行った。この発見は従来のホヤの動植軸の考えを覆すもので、この正しい動植軸に基づくホヤ胚の割球の位置と動物—植物半球の位置関係も示されている。

これらの結果、さらに結果に基づく提案がまとめられた本論文は新奇性が極めて高く、ホヤの胚発生の研究のみならず、分裂面の定位のコントロールという、より一般的な分野にも大きなインパクトを与えるものであると考えられる。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として十分に価値があるものと認める。