

氏名・本籍	後藤 俊志（兵庫県）
学位の種類	博士（理工学）
報告番号	甲第119号
学位授与の日付	令和4年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 該当者
論文題目	ホヤ1細胞期における母性決定因子輸送機構の解明
審査委員	（主査） 教授 西方 敬人 （副査） 教授 藤井 敏司 （副査） 准教授 川内 敬子 （副査） 助教 岩崎 哲史 （神戸大学バイオシグナル総合研究センター）

論文内容の要旨

動物胚の形態形成は、胚の背腹や左右の向きを決定する体軸形成が端緒となる。この体軸形成には、胚内における特定の母性決定因子（タンパク質、mRNA）が偏在することで生じる非対称性が必須である。胚に非対称性が生じるメカニズムは生物固有のものであるが、多くの動物で細胞骨格に依存していることが知られている。従って、動物の形態形成を理解するためには、細胞骨格依存的な物質輸送によって胚に非対称性が生じるメカニズムを理解することが強く求められる。

ホヤでは、1細胞期に明確な境界を持った2つのオルガネラドメイン（ミトコンドリアおよびER）により構成される Myoplasm やその領域に存在する母性 mRNA が非対称化することが知られている。細胞質再配置と呼ばれるこの現象は、正常な前後軸形成や細胞分化に必須であることから、発生の最も初期に見られる運命決定機構とされている。しかし、細胞骨格依存的な二段階の再配置（それぞれアクチン繊維および微小管に依存的な移動）が見られるなど細胞質再配置の俯瞰的なメカニズムはすでに明らかにされているが、移動に関わる分子構造やその制御機構など解明されていない点が多く残されている。そこで私は、細胞質再配置の分子メカニズム

を明らかにすることで、ホヤの形態形成メカニズムの解明を目的とした。

まず、細胞質再配置の経時変化を詳細に分類することで、細胞質再配置が減数分裂の進行と強い相関を持って進行していることを明らかにした。さらに阻害剤の添加実験により、受精直後の Calcium signaling がアクチン繊維の植物極への再構成を誘導することで第一再配置が行われていることを確認し、第二再配置は細胞周期調節因子である CDK および MAP kinase による制御を受けていることを明らかにした。従って、受精を引き金とする種々のシグナル伝達が細胞質再配置のペースメーカーとなっていることが期待される。

次に、細胞質再配置の駆動力である細胞骨格に着目した解析を実施した。アクチン観察手法の最適化により、植物極におけるアクチン繊維の局在は第二再配置まで維持されていることを発見し、阻害剤実験からこの局在が第二再配置を制御していることを明らかにした。この結果は、Myoplasm がアクチン繊維から微小管依存的な移動へと切り替わる遷移過程であることを示唆している。また、微小管観察手法の最適化により、第二再配置の後極表層で発達したレーン様の微小管構造 Cortical Array of Microtubules in Posterior-vegetal region (CAMP) が形成されることを発見した。さらに複数分子を同時に観察可能な染色法を開発することで、CAMP は Myoplasm の ER 領域に形成される一方で、母性 mRNA は第二再配置までに ER から一時的に乖離しながらも後極へと移動することを示した。これは、ER の移動には CAMP が、母性 mRNA の移動には他の構造が関与していることを示唆している。

以上の結果は、卵という巨大な細胞において、受精に伴うシグナル伝達が適切なタイミングで細胞骨格を制御し、オルガネラや mRNA がそれぞれ適切な細胞骨格へと巧妙に乗り継ぐことで適切な場所へと移動する複雑かつ洗礼された物質輸送が存在していることを示している。一方で、物質輸送は体細胞においても普遍的に見られる現象であり、細胞質再配置のより詳細な分子メカニズムを明らかにすることで、形態形成に関する新しい理解を得られるだけでなく、体細胞の物質輸送における未知のメカニズム解明に貢献することも期待される。

審査結果の要旨

申請者は、ホヤの形態形成の端緒となる細胞質再配置に注目し、可視化技術を改良することで高精細にオルガネラや細胞骨格を観察し、その分子メカニズムを究明した。申請者はまず、微小管観察の最適化により細胞質再配置の駆動力を生み出す新規微小管構造 CAMP を発見した。また、CAMP を含む様々な微小管構造が卵の賦活化を制御するシグナル分子によって制御されていることを明らかにし、1細胞期における受精から胚軸形成に至る一連の変化の統一的理解を提示した。さらに、免疫染色と *in situ* hybridization の同時染色法を精細化し、mRNA と小胞体およびミトコンドリア、細胞骨格との位置関係を詳細に記載した。一方、透明化手法を再検

討することで、アクチン線維が卵の植物極表層に長時間留まることを示すとともに、CAMPの形成をはじめとする胚軸形成に関わる複数のステップに関与することを明らかにした。この結果は、細胞質再配置においてこれまで独立に考えられてきた微小管とアクチン線維との明確な相互作用を指摘するものである。申請者のこれらの研究は、細胞質再配置における分子レベルでの解析に必要な知見を提供している。さらに、申請者の開発した技術は、卵という巨大な細胞で3次元のかつ高精細にオルガネラや mRNA を同時に観察することを可能にするものであり、これまで培養細胞などでは見つかっていない未知の現象が顕在化されることも期待される。特に、微小管やアクチン線維など複数の細胞骨格が関連して境界の不明瞭な細胞質領域を大きく動かす輸送装置を *translocational machinery* と命名し、アクチンやチューブリン分子の高い保存性や細胞質領域と液-液相分離の共通性を指摘することで展開する独自の仮説は興味深い。これらの研究成果は、総説を含む国際学術誌5編に掲載され、国際学会などでも数多く発表されており、国内外において高い評価を受けている。

令和4年2月21日、本学の学位規程に従い公開講演会を行い、本論文に関する説明と質疑応答を行った。申請者の説明はきわめて明快であり、応答内容も十分満足できるものであった。

以上により下記審査委員は本論文提出者（後藤俊志）の博士論文の審査、試験及び学力の認定を行った結果、本論文提出者が博士（理工学）の学位を授与せられるに充分なる資格をもつものであると認める。