

氏 名	きたざわ だいし <b>北澤 大志</b>
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 6 5 5 号
学位授与の日付	平成 25 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 ・ 専 攻	工芸科学研究科 生命物質科学専攻
学 位 論 文 題 目	<b>Cell biological and genetic studies on dynamics of cellular structures during male meiosis in <i>Drosophila</i></b> (ショウジョウバエ雄減数分裂における細胞内構造の動態に関する細胞生物学および遺伝学的研究)
審 査 委 員	(主査)教授 森 肇 教授 遠藤泰久 教授 山口政光 准教授 井上喜博

## 論文内容の要旨

ショウジョウバエ雄の減数分裂細胞は、体細胞に比べ大きく、16 個の細胞が同調して分裂をおこなうため、細胞内構造の動態を解析するうえで非常に優れたモデルである。本研究では、減数分裂期の細胞内物質輸送におけるメンブレントラフィックの重要性に関する検討、細胞質分裂を実行する収縮環の形成を制御するメカニズムの解析をおこなった。またショウジョウバエ種間において減数分裂期の紡錘体の大きさが異なる要因を種間で比較検討した。以上の結果を 3 章からなる学位論文にまとめた。

第 1 章では、ショウジョウバエの精母細胞特異的にメンブレントラフィックに関与する 52 遺伝子の dsRNA をそれぞれ発現させ、そのノックダウン効果を調べた。そして被覆小胞 COPI が雄減数分裂に必須であることを明らかにした。COPI 小胞は、雄減数分裂期に染色体分配に先駆けて中心体周辺に集積する。この動きは星状体微小管とマイナス端微小管モーターである dynein に依存する。そして娘細胞に等しく分配されることを明らかにした。COPI を欠損させると、細胞質分裂に必要なタンパク質や脂肪滴の収縮溝への集積が阻害されること、さらに、細胞質分裂に必要なセントラルスピンドル微小管の形成が阻害されることを示した。本研究により COPI は収縮溝に重要なタンパク質を運ぶとともに、ER で構成される細胞内構造の形成にも必要であることが分かった。第 2 章では、雄減数分裂において、微小管に依存してアクチン繊維からなる収縮環が細胞中央部に集積することを示した。このとき微小管プラス端タンパク質 Orbit/CLASP が収縮環上で直接アクチン繊維およびミオシン II 重鎖と結合する。Orbit が雄減数分裂において微小管と収縮環をつなぐ中心的な働きを担っていることが明らかになった。さらにタンパクキナーゼ Polo ならびにそれを含む KLP3A-Feo 複合体により、Orbit が収縮溝に集積されることをみいだした。第 3 章では、雄減数分裂紡錘体のサイズがショウジョウバエ種間によって異なる仕組みを解析した。ショウジョウバエ 28 種において減数分裂細胞を観察した結果、*D. kanekoi* が、これまで記載されている生物種の中で最も長い紡錘体を持つことが分かった。生殖系列細胞はひとつの細胞ユニットを作って増殖、分化する。このユニット内の細胞を生み出す細胞分裂の回数が少ない種ほど精母細胞の大きさが大きく、紡錘体も長いことがわかった。この相関関係は *D.*

*melanogaster* の突然変異体を用いて精原細胞の細胞周期を変化させることにより検証した。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、細胞分裂のモデルとして優れた特徴を持つショウジョウバエ雄の減数分裂を材料にして、細胞分裂に必要なタンパク質がどのようなメカニズムにより分裂面に運ばれるかという、いまだ未解決な点も多い重要課題に取り組んでいる。申請者は複数の蛍光タンパク質を用いたライブ観察法や FRET 法などの最新の細胞生物学的テクニック、および網羅的に遺伝子をノックダウンしていくという新しい遺伝学的手法を取り入れてこの問題の解明にあたってきた。細胞内の物質輸送についてはメンブレントラフィックという膜小胞による細胞内輸送が注目を集めているが、細胞分裂前に不活化されると従来は考えられていた。しかし申請者の研究により、分裂期における細胞質分裂の進行に被覆小胞 COPI が必須であることが明らかとなり、分裂面に必要なタンパク質や膜成分を供給するメカニズムの一端が明らかになった。したがってその学問的意義は高く評価できる。実際、これを報告した論文は国際的に評価の高い学術誌 (J. Cell Sci.) に掲載されている。さらに細胞を 2 つに割る収縮環という構造が形成される位置が微小管によって規定されることを明らかにするとともに、収縮環の構成因子であるアクチン繊維とミオシン分子が Orbit という微小管プラス端結合タンパク質の働きにより、目的の細胞膜上に運ばれるというメカニズムも明らかにした。微小管と収縮環との密接な関連は以前より指摘されていたが、それをつなぐ分子が同定されていなかった。申請者の研究はそのミッシングリンクを見つけたとして高く評価できる。さらに申請者は、細胞が 2 つに増殖するメカニズムの解析のみならず、雄減数分裂時に作られる紡錘体微小管が同じショウジョウバエでも種によって大きさが異なることをみいだした。生殖系列細胞を種間で比較検討することにより、減数分裂をおこなう精母細胞を生み出す細胞分裂の回数が少ない種ほど、その微小管構造が大きいことを明らかにした。細胞分裂の制御機構の解明のみならず、それを生物進化の問題にまで発展させた点は高く評価できる。学位論文は 3 章から構成され、明解な英文で記載されている。クリアな結果が得られており、論旨も明らかであった。本学位論文の内容は、申請者が筆頭著者である 1 編、共著者である 2 編（うち 1 編は共著者の Miyauchi, C. と同じ貢献をしていると明記されている）の査読のある国際的学術誌にすでに発表済みあるいは印刷中である。

1) Kitazawa D, Yamaguchi M, Mori H. and Inoue Y. H. COPI-mediated membrane trafficking is required for cytokinesis in *Drosophila* male meiotic divisions. *Journal of Cell Science* 125; 3649-3660. (2012)

2) Inoue Y. H, Miyauchi C, Ogata T and Kitazawa D. Dynamics of cellular components in meiotic and premeiotic divisions in *Drosophila* male. *InTech Meiosis*. 2012; 67-86. (2012)

3) Miyauchi C\*, Kitazawa D\*, Hayashi D, Ando I and Inoue Y. H. (\*equal contribution) Orbit/CLASP is required for germline cyst formation through its developmental control of fusomes and ring canals in *Drosophila* males. *PLOS ONE* in press

また参考論文として、以下の査読のある国際的学術誌 1 編、国内学会誌 1 編に発表済みである。

1) Ushijima, Y., Inoue, Y. H., Konishi, T., Kitazawa, D., Yoshida, H., Shimaji, K., Kimura, H. and Yamaguchi, M. (2012) Role of histone H3K9 methyltransferases during *Drosophila*

spermatogenesis. Chromosome Res. 20:319-331.

2)Kitazawa, D. and Inoue, Y. H. (2009) Structure and biological function of “Bionanofibers” essential for cell division. SENI GAKKAISHI 65, 114-120.