

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19870037  
 研究課題名（和文） ボルボックス胚の形態形成運動における細胞突起形成機構の解明  
 研究課題名（英文） Analysis of the mechanism of cell stalk formation in morphogenesis of *Volvox* embryo  
 研究代表者  
 豊岡 博子（TOYOOKA HIROKO）  
 独立行政法人理化学研究所・西井独立主幹研究ユニット・ユニット研究員  
 研究者番号：00442997

## 研究成果の概要：

本研究課題では、多細胞緑藻のボルボックス胚の形態形成運動「インバージョン」を引き起こす主要な過程の一つである「細胞突起形成」の分子機構とその進化の解析を、この過程に機能する新規タンパク質 *InvD* の解析を通して行った。*InvD* の細胞内局在解析により、*InvD* の表層微小管に対する作用が推測された。また *InvD* は *InvE* MAP キナーゼに依存したリン酸化を受けていた。さらにクラミドモナス *InvD* ホモログの解析により、*InvD* の分子進化が「インバージョン」の獲得に重要であったことが示唆された。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,370,000	0	1,370,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,720,000	405,000	3,125,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：生物学・発生生物学

キーワード：ボルボックス、形態形成運動、緑藻類、細胞突起、細胞形態変化

## 1. 研究開始当初の背景

多細胞緑藻ボルボックス (*Volvox carteri*) 胚の形態形成運動（インバージョン）は、多細胞生物の発生において重要な役割を担う細胞シートの反り返り現象の一つのモデルである。インバージョンは細胞レベルの2つのイベント、すなわち 1) 細胞が胚の外側に向かって細長く伸長して突起を形成する（「細胞突起形成」）、2) 細胞間を繋げる原形質連絡に対して個々の細胞が胚の内側へ移動した結果、その連絡が突起先端に移る（「細胞移動」）、によって引き起こされると

考えられてきた。研究代表者の所属する研究グループでは、インバージョンの分子メカニズムを解明するため、トランスポゾンタギング法を用いた変異体の単離とその原因遺伝子の同定・解析を進めてきた。その中で研究代表者は、*InvD* 変異体の原因遺伝子の同定と解析を担当した。*InvD* 変異体では、「細胞突起形成」が阻害されており、「細胞移動」は正常に起こった。*InvD* 変異体の原因遺伝子 *invD* がコードするタンパク質には、2つのコイルドコイル領域が存在したものの、顕著な相同性を示す既知のタンパク質は存在しな

かった。これらの結果により、研究代表者は「細胞突起形成」がインバージョンに必須なイベントであることを分子レベルで初めて証明し、*invD*がこの「細胞突起形成」に関与する機能未知の新規タンパク質であることを示した。

インバージョンにおける「細胞突起形成」には、微小管の重合が必要であることが阻害剤を用いた実験によって示されていた。しかし、それ以上の分子メカニズムは全く分かっていなかった。

また当研究グループではボルボックスに近縁な単細胞緑藻クラミドモナスにおける *invD* のホモログ遺伝子 *IDR1* が単離されていた。*invD* と *IDR1* の相同性は、他の4つのインバージョン関連遺伝子とそのクラミドモナスホモログ間と比較して、著しく低かった。そのため *invD* はインバージョンの必要性に伴って大きな分子進化を遂げ、細胞突起の形成に必要な機能を獲得した可能性があるのではないかと推測された。

## 2. 研究の目的

本研究課題は、インバージョンの分子機構の中で、この現象を引き起こす主要なイベントの一つである「細胞突起形成」に焦点を絞り、研究代表者らが同定した「細胞突起形成」に機能する新規タンパク質 *InvD* の作用機序を解析することで「細胞突起形成」の分子機構を明らかにすることを目的とした。さらに、*InvD* の機能の進化を解析することで、インバージョンにおける「細胞突起形成」がどのようにして単細胞生物から進化したのかを分子レベルで解明することを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) *InvD* タンパク質の発現解析

ボルボックスの発生過程における *InvD* タンパク質の増減を調べるため、各発生段階にある胚からタンパク質を抽出し、外注により作製した抗 *InvD* ペプチド抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。

### (2) *InvD* タンパク質の細胞内局在解析

*InvD*-HA 融合タンパク質を発現するコンストラクトを作製し、既に確立されているパーティクルガン法を用いた形質転換系によって *InvD* 変異体に導入して表現型が相補された系統を選抜した。得られた系統における *InvD*-HA 融合タンパク質の発現をウエスタンブロット解析により確認した後、抗 HA 抗体を用いた免疫染色を行った。なお、(1)で作製した抗 *InvD* 抗体は、非特異的なシグナルを検出してしまうため、免疫染色には用い

ることができなかった。

### (3) ボルボックスにおけるクラミドモナス *invD* ホモログ *IDR1* の機能解析

上記(2)と同様の方法で、ボルボックスの *InvD* 変異体にクラミドモナス *IDR1* を導入し、選抜された個体の表現型を調べた。

### (3) 細胞突起形成の信号伝達経路の解析

上記(1)のウエスタンブロット解析で、*InvD* のシグナルが分子量に差がある複数のバンドとして検出されたことから、*InvD* が翻訳後修飾を受けている可能性が示唆された。そこで、インバージョン前の胚のタンパク質抽出液のアルカリフォスファターゼおよびその阻害剤を用いた処理を行い、ウエスタンブロット解析を行った。また、*InvD* 変異体と同様な表現型（「細胞突起形成」の異常）を持つ *InvE* 変異体における *InvD* タンパク質の解析も行った。

## 4. 研究成果

ウエスタンブロットによる *InvD* 発現解析の結果、*InvD* は細胞分裂期後期からインバージョン期にかけて高い発現レベルを示し、インバージョン後は消失することが分かった（図1）。これは、*InvD* がインバージョンに先立って蓄積されることを意味する。

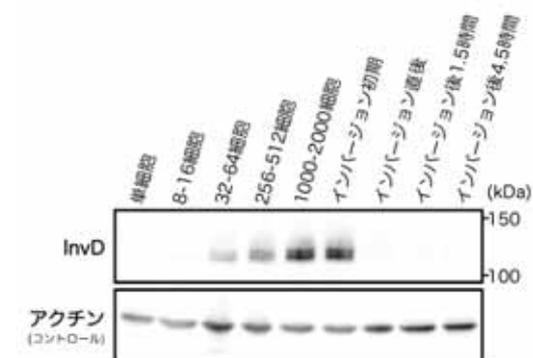


図1 ウエスタンブロットによる *InvD* タンパク質の発現パターンの解析

また免疫染色による細胞内局在解析の結果、*InvD* はインバージョン期において細胞表面層に観察された。特に、原形質連絡や基底小体に強いシグナルがみられ、細胞突起の先端にも *InvD* の局在が観察される場合もあった（図2）。なぜ *InvD* がインバージョン期においてこのような局在パターンを示すのかはまだ明らかではないが、細胞表面層には微小管が存在するので、*InvD* が微小管の重合や安定化になんらかの作用を及ぼしている可能性が考えられる。多細胞生物の形態形成運動に伴って細胞が変形する現象は、様々な生物種で普遍的に見られる現象であり、*InvD* という

新規タンパク質が微小管を介してこの現象を制御しているという可能性は、発生生物学研究において重要な意義があるといえる。特に細胞突起の先端への局在は興味深く、今後の *InvD* の作用メカニズムの全貌解明に向けて、重要な情報になると考えている。

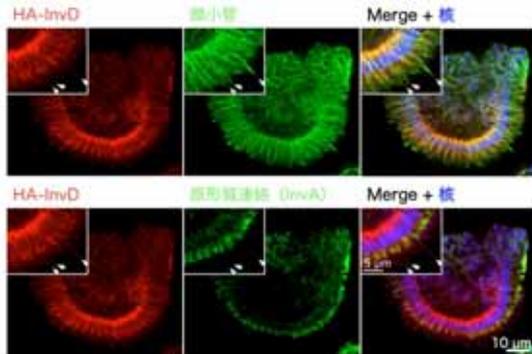


図2 インバージョン期における *InvD* タンパク質の局在  
各写真の左上に組み込まれた像は、胚の一部分の拡大像。矢印は細胞突起の先端を示す。

またインバージョン後の胚では、インバージョン前やインバージョン中の胚と比較して *InvD* のシグナルが著しく低下していた(図3)。これは、ウエスタンブロットの結果でインバージョン後 *InvD* が消失すること(図1)と一致する。細胞突起はインバージョン期にしかみられない一時的な構造である。そのため *InvD* が、インバージョン終了後、速やかに分解されることで細胞突起の消失に寄与している可能性が示唆される。

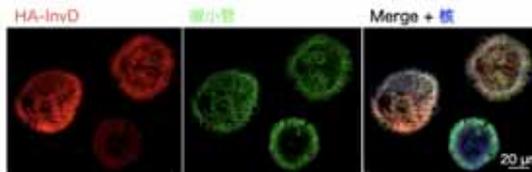


図3 インバージョン後の *InvD* タンパク質の消失  
インバージョン後の胚(下)における HA-*InvD* のシグナルは、インバージョン前(左)やインバージョン中(右上)と比較して、著しく低い。

またクラミドモナスの *invD* ホモログ *IDR1* のボルボックス *InvD* 変異体に導入した結果、複数の形質転換体が得られたにも関わらず、*InvD* 変異体の表現型を相補した系統は得られなかった。このことは、*invD* と *IDR1* の相同性の低さから推察されていた、*invD* の分子進化がインバージョンにおける「細胞突起形成」の獲得に重要であった可能性を一層強めた。今後、クラミドモナスとボルボックスの中間種における *invD* ホモログ遺伝子の探索とその機能解析により、*invD* が「細胞突起形

成」に必要な機能を獲得していった過程の解明が期待される。

またアルカリフォスファターゼとその阻害剤を用いた実験により、*InvD* タンパク質がリン酸化を受けていることが明らかになった(図4)。さらに *InvE* 変異体においては、*InvD* タンパク質のリン酸化が阻害されており、その発現量も減少していることが分かった(図5)。*InvE* 変異体の原因遺伝子は、MAPキナーゼであることが既に示されている。そのため *InvD* は *InvE* MAPキナーゼに依存したリン酸化・発現量の調節を受けているといえる。本研究課題によって「細胞突起形成」の情報伝達経路の一端を初めて明らかにできたことは、今後その経路の全貌の解明を目指す上で非常に意義深いといえる。今後の生化学的・細胞生物学的解析を通して、*InvD*・*InvE* 両タンパク質が具体的にどのようなしくみで「細胞突起形成」に働いているのかを明らかにすることが期待される。



図4 アルカリフォスファターゼ(CIP)とその阻害剤の効果  
CIPを処理することによって、ブロードであった *InvD* タンパク質のシグナルがシフトダウンし、一本のシャープなバンドになった。CIPの効果は、濃度依存的にCIP阻害剤によって打ち消されたため、この効果はCIPの脱リン酸化によるものであるといえる。

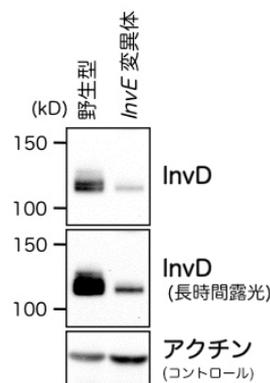


図5 *InvE* 変異体における *InvD* タンパク質のリン酸化と発現  
*InvE* 変異体では、野生型と比較して *InvD* タンパク質の量が少なく、リン酸化によるブロードなシグナルは見られなかった。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計3件)

豊岡博子(他5名) ボルボックスの形態形成運動における細胞突起形成の分子メカニズム、第7回クラミドモナスワークショップ、2009年3月25日、名古屋大学東山キャンパス

Toyooka, H(他2名)、*Volvox InvD* is a novel protein essential for cell shape change during inversion、13<sup>th</sup> International Chlamydomonas Conference、2008年5月28・29日、パール(フランス)

豊岡博子(他2名) ボルボックス胚の形態形成運動「インバージョン」の分子メカニズム、日本植物学会第71回大会(シンポジウム講演)、2007年9月7日、東京理科大学野田キャンパス

6. 研究組織

(1)研究代表者

豊岡 博子 (TOYOOKA HIROKO)

独立行政法人理化学研究所・西井独立主幹研究ユニット・ユニット研究員

研究者番号：00442997