

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月11日現在

機関番号：32606

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22770196

研究課題名（和文） 二核細胞の分化機構と存在意義

研究課題名（英文） Mechanisms and roles of cell binucleation

研究代表者

谷口 喜一郎 (KIICHIRO TANIGUCHI)

学習院大学・理学部生命科学科・助教

研究者番号：20554174

研究成果の概要（和文）：

心筋や肝臓などでは、二核化という特殊な有糸分裂をおこない二核細胞をつくりだされる。本研究計画では、ショウジョウバエを用い、二核化制御メカニズムと二核化の意義について解析を行った。本研究により、細胞分裂と二核化の違いを生み出す因子として Mud タンパク質を同定できた。また、二核状態は、核の再配置により細胞形態の多様な変化を可能にし、器官形態の柔軟性をうみだしていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Some cells such as myocytes and hepatocytes can contain two nuclei. In this research project, I examined mechanisms and roles of the binucleation using the *Drosophila* tissue. In the result, we identified Mud which is a key factor to control the behavior of binucleating cells. We also found that binucleate state enables a cell to effectively change its shape by rearrangement of two nuclei for a plasticity of organ shape.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：ショウジョウバエ、二核細胞、生殖器附属腺、細胞分裂、細胞周期

1. 研究開始当初の背景

多くの真核細胞は分裂によりその個数を増やす際に、核分裂と連動して細胞質分裂を行うという普遍的原則を持つ。そのため真核細胞の普遍的特徴の一つとして、一細胞に対して一つの核が細胞内に存在し、その遺伝子発現を担うという性質がある。核分裂と細胞質分裂の連続性は細胞周期制御により厳密

に監視されており、何らかの異常が認められた細胞は修正・消去される。

一方、分化した細胞などでは、その遺伝子転写量を上昇させるために染色体の複製のみを行う、倍数化を行うことがある。倍数化状態は、細胞周期においてM期（核分裂・細胞質分裂）を積極的にスキップすることでつくりだされる。しかし、倍数化細胞においても一細胞に対して一核の状態は維持され

る。結果的に、筋細胞のような細胞融合を行う組織を除けば、通常の細胞分裂制御では多核状態はつくりだされず、がん細胞等の細胞周期制御が破綻した細胞でしか見られない。

ところが、肝臓や心筋など一部の細胞種では、分裂の際に、核分裂に続く細胞質分裂を放棄することがある。このため、正常発生において細胞内に二つの核を持つという、細胞周期制御の原則から見ると、一見異常な分化状態がつくりだされる。興味深いことに、二核細胞は広範な生物種において存在しており、哺乳動物など一核細胞を常態とする高等多細胞生物においても多く存在している。また、肝臓細胞における二核化は離乳や疾患と関連していることや、心筋細胞における二核化は臓器の成熟に関連ことが知られており、臓器の機能維持において二核状態が何らかの意義を持って生み出されていることが予想できる。しかしながら、細胞の二核化に関しては、国内外においてあまり注目されておらず、その制御メカニズムや存在意義については不明な点が多い。

代表者は、二核細胞の研究に取り組むにあたり、ショウジョウバエ雄生殖器の一部である附属腺を用いている。附属腺は、その上皮が二核細胞のみからなる、極めて特徴的な器官である。しかしながら、附属腺の二核化はほとんど注目されておらず、その制御メカニズムや意義については全く分かっていなかった。そこで代表者は、二核化と細胞分裂の違いを明らかにした。その結果、二核化時には、分裂装置である中心紡錘体が形成されていないことが明らかになった。

2. 研究の目的

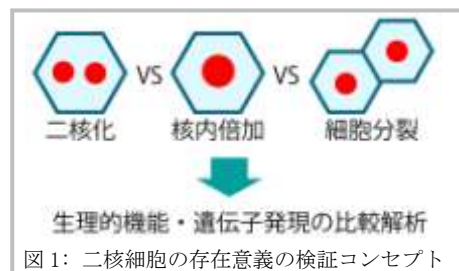
(1) 多くの真核細胞は、細胞内にただ一つの核を保有する。しかしながら、心筋細胞や肝細胞では、細胞内に二つの核を保有するという、一見異常な分化状態を積極的につくりだす。心筋細胞では臓器の成熟、肝細胞では離乳・疾患が二核化に関連していることが示唆されており、二核状態は組織恒常性において何らかの意義を持っていると考えられる。しかしながら、二核状態の意義については、ほとんど研究がなされてこなかった。本研究では、二核細胞のみで構成されることが知られるショウジョウバエ雄附属腺をモデル系として用い、二核状態の機能的優位性について解明することを目的とする。

(2) 細胞分裂では、染色体分配（核分裂）と細胞質分裂は常に連続しておこる減少であり、これにより一核状態は常時維持されることになる。この連続性が乱れた細胞は、異常細胞として認識され、修正または排除され

る。しかしながら、肝細胞や心筋細胞は、染色体分配に続く細胞質分裂にスキップすることで、二核細胞をつくりだすことが知られている。代表者は、ショウジョウバエ附属腺を用いた研究により、附属腺細胞における二核化は、中心紡錘体形成の抑制により引き起こされることを明らかにしてきた。本研究では、附属腺において中心紡錘体形成を抑制する因子の動的・解析をおこない、二核化という特殊な細胞周期を制御する遺伝的メカニズムを解明する

3. 研究の方法

(1) 附属腺細胞は $4n$ の核を二つ保有する $8n$ ($4n \times 2$) の二核細胞である。二核細胞の存在意義の解明をおこなうにあたり、人為的に $8n$ の一核細胞（疑似倍加細胞）と $4n$ の一核細胞（疑似分裂細胞）を附属腺において人為的な作成を試みる。これらの細胞は M 期サイクリンの機能阻害 (*fzr* 遺伝子の一過的な強制発現)、またはスピンドルチェックポイントの機能阻害 (*mad2* 遺伝子に対するノックダウン) を人為的に操作する方法で創出する。作成した一核細胞 ($8n$) と一核細胞 ($4n$) を用いて、二核細胞 ($4n \times 2$) との比較を行う (図 1)。これにより、核内倍加と細胞分裂と比較した場合の、二核化の優位性を検証する。



まず、核の個数が細胞分化に影響を与えるかどうか、以下の遺伝的マーカーを用いて検証する: Paired (必須タンパク質)、Acp70A (分泌タンパク質)、Hsp60 (恒常性維持タンパク質)、ヒストンアセチル化 (ゲノム活性化指標)。次に、附属腺による生殖機能に注目した比較解析を行う。附属腺は、内腔に性ペプチドを保有し、その容量と生殖効率は比例する。一方で、交尾時には、附属腺は顕著に収縮し効率的に内容物を雌に送り出す。この附属腺の内腔サイズの変化に注目し、二核細胞の優位性の検証をおこなう。

(2) 二核化時には、細胞分裂装置の一つである中心紡錘体の形成が抑えられている。そこで、微小管の発達や紡錘体形成に関与する因子に絞り、細胞二核化を制御する遺伝子の探索を行う (図 2)。過去の知見を元に、候補

因子として、以下の遺伝子を検証する：
M期キネシン (*Kinesin-like protein at 10A*, *Kinesin-like protein at 61F*, *Kinesin-like protein at 61F*, *Pavarotti*, *no distributive disjunction*)、微小管関連因子 (*chromosome bows*, *Eb1*, *Katanin 60*, *spastin*)、紡錘体極性形成因子 (*bazooka*, *par-1*, *rapsunoid*, *G protein α i subunit*, *mushroom body defect*)

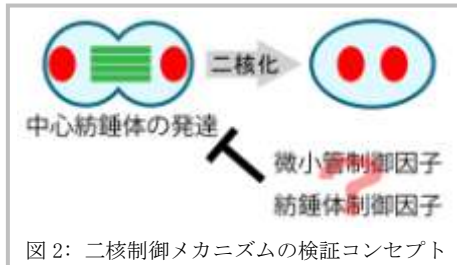


図2：二核制御メカニズムの検証コンセプト

同定された遺伝子について、突然変異体を用いて、二核化時における中心紡錘体形成・細胞質分裂の観察をおこなう。また、同定された遺伝子を強制発現させることで、通常の細胞分裂をおこなう細胞において二核化を誘導することができるか検証する。

4. 研究成果

(1) 細胞二核化の生理的意義の解明

- ① 通常状態では、すべて二核細胞 ($4n \times 2$) からなる附属腺上皮において、スピンドルチェックポイントの機能を操作することで一核細胞 ($8n$) の創出に成功した。*Mad2* は染色体分配を監視するスピンドルチェックポイントの構成因子である。一方で、ショウジョウバエにおいてはスピンドルチェックポイントを欠いても有糸分裂にはほとんど影響は無いことが報告されている。しかしながら、附属腺細胞の二核化時において *Mad2* 遺伝子をノックダウンすると、通常二核細胞に加えて、有糸分裂が高効率に失敗し、結果的に一核細胞 ($4n \times 1$) が作りだされた。この結果は、二核化時においては、通常の細胞分裂時とくらべ、染色体-微小管結合の効率が低く、スピンドルチェックポイント欠損による影響が現れたものであると考えられる。

この一核細胞では、その後の発生において、通常通り倍数化 ($8n \times 2$) するものと、倍数化が起こらない ($4n \times 1$) 場合の二通りが観察された (図3)。これらの二種類の細胞について、 $8n$ の一核細胞を“疑似倍加細胞”、 $4n$ の一核細胞を“疑似分裂細胞”と定義づけ、その後の二核細胞 ($4n \times 1$) との比較実験に用いることにした (図3)。

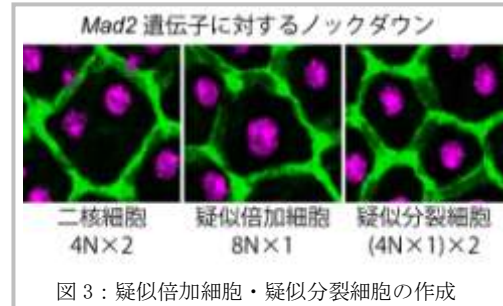


図3：疑似倍加細胞・疑似分裂細胞の作成

- ② DNA量の等しい3種類の細胞を比較実験に用いた：二核細胞 ($4n \times 2$)、疑似倍加細胞 ($8n \times 1$)、疑似分裂細胞 2細胞分 ($(4n \times 1) \times 2$) (図3)。まず、二核状態が細胞分化に関与しているかを用いて調べた。附属腺の分化における必須タンパク質 *Paired*、附属腺の分泌タンパク質である *Acp70A*、細胞の一般的恒常性に関与する *Hsp60* ゲノム活性化指標であるヒストンアセチル化について調べた。その結果、いずれの細胞においても分化の指標である、*Acp70A* と *Paired* の発現は正常に見られた。また、*Hsp60* の発現レベルの差異も見られず、基本的な転写・翻訳のレベルも差異はないと考えられた。さらに、ヒストンアセチル化にも差異は見られず、ゲノム活性化・不活性化にも影響は無いことが示唆された。以上の結果から、二核化は細胞分化自体には必須ではないことが考えられた。

つぎに、附属腺の生理的機能に対する二核状態の意義について検証を行った。附属腺は、性ペプチドと呼ばれるタンパク質を分泌・保有し、交尾時に雌へ排出する。生殖効率を上げるために、附属腺は、器官内腔のサイズを多様に変化させている。解析の結果、二核細胞は、核の立体配置を変化させることで、細胞の扁平化 (器官内腔の拡大) と立方化 (器官内腔の縮小) をおこなっていることが明らかになった (図4)。この器官形態の柔軟性に二核状態が有利であることを証明するために、疑似倍加細胞 ($8n \times 1$)、疑似分裂細胞 2細胞分 ($(4n \times 1) \times 2$) における器官形態の柔軟性を調べた。その結果、二核状態は、疑似倍加細胞や疑似分裂細胞と比べて、器官形態の柔軟性 (内腔サイズの最大値と内腔サイズの最小値の比率) が有意に高いことが統計的に明らかになった。

二核細胞としてよく知られている、心筋細胞や肝細胞はどちらもその細胞形態・器官形態を多様化させる器官である。心筋細胞は、その形態の収縮させることで器官の機能性を維持していることは

言うまでもない。また、肝細胞は飢餓状態と富栄養状態でその細胞サイズを大きく変化させることや、再生時において、細胞形態を拡大させることが知られている。本研究成果により提唱する、二核状態が細胞形態・器官形態の柔軟性を生み出すという理論は、ショウジョウバエ附属腺のみならず、心筋細胞や肝細胞にも適用できる可能性がある。また、二核細胞のみならず、骨格筋のような多核細胞に対しても本研究成果は応用できる可能性がある。

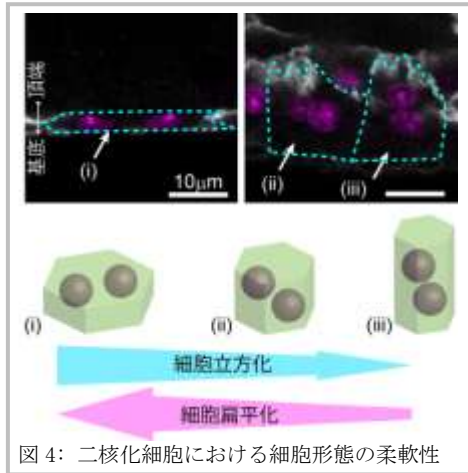


図4: 二核化細胞における細胞形態の柔軟性

(2) 細胞の二核化制御メカニズムの解明

- ① 附属腺細胞の二核化は、細胞分裂装置である中心紡錘体が発達しないことに起因して起こる。そこで、二核化時において中心紡錘体形成を抑えている因子の同定を試みた。M期キネシン (*Kinesin-like protein at 10A*, *Kinesin-like protein at 61F*, *Kinesin-like protein at 61F*, *Pavarotti*, *no distributive disjunction*)、微小管関連因子 (*chromosome bows*, *Ebl*, *Katanin 60*, *spastin*)、紡錘体極性形成因子 (*bazooka*, *par-1*, *rapsunoid*, *G protein α i subunit*, *mushroom body defect*) を候補遺伝子として調べた結果、*mushroom body defect (mud)* を同定できた。通常、二核化時には、中心紡錘体が作られないことで、細胞質分裂が停止する。しかしながら、*mud* 突然変異体においては、二核化時にもかかわらず、中心紡錘体が発達し、細胞質分裂が進行していた (図5)。この結果から、*Mud* は二核化時において中心紡錘体形成を抑える因子であることが示唆された。

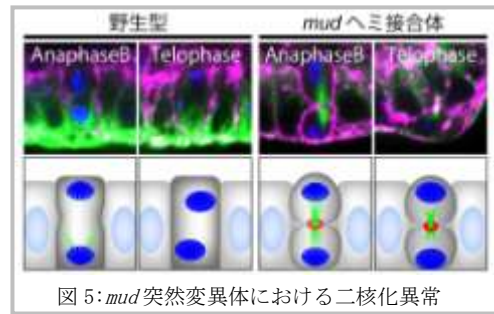


図5: *mud* 突然変異体における二核化異常

- ② *Mud* はショウジョウバエ NuMA ホモログであり、非対称分裂時において紡錘体極性に必須の因子である。一方、*Mud* の研究はこれまで多く行われてきたが、微小管重合・束化の阻害といった、中心紡錘体形成の抑制に関与しうる機能は報告されていない。つまり、二核化時における *Mud* の機能は、これまで知られてきた機能とは大きく異なると考えられる。

代表者は、*mud* 遺伝子が、オルタナティブスプライシングにより、複数のスプライシングバリエントを産生する点に注目した。*mud* は、大きく分けて、タンパク質サイズの大きい *Mud^{long}* と、タンパク質サイズの小さい *Mud^{short}* をコードする (図4)。これまでに解析が行われてきた、スプライシングバリエントは、*Mud^{long}* である。*Mud^{long}* は、C末に LGN 結合モチーフと呼ばれる特徴的構造を持っており、この構造が *Mud^{long}* の機能に必須である (図6)。一方で、*Mud^{short}* に関する機能は全く報告されていない。しかしながら、アミノ酸配列情報から *Mud^{short}* は LGN 結合モチーフを持たないことが分かっており、*Mud^{long}* とは全く異なる機能を持つ可能性が期待された (図6)。興味深いことに、これらの二種類のスプライシングは、哺乳動物にも存在することがゲノム情報から予想された (図6)。

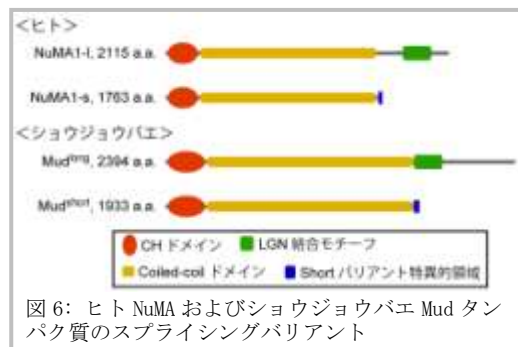
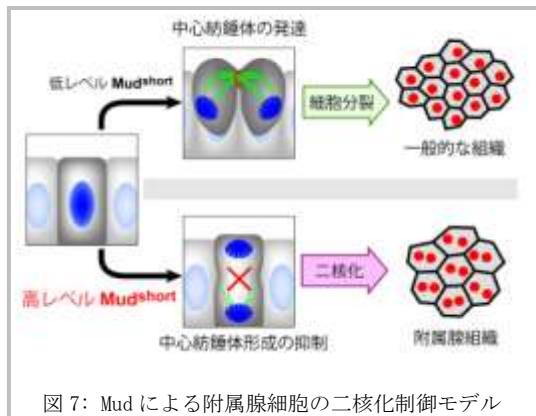


図6: ヒト NuMA およびショウジョウバエ Mud タンパク質のスプライシングバリエント

本研究では、*Mud^{short}* が二核化時において、中心紡錘体形成を抑えている可能性について検証した。検証の結果、*mud* 突然変異体の二核化時における、過剰な紡錘体の発達は、*mud^{short}* を強制発現させる

ことで救済できた。*mud^{long}*の強制発現もまた、*mud*突然変異体における異常を抑えたものの、その効果は弱かった。これらの結果から、これまでに機能未知であった *Mud^{short}* が、二核化時において中心紡錘体形成を抑えている因子であることが明らかになった (図7)。

Mud/NuMA は幹細胞系の維持に関与することが知られている。また、腫瘍化した細胞では、*Mud/NuMA* の発現量が異常になることが知られている。しかしながら、これまでの研究では、*Mud/NuMA* のサブライシングバリエーション特異的な機能の存在について考慮されてこなかった。本研究結果によって明らかになった、サブライシングバリエーション特異的な新規な *Mud/NuMA* の機能を考慮することで、幹細胞システムや腫瘍形成における *Mud/NuMA* の新たな働きが明らかになる可能性がある。



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)

[雑誌論文] (計7件)

- ① Okumura, T., Fujiwara, H., Taniguchi, K., Kuroda, J., Nakazawa, N., Nakamura, M., Hatori, R., Ishio, A., Maeda, R. and Matsuno, K., Left-right asymmetric morphogenesis of the anterior midgut depends on the activation of a non-muscle myosin II in *Drosophila*., *Developmental Biology*, 査読有, 344 巻, 2010, 693-706
DOI: 10.1016/j.ydbio.2010.05.501.
- ② Kuroda, J., Nakamura, M., Yoshida, M., Yamamoto, H., Maeda, T., Taniguchi, K., Nakazawa, N., Hatori, R., Ishio, A., Ozaki, A., Shimaoka, S., Ito, T., Iida, H., Okumura, T., Maeda, R. and Matsuno, K., Canonical Wnt signaling in the

visceral muscle is required for left-right asymmetric development of the *Drosophila* midgut., *Mechanisms of Development*, 査読有, 2011, 128 巻, 625-639

DOI: 10.1016/j.mod.2011.12.002

- ③ Taniguchi, K., Kokuryo, A., Imano, T., Minami, R., Nakagoshi, H. and Adachi-Yamada, T., Binucleation of *Drosophila* adult male accessory gland cells increases plasticity of organ size for effective reproduction., *Biological Systems- Open Access*, 招請論文, 2011, 1 巻, e101

DOI: 10.4172/BSO.1000e101

- ④ Taniguchi, K., Maeda, R., Ando, T., Okumura, T., Nakazawa, N., Hatori, R., Nakamura, M., Hozumi, S., Fujiwara, H. and Matsuno, K., Chirality in planar cell shape contributes to left-right asymmetric epithelial morphogenesis., *Science*, 査読有, 2011, 333 巻, 339-341

DOI: 10.1126/science.1200940

- ⑤ Minami, R., Wakabayashi, M., Sugimori, S., Taniguchi, K., Kokuryo, A., Imano, T., Adachi-Yamada, T., Watanabe, N. and Nakagoshi, H., The homeodomain protein defective proventriculus is essential for male accessory gland development to enhance fecundity in *Drosophila*., *PLoS One*, 査読有, 2012, 7 巻, e32302

DOI: 10.1371/journal.pone.0032302.

- ⑥ Nakamura, M., Matsumoto, K., Iwamoto, Y., Muguruma, T., Nakazawa, N., Hatori, R., Taniguchi, K., Maeda, R. and Matsuno, K., Reduced cell number in the hindgut epithelium disrupts hindgut left-right asymmetry in a mutant of pebble, encoding a RhoGEF, in *Drosophila* embryos., *Mechanisms of Development*, 査読有, 2012, 130 巻, 169-180

DOI: 10.1016/j.mod.2012.09.007

- ⑦ Nakazawa, N., Taniguchi, K., Okumura, T., Maeda, R. and Matsuno, K., A novel Cre/loxP system for mosaic gene expression in the *Drosophila* embryo., *Developmental Dynamics*, 査読有, 241 巻, 965-974.
doi: 10.1002/dvdy.23784

[学会発表] (計6件)

- ① Taniguchi, K., Kokuryo, A., Imano, T., Minami, R., Nakagoshi, H. and Adachi-Yamada, T., Cytokinesis-

deficient binucleation as a strategy for tissue enlargement in *Drosophila*. , 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 2010/12/10, 神戸ポートアイランド

- ② Taniguchi, K., Kokuryo, A., Imano, T., Sakata, R., Minami, R., Nakagoshi, H. and Adachi-Yamada, T., Cytokinesis-deficient binucleation in *Drosophila* accessory gland for providing plasticity of organ size., 1st Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference, 2011/5/22-25, 劍潭青年活動中心 (台湾)
- ③ Taniguchi, K., Kokuryo, A., Imano, T., Sakata, R., Minami, R., Nakagoshi, H. and Adachi-Yamada, T., Cytokinesis-deficient binucleation in *Drosophila* accessory gland for providing plasticity of organ size., 第63回日本細胞生物学会大会, 2011/6/18, 北海道大学
- ④ Taniguchi, K., Kokuryo, A., Imano, T., Sakata, R., Minami, R., Nakagoshi, H. and Adachi-Yamada, T., Cytokinesis-deficient binucleation in *Drosophila* accessory gland for providing a higher level of plasticity of organ size., 第34回日本分子生物学会年会, 2011/12/16, パシフィコ横浜
- ⑤ Taniguchi, K., Kokuryo, A., Imano, T., Sakata, R., Minami, R., Nakagoshi, H. and Adachi-Yamada, T., Cytokinesis-deficient binucleation in *Drosophila* accessory gland for providing plasticity of organ size., 53rd Annual *Drosophila* Research Conference, 2012/3/8-10, Sheraton Chicago Hotel & Towers (米国)
- ⑥ Taniguchi, K., Abe, S., Minami, R., Imano, T., Kokuryo, A., Nakagoshi, H. and Adachi-Yamada, T., Elimination of malfunctioning cells in *Drosophila* male accessory gland, a non-regenerative tissue., 第35回日本分子生物学会年会, 2012/12/12, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

[図書] (計2件)

- ① 前田礼男、谷口喜一郎、安藤格士、松野健治、学研メディアカル秀潤社、細胞工学 Vol.30 No.12、2011、1298-1300
- ② 中澤直高、谷口喜一郎、前田礼男、安藤格士、松野健治、羊土社、実験医学 Vol.30 No.1、2012、75-78

[その他]

ホームページ等

<http://www-cc.gakushuin.ac.jp/~e090001/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 喜一郎 (KIICHIRO TANIGUCHI)
学習院大学・理学部生命科学科・助教
研究者番号：20554174