

論文の内容の要旨

論文題目 細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の
多細胞組織化における接触依存的な運動機構

氏名 藤森大平

多細胞生物の発生における様々な場面で、細胞集団は分泌した拡散性の因子や細胞間接着を介して互いの運動を制御し合う。それらのシグナルをどのように組み合わせ、目的の形態を形成するのかを明らかにすることは発生の仕組みを理解する上で重要である。しかしながら、高等動物は高度に組織化されているためシグナルは多種多様であり、その解析は困難な場合が多い。本研究では、より単純な多細胞組織を形成する細胞性粘菌に注目し、細胞性粘菌の多細胞組織化における運動制御機構を解析した。

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は土壤中に生息する単細胞アメーバである。バクテリアを捕食して無性生殖により増殖するが、飢餓状態に陥ると集合し多細胞体を形成する。多細胞体は最終的に貧栄養環境耐性の高い孢子と、孢子を死んで支える柄に分化し、子実体を形成する。細胞の分化は集合後期から徐々に進み、集合塊中は予定孢子に分化した細胞と予定柄に分化した細胞が混在した状態になる。二つの細胞型の集団はだんだんと細胞選別を起こし、予定孢子細胞集団の上に予定柄細胞集団が配置する。これは頂端形成と呼ばれ、その後の発生過程へ進むために重要なステップである。集合から細胞選別に至るまで、細胞性粘菌の多細胞化の過程は自ら分泌する cAMP への走化性運動を軸に理解されてきた。集合期の細胞性粘菌は cAMP を受容すると自ら産生し分泌する。隣接する細胞間で次々に cAMP シグナルがリレーされることで cAMP 螺旋波を生成し、螺旋波に対する一方向的な運動により螺旋中心へと集合する。分化した細胞間で走化性運動を比べると、予定柄細胞の方が予定孢子細胞よりも cAMP に対す

る走化性運動の速度が大きい。したがって、予定胞子細胞と予定柄細胞の細胞選別は、走化性速度の差異により生じると考えられてきた(differential chemotaxis 仮説)。しかしながら、cAMP を合成できない変異株に PKA の触媒サブユニットを過剰発現させ発生をバイパスさせると集団的な運動を示すことや、細胞間接着分子である TgrC1 や TgrB1 を欠損させると集合以降の多細胞体形成が進まないことから cAMP だけでなく細胞間接着分子の集団運動に対する寄与が示唆されてきたが、今日に至るまで細胞間接着分子による運動制御は明らかにされてこなかった。そこで本研究では、細胞性粘菌の発生における細胞間接着による運動制御を検証した。

第 3 章では、cAMP 濃度勾配下で運動する集合期の細胞性粘菌を観察し、単独で運動する細胞と 2 細胞ペアの前方の細胞、後方の細胞それぞれの運動の特徴を解析した。集合時の細胞は隙間なく密接して 3 次元的に運動するため、個々の細胞の形状や運動を解析することが難しい。そこで高さが 5 μm のマイクロ流体デバイスを作製し、細胞同士が重ならない状況下で詳細に細胞運動を観察した。流路内を単独で運動する細胞は、時折り細胞側面から新たな膜突出(側方仮足)を出して運動方向を変えながら運動した。2 細胞のペアの前方の細胞は単独の細胞と同様に側方仮足を形成しながら運動していたのに対し、後方の細胞は細胞間接着を前方として伸びた形状(極性)を強く維持しながら前方の細胞を追従した。2 細胞ペアの前方の細胞をレーザーでダメージを与え運動を止めると、後方の細胞はそのまま押し続けた。cAMP 濃度勾配の反転に対して、2 細胞ペアの前方の細胞は側方仮足を形成して運動方向を反転させるのに対し、後方の細胞は反転した勾配に応答しにくかった。以上から、2 細胞ペアの後方の細胞は強い細胞極性を維持しつつ、能動的に運動していることが示唆された。

第 4 章では、前章で見られた追従する細胞における強い細胞極性を、細胞内の分子動態から理解することを目的とした。まず細胞前端での細胞膜の押し出しを担う樹状アクチンネットワークに注目した。樹状アクチンネットワークの構成要素である Arp2 を GFP 標識した GFP-Arp2 発現細胞を用いて、樹状アクチンネットワーク内の GFP-Arp2 を局所的に蛍光退色させることで樹状アクチンネットワークの成長を可視化し、その速度を定量した。その結果、単独の細胞や連なった先頭の細胞の前端での樹状アクチンネットワーク成長速度は約 21 $\mu\text{m}/\text{min}$ であるのに対し、追従する細胞の進行方向の細胞間接着領域では約 31 $\mu\text{m}/\text{min}$ と大きかった。Arp2/3 複合体を直接活性化する SCAR 複合体の局在を、SCAR 複合体のサブユニットの一つ HSPC300 を GFP 標識した HSPC300-GFP 発現細胞を用いて可視化した。その結果、連なって運動する細胞ペアの前方の細胞では、HSPC300-GFP 局在が約 10 秒程度で生成と消失を繰り返していたのに対し、後方の細胞では進行方向の細胞間接着領域に HSPC300-GFP が局在し続けることがわかった。膜収縮により細胞後端を形成するミオシン II の局在を解析したところ、単独で運動する細胞と比較して追従する細胞の前端はミオシン II の集積が低下していた。

第 5 章では、追従する細胞で見られる持続的な樹状アクチンネットワーク形成を司る細胞間接着分子を探索した。ヘテロフィリックに結合する細胞間接着分子 TgrB1 と TgrC1 の欠損株は集合以降の発生が進まないことから、これらが細胞運動に関与する可能性があると考えた。tgrB1 と tgrC1 それぞれの欠損株と野生株の混合集団を観察し、細胞の前後配置の組み合わせの出現頻度を定量したところ、TgrC1 欠損株が前になるペアの頻度が低く、TgrB1 欠損株が後ろになるペアの頻度が低かった。以上から前方の

細胞の TgrC1 と後方の細胞の TgrB1 の相互作用が必要であることが示唆された。栄養成長期の TgrC1 過剰発現株に接着した集合期の野生株細胞は強く伸長した形状をとった。ガラスニードルで葉酸の濃度勾配を形成し、栄養成長期の TgrC1 過剰発現株の走化性運動を誘起したところ接着した集合期の細胞は伸長した形状を維持して追従した。TgrC1 を含む細胞間接着が運動制御に関与することを構成的に示すために、TgrC1 を精製し糖結合タンパク質の一種である WGA とともにビーズにコートすることで細胞間接着を模倣するビーズを作製し細胞に接着させた。その結果、ビーズとの接着領域で持続的な F-アクチン形成が維持され、細胞は強く伸長した形状を維持した。以上の解析から、TgrC1 を含む細胞間接着によって持続的な F-アクチン形成と細胞極性を維持されることを明らかにした。

第 6 章では、走化性運動と本研究で発見した細胞間接着による極性維持とが、どのように組み合わせられているのかを明らかにするため、予定柄細胞と予定胞子細胞の間で起きる細胞選別に注目して解析した。すでに予定柄または予定胞子細胞に分化済みの細胞集団を用意し、寒天上で細胞選別から子実体形成までを起こさせる実験系を構築した。細胞間の TgrB1 と TgrC1 の相互作用を競合的に阻害すると期待される精製した TgrB1 を投与すると、細胞選別が起きにくくなり予定胞子細胞と予定柄細胞が混ざったままになった。細胞外の cAMP を減少させると期待される cAMP 分解酵素(PDE; phosphodiesterase)を投与すると、予定胞子細胞が集団の内側、予定柄細胞が集団の外側全体に分離したが、予定柄細胞が頂端に集まらなかった。このことは、予定胞子細胞と予定柄細胞の「分離」に限れば、細胞外 cAMP よりも細胞間の TgrB1 と TgrC1 の相互作用の寄与の方が大きいことを示唆する。細胞間接着を模倣したビーズに対して、予定胞子細胞はビーズとの接着領域が強く伸長した形状を維持したのに対し、ビーズと接着した予定柄細胞は伸長した形状をとるものの頻りに側方仮足を形成した。予定胞子細胞と予定柄細胞の混合集団をマイクロ流体デバイス内で観察すると、予定柄細胞は予定胞子細胞よりも運動の一方向性が低かった。以上から、細胞塊中の予定胞子細胞は細胞間接着による極性維持が強く側方仮足を出さなくなるのに対し、予定柄細胞は頻りに側方仮足を形成してランダムな方向に運動しやすいと考えられる。これが予定柄細胞と予定胞子細胞の「分離」に重要だと考えられる。

PDE 投与下では予定胞子細胞と予定柄細胞の内と外の分離は生じたが、予定柄細胞が細胞塊の頂端に集合しなかった。このことは、頂端への予定柄細胞の集合に cAMP が必要であることを示唆する。予定柄細胞は予定胞子細胞の集団運動から外れやすいため、cAMP の濃度勾配が存在すれば走化性運動を示すと考えられる。予定柄細胞は予定胞子細胞よりも cAMP の産生能が高いことが知られているので、予定柄細胞が集まりだすと局所的に cAMP 濃度が上昇しさらに予定柄細胞の集合が促進されると考えられる。すなわち、cAMP への走化性運動は予定柄細胞が頂端に集まるための「配置制御」に寄与している可能性がある。

以上の研究から、TgrB1 と TgrC1 を含む細胞間接着依存的な F-アクチン形成と細胞極性の維持の存在を明らかにした。細胞選別への寄与を検証した結果、予定胞子細胞の塊の上に予定柄細胞の塊が配置する頂端形成のためには、細胞間接着による極性維持の強さの違いによる「分離」と、cAMP に対する走化性運動で予定柄細胞が互いに引き寄せあう「配置制御」の二つの仕組みが組み合わさることが重要であるという新たな仮説に至った。