

氏名	つじ おか まさ つね 辻 岡 政 経
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2247 号
学位授与の日付	平 成 12 年 5 月 23 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	理 学 研 究 科 生 物 学 専 攻
学位論文題目	細胞性粘菌 <i>Dictyostelium discoideum</i> におけるタリン遺伝子の単離及び機能の解析

論文調査委員 (主査) 講師 井上 敬 教授 長谷あきら 教授 西村いくこ

論 文 内 容 の 要 旨

多細胞生物の形態形成では、各細胞で発生した力が細胞外マトリクスを介して組織全体に伝えられなければならないが、力の伝達の機構についての知識は限られており、力の伝達に関わっていることが証明されている蛋白質もまだ非常に少ない。申請論文では、真核微生物である細胞性粘菌の一種 *Dictyostelium discoideum* 形態形成に必須の遺伝子として *talB* を同定し、その産物であるタリンBが実際に力の伝達に関わっていることを示している。

talB 遺伝子の塩基配列から予測されるタンパク質は、分子量 277,698Da の大型の蛋白質で、そのアミノ末端領域にはバンド4.1スーパーファミリーに共通の細胞膜と相互作用する配列がある一方、カルボキシル末端領域には、I/LWEQ モジュールと呼ばれるアクチン結合配列があり、タリン (talin) と呼ばれる細胞骨格系タンパク質の特徴をそなえていた。タリンは、ヒト、マウス、線虫などで知られており、細胞と基質の接着点で細胞膜とアクチンフィラメントを繋ぐ役割を持つと考えられている。これに加えて、タリンBにはビリン (villin) ファミリーに共通のヘッドピース (headpiece) と呼ばれるアクチン結合配列が I/LWEQ モジュールの更にカルボキシル末端側にあり、これは今までに知られているタリンには無かった特徴である。

細胞性粘菌は、飢餓状態になると個々の単細胞アメーバが集合して多細胞体を形成し、分化を伴いながら形態形成運動をおこなって、最終的に胞子とそれを支える柄からなる子実体を作る。*talB* 遺伝子の破壊株 (*talB* 変異株) は、多細胞期初期の半球状の集合体で発生が完全に停止する。*Dictyostelium* ではもう1つ別のタリン遺伝子 (*talA*) がマックスプランク研究所のグループにより同定されているが、その破壊株は、単細胞アメーバの時期に多くの欠陥が見られるのに対し多細胞期における形態形成に異常はないため、その産物はタリンBとは異なる機能を持つと考えられる。1つの生物に機能の異なるタリンが同定されたのはこれが初めてである。

talB 変異株の多細胞体では細胞分化・選別は正常であり、発生が止まるのは細胞の分化や選別に問題があるためではない。一方、タリンAと相同性の低い領域に対する抗体を作製し、その抗体を用いた組織染色をおこなった結果、この蛋白質は細胞が基質や周囲の細胞と接着する部分に局在することが示された。この局在パターンはF-アクチンの分布とはほぼ一致している。組織レベルでは、形態形成運動においてより強い力を出している予定柄細胞での発現が強いことも示されている。形態形成期の個々の細胞の運動能力の測定から、*talB* 遺伝子破壊株は野生株に比べて力が弱い事も示された。さらに、*talB* 遺伝子破壊株の多細胞組織中での細胞運動にも異常が見られた。

これらの結果と、タリンのこれまでに知られている機能を考え合わせて、タリンBは細胞と基質、あるいは細胞間の接着点で細胞膜とアクチンフィラメントを繋げ、細胞内の駆動力を運動のための足場となる接着点に効率良く伝える役割をしており、*talB* 変異株では細胞内の駆動力が効率良く伝わらないため運動性が低く、形態形成運動を進める事ができないと考えられた。タリンが形態形成において機能を果たしている事が証明されたのは、これが初めてである。

論文審査の結果の要旨

本申請論文では、遺伝子タギング法の一つを用いて細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の形態形成がブロックされる突然変異株を単離し、その原因遺伝子として細胞骨格蛋白質の1つタリンの遺伝子に相同性の高い *talB* 遺伝子を同定すると共に、それがコードする蛋白質の構造と機能の解析から、この蛋白質が多細胞の形態形成運動における力の伝達に重要な働きをしていることを示している。

多細胞生物の形態形成が正常におこなわれるには、細胞が生成した力が細胞外に効率よく伝わらねばならないが、力の生成機構に比べ、力の伝達機構についてはあまり調べられていない。細胞内外の力の伝達を担う分子としてはこれまでに膜貫通蛋白質であるインテグリン、カドヘリンについてある程度調べられているが、膜蛋白質とアクチンフィラメントとの間の力の伝達がどのような分子によっているのかよくわかっていない。申請者は、細胞の増殖と形態形成が独立におこる細胞性粘菌の利点を生かして、形態形成不能突然変異のスクリーニングをおこない、形態形成に必要な新たなタリン遺伝子 *talB* を同定した。タリンは、これまでヒト、マウス、ニワトリ、線虫、細胞性粘菌で知られており、細胞と基質の接着点で細胞膜とアクチンフィラメントを繋ぐ役割を持つことが示唆されているが、形態形成における役割は調べられていなかった。細胞性粘菌で知られていたタリンは単細胞の時期に細胞と基質の接着などに機能していることが知られていたが、多細胞の形態形成には必要が無い。申請論文では、新たに同定した *talB* 遺伝子を破壊した細胞が、運動に対する抵抗の少ない条件では野生株の細胞と同程度の運動能力があるが、運動に対する抵抗の強い条件では野生株の細胞に比べ顕著に運動性が低下することを示している。また、野生株とのキメラを作製し、その中での変異細胞の運動能力が野生株の細胞に劣っていることも示している。さらに、*talB* 遺伝子の一部を大腸菌で発現して得られたポリペプチドに対する抗体を取り、それを用いた組織染色をおこなって、この蛋白質が細胞と基質の接着部位や他の細胞と接着する部分に局在すること、その分布がF-アクチンの分布とほぼ一致することを示している。それと同時に組織レベルでの発現パターンも調べており、形態形成運動において強い力を出している予定柄細胞でより発現が強いことも明らかにされた。これらの結果は、タリンBが力の伝達という機能を持つことを支持すると言える。

本申請論文で見いだされた新たなタリンは、他のタリンと共通のF-アクチン結合配列に加え、ビリリン (villin) ファミリーに共通のヘッドピース (head piece) と呼ばれるF-アクチン結合配列をそのカルボキシル末端に持つユニークなもので、このような特徴を持つタリンが細胞性粘菌に限られるのか、もつと広い範囲の系統に存在するのか大変興味がある。また、一つの生物に2種類の機能の異なるタリンが同定されたのも申請者の研究が最初である。

このように、本申請論文は形態形成の分子機構の研究に新しい展望を開くものであり、学位論文として十分の内容を持つものと評価される。申請論文は構成・記述とも明確で、研究をまとめる面においても申請者は十分な能力を持っていると判断される。以上の論文の審査に加え、平成12年3月16日に申請論文の内容とそれに関連した口頭試問をおこなった結果、合格と認めた。