

論文審査の結果の要旨

氏名

浅野 由香子

本論文では、ウニ未受精卵においてタンパク質ホスファターゼ阻害剤 calyculin-A (CL-A) で処理することによって誘導される表層収縮現象について述べられている。

動物細胞の細胞質分裂は、細胞赤道面表層に形成される収縮環がアクチンとミオシンの滑り運動によって収縮し、細胞を二つにくびり切る現象である。近年、様々な生物で細胞質分裂に関与するタンパク質の同定は進んでいるものの、その制御機構は明らかにされていない。1992年にCL-Aがウニ未受精卵に細胞質分裂に類似した形態変化を誘導するという報告があり、本研究はこの現象を利用して細胞質分裂に関連した細胞表層の性質について知見を得ることを目的として行われた。その過程で、CL-A で短時間処理するとウニ未受精卵表層が収縮することを見出し、この現象について細胞生物学的、生化学的方法を用いて解析した。まず、卵表層が収縮する構造的基盤を明らかにするため、収縮した表層の光学顕微鏡観察を行ったところ、蛍光標識ファラシジンで強く染色されるカップ状の構造だった（アクチンカップと呼ぶ）。続いて電子顕微鏡観察で超微細構造を明らかにした。主成分の繊維にはミオシン S1 が結合したことから、これらはアクチン繊維であり、方向性は外側に barbed end が位置することが判明した。さらに、細胞膜を保存したアクチンカップと、収縮前の状態であるCL-A 処理卵の電顕観察により、アクチンカップの形成過程を解明した。

次にCL-A 処理卵の張力の変化を調べたところ、処理開始直後から張力が増加して表層に収縮力が発生していることがわかり、処理開始後すぐにアクチン繊維とミオシンは相互作用している可能性が考えられた。ミオシン ATPase 活性の阻害剤である butanedione monoxim やアクチン繊維の barbed end に結合して重合を阻害するサイトカラシンB で卵を処理することでアクチンカップ形成が起こらなくなったことから、CL-A の誘導する収縮にはアクチン繊維とミオシンの ATPase 活性が必要であることが示唆された。またアクチンカップには、ミオシンの他に、アクチン調節タンパク質であるスペクトリン、Arp2、Arp3、トロポミオシンが濃縮されていた。

別のタンパク質ホスファターゼ阻害剤である tautomycin によってもアクチンカップは形成されたことから、アクチンカップの形成は1型または2A型ホスファターゼの阻害によると考えられた。タンパク質ホスファターゼの活性が抑えられることで、タンパク質リン

酸化が亢進して、アクチンの重合、束化、収縮に至る一連の反応が起こると考えられる。生きた卵を³²P 正リン酸でラベルした後にアクチンカップを単離する実験の結果、アクチンカップ中の複数のタンパク質がリン酸化されており、その一つがミオシン調節軽鎖 (MRLC) であることが明らかとなった。これまでに平滑筋、非筋細胞ミオシンについて MRLC の Ser-19 と Thr-18 がリン酸化されるとミオシンの ATPase 活性が上昇しフィラメント形成が起こることが *in vitro* 実験で示され、平滑筋では *in vivo* で Ser-19 のリン酸化により収縮が起こることなどが知られている。アクチンカップではこれらの部位がリン酸化されていることをリン酸化ペプチド抗体を用いて示した。また、CL-A 処理卵では MRLC のこれらの部位のリン酸化は処理時間 5 分の時点で見られ、その後処理時間の増加とともにリン酸化量は増加するという知見も得られた。

本研究で解析した現象は、収縮位置が限定されないことや収縮後の収縮構造の消失が起こらない点で細胞質分裂とは異なるが、表層の収縮であることやアクチンとミオシンが関与すること、さらに MRLC のリン酸化を伴うことなどが細胞質分裂と共通している。またアクチンカップの単離は容易で未受精卵に誘導できるという利点があるため、細胞質分裂の一連の過程のうち特に収縮段階のモデルになる可能性あると考えられる。

なお、本論文は、馬淵一誠との共同研究であるが、論文提出者が主体となって研究を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。