

論文の内容の要旨

論文題目 線虫における紡錘体形成に必要なプロテインフォスファターゼ4の解析

氏名 住吉英輔

中心体は細胞内の主要な微小管形成中心であり、紡錘体の形成に寄与することで細胞分裂に重要な役割を果たしている。中心体は二つの中心粒(centriole)およびそれらを取り囲む中心粒外周物質(pericentriolar material, PCM)から成る。PCMは微小管の形成に重要な役割を果たしている。多くの生物において、PCMの微小管形成活性に関して非常に重要な役割を果たしている分子として γ -tubulinが知られている。細胞分裂期が近づくと、PCMの体積の増大および、 γ -tubulinをはじめとする中心体タンパク質の局在量の増大が見られ、それに伴って中心体の微小管形成活性が劇的に増大する。この現象は中心体の成熟と呼ばれる。

G2/M期における中心体の成熟の機構は詳しくは分かっていないが、哺乳類細胞等においてサイクリン B/cdc2 複合体および POLO 様キナーゼといったタンパク質リン酸化酵素が関与していることが知られている。サイクリン B/cdc2 複合体および POLO 様キナーゼは中心体に局在し、中心体タンパク質の中心体への局在化および紡錘体の形成に関与していることが示されている。一方、タンパク質の脱リン酸化もまた、分裂期における中心体による微小管形成に関与している。いくつかの知見によって、オカダ酸感受性のタンパク質脱リン酸化酵素が中心体による微小管形成活性の増大に関与していることが示唆されている。

プロテインフォスファターゼ 4(PP4)はオカダ酸に感受性のセリン/スレオニン型タンパク質脱リン酸化酵素である。セリン/スレオニン型タンパク質脱リン酸化酵素には、そのアミノ酸配列上の特徴から区別される PPP および PPM という二つのファミリーが知られている。PP4はPPPファミリーに属し、哺乳類およびショウジョウバエにおいてPP4は、中心体に局在することが知られており、微小管形成に対する関与が考えられていた。ショウジョウバエにおいてはPP4のmRNAの発現量が減少した *cmm* 変異体を得られている。*cmm* 変異体は多核性胞胚期の分裂期において染色体の凝縮が起きるが紡錘体の形成が起らない、あるいは中心体から紡錘体が外れてしまうという表現型を示した。また、*cmm* 変異体では γ -tubulinの中心体への局在が減少する。これらの知見から、PP4が中心体の微小管形成能に関与すると考えられた。しかしながら他の生物におけるPP4の機能は明ら

かではない。そこで、本研究では逆遺伝学的解析に適しており、また細胞分裂過程の観察が容易な線虫 *C. elegans* を用いて PP4 の機能解析を行った。

C. elegans ゲノム上には二つの PP4 相同遺伝子が存在していた。それらを *pph-4.1* および *pph-4.2* と名付けて以下の実験を行った。まず、RNA 干渉法を用いて各々の遺伝子機能を阻害した。*pph-4.1* に対応する二重鎖 RNA を野生型成虫個体(P0)の生殖腺に注入した場合、注入した個体の孫にあたる F2 世代(*pph-4.1(RNAi)*F2 胚)において高い割合で胚性致死となった。一方、*pph-4.2* に対応する二重鎖 RNA を生殖腺に注入した場合、注入した個体の子である F1 世代に低頻度で幼虫致死が見られた。これらの結果から胚発生においては PPH-4.1 がとくに重要な役割を担っていると考えられた。従って、以後は PPH-4.1 の機能に焦点を絞って解析を進めることとした。

第一卵割の過程を観察することで、*pph-4.1(RNAi)*F2 胚が細胞分裂にどのような欠損を示すかを調べたところ、雄性前核を 2 つ持つものおよび雄性前核を持たないものが見られ、また 4 極の紡錘体を形成することが観察された。雄性前核および中心体はともに精子によって胚に持ち込まれるものである。従って *pph-4.1(RNAi)*F2 胚においては精子形成に異常があるために雄性前核および中心体が余分に持ち込まれている可能性が考えられた。そこで *pph-4.1(RNAi)*F1 雄個体での精子を観察した結果、*pph-4.1(RNAi)*Fi 個体由来の精子には核の個数に異常を示すものが多く見られた。また、*pph-4.1(RNAi)*F1 個体由来の精母細胞の減数分裂においては、染色体の分配に異常が観察された。また、*pph-4.1(RNAi)*F1 個体における精子形成時の減数分裂における紡錘体構造を抗 α -tubulin 抗体によって観察したところ、紡錘体形成に異常が有ることが観察された(図 1)。

また、*pph-4.1(RNAi)*F2 胚は第一卵割において紡錘体の形成に遅延が観察された。正常な精子を受精させることで *pph-4.1(RNAi)*による精子形成の異常の影響を取り除いた状態でも第一卵割における紡錘体形成の遅延は観察された。これらの結果から、第一卵割時の紡錘体形成の遅延が精子形成の異常の二次的な結果ではなく PPH-4.1 が胚における体細胞分裂時の紡錘体形成にも関与していると考えられた。また、*pph-4.1(RNAi)*F2 初期胚を DAPI および抗 α -tubulin 抗体によって染色したところ、染色体の凝縮が見られるのにも関わらず、中心体から伸びている微小管が全くないか著しく減少しており、紡錘体および星状体の形成が見られない胚が観察された(図 1、図 2)。これらの結果から、PPH-4.1 が体細胞分裂および精子形成時の減数分裂において紡錘体の形成に必要であることが分かった。

C. elegans の γ -tubulin および POLO 様キナーゼである PLK-1 は分裂期において中心体に局在することが知られている。これらの中心体タンパク質の局在に対する PPH-4.1

機能欠損の影響を調べた。*pph-4.1(RNAi)F2* 胚および *pph-4.1(RNAi)* 精母細胞においては γ -tubulin の中心体への局在が見られなかった(図 1)。また、*pph-4.1(RNAi)F2* 胚においては PLK-1 の中心体への局在が観察されず、核周辺および細胞質中に異所局在していることが明らかになった(図 2)。したがって、PPH-4.1 は γ -tubulin および、PLK-1 の分裂期における中心体への局在に必要であることが分かった。

哺乳類細胞およびショウジョウバエにおいては、POLO 様キナーゼは中心体の成熟に関与し、 γ -tubulin の中心体への局在化に必要であることが示されている。しかしながら、*C. elegans* においては PLK-1 の γ -tubulin の局在に対する役割は明らかになっていなかった。そこで、*plk-1(RNAi)* 胚での γ -tubulin の局在を抗 γ -tubulin 抗体染色によって観察した。その結果、*plk-1(RNAi)* 胚において γ -tubulin の中心体における局在は観察されたが、局在する領域が縮小していることが分かった。このことは POLO 様キナーゼが *C. elegans* においても中心体の成熟に関与していることを示唆し、PPH-4.1 が PLK-1 の中心体への局在化を介して γ -tubulin の局在に関与している可能性が考えられた。

次に、抗 PPH-4.1 抗体を作成し、抗体染色により PPH-4.1 の細胞内局在を観察した。その結果、PPH-4.1 タンパク質は分裂前期から分裂終期にかけて中心体に局在するが、間期においては中心体には局在しないことを見いだした(図 3)。

さらに、紡錘体形成に関与していると思われる B 型サイクリンと PPH-4.1 の関わりを検討した。*C. elegans* における B 型サイクリンの相同遺伝子のうちサイクリン B1 に高い相同性を持つ *cyb-1* およびサイクリン B3 に相同性を持つ *cyb-3* の機能を同時に破壊した胚を RNAi によって作成した。その結果 CYB-1 および CYB-3 は紡錘体形成および γ -tubulin の中心体への局在に必要であり、その RNAi による除去は *pph-4.1(RNAi)* と類似した表現型を示すことが判った。また、*cyb-1(RNAi)cyb-3(RNAi)* 胚においては、PPH-4.1 の中心体への局在が見られないことが判った。これらの結果から、CYB-1 および CYB-3 が PPH-4.1 の中心体への局在化に関与していることが示唆された。

また、PPH-4.1 の卵形成における機能を解析するために、*pph-4.1(RNAi)* 雌雄同体の成虫の生殖細胞核を DAPI 染色によって観察した。その結果 *pph-4.1(RNAi)* 個体の卵母細胞においてはダイアキネシス期の核に 1 価染色体が観察され、相同染色体間のキアズマ形成に欠損が見られた。このことから、PPH-4.1 は減数第一分裂におけるキアズマの形成または、その維持にも関与すると考えられた。

以上の結果より、PPH-4.1 は *C. elegans* の体細胞分裂および精子形成時の減数分裂において中心体の微小管形成に必要な中心体タンパク質であることが明らかになった。また、PPH-4.1 は紡錘体形成以外に減数分裂におけるキアズマの形成または維持にも関与していることが示唆された。

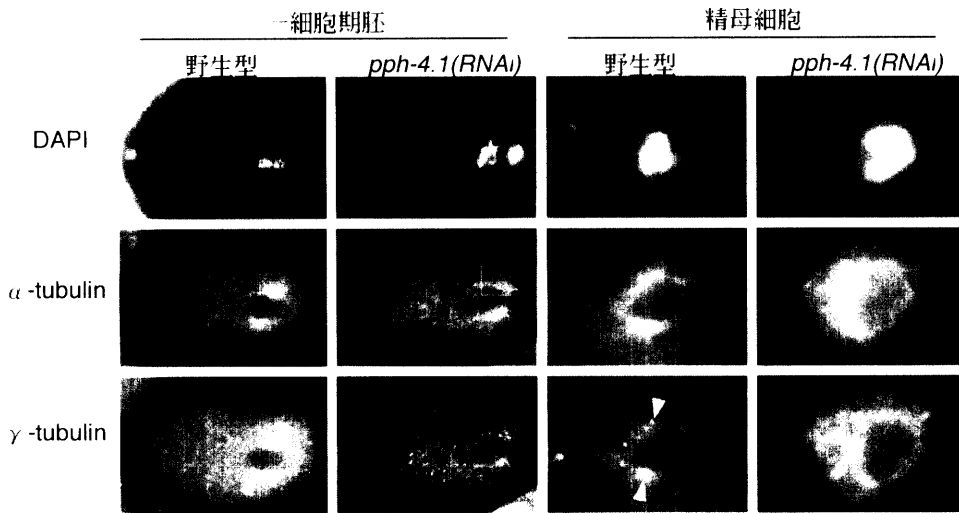


図1
*pph-4.1(RNAi)*F2胚および
*pph-4.1(RNAi)*精母細胞における
 微小管および γ -tubulinの局在。
 中心体における γ -tubulinの局在を矢
 頭で示した。

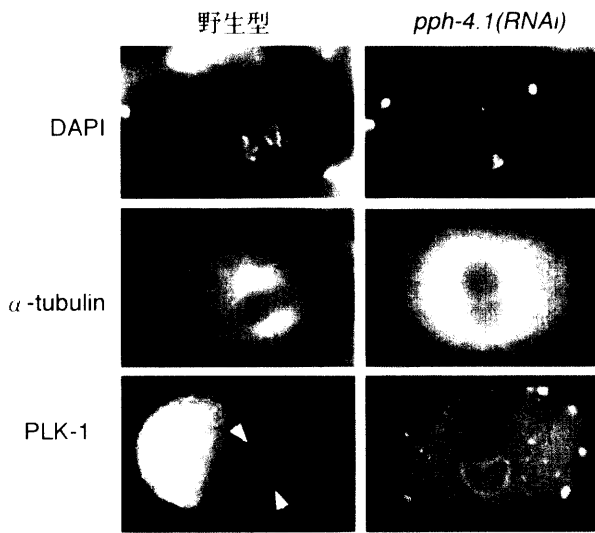


図2
*pph-4.1(RNAi)*F2胚における微小管および
 PLK-1の局在。
 中心体におけるPLK-1の局在を白い矢頭
 で示した。

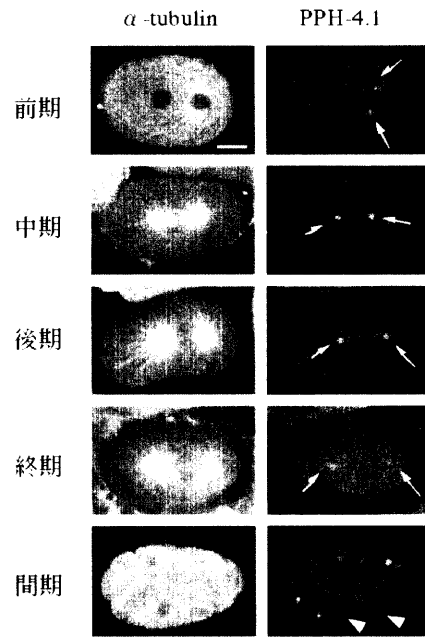


図3
 野生型胚におけるPPH-4.1の局在。
 中心体におけるPPH-4.1の局在を矢印で示した。
 また、間期の細胞を矢頭で示した。

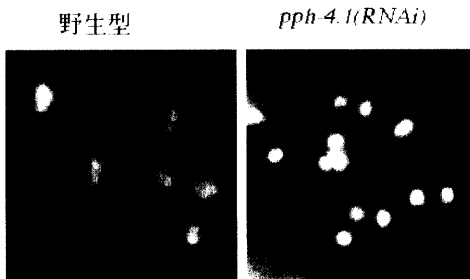


図4
 減数第一分裂ダイアキネシス期における
 DAPI染色による染色体の形態の比較。