

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 14 年度博士課程入学
氏 名 佐々木 隆宏
指導教員 依田 幸司

論文題目

細胞性粘菌を用いた動物型細胞質分裂分子機構の解析

1. はじめに

細胞分裂は最も根源的な生命現象の 1 つであり、細胞成分を娘細胞に均等に分配するため、様々なタンパク質により厳密に制御されている。細胞質分裂は染色体を等分配する核分裂に引き続いて起こる細胞分裂の最終段階であり、細胞質を等分配するプロセスである。

動物型の細胞質分裂は、アクチン収縮環の収縮によるとされる分裂溝の陥入を中心として、微小管とその結合タンパク質などから成る紡錘体の動態、小胞輸送などが密接に関わり合って進行し、最後に娘細胞を繋ぐ架橋構造である中央体が形成・切断されることで完了する。最近、高等動物の中央体タンパク質の網羅的同定による細胞質分裂関連分子の同定とそれらの予備的機能解析が報告された。しかし、分裂溝の形成・陥入や中央体切断の詳細な分子機構、制御分子間の相互作用やシグナルカスケードはその多くが未解明のままである。

本研究は、細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の増殖期アメーバをモデルとして動物型細胞質分裂の分子機構を解明することを目的とした。当研究室では、タギング法 REMI (Restriction Enzyme-Mediated Integration) により、基質上で巨大細胞を生じる細胞質分裂変異株を分離し、その変異遺伝子から IQGAP 様タンパク質をはじめとする新規タンパク質を同定し、細胞質分裂における機能を解析してきた。本研究では、変異遺伝子が未同定の細胞質分裂変異株についてその同定を行い、新しく見出されたタンパク質の細胞質分裂における役割を解析した。

2. 細胞性粘菌細胞質分裂変異株の変異遺伝子の同定

当研究室で REMI 法を用いて分離された 17 株の細胞質分裂変異株のうち、解析が進んでいなかった 12 株について詳細に解析した。プラスミドレスキューによりタグ挿入部位近傍のゲノム DNA のクローニングを試みたところ、5 株について取得できた。残り 7 株についてはタグ DNA の部分欠損のためか取得できなかった。成功した 5 株については、相同組換えにより同一の挿入変異を野生株に導入したところ、D108-6、D47-1、D411-2 の 3 株は元の変異株と同一の表現型を示し、変異遺伝子の細胞質分裂への関与が確認されたが、D49-2、D108-1 の 2 株では多核化が再現せず解析を中止した。D108-6、D47-1、D411-2 の 3 株のタグ挿入部位近傍の塩基配列を決定し、相同性検索を行ったところ、いずれも新規の MKLP1 ファミリーキネシン様タンパク質、アクチン結合タンパク質のフィンブリン様タンパク質、データベース上に他に相同配列を持たないタンパク質をそれぞれコードしていた。前 2 者について全長遺伝子と全長 cDNA をクローニングし、変異株に cDNA を GFP 融合タンパク質として発現させたところ、D108-6 では変異が相補され、遺伝子の細胞質分裂への関与がさらに確認されたが、D47-1 では、相補されなかった。

3. 細胞質分裂に関わる細胞性粘菌新規タンパク質の解析

3-1. D108-6p の構造と細胞質分裂における機能及び局在

D108-6 株の変異遺伝子がコードするタンパク質 D108-6p は、その N 末端領域で MKLP1 サブファミリーに属するキネシン様タンパク質のモータードメインと高い相同性を示した。このタンパク質はモータードメインに続き、ネック領域、ホモダイマー形成に必要なコイルドコイル領域、C 末端領域から構成されていた。D108-6p は、ネック領域と C 末端領域での相同性が見られないものの、他生物の MKLP1 ファミリーのキネシンと同じ構成をとるため、共通の細胞内機能を持つものと考えられた。また、MKLP1 ファミリーのキネシンは、高等動物で保存され、酵母で見つかっていないことは、動物型細胞質分裂の分子機構を研究する上で興味深いタンパクであると思われる。

D108-6p の細胞分裂における働きを明らかにするため、相同組換えにより新たにマーカ挿入部位の異なる遺伝子破壊株 D108-6CKO1 を作製して解析を行った。D108-6p が細胞質分裂のどの段階に関与するか調べるため、基質上で増殖中の D108-6CKO1 株の形態変化をタイムラプスビデオで記録し、単核細胞からの分裂について解析した。その結果、D108-6CKO1 株では、細胞の球形化、分裂溝陥入、中央体形成までの形態変化は野生株と同じだったが、中央体が切断されずに分裂溝陥入が逆行して 1 つの 2 核細胞になる細胞質分裂の失敗が約 50% の確率で起こり、これがくり返されることで

多核化した。従って、D108-6p は少なくとも中央体切断に関与していることが示唆された。

次に、遺伝子破壊による変異を GFP 融合タンパク質の発現で相補した株を用いて、細胞内での挙動を詳細に観察した。間期の細胞では核内の点状構造にあり、これは核小体に局在する Hsp32 と共局在した。細胞分裂が始まると核内に拡散した後、中央紡錘体と分裂溝表層の 2 箇所に分かれて濃縮した。前者は中央紡錘体の中央部分にしっかりと強く濃縮し、その位置で中央紡錘体が断裂した。その局在は断裂後の 2 つの先端に残り、微小管束と共に娘核側に引き込まれた。一方、後者は中央紡錘体がなくなった後も分裂溝とその後形成される中央体の表層に強く局在し、それは中央体切断直後まで続いた。このような中央体における D108-6p の局在から、表層の D108-6p が中央体切断に機能していることが示唆された。細胞性粘菌では高等動物の場合と異なり、分裂溝陥入の途中で中央紡錘体が断裂して分裂面からなくなり、微小管束のない中央体が形成されるため、その切断に微小管束は直接関与しない。MKLP1 ファミリーの機能が生物種を超えて保存されているとすれば、高等動物においてもこれらは中央体表層で微小管束非依存的に働くものと考えられる。また、微小管上に局在する D108-6p は、核分裂にも関与するか、表層に局在する前に何らかの機能獲得のため局在している分子である可能性が考えられる。

さらに、D108-6p 各ドメインの細胞質分裂における機能と局在化シグナルとしての機能を調べるため、部分断片を遺伝子破壊株及び野生株で発現させた。その結果、遺伝的相補にはほぼ全長が必要であること、核小体への局在には C 末端領域のみで十分であること、中央紡錘体と分裂溝表層への局在にはモータードメインからコイルドコイル領域までで十分であることが明らかとなった。また、野生株にコイルドコイル領域を持つ断片を発現させると多核化した。これは、内在性の全長分子と部分断片がコイルドコイル領域で機能しないヘテロダイマーを形成し、これがドミナントネガティブ型として働くためと考えられた。

3-2. D47-1p の構造とその遺伝子破壊株の解析

D47-1 の変異遺伝子がコードするタンパク質 D47-1p は、中央にスペクトリンリピート、C 末端にアクチン結合タンパク質フィブリンと高い相同性を持つドメインを持っていた。ユニークな構造と酵母などのフィブリンで細胞質分裂への関与が示唆されていることから興味を持たれた。元の変異株とは別の位置にマーカーを挿入した遺伝子破壊株も同様に多核化した。既知の細胞質分裂関連タンパク質 GAPA、DGAP1 (いずれも IQGAP 様タンパク質)、cortexillin、coronin (いずれもアクチン結合タンパク質)

との関係を調べるため、遺伝子破壊株にこれらを高発現させたがいずれも局在は野生株の場合と同一であり、多核化の回復も見られなかった。

4. D108-6p の細胞質分裂における機能と局在化に関わるタンパク質の検索

D108-6p は分裂溝と中央体の表層に局在し、少なくとも中央体切断に関わるが、単独破壊株では致死とならないことから、他の切断メカニズムの存在も考えられる。IQGAP 様タンパク質 GAPA は基質上で多核化する変異株から同定されたタンパク質で、これまでの研究から分裂時に分裂溝と中央体の細胞表層に局在し、中央体切断に関わることが知られている。中央体切断における D108-6p と GAPA の関係を調べるため、まず、GAPA 遺伝子破壊株に D108-6p のドミナントネガティブ型を高発現させたところ、致死とはならないものの少なくとも懸濁培養において細胞質分裂欠損がより重篤になった。さらに、GAPA と D108-6p の遺伝子二重破壊株を作製したところ、単独破壊株はいずれも生育は可能であるのに対し、二重破壊株は細胞質分裂欠損のため合成致死となった。従って、D108-6p と GAPA の中央体切断に関する機能の重複性が示唆された。細胞質分裂欠損が原因となり基質上の細胞が致死となる例は報告されておらず、これが初めての知見である。また、動物型細胞質分裂において、中央体切断の欠損が細胞に死をもたらす可能性も示唆された。一方、各 GFP 融合タンパク質の細胞内局在は、他方の単独遺伝子破壊に影響されなかった。これらのことから、D108-6p と GAPA それぞれを含む 2 つのシステムが中央体表層に局在し、相助的に中央体切断を行っている可能性が示唆された。

また、D108-6p は分裂溝にも局在するので、アクチン収縮環を収縮させ分裂溝陥入の原動力とされるミオシン II との関係も二重遺伝子破壊、高発現抑制、局在への依存性により調べたが、両者に相互関係は見られず、細胞質分裂において独立に働くことが示唆された。

さらに、表層への局在がアクチンとの直接的相互作用による可能性を考え、D108-6p 部分断片の GST 融合タンパク質を大腸菌から精製し、アクチンとの共沈実験を行ったところ、コイルドコイル領域を含む領域と C 末端ドメインが共沈した。このことから、D108-6p は中央体表層にアクチンを介して局在している可能性が示唆された。

5. まとめ

細胞性粘菌の細胞質分裂変異株を用い、動物型の細胞質分裂において、中央体表層に局在する MKLP1 ファミリーのキネシンと IQGAP 様タンパク質が相助的に中央体切断に働くことを明らかにした。