

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 佐々木 隆宏

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、細胞質を等分するプロセスである。動物型の細胞質分裂は、分裂面決定、分裂溝の陥入、中央体の形成と切断という流れで進行し、その正確な遂行には、アクチン系及び微小管系細胞骨格の制御が重要な働きしていると考えられているが、詳細な分子機構はその多くが未解明のままである。本論文は、細胞質分裂研究の重要なモデル生物として位置付けられている細胞性粘菌の増殖期アメーバ細胞を用い、動物型細胞質分裂に関わる新規タンパク質の同定、機能解析、相互作用解析を行った研究成果をまとめたもので、3章からなっている。

第一章では、細胞性粘菌細胞質分裂変異株の変異遺伝子の同定について述べている。タギング法 restriction enzyme-mediated integration (REMI)法を用いて分離された12株の細胞質分裂変異株についてプラスミドレスキューを行い、うち5株について変異遺伝子断片のクローニングに成功した。このうち3株については、変異の再生によりクローニングした遺伝子が細胞質分裂欠損に関わることを明らかにした。この3株の変異遺伝子のうち、新規の mitotic kinesin-like protein 1 (MKLP1)ファミリーのキネシン様タンパク質をコードしている遺伝子について全長 cDNA をクローニングし、green fluorescent protein (GFP)融合タンパク質として当該変異株において発現させたところ、巨大多核細胞を生じる表現型が相補され、このタンパク質 cytokinesin が細胞質分裂に関わることが証明された。

第二章では、第一章で細胞質分裂に関わることが証明された細胞性粘菌の新規タンパク質 cytokinesin の細胞質分裂における機能及び細胞内局在を解析した結果が中心に述べられている。基質上における単核細胞からの細胞質分裂をタイムラプスビデオで記録・観察したところ、cytokinesin 遺伝子破壊株の細胞では、細胞の球形化、伸長、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、これが繰り返されることで多核化した。この結果から cytokinesin が少なくとも中央体の切断に関わることが示唆された。

次に、遺伝子破壊を GFP 融合タンパク質の発現で相補した細胞を用いて cytokinesin の細胞内での挙動を観察した。その結果、cytokinesin は、間期には核小体に局在しているが、分裂期に入ると、一旦核内に分散した後、中央紡錘体と分裂溝表層の2箇所に分かれて局在した。前者は、分裂の進行とともに中央紡錘体中央部に濃縮し、その位置で中央紡錘体が断裂した。一方、後者は中央紡錘体が無くなり中央体が形成された後も中央体の表層に強

く局在し、中央体切断直後も局在した。これらの局在はそれぞれ中央紡錘体での微小管束化、中央体切断に働くものと考えられた。高等動物では中央体に微小管束があり、中央体の MKLP1 のうち中央体切断に関わる分子が表層上か微小管上は分かりにくい、この結果から表層の分子が中央体切断に関与する可能性が示唆された。さらに、cytokinesin 部分断片の、遺伝的相補能、細胞内局在の解析から、遺伝的相補にはほぼ全長が、核小体局在には C 末端部分が、分裂期の紡錘体と表層の局在には頭部から上流のコイルドコイル領域が、それぞれ必要であることも明らかにした。

第三章では、cytokinesin の機能と局在化に関わるタンパク質について解析した結果について述べている。中央体切断に関わる IQGAP 様タンパク質 GAPA との関係については、遺伝子 2 重破壊株と GAPA の遺伝子破壊株に cytokinesin の dominant negative 型を高発現させた株に合成効果が現れたこと、それぞれの局在がいずれも他方の遺伝子破壊に影響されなかったことから、両者をそれぞれ含む 2 つのシステムが独立に中央体に局在し、相助的に中央体切断に関わる可能性が示唆された。また、遺伝子破壊株の性質が異なるが、細胞質分裂に関わることが示されている myosin II と cytokinesin との関係も同様に調べたが、予想通り相互作用は見出されず、両者は細胞質分裂において別々の機構に関わることが示唆された。表層への一時的な局在化から予想された F アクチンとの相互作用は、尾部断片の組換えタンパク質を用いた共沈実験より証明された。さらに、cytokinesin と相互作用するタンパク質を酵母 two-hybrid 法により検索し、多数の cytokinesin 結合タンパク質の同定に成功した。

以上、本論文は、細胞性粘菌の特性を利用して細胞質分裂に関わるタンパク質を同定し、同定したタンパク質のうち特に cytokinesin について、その細胞質分裂における役割、機能、局在、タンパク質間相互作用を詳細に解析し、動物型の細胞質分裂における中央体の切断機構に関する重要な新知見を数多く明らかにしたものであり、これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。