

[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 箕 嶋 幸 範

本研究は細胞分裂の最終過程である細胞質分裂の機構を、低分子量 GTP 結合タンパク質およびその調節因子に注目し解析を行ったものである。細胞質分裂の終了には、低分子量 GTP 結合タンパク質である RhoA の活性化型および不活性化型間のサイクルが重要であることが知られている。このサイクルの機構について、加水分解酵素活性化因子 (GTPase activating protein, GAP)である MgcRacGAP に注目し解析を行い、以下の結果を得ている。

1. GAP タンパク質である MgcRacGAP は、細胞質分裂に必須であること、細胞質分裂時に中央体に局在することが知られている。ヒト子宮頸癌の細胞株である HeLa 細胞を用いて中央体に局在する MgcRacGAP を精製したところ、翻訳後修飾を受けることが示され、さらに脱リン酸化酵素処理およびバイオラベル法を用いた解析からこの翻訳後修飾がリン酸化であることが示された。
2. MgcRacGAP のリン酸化を引き起こすリン酸化酵素の候補として、MgcRacGAP 同様、細胞質分裂時に中央体に局在し細胞質分裂に必須である AuroraB に着目した。HeLa 細胞の細胞周期を同調し共免疫沈降法を用いて解析した結果、細胞質分裂時に MgcRacGAP と AuroraB が複合体を形成することが示された。さらに、免疫染色法によりこれら二者が中央体にて共局在することも示された。次に、AuroraB が MgcRacGAP をリン酸化するのかどうかを解析するため、試験管内で、放射性リンの取り込み実験を行ったところ、Aurora B は MgcRacGAP をリン酸化することが示された。MgcRacGAP はおもに 4 つの領域から構成されており、これらの領域を別々に解析した結果、3 つの領域が Aurora B によりリン酸化を受けていた。GAP 活性をもつ領域 (GAP 領域) もリン酸化されていることが示された。
3. 大腸菌で発現、精製したヒト MgcRacGAP は低分子量 GTP 結合タンパク質である

Rac1 や cdc42 に対しては GAP 活性を發揮するが、RhoA に対しては GAP を示さないことが知られていた。そこで、このリン酸化が MgcRacGAP の RhoA に対する GAP 活性に何らかの変化を及ぼすのではないかと仮説を立て、試験管内で Aurora B によりリン酸化を受けた GAP 領域と、リン酸化を受けていない GAP 領域で RhoA に対する活性を測定した。その結果、AuroraB によりリン酸化された GAP 領域は RhoA に対する GAP 活性を示すことが明らかとなった。

4. リン酸化アミノ酸解析により、Aurora B によりリン酸化を受けるのはほぼセリン残基のみであることが明らかとなった。GAP 領域には 7 カ所セリン残基があるが、どのセリン残基がリン酸化されているかを試験管内で検討した結果、387 番目 (S387) と 410 番目 (S410) のリン酸化が認められた。次に、この 2 カ所のセリン残基を、リン酸化セリンを模倣するアスパラギン酸残基に置換した変異体をそれぞれ (S387D, S410D) 作製し GAP 活性を測定したところ、S410D では野生型と変わらないのに対し S387D においては RhoA に対する GAP 活性が認められた。しかし、逆に Rac1, Cdc42 に対する GAP 活性は完全に消失していた。
5. MgcRacGAP と RhoA, Rac1 および Cdc42 の細胞質分裂時における共局在を調べたところ、MgcRacGAP は細胞質分裂時において RhoA と中央体においてリング状の構造をとり、おそらく収縮環上で共局在していることが確認されたが、Rac1 および Cdc42 との局在は異なっていた。
6. S387 のリン酸化を特異的に認識する抗リン酸化抗体を作製した。この抗体を用いて HeLa 細胞を免疫染色したところ、中央体において染色像が確認された。この結果より、S387 は細胞内でもリン酸化されること、およびそのリン酸化が中央体にて引き起こされることが明らかとなった。また、リン酸化能を失った Aurora B の不活性化型変異体を HeLa 細胞に導入し、S387 の抗リン酸化抗体を用いて免疫染色した結果、中央体での染色は観察されなかった。よって、MgcRacGAP の中央体における S387 のリン酸化において中心的な役割を果たすのは Aurora B であると考えられた。
7. 最後に、S387 にリン酸化を受けないようアラニン残基に置換した変異体 S387A を細胞に導入したところ、著明な細胞質分裂の障害が観察された。一方、S387D では細胞質分裂障害は確認できなかった。このことは、S387 がリン酸化されること、つまり MgcRacGAP が RhoA に対する GAP 活性を持つことが、細胞質分裂に必須であることを強く示唆している。

以上、本論文はヒト子宮頸癌細胞株である HeLa 細胞の細胞質分裂機構において必須な役割を果たす RhoA, MgcRacGAP および AuroraB の関係を明らかにした。本研究は生命の基本的現象である細胞分裂の機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。