

論文審査の結果の要旨

氏名 米田 新

本論文は3章からなり、第1章は高等植物の生細胞内における微小管の可視化系の確立、第2章はその系を用いた M/G₁ 境界期における表層微小管再形成過程の観察、第3章は M/G₁ 境界期の表層微小管再形成過程におけるアクチン繊維の関与について述べられている。

第1章では、GFP-チューブリン融合遺伝子をタバコ培養細胞 BY-2 に導入した形質転換体 BY-GT16 株を作出している。この BY-GT16 は野生型 BY-2 と同様の高い増殖率を示し、さらに薬剤処理により高度に細胞周期を同調化することが可能である。さらにこの BY-GT16 細胞を観察することで、微小管の構造変化を経時的に追跡することに成功している。これらのことから、本論文で確立された BY-GT16 細胞は細胞周期の進行に伴うチューブリンと微小管の動態を研究する上で非常に有用な材料になった。

第2章では、第1章で確立した BY-GT16 細胞を用いて、M/G₁ 境界期における表層微小管再形成過程の詳細な観察を行っている。細胞全体の観察が容易なデコンボリューション顕微鏡と、繊維状の微小管構造だけでなく遊離のチューブリンタンパク質をも観察可能な BY-GT16 細胞を組み合わせて使うことにより、M/G₁ 境界期において崩壊したフラグモプラストから遊離したチューブリンタンパク質が一過的に娘核の表面に集積し、その集積地点から最初の微小管が出現して伸張する様子を観察することに成功している。そしてそれらの観察結果から、M/G₁ 境界期においてチューブリンが娘核上に移動・集積し、その後の微小管再形成時に再利用されているという新たな仮説を提起している。また、娘核上から出現して伸張した微小管が細胞表層に達したところで「蛍光輝点」を形成し、その蛍光輝点から最初に細胞長軸に平行な表層微小管が出現して伸張することを見出している。それらの観察結果から、表層微小管の“起源”についても重要な知見が得られている。その後、細胞長軸に平行な表層微小管が細胞の端に届いたころ、それらと垂直な表層微小管が分裂面付近から出現し、平行な微小管が徐々に消失するのに伴って垂直な微小管が細胞表層全体へと広がり、G₁ 期型の表層微小管が完成する様子を経時的に観察している。以上より、M/G₁ 境界期における表層微小管再形成の全過程を明らかにした。

第3章では、第2章で見出した M/G₁ 境界期における表層微小管再形成過程がアクチン繊維により制御されていることを明らかにしている。短時間で効果的にアクチン繊維を破壊できるアクチン重合阻害剤ビステオネライド A (BA) を用いて BY-GT16 細胞のアクチン繊維を破壊したところ、M/G₁ 境界期において表層微小管が全く再形成されなかった。このことから、M/G₁ 境界期における表層微小管再形成にアクチン繊維が必須であることが分かる。また、BA 処理を行った細胞の約 80% では、崩壊したフラグモプラストから遊離したチューブリンタンパク質が分裂面近くにとどまったままで、娘核上への移動や集積が観察できなかった。このことから、アクチン繊維はこれらのチューブリンのリクルートメントやリサイクルに関わっていることも示唆された。さらに興味深いことに、アクチン繊維を

破壊した約 20%の細胞では、オリジナルのフラグモプラストとは独立してフラグモプラスト様の構造が形成されることを発見した。この「余剰のフラグモプラスト」はオリジナルのフラグモプラストの片側一層だけの構造に類似する構造をしていたが、それにも関わらず余剰の細胞板を形成する能力を持っていた。このように、紡錘体・染色体及び核の位置とは無関係にフラグモプラストが形成されるのは初めての観察例であり、また片側一層だけのフラグモプラスト構造としても初めてである。これらのことから、フラグモプラスト関連タンパク質の局在にもアクチン繊維が関わっていることが示唆される。またこの余剰のフラグモプラストは、フラグモプラスト形成のメカニズムを明らかにする上でも有用な系になると考えられる。

これら本論文における一連の研究により、M/G₁境界期における表層微小管再形成機構の統合的理解が可能になったと言える。

なお、本論文第 1、2 章は熊谷 史、佐野 俊夫、冨田 太一郎、長田 敏行、馳澤 盛一郎との、第 3 章は河野（赤塚） 美乃里、熊谷 史、馳澤 盛一郎との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、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（生命科学）の学位を授与できると認める。