

## 論文内容の要旨

### 論文題目

分裂酵母の細胞質ダイニンによる核往復運動の発生機構

Mechanism of the nuclear oscillation driven by cytoplasmic dynein in fission yeast

氏名 藤田 生水

分裂酵母の減数分裂前期の核は、細胞の両極を周期的に往復移動する。この現象はホーステール運動と呼ばれ、減数分裂期の相同染色体同士の間合や組替えを促進していると考えられている。この時期、核膜に埋め込まれた紡錘極体 (SPB) に、核内では全てのテロメアが束ねられており、一方細胞質では微小管のマイナス端が束ねられ、細胞表層に向けて放射状に伸びている。微小管と細胞表層が接する点に微小管モーターである細胞質ダイニン (以下、ダイニンと表記) が局在し、微小管上をマイナス端方向に動こうとすることで微小管の牽引が引き起こされ、核が移動すると考えられている。ダイニンの細胞表層への繫留には、細胞表層に局在する Num1 タンパク質が必須であると知られるが、その分子機構には未知の部分が多い。本研究ではダイニンを細胞表層に繫留して微小管の牽引を引き起こす分子機構を解明するため、ダイニンの制御因子として知られるダイナクチンに注目し、遺伝子操作と蛍光タイムラプス観察を主な手法として解析を行った。さらに核の周期的な往復運動を発生する機構の解明を目指して、生細胞の微小管動態に基づく計算機シミュレーションモデルを構築し、解析を行った。

分裂酵母ではダイナクチンサブユニットとしてすでに Ssm4 タンパク質が同定されており、

ホーステール運動に必須であると知られている。本研究では哺乳類等のダイナクチンサブユニット ARP1、p22/p24、p50/dynamitin との相同性からそれぞれ Arp1、Mug5、Jnm1 をコードする遺伝子を同定した。2 ハイブリッド法により、Ssm4 が Mug5 と Jnm1 に、また Arp1 が Mug5 と Jnm1 に結合することが分かった。さらに免疫沈降によって Ssm4 と Arp1 が Mug5 および Jnm1 に依存して相互作用することが分かった。

各ダイナクチンサブユニットの遺伝子破壊株を作製し、その表現型を観察したところ、減数分裂および胞子形成に異常が見られた。*arp1* 破壊株における減数分裂前期の SPB と染色体の動きを観察したところ、細胞の両端を行き来するホーステール運動が著しく損なわれていた。

ダイニン軽中鎖 Dli1 に蛍光タンパク質を結合して、野生型株におけるダイニンの局在を観察したところ、ダイニンは SPB と微小管に局在し、微小管が細胞表層に接する点に強く局在していた。タイムラプス観察によりダイニンの局在変化を観察したところ、ダイニンは微小管が収縮するのに伴ってプラス端に蓄積し、同時に細胞表層に固定されることで、微小管の牽引が引き起こされている様子が観察された。

次に各ダイナクチンサブユニットの遺伝子破壊株におけるダイニンの局在を観察した。*ssm4* 破壊株ではダイニンは SPB に局在していたものの、微小管への局在が著しく損なわれていた。*arp1*、*mug5*、*jnm1* の各遺伝子破壊株においては、*ssm4* 破壊株とは異なり、ダイニンは SPB と微小管に局在していた。しかし、微小管のプラス端が細胞表層に固定されず、離れてしまう様子が観察された。このときダイニンは収縮する微小管のプラス端に蓄積していた。このことから、ダイナクチンはダイニンを細胞表層に繫留する働きを持つと考えられた。また、微小管のプラス端におけるダイニンの局在を定量したところ、*arp1* 破壊株において野生型株や *num1* 破壊株と比べてより蓄積している様子が見られた。

*ssm4* の部分欠失型遺伝子を多数作製し、2 ハイブリッド法により解析したところ、Ssm4 はその中央領域でダイニン軽鎖 Dlc1 と、C 末端領域で Mug5 と結合することが推測された。この Mug5 との結合に必須な C 末端領域を欠失させた Ssm4-dC540 変異体を発現する株を作製し、免疫沈降実験を行ったところ、Ssm4-dC540 タンパク質では Mug5 および Arp1 との相互作用が損なわれていた。*ssm4-dC540* 変異体株におけるダイニンの局在を観察したところ、*ssm4* 破壊株とは異なりダイニンは微小管に局在していたが、細胞表層に繫留されず、正常



な微小管の牽引が起こらなかった。

野生型株において Arp1 の局在は、細胞表層に一過的に局在し、微小管と細胞表層が接する点に強く局在するダイニンと共局在していた。しかし、常に SPB に局在するダイニンや Ssm4 とは異なり、Arp1 は SPB にほとんど局在していなかった。Mug5 と Jnm1 についても同様の局在が見られた。Arp1 とダイニンの共局在は *mug5* 破壊株では見られなかったが、*num1* 破壊株では見られたことから、Num1 に依存しないと考えられた。また、Arp1、Mug5、Jnm1 の局在と Ssm4 の局在が SPB 近傍で異なっていたことから、微小管のプラス端と SPB 近傍とではダイナクチンサブユニットが同一の複合体を形成していない可能性が考えられ、ダイナクチンサブユニット同士の会合と乖離が細胞内で制御されていることが示唆された。

免疫沈降実験により、Num1 とダイニン中鎖 Dic1 が Arp1 および Ssm4 に依存せずに結合することが分かった。細胞表層にドット状に局在したダイニンの挙動を解析したところ、*num1* 破壊株では野生型株や *arp1* 破壊株と比べてダイニンのドットが細胞表層に沿って動きやすい様子が見られた。このことから Num1 は細胞表層上でダイニンの位置を固定する役割があると示唆された。

ダイニンのモーター活性に必須である、ダイニン重鎖 Dhc1 の一番目の AAA<sup>+</sup> ATPase ドメインに変異を導入した *dhc1-P1* 変異体株を作製し、その表現型を観察した。ダイニンの局在を軽中鎖 Dli1 を指標に観察したところ、微小管に局在し、SPB 近傍に異常な蓄積を示していた。この株ではダイニンが細胞表層に繫留されず、微小管の牽引が起こらなかった。

微小管の蛍光タイムラプス観察により、各種変異体株における微小管の伸長および収縮の速度を調べた。伸長に関しては変異体間で大きな差は見出されなかったが、収縮に関しては *arp1* 破壊株や *dhc1-P1* 株において野生型株より顕著に遅くなっていた。一方 *ssm4* 破壊株においては逆に野生型株より収縮が速くなっていた。さらに、一細胞あたりの微小管の束の本数を定量したところ、*arp1* 破壊株や *ssm4* 破壊株、*dhc1-P1* 株において、野生型株や *num1* 破壊株と比べて多くなっていた。これらのことから、細胞内の微小管の収縮や束化が、ダイニンのモーター活性やダイナクチンによって制御されていると考ええられた。

核の往復運動を解析するため、生細胞で観察した微小管動態に基づき SPB と核の動きを再現する計算機シミュレーションモデルを構築した。微小管のタイムラプス観察などから、

ダイニンが微小管を引く力に加えて微小管が細胞表層を押し力を考慮する必要があると考え、そのようなモデルを構築した。微小管の押し力を考慮したモデルは、それを考慮しないモデルに比べて、より生細胞に近い往復運動が再現された。

構築したシミュレーションモデルにおいてパラメータ値を様々に変更することで、一定時間あたりの往復回数に影響を及ぼすパラメータを探索した。その結果、細胞長のパラメータが往復回数に影響することが予測された。実際に様々な細胞長の生細胞を観察し、一定時間あたりの往復回数を測定したところ、短い細胞ほど一定時間あたりの往復回数が多い傾向が見られ、細胞長と往復回数に負の相関関係が見出された。

同様に、シミュレーションにおいて SPB および核が細胞質から受ける粘性抵抗のパラメータ値が、往復回数に影響を及ぼすことが見られた。核内で染色体と SPB 間の相互作用が損なわれることが知られる *bqt1* 遺伝子の変異体では、核の体積の大部分を細胞中央に取り残したまま SPB が往復運動する。このため *bqt1* 破壊株においては、移動する SPB が細胞質から受ける粘性抵抗が野生型株よりも減少していると考えられた。実際に *bqt1* 破壊株における SPB の動きを観察したところ、野生型株よりも移動速度が上昇しており、一定時間あたりの往復回数が多いことが見出された。

本研究は、生細胞観察とシミュレーションの比較を通して、分裂酵母で見られる核の周期的な往復運動が基本的な微小管の性質とダイニンが細胞表層で微小管を引く力とによって引き起こされるというモデルを提唱した。さらに本研究は、細胞生物学におけるシミュレーションの活用が、それによる予測を手掛かりに新たな細胞現象の特性を発見するために有効である実例を示したと言える。