

氏名	木下和久
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	理博第1987号
学位授与の日付	平成10年5月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	理学研究科生物科学専攻
学位論文題目	細胞周期における微小管動態を制御するホスファターゼ2Aとスピンドル極体タンパク質 Dis 1 の研究 (主査)
論文調査委員	教授 柳田充弘 教授 竹市雅俊 教授 西田栄介

### 論 文 内 容 の 要 旨

真核細胞の染色体分配過程では、姉妹染色分体を正しく均等に娘細胞に分配するために、スピンドル(紡錘体)と呼ばれる特殊な構造が細胞周期M期特異的に出現し機能する。スピンドルの主要構成因子である微小管は細胞周期を通じてその構造をダイナミックに変化させる。申請者は分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*を用い、染色体分配に関与する微小管結合タンパク質Dis 1と、Dis 1との機能的な関連が示されていたプロテインホスファターゼ2A(PP2A)の細胞内における機能の解析をおこない、染色体分配過程の分子レベルでの理解を目指した。その結果、これらの微小管結合タンパク質とプロテインホスファターゼがそれぞれ、細胞周期における微小管動態の制御に関与していることを見出した。論文は二部構成となっており、第1部でPP2Aの解析結果について、第2部においてDis 1の解析結果について報告している。

PP2Aは真核生物において進化的に高度に保存されたセリン/スレオニンホスファターゼの一つであり、触媒サブユニットと2つの制御サブユニットからなるヘテロ三量体のホロ酵素を形成する。分裂酵母ではPP2Aが細胞周期M期進入を負に制御することが報告されていたが、細胞周期進行制御以外におけるPP2Aの役割については不明であった。申請者はPP2Aの関与する細胞機能をさらに明らかにする目的で、分裂酵母のPP2A制御サブユニット遺伝子の単離とその機能解析を試みた。PCR法を用いて制御サブユニットA(PR65)およびB(PR55)をコードする遺伝子を単離し、それぞれ $paa 1^+$ および $pab 1^+$ と名付けた。Paa 1およびPab 1サブユニット欠失変異株を作成し、変異株細胞の表現型を解析した結果、PP2Aの染色体分配過程への直接的な関与は見出されなかったが、PP2A制御サブユニットが間期細胞質微小管の構築に必須であることが明らかにされた。染色体を正しく分配するためには微小管構造のダイナミックな変化が不可欠であり、本研究により*in vivo*においてPP2Aが細胞周期における微小管動態の制御に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。またPP2Aが微小管動態制御のみならず、アクチンの細胞内分布の制御や、細胞壁合成、細胞質分裂、および接合・胞子形成過程など、多様な細胞機能にも関与することが示された。

Dis 1は882アミノ酸からなる新規なタンパク質で、微小管と相互作用しながら機能し、かつCdc 2キナーゼによるリン酸化の制御を受けることが示唆されていた。申請者はDis 1が染色体分配において果たす分子機能の理解を目指し解析をおこなった。機能ドメインと細胞内局在の解析の結果、Dis 1の必須機能がカルボキシル末端領域に担われていること、その必須機能にスピンドル極体(SPB)における局在が重要であること、アミノ末端領域がDis 1を細胞周期特異的にSPBに結合させること、そしてアミノ末端領域のCdc 2キナーゼ標的部位が中央領域と同様に*in vivo*においてリン酸化されることが明らかにされた。また電子顕微鏡観察から、*dis 1*変異株では微小管の重合異常が起きていることが示された。さらに、*dis 1*変異の表現型がMad 2依存性スピンドル形成チェックポイントに依存していることが明らかにされた。これらの結果から、Dis 1が細胞周期M期においてSPBに局在して正常なスピンドル形成過程に機能し、その制御を通して染色体分配の正確さを保障している可能性が見出された。

## 論文審査の結果の要旨

染色体分配は、染色体の高次構造の再編とスピンドルの主要構成因子である微小管の構造変化を伴って分裂装置としてのスピンドルが形成され、その機能が統合的に制御されることにより遂行される。申請者は分裂酵母の染色体分配欠損を示す *dis 1* 変異との相互作用が示唆されていた遺伝子群の解析をおこない、これらの因子が細胞周期における微小管動態の制御に関わることを明らかにした。

*dis 1* 変異はプロテインホスファターゼ 2A (PP2A) の触媒サブユニット Ppa 2 の欠失変異により相補される。PP2A の関与する細胞機能について解析するため、2種類の制御サブユニットをコードする遺伝子を単離し、PP2A が触媒サブユニットのみならず制御サブユニットについてもホ乳類から分裂酵母に至るまで高度に保存されていることを示した。これらの制御サブユニットの保存性はPP2Aの活性が真核細胞に共通な機構により制御されていることを示唆している。PP2A制御サブユニットの欠失株の表現型の詳細な解析により、制御サブユニットが細胞周期間期における細胞質微小管の構築に必要であることを明らかにした。この結果は *in vivo* においてPP2Aが細胞周期における微小管動態の制御に関与することを示した初めての報告である。*in vitro* の実験系において示唆されていたPP2Aの脱リン酸化反応による微小管ダイナミクスの制御が、*in vivo* においても重要であることを示しており興味深い。また申請者は、アクチンの細胞内分布の制御や、細胞壁合成、細胞質分裂、接合・胞子形成過程など、多様な細胞機能にPP2Aが関与することを示した。以上の結果は、これまで未知であった細胞周期進行制御以外のPP2Aの細胞内における機能を明らかにした点でも評価できる。

申請者はさらに、*dis 1* 変異の本体である *dis 1*<sup>+</sup> 遺伝子産物の機能の探索をおこなっている。突然変異部位の解析と部分欠失させた変異遺伝子の解析から、Dis1の必須機能を担うドメインを同定した。またGFP (緑色蛍光タンパク質) 融合したDis1を用いて細胞内局在を検討し、その必須機能にスピンドル極体 (SPB) における局在が重要であることを明らかにした。さらに電子顕微鏡を用いた観察から *dis 1* 変異株におけるスピンドル微小管の重合異常を見出し、スピンドル形成チェックポイントとの遺伝子的関係と合わせて、Dis1がスピンドル微小管のダイナミクスの制御を通してスピンドル形成に機能する可能性を示した。これらの結果は、正常なスピンドルの形成と機能においてスピンドル構成因子あるいは制御因子としてのDis1の局在と制御が重要であることを示しており興味深い。

以上、申請論文はプロテインホスファターゼと微小管結合タンパク質がそれぞれ細胞周期における微小管動態を制御することを示し、その制御を通して染色体分配過程の制御に関与する可能性を見出した。本研究によって得られた知見は、リン酸化-脱リン酸化反応と微小管結合タンパク質による微小管ダイナミクスの制御機構の理解に大きく寄与するものと考えられる。よって本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。

なお、主論文及び参考論文に報告されている研究業績を中心として、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。