

氏 名	たけ なか かつ や 竹 中 克 也
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 1845 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 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 物 理 学 専 攻
学位論文題目	紡錘体形成チェックポイントへの MAP キナーゼスーパーファミリーの関与

論文調査委員	(主 査)			
	教 授 西 田 栄 介	教 授 柳 田 充 弘	教 授 永 田 和 宏	

論 文 内 容 の 要 旨

MAP (mitogen-activated protein) キナーゼは、哺乳類、両生類から、ハエ、線虫、酵母に至るまで各種生物に広く保存されている分子量42 K 前後のセリン/スレオニンキナーゼである。MAP キナーゼは *Xenopus* (アフリカツメガエル) においては、卵成熟過程に活性化することが明らかにされ、卵成熟過程における減数分裂の進行および減数第2分裂 M 期での細胞周期停止に重要な役割を果たしていることが知られている。しかし、このような MAP キナーゼの M 期における重要な役割が、M 期普遍的なものであるかどうかについてはこれまで明らかになっていなかった。そこで本研究では体細胞分裂の M 期において MAP キナーゼが細胞周期の進行に関与しているかどうかについて検討を行なった。また、最近これまで知られていた古典的 MAP キナーゼと類似したキナーゼである、SAPK や p38 が発見され、MAP キナーゼスーパーファミリーが存在することが明らかとなってきたが、これら新規の MAP キナーゼファミリー分子が細胞周期制御に関与している可能性についても検討した。

申請論文は2章からなっており、第1章では *in vitro* で細胞周期を再現する *Xenopus* 卵無細胞系 (cycling extract) を用いて研究を行なっている。この系で MAP キナーゼの活性を測定したところ、MAP キナーゼも M 期に周期的に活性化していることが明らかになった。MAP キナーゼが M 期に活性化していることから、この系での M 期の進行に MAP キナーゼが関与している可能性が考えられた。そこで MAP キナーゼの関与を調べるため、抗 *Xenopus* MAP キナーゼ抗体を用いてイムノデブリーションを行ない、MAP キナーゼを除去した cycling extract を作製した。この系でも、コントロール抗体でイムノデブリーションの操作を行なった系と同様に MPF の周期的な活性化が見られたことから、通常の細胞周期の進行には MAP キナーゼは必要でないと考えられた。大量の精子クロマチンを cycling extract に加えることによって、紡錘体形成チェックポイントが機能し、細胞周期が M 期で停止することが Murray らによって報告されている。紡錘体形成チェックポイントとは微小管重合阻害剤などの影響で紡錘体が形成されない時に、不完全な染色体分配を防止するために細胞周期を M 期で停止する機構である。

MAP キナーゼスーパーファミリーの脱リン酸化酵素である MKP-1 を用いた実験から、MAP キナーゼスーパーファミリーがこの M 期停止に関与している可能性が彼らによって示唆されていた。本研究では、この M 期停止に関与しているのが古典的 MAP キナーゼそのものであるかどうかを調べるため、抗 MAP キナーゼ抗体でイムノデブリートした cycling extract で紡錘体形成チェックポイントが機能するかどうかについて検討した。MAP キナーゼを除去した無細胞系では紡錘体形成チェックポイントによる M 期停止が起きなかったため、古典的 MAP キナーゼが紡錘体形成チェックポイント情報伝達を担っていることが証明された。また、出芽酵母 *STE11* の活性型遺伝子産物によって古典的 MAP キナーゼの高活性化状態を維持することによって、cycling extract の M 期停止を引き起こすことができた。以上の結果から、紡錘体形成チェックポイントによる M 期停止には MAP キナーゼの活性化が必要かつ十分であることが証明された。

第 2 章では、哺乳類培養細胞での紡錘体形成チェックポイントについて検討を行なっている。これまで、紡錘体不形成によって M 期停止した哺乳類培養細胞では古典的 MAP キナーゼが活性化していないとされていたので、特に新規 MAP キナーゼスーパーファミリーのキナーゼに注目して実験を行なった。

マウス線維芽細胞 NIH3T3 に微小管重合阻害剤を与え、M 期で停止したため接着が弱くなった細胞を振動を与えることにより回収した。回収した細胞の抽出液から、古典的キナーゼ、SAPK、p38 それぞれの活性を、それぞれの分子に対する特異抗体で免疫沈降して測定したところ、紡錘体形成チェックポイントが機能して M 期で停止した細胞では p38 のみが活性化していることが明らかになった。

紡錘体形成チェックポイントによる M 期停止に p38 が関与している可能性が考えられたので、M 期停止能を検出する系として確立されている、*Xenopus* 初期胚の系を用いて実験を行なった。大腸菌で発現した MKK6 と p38 を混合してインキュベートすることによって活性型 p38 を得、2 細胞期の初期胚の一方の割球にインジェクトした。緩衝液をインジェクトした割球では正常な卵割が進行したのに対し、活性型 p38 をインジェクトした割球は卵割を M 期で停止した。このことから活性化した p38 によって M 期停止が引き起こせることが示された。

以上、本研究では *Xenopus* 卵無細胞系と哺乳類培養細胞の 2 つの系で、MAP キナーゼスーパーファミリーと紡錘体形成チェックポイントの関係について解析を行なった。その結果、それぞれの系で MAP キナーゼスーパーファミリーのキナーゼが紡錘体形成チェックポイントによる M 期停止に関与していることを示した。

論文審査の結果の要旨

MAP キナーゼはこれまで哺乳類培養細胞 G0/G1 期移行および *Xenopus* 減数分裂の M 期に活性化し、それぞれの時期に細胞周期の進行の制御において重要な役割を果たしていることが知られていた。しかし、MAP キナーゼの M 期における重要な役割が、M 期普遍的なものであるかどうかについてはこれまで十分に調べられておらず、明らかになっていなかった。申請者は本研究において、体細胞分裂の M 期に MAP キナーゼが活性化し細胞周期の進行を制御している可能性について検討をおこなった。

検討にあたっては、*Xenopus* 卵無細胞系 (cycling extract) と哺乳類培養細胞を用いた。まず cycling

extract において、申請者は MAP キナーゼが M 期に活性化しうることを見出した。これまでにこの系では Murray らの脱リン酸化酵素 MKP-1 を用いた実験によって、MAP キナーゼが紡錘体形成チェックポイント情報伝達に関与している可能性が示唆されていた。しかし、MKP-1 による実験だけでは、紡錘体形成チェックポイントを担っているのが、古典的 MAP キナーゼそのものであるかどうかを確定するには不十分であった。申請者は特異性の高い抗 *Xenopus* MAP キナーゼ抗体により、cycling extract から古典的 MAP キナーゼのみをイムノデブリーションによって取り除くという方法で、この問題について検討をおこなった。その結果、古典的 MAP キナーゼそのものが紡錘体形成チェックポイントの情報伝達を担っていることが証明された。さらに、系に活性型 MAP キナーゼキナーゼキナーゼを加えて MAP キナーゼを活性化させるという方法によって、MAP キナーゼの活性化のみで無細胞系が M 期停止しうることを初めて示した。以上の結果から、cycling extract における紡錘体形成チェックポイントに MAP キナーゼが必要十分であることが示され、M 期細胞周期制御において MAP キナーゼが役割を担っていることを確実にした。また、減数分裂期とは異なり、この系では MAP キナーゼは通常の M 期の進行には必要でないことも示し、体細胞分裂の M 期における MAP キナーゼの役割が、主に紡錘体不形成という異常時への対処に限定されていることを示唆した。

次に、哺乳類培養細胞の系での実験によって、紡錘体不形成による M 期停止時に、MAP キナーゼスーパーファミリーのうち、p38 のみが活性化していることを明らかにした。さらに、活性化した p38 が、細胞周期を M 期停止できうることを示した。これらの結果は、通常の体細胞分裂において、紡錘体形成チェックポイントに p38 が関与することを初めて示したもので、非常に意義深い。これはまた同時に、これまで細胞周期制御との関係が全く調べられていなかった新規 MAP キナーゼスーパーファミリー分子が、細胞周期制御を担っていることを示した初めての例である。これまで知られていた p38 の活性化条件では、いずれの場合も SAPK も同時に活性化していたが、M 期停止細胞では SAPK は活性化していなかった。したがってこの発見は p38 のみが活性化していることを初めて示した例であり、それぞれ異なる MAP キナーゼスーパーファミリー間の活性化制御機構の独自性を解明する上でも有用であると思われる。

以上、本申請論文では cycling extract と哺乳類培養細胞という 2 つの異なる系で MAP キナーゼスーパーファミリーの紡錘体形成チェックポイントへの関与を明確にした。ここでは MAP キナーゼスーパーファミリー分子が体細胞分裂の M 期細胞周期制御に機能していることが初めて明らかにされたと共に、今後それぞれの系の特徴を生かして紡錘体形成チェックポイントの作用機序を明らかにできる可能性が示されており、博士（理学）の学位論文として十分に価値が高いと認められる。

なお、本申請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。