

氏 名	オセゲラ ヤネス ファビアン Oceguera-Yanez Fabian
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2801 号
学位授与の日付	平 成 17 年 1 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	医 学 研 究 科 脳 統 御 医 科 学 系 専 攻
学位論文題目	Ect-2 and MgcRacGAP regulate the activation and function of Cdc42 in mitosis. に関する研究 (分裂期において, Ect2 と MgcRacGAP が Cdc42 の活性化と機能を制御する) (主 査)
論文調査委員	教 授 野 田 亮 教 授 武 田 俊 一 教 授 松 本 智 裕

論 文 内 容 の 要 旨

細胞が正常に増殖するためには、細胞分裂で染色体が正確に娘細胞に分配されることが必要である。細胞骨格は種々の力を発生し、この過程を制御する。Rho ファミリー GTPases は、特異的なアクチン細胞骨格の誘導と局所の微小管動態を調節することで、接着、運動、収縮などの様々な細胞機能を制御している。細胞分裂においても、Rho は収縮環の形成と維持を行い、細胞質分裂を遂行する。このような Rho の働きに比べ、他の Rho ファミリー GTPases の分裂における役割は不明であった。Rho ファミリー GTPases は、GDP から GTP への交換を触媒するグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) によって活性化され、GTPase 活性化蛋白質 (GAP) によって加速される GTP 水解によって不活化される。本研究で、我々は、Rho ファミリー GTPase の一つ、Cdc42 の細胞分裂における役割と活性制御機構を解析した。細胞周期を同調した HeLa 細胞より細胞分裂の各相でのホモジェネートを調製、これを用いて GTP 型の Cdc42 と Rac1 の分裂期における変動を pull-down 法にて解析した。これにより、GTP 型 Cdc42 は分裂中期に一過性に上昇するが、GTP 型 Rac1 は分裂期に有意な変動を示さないことが明らかとなった。ついで、分裂期に働く Rho ファミリー GTPases の GEF である Ect2 と GAP である MgcRacGAP の Cdc42 の分裂中期活性化への関与を調べた。その結果、Ect2 のドミナントネガティブ体を HeLa 細胞に過剰発現すると、分裂中期における Cdc42 の活性化が阻害されること、GAP 活性が欠損する MgcRacGAPR386A 変異体を過剰発現させると、Cdc42 の活性化が前倒しされ GTP 型 Cdc42 が前中期に蓄積されることが明らかとなった。一方、いずれの発現も Rac1 の活性には影響しなかった。Ect2 の RNAi を HeLa 細胞で行うと 48 時間後内在性の蛋白の発現を 20% 以下に抑制される。この RNAi によりやはり GTP-Cdc42 の分裂中期における蓄積が抑制された。これらの結果から、Cdc42 が分裂中期に特異的に活性化されること、この活性化に制御に Ect2 と MgcRacGAP が関わっていることが示唆された。ついで、この活性化の分裂における意義を明らかにするため、Cdc42 や Ect2 を RNAi で枯渇させ、その分裂に対する影響を観察した。それにより、Cdc42 や Ect2 を枯渇した細胞集団では、分裂指数が有意に高いことを見出した。これらの細胞を蛍光免疫染色で観察すると、Cdc42 や Ect2 枯渇群では、多数の細胞が 2 極性の紡錘体を形成するに拘わらず、対照と比較して染色体配列の障害頻度が有意に高かった。また、Cdc42 や Ect2 枯渇群では紡錘体チェックポイント蛋白質として知られる Mad2 のキネトコアでの染色が有意な頻度で見られた。このことにより、Cdc42 や Ect2 が枯渇した細胞では、紡錘体微小管のキネトコアへの結合が減弱していることが示唆された。しかし、これら Cdc42 や Ect2 の枯渇細胞は、分裂期停止を起こさず G1 期に進行し微小核や巨核など核異常をもつ細胞を形成する。このことから、これらの細胞群における紡錘体チェックポイント機構の障害が示唆された。これら Ect2 や Cdc42 を枯渇する細胞での分裂の進行をビデオ顕微鏡で観察すると、対照の細胞では前中期から終期まで 50 分以内に進んだが、Cdc42 や Ect2 の RNAi 処理細胞では中期板の形成に時間を要し、時間内に分裂を終了できなかった。同様の表現型は、MgcRacGAP 変異体を発現させた細胞でも見られた。以上、本研究により、分裂中期に Cdc42 が活性化され、染色体配列に先立つ微小管のキネトコアへの双極性結合に働くこと、この Cdc42 の活性化には Ect2 が、不活化には MgcRacGAP が関係していること

が、示唆された。

論文審査の結果の要旨

正常な細胞分裂には、染色体の娘細胞への正確な分配が必要であり、これは微小管とアクチンが時間・空間特異的に制御されることで達成される。Rho ファミリー GTPase は特異的なアクチン骨格の誘導と局所での微小管動態を制御して作用を発揮する。これまで、Rho ファミリー GTPase のうち、Rho の細胞質分裂での働きは知られていたが、その他の分子の分裂における役割は不明であった。

本研究で、申請者は、Rho GTPase の一つ、Cdc42 の細胞分裂における役割と活性制御機構を解析した。まず、細胞周期を同調した HeLa 細胞を用い、Cdc42 の分裂期における活性化を pull-down 法にて解析した。その結果、Cdc42 が分裂中期に一過性に活性化されることがわかった。この活性化は、分裂期に働く Rho ファミリーの活性化因子である Ect2 や不活化因子 MgcRacGAP のドミナントネガティブ体や RNAi によって阻害された。また、これら変異体の過剰発現や RNAi による Cdc42 や Ect2 の枯渇により、細胞分裂の分裂中期への進行が遅延した。これらの細胞では、紡錘体チェックポイント蛋白質、Mad2 の動原体での染色が有意に見られ、紡錘体微小管の動原体への結合が阻害されているのが明らかになった。以上の研究は、これまで不明であった Cdc42 とその制御分子の細胞分裂での働きを明らかにしたもので、細胞生物学の進歩に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値のあるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成16年12月24日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。