

氏 名	安 藤 義 和
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3236 号
学位授与の日付	平 成 20 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	医 学 研 究 科 脳 統 御 医 科 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Inactivation of Rho GTPases with <i>Clostridium difficile</i> toxin B impairs centrosomal activation of Aurora-A in G2/M transition of HeLa cells (<i>Clostridium difficile</i> toxin B による Rho GTPases の阻害は G2/M 期 centrosome での Aurora-A の活性化を減弱させる)
論文調査委員	(主 査) 教 授 武 田 俊 一 教 授 岩 田 想 教 授 武 藤 誠

論 文 内 容 の 要 旨

細胞は、G1、S、G2、M 期をへて分裂、増殖する。これら各期の進行はその時点での細胞状態をモニターするチェック機構により厳密に制御されている。細胞周期進行は、また、各期における細胞形態と密接に関連しており、これを制御する Rho、Rac、Cdc42 などの Rho GTPases は G1/S 期進行や細胞質分裂で働くが、その G2/M 期での役割は不明である。

G2/M 期進行には、Polo kinase、Aurora-A などの M 期 kinase と総称されるキナーゼ群が重要な働きをなしており、中でも Aurora-A は、G2 期に中心体で活性化され、Cyclin B-Cdk1 の活性化を誘導し、M 期への進入を引き起こす。この Aurora-A の活性化には、細胞接着斑に存在する HEF1 (human enhancer of filamentation 1) や Rho GTPases の effector である PAK (p21 activated kinase) が関与すると報告されているが、その詳細は不明である。

今回、Rho GTPases の阻害酵素である *Clostridium difficile* toxin B を用いて、G2/M 期進行における Rho GTPases の働きを検討した。G2 初期の HeLa 細胞に toxin B を加えると、1-1.5 時間後に Rho GTPases は mobility shift を示し、Rho GTPases のグルコシル化による不活化が証明された。これらの細胞では、DNA 凝集や Histone H3 のリン酸化が 2 時間遅延し G2 期から M 期へ進入が阻害されていることが明らかとなった。さらに、toxin B 処理細胞では、M 期進入に中心的な役割を果たす Cyclin B-Cdk1 の活性化も 2 時間遅延しており、これに先立つ中心体での Aurora-A の活性化も遅延していることが immunoblot、kinase assay、immunofluorescence など確認された。また、中心体では、Aurora-A 活性化に必要な PAK の活性化体の集積が G2 初期に、同じく Aurora-A 活性化に必要な HEF1 の中心体への集積が G2 中期に起こるが、toxin B 処理によりこれらの集積が 2 時間程度抑制された。これらの結果、および、Rho GTPases のうち、Rac や Cdc42 が PAK の活性化を起こすことが知られていることから、Rho GTPases は、G2 初期の PAK の活性化と中心体への集積、G2 中期の HEF1 の中心体への集積を制御して G2/M 期進行に働いていることが示唆された。

ついで、Rho GTPases 不活化による G2/M 期進行の遅延が actin 細胞骨格を経由しているかを検討するために、Cytochalasin D で actin 細胞骨格を阻害し、G2/M 期進行を観察した。Cytochalasin D 処理は、0.5-1 時間程度の Aurora-A 活性化の遅延を生じたが、PAK の活性化には効果がなかった。また、Rho GTPases のうち Rho を特異的に阻害する *Clostridium botulinum* C3 酵素を用いて実験したところ、C3 酵素処理も Aurora-A の活性化を 1 時間程度遅延させることが明らかとなった。

これらの結果は、これまで不明であった Rho GTPases の G2/M 期進行への関与を明らかにしたものであり、本論文により、Rho GTPases が中心体での Aurora-A の活性化に至る複数の経路を調節して G2/M 期進行を制御していることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

Rho GTPases は、アクチン細胞骨格の組替えと微小管の局所動態の調節を行い、刺激によって活性体－不活性体を往復することで細胞内分子スイッチとして働いている。これまで Rho GTPases の細胞周期での働きとして、G1/S 期進行調節、分裂期紡錘体及び、収縮環形成が知られていたが、G2/M 期進行での役割は不明であった。本論文では、Rho GTPases 全てをグルコシル化し不活化するクロストリジウム・ディフィシル菌の toxin B を用いこの点を検討した。

HeLa 細胞の細胞周期を同調し、G2 期に toxin B を添加、G2/M 期進行に対する効果を観察した。その結果、toxin B による Rho GTPases の不活化に伴い、M 期進入マーカーである DNA 凝集や Histone H3 のリン酸化が 2 時間遅延し、この過程に重要な CyclinB-Cdk1 とそれに先立つ中心体での Aurora-A の活性化の遅延に起因することが示された。また toxin B 処理は、中心体での Aurora-A 活性化に必要な Cdc42 標的蛋白質である PAK や HEF1 の中心体への集積も遅延させることが判明した。これらの結果から、Rho GTPases が中心体での Aurora-A の活性化に至る複数の経路を調節し G2/M 期進行を制御していることが示唆された。

以上の研究は、細胞の G2/M 期進行機序の解明に貢献し、細胞生物学の発展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みとめる。

なお本学位授与申請者は、平成 20 年 2 月 13 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。