

氏 名	か の う ふ み
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2532 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 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	哺 乳 動 物 細 胞 の ゴ ル ジ 体 ・ 小 胞 体 の 細 胞 周 期 依 存 的 形 態 形 成 の 分 子 機 構 の 解 明

論文調査委員	(主 査) 教 授 藤 吉 好 則	教 授 西 田 栄 介	教 授 七 田 芳 則
--------	----------------------	-------------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

真核細胞のオルガネラは、基本的には細胞分裂時には娘細胞に等分配される。その方式は、各オルガネラのコピー数に依存していると考えられている。例えば、ミトコンドリアやペルオキシソームといった細胞内に多コピー存在するオルガネラは、細胞内に均一に分布していれば娘細胞にほぼ等分に分配される。ところが、核膜、小胞体、ゴルジ体といった細胞内にシングルコピーしか存在しないオルガネラは、そのままでは2つの娘細胞へと分配されないことから、細胞分裂時にはその形態を変化させる。申請者は、哺乳動物細胞のゴルジ体・ERのバイोजェネシス、特に細胞周期依存的な形態形成機構の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。そのため、「セミンタクト細胞系」という、細胞内マニピュレーションを可能にする「細胞型試験管」を実験ツールとし、次のように研究を進めた。(1)形質膜を部分的に透過性にした「セミンタクト培養動物細胞」内に、間期・M期細胞質を導入することによって、セミンタクト細胞中のGFP可視化されたゴルジ体・ER膜の細胞周期依存的形態変化・ダイナミクスを形態を指標に光学顕微鏡下で再構成した。(2)セミンタクト細胞系の利点を生かし、それら再構成の過程に必要な細胞質因子を生化学的にスクリーニング・同定した。(3)同様に、ER膜⇄ゴルジ体間の小胞輸送を間期細胞質を用いて再構成し、そのキネティックスの定量的解析(速度定数決定)を行った。次いで、M期細胞質を用いた時の小胞輸送キネティックスへの影響を解析し、細胞周期依存的な小胞輸送と両オルガネラのバイोजェネシスの相関を考察した。

1) 細胞周期依存的なゴルジ体ディスアッセンブリー過程の再構成

哺乳動物細胞のゴルジ体は特徴的な層板構造を持ち、核の一極に局在している。M期になるとゴルジ体は細胞質中に分散した状態へとその構造を変化させる。この過程をセミンタクト細胞中で再構成した。はじめにゴルジ体に局在する膜タンパク質とGFPの融合タンパク質(GT-GFP)を恒常的に発現するMDCK細胞株MDCK-GTを樹立した。MDCK-GTをセミンタクトにし、そこへM期に同調させたカエル卵抽出液を加えることにより、M期特有のゴルジ体のディスアッセンブリーを誘導することが出来た。その結果、ゴルジ体ディスアッセンブリー過程は形態的にも生化学的にも、2つの連続した素過程に分解できることがわかった。形態的には、層板構造であったゴルジ体(stage I)ははじめに核上部のアピカル側に大きな点状構造体(stage II)になり、それがさらに細かく細胞質中に分散した(stage III)。またstage IIIではゴルジ体は小胞化するとともに、そのコンポーネントの一部(今回の場合はGT-GFP)はERへと吸収されている様子が光学顕微鏡下で観察された。また、stage I→IIにはMEK(MAP kinase kinase)、stage II→IIIにはcdc2 kinaseが関与することを明らかにした。

2) 細胞周期依存的なERのthree-way junction formationの再構成

哺乳動物細胞のER(endoplasmic reticulum)はthree-way junctionによってつながれた連続的なネットワーク構造である。ERネットワーク構造は細胞分裂時にどのように娘細胞に等分配されるかを明らかにする目的で、次の実験を行った。まずERに局在するHSP47のGFP融合タンパク質を恒常的に発現するCHO細胞株(CHO-HSP)を樹立し、CHO細胞

の ER ネットワークの細胞周期依存的形態変化の可視化に成功した。次に、セミインタクト CHO-HSP 細胞に HeLa 細胞から調製した M 期・間期細胞質を添加し ER の細胞周期依存的な形態変化を再構成した。その結果、生細胞で観察された M 期の ER の様子と同様に、M 期細胞質存在下では ER の three-way junction の数が減少していることがわかった。M 期細胞質を洗い流し、そこへ新たに間期細胞質を添加することにより、three-way junction 形成を誘導し、ER ネットワークを再構築することが出来た。この再構成系を用いて three-way junction 形成に必要な因子を探索した。その結果、NSF/SNAPs (一般的な膜融合促進タンパク質群) と p97/p47 (主に homotypic membrane fusion に関与するといわれている膜融合促進タンパク質群) と新規細胞質タンパク質 VRF135 の 5 種類のタンパク質が three-way junction の形成に十分であることを示した。また NSF による融合反応により中間体が形成され、それに引き続いて p97 によるチューブ全体の融合反応 (つまり three-way junction 形成) が引き起こされることを明らかにした。

3) ER-ゴルジ体間小胞輸送過程の再構成

ER からゴルジ体へと輸送されるタンパク質は COP (coat protein) II で被覆された小胞に選択的に濃縮され、ゴルジ体へと輸送される (順行輸送, ER → ゴルジ体小胞輸送)。しかしこの選別は厳密ではないため、ゴルジ体から ER へとタンパク質を回収する逆向きの輸送も存在する (逆行輸送, ゴルジ体 → ER 小胞輸送)。順行輸送と逆行輸送のバランスによる ER とゴルジ体に流入する膜やタンパク質の量の変化が、これらのオルガネラの形態の維持 (あるいは変化) に大きな影響を与えるファクターの一つであると考えられる。M 期における ER-ゴルジ体間小胞輸送のバランス変化を明らかにするため、セミインタクト CHO-GT 細胞に間期および M 期の L5178Y 細胞質を添加して小胞輸送過程を再構成し、ゴルジ体 → ER, ER → ゴルジ体間の小胞輸送を定量的に解析した。ガラクトシルトランスフェラーゼ (GT) は ER とゴルジ体をリサイクルするタンパク質であり、GFP との融合タンパク質 (GT-GFP) として細胞に発現させると、主にゴルジ体が、そして薄く ER が蛍光標識できる。ER → ゴルジ体小胞輸送量を測定時は、ゴルジ体領域にある GT-GFP を強出力のレーザーで消光させる。ER から (光る) GT-GFP が輸送されてくることによるゴルジ体領域の蛍光強度の回復を小胞輸送量として見積もり、定量化した。ゴルジ体 E → R 間輸送の見積もりは、逆に ER の蛍光成分を消光させることによって達成した。この再構成系から、M 期細胞質存在下では ER → ゴルジ体小胞輸送過程が停止するにもかかわらず、ゴルジ体 → ER 小胞輸送は普通通り起こっていることが明らかになった。また、M 期細胞質添加による ER → ゴルジ体小胞輸送の阻害は cdc2 kinase 依存的であること、小胞が出芽する ER exit site の崩壊がその阻害の原因の一つであることも明らかにした。

オルガネラの組成・形態はそれぞれ独立性を保っているように見える。しかし、オルガネラを構成するタンパク質や脂質は、細胞内にはりめぐらされた小胞輸送ネットワークなどを介して常に流動的に混ざり合っている。よって一見不動に見えるオルガネラの形態は、このような分子の流れの平衡が元となっていると考えられる。1) ~ 3) の研究を通し、細胞周期依存的なオルガネラの形態変化は、個々のオルガネラごとに独立に生起しているのではなく協動的に生起し、この原因として各オルガネラ間を結ぶ小胞輸送ネットワークの平衡の細胞周期依存的揺動が密接に関与している可能性を示すことが出来た。

論文審査の結果の要旨

真核生物の細胞が分裂するときにそのオルガネラは、娘細胞に均等に分配されなければならないが、細胞内で均一に分布していないオルガネラは細胞分裂に従ってどのようにこの問題を解決しているのかという疑問は、興味ある細胞生物学の研究課題である。例えば、細胞の中にシングルコピーしかない核膜や、小胞体、それにゴルジ体はそのままでは娘細胞へ分配できないことから、細胞分裂を行うときにその周期に合わせて形態を変えなければならない。本論文により、申請者は、哺乳動物由来の細胞を用いて、ゴルジ体と小胞体が、細胞周期依存的に形態を変化させる機構を丹念に研究し、娘細胞へほぼ等分に分配される上で必須と考えられるオルガネラの細胞周期依存的形態変化機構の分子メカニズムの重要な部分を解明した。申請者は、細胞内液を任意に交換できる「セミインタクト細胞系」の手法を駆使し、3つに大別できる研究を進めた。すなわち、1) M 期ゴルジ体のディスアセンブリー過程の分子機構、2) 細胞周期依存的な小胞体ネットワークの分断と再構築の分子機構、3) M 期における、小胞体とゴルジ体間の小胞輸送の解析と両オルガネラの形態形成機構について研究を進めた。

1) M期になると、ゴルジ体は細胞質内全体に広がるようにディスアッセンブリーすることがわかっている。ゴルジ体に局在する膜蛋白質に GFP を融合させたキメラ蛋白質を恒常的に発現する MDCK 細胞株を樹立して、これをセミインタクト細胞とした。M 期に同調させたカエル卵抽出液を加えることによって、M 期特有のゴルジ体のディスアッセンブリーを誘導することができた。その結果、この過程は 2 つの連続した素過程に分解できて、第 1 の素過程には MEK (MAP kinase kinase) が、第 2 の素過程には cdc2 kinase が関与することを解明した。

2) 小胞体は three-way junction とよばれる連続的なネットワーク構造をとっているが、M 期の細胞質によりこのネットワークが減少し、間期の細胞質を添加するとネットワークが再構築されることを示した。このネットワーク形成に十分な因子として 5 種類の蛋白質を同定した。また、同定された蛋白質 NSF による膜融合反応により中間体が形成され、それに引き続いて p97 という蛋白質によるチューブ全体の融合反応が引き起こされることを明らかにした。

3) 小胞体とゴルジ体の間の小胞輸送を詳細に解析することによって、M 期細胞質存在下では小胞体からゴルジ体への小胞輸送が停止するにもかかわらず、逆の輸送は通常通り起こっていること、さらにその小胞体からゴルジ体への小胞輸送の阻害は cdc2 kinase 依存的事であることを明らかにした。

以上の研究を通して、細胞周期依存的なオルガネラの形態変化は、個々のオルガネラにおいて独立に行われているのではなく協奏的に生起しているもので、各オルガネラ間を結ぶ小胞輸送ネットワークの平衡の細胞周期依存的揺動が密接に関与していること、またこれらの機構に関わる分子を同定した。

よって、博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、主論文に報告されている研究業績を中心として、これに関連した分野について諮問した結果、合格と判定した。