

別紙 4

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

主 論 文 の 要 旨

論 文 題 目 誘導型細胞内タンパク質分解システムを活用した微小管生成および紡錘体形成機構の研究

氏 名 土屋 賢汰

論 文 内 容 の 要 旨

細胞骨格の一種である微小管は幅広く生命現象に関わっており、その機能不全は様々な疾患の原因となる。微小管の構造は、 α -チューブリンと β -チューブリンが結合した $\alpha\beta$ -チューブリンヘテロダイマーによって形成される中空状であり、伸長と短縮を繰り返す動態を示す。プラス端を介した微小管動態の制御機構に関する解析は進んでおり、ch-TOG, CLASP, CLIP170 等の微小管付随タンパク質が制御因子として協調して機能することで伸長や短縮といった動態が生み出されることが分かっている。一方で、微小管生成機構については未解明な点も多い。In vivo, In vitro の解析から、 α -、 β -チューブリンのサブクラスである γ -チューブリンと GCPs によって構成される γ -TuRC 複合体が微小管生成の主要因子であり、 γ -TuRC が $\alpha\beta$ -チューブリンヘテロダイマーの鋳型となることで微小管生成が促進されることが報告されている。ところが興味深いことに、RNAi や阻害剤を用いた γ -チューブリンの機能阻害実験でも微小管生成が確認されており、 γ -チューブリン非依存的な微小管生成経路も存在することが予想されていた。しかし、これらの手法による γ -チューブリンの機能阻害は不完全であるため、 γ -チューブリン非依存的な微小管生成経路が細胞内に存在することは明瞭に証明されておらず、関連因子も特定されていなかった。 γ -チューブリンの機能を完全に阻害しようにも、 γ -チューブリンは必須遺伝子であるため、遺伝子破壊株等の作製は不可能であり、 γ -チューブリン非依存的な微小管生成経路を解析するためには、この問題を克服する必要があった。

そこで本研究の第一章では、AID 法を活用して γ -チューブリン非存在環境を人為的に作り出し、 γ -チューブリン非依存的な微小管生成経路を特定および解析することを目的とした。まず、ヒト HCT116 細胞において CRISPR/Cas9 法を用いて γ -チューブリンに mAID-mClover 標識を施し、AID 法による γ -チューブリンの時期特異的分解を試みた。その結果、細胞内の γ -チューブリンは検出限界以下の量にまで分解可能であることが確認できた。次に γ -チューブリン非存在下での微小管生成を解析するため、 γ -チューブリンの分解過程を可視化して確認した上で、微小管を一度完全に脱重合させてから再重合を促したところ、微小管が生成された。この結果は、線虫等を用いた解析から予想されていた、 γ -チューブリンと独立した微小管生成経路の存在を明瞭に証明した。次に 11 種の微小管付随タンパク質の RNAi スクリーニングと複数タンパク質の同時分解実験の結果から、微小管安定化因子として知られる CLASP1 が間期と分裂期において、TPX2 が分裂期において、微小管生成に関わることが明らかになった。さらに、微小管伸長促進因子 ch-TOG は、間期では微小管生

に寄与するものの、分裂期においては微小管生成ではなく、微小管伸長に関わることが示された。加えて γ -チューブリン非存在下で分裂期キナーゼを阻害したところ、微小管生成が認められなかったことから、Aurora-A, Aurora-B キナーゼが分裂期微小管生成に関わることが明らかになった。

以上の結果から、細胞内において γ -チューブリン非存在条件を人為的に誘導可能であること、細胞内において γ -チューブリン非依存的に微小管が生成されること、微小管付随タンパク質および分裂期キナーゼが γ -チューブリンと独立して微小管生成を担うことが示された。 γ -チューブリン非依存的な微小管生成は、ヒメツリガネゴケ細胞やショウジョウバエ脂肪細胞においても確認されているため、本研究で明らかになった微小管生成経路は生体内でも機能していると予想される。特に中心体遠位の神経細胞軸索先端や中心体が存在しない卵母細胞の減数分裂などの微小環境における微小管動態制御への理解に繋がると期待される。

RanGTPは細胞周期を通して細胞内タンパク質の局在制御に必須の役割を果たすタンパク質であり、分裂期には細胞内で濃度勾配を形成し紡錘体形成因子の局在を制御することで、紡錘体形成に寄与することが報告されている。分裂期ではRanGEFであるRCC1は染色体に局在し、RanGAP1は細胞質に拡散しているため、分裂期では染色体近遠軸でRanGTPの濃度勾配が形成される。紡錘体形成因子はimportin- α およびimportin- β と結合すると機能が不活性化され、RanGTPの結合によりimportinのタンパク質結合状態が変化し、紡錘体形成因子はimportinと解離するとともに不活性化制御も外れる。つまりRanGTP濃度勾配が高いところでは紡錘体形成因子が活性化し、低いところでは紡錘体形成因子が不活性化する。ところが、RanGTPは間期にもタンパク質の局在を制御する必須因子として機能しており、これまでの手法では分裂期のみでRanの機能を阻害することが困難であったため、分裂期における紡錘体形成因子の局在制御については不明瞭な点が多かった。

そこで本研究の第二章では、Ranの制御因子であるRCC1, RanGAP1およびimportin- β や紡錘体形成因子に対してAID法による分裂期特異的な分解を行うことで、紡錘体形成因子の局在制御機構を厳密に検証することを目的とした。まず、Ran経路の制御因子を分裂期特異的に分解して紡錘体形成因子の動態を観察したところ、RanGTP濃度勾配の非存在下でもNuMA, TPX2の局在は変わらないことが明らかになった。次に、RanGTP過剰存在下ではHURP, importin- β はどちらも微小管結合強度が向上し、キネトコア微小管上をダイナミックに結合と解離を繰り返すことでキネトコア微小管を安定化することが示唆された。

以上の結果から、今まで不明瞭であったRan依存的な紡錘体形成因子の分裂期特異的な局在制御機構について、本研究の厳密な解析により、現行モデルを修正した局在制御モデルを提唱するに至った。これは紡錘体の形成・維持・位置決定などの機構についてのさらなる理解に繋がると期待される。