

別紙 4

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 小頭症原因遺伝子 *Asp*/*ASPM* による紡錘体の極収束機構の解析

氏 名 伊藤 亜実

論 文 内 容 の 要 旨

生命体は、細胞分裂を繰り返すことで自身を構成する細胞を増殖させる。そのため、細胞分裂の際に遺伝物質を正確に配分することは、遺伝情報を維持する上で非常に重要である。紡錘体は、遺伝物質である染色体の分配に必要とされる巨大な構造物であり、主に微小管と呼ばれる極性を持った細胞骨格によって形成される。動物細胞の有糸分裂では、紡錘体は2つの極を持った菱形をしており、微小管のプラス端側が紡錘体中央に、マイナス端側が極に集積することが知られている。紡錘体の極には中心体と呼ばれる微小管形成を行う構造体が存在する。そのため長い間、中心体から伸長した微小管が紡錘体を形成することで、極を持った紡錘体構造が形成されると考えられていた。ところが、近年、中心体非依存的な微小管形成経路が明らかになったことで、紡錘体形成機構が改めて見直されるようになった。現在では、紡錘体内部にも様々な長さの微小管が存在しており、それらのマイナス端が何らかの働きで収束することで、紡錘体の極が形成されると考えられている。しかしながら、これまでに報告された極形成に関するモデルはどれも限定的であり、不明な点が多い。

Asp は、ショウジョウバエで同定された極形成因子である。小頭症原因遺伝子として有名なヒト *ASPM* のオーソログであり、変異により脳サイズの減少が認められる。細胞レベルでは、*Asp* の機能を阻害すると、紡錘体の極領域で微小管マイナス端が収束せずに広がり、染色体の分配異常が誘発される。しかしながら、*Asp* や *ASPM* が極形成時に果たす具体的な機能は明らかになっていない。また、ショウジョウバエでは、極形成に関わるもう1つの因子としてキネシン14が同定されているが、*Asp* とキネシン14がどのような協調関係で機能するかについても不明である。

そこで本研究では、極形成時における *Asp* の機能を解明するために、ショウジョウバエ S2 細胞を用いた細胞生物学的、生化学的解析を行った。まず、生細胞観察と多重阻害実験により、*Asp* がキネシン14とは独立に機能していることを明らかにした。この際、各タンパク質を欠損した細胞の詳細な比較から、極の収束を直接担うのは *Asp* であり、キネシン14は様々な場所で

微小管を架橋し、紡錘体全体をまとめる機能を果たしていることが示唆された。次に、Asp の部分欠失断片を作成し、細胞内における局在と機能を評価した。その結果、紡錘体微小管を収束させるために必要かつ十分な領域を同定した。同時に、Asp の部分欠失断片を使った試験管内実験を行い、Asp が微小管架橋活性を持つことを明らかにした。また興味深いことに、生細胞観察の結果、Asp-GFP が極付近に蓄積すると同時に、紡錘体内部で形成された微小管のマイナス端にも蓄積し、微小管の動きに伴い極方向へ移動することを見出した。さらに、Asp 欠損細胞における微小管マイナス端の追跡実験から、Asp が紡錘体内部で形成された微小管のマイナス端を別の微小管と架橋することで、全ての微小管の極付近での収束を保障していることを示した。

一方、ヒト ASPM に関しては、最も一般的な小頭症原因遺伝子であるにも関わらず、細胞内における機能がほとんど明らかになっていない。そこで ASPM の紡錘体内機能を検証するため、ヒト培養細胞である HCT116 細胞を用いた細胞生物学的解析を行った。まず、ASPM ノックアウト株を作成し、生細胞観察を行ったが、紡錘体の形態や分裂期の進行に関する異常は認められなかった。ところが、ASPM ノックアウト株にキネシン 14 の阻害剤を加えたところ、紡錘体極の異常な分離が発生することが明らかになった。また、中心体依存的な微小管形成の活性化因子である CDK5RAP2 を分解すると、ASPM ノックアウト株で紡錘体の極収束異常と分裂期の著しい遅延が引き起こされることを発見した。これにより、紡錘体の極形成過程において、ASPM が中心体やキネシン 14 と冗長的に機能することが示された。さらに、小頭症患者の ASPM 変異が細胞内で及ぼす影響を検証するため、患者から同定された ASPM 変異を導入した株を作成した。その結果、CDK5RAP2 が存在しない条件で、同じような極収束異常が観察された。これにより、紡錘体の極収束異常が小頭症を発症させる原因であるという可能性が示唆された。

本研究では、ショウジョウバエ Asp の極収束機能を明らかにし、紡錘体極形成機構の新たな分子モデルを構築した。また、ヒト ASPM が極収束因子であること、そして、小頭症患者の変異でも極収束異常が見られることを示した。これらの結果は、紡錘体構造の理解を深めるだけでなく、小頭症の研究を推進する新たな知見となるだろう。