

別紙 4

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 微小管プラス端動態の試験管内再構成

氏 名 森脇 崇史

論 文 内 容 の 要 旨

微小管はチューブリンタンパク質で構成された繊維状の細胞内ポリマーである。動的に重合／脱重合する微小管は細胞分裂期の紡錘体形成や細胞極性など、真核生物の様々な細胞内現象に重要な役割を担っている。それらの役割においては、伸長と短縮を繰り返す動的な微小管が必須であることが知られている。生体内において、動的な微小管を形成するには複数の微小管関連タンパク質による制御が必要であり、環境や細胞周期などにより時空間的な制御があることが知られている。基本的な動態として、他の細胞内構造に結合していない細胞質中の微小管は伸長、短縮、停止（ポーズ）という状態を繰り返している。しかし、分子レベルで如何にこの微小管重合サイクルが生み出され、時空間的に調節されているかは、既知の構成因子を用いた試験管内再構成において完全な重合サイクルの再現に成功していないため、未だ明らかになっていない。本研究ではキイロショウジョウバエ培養細胞である S2 細胞およびショウジョウバエタンパク質を用いて、細胞内の微小管動態の再現を目指した。

所属研究室において EB1、Sentin、XMAP215^{MspS} の 3 因子が *in vitro* において微小管先端で複合体を形成し、動的な微小管を生み出すことが示された。しかし、これら 3 因子を様々な濃度で混合しても、細胞内の伸長、短縮、停止（ポーズ）という 3 状態のサイクルを再現することはできなかった。そこで、再現の失敗の原因は動態調節因子の不足であると仮説を立て、構成要素を拡張することにした。具体的には細胞において微小管動態に重要であることが知られ、他生物種において *in vitro* で微小管動態への活性が示されている kinesin-13^{Klp10A} および CLASP^{Mast/Orbit} を候補とし、最終的にチュ

ーブリンおよび5つのタンパク質 (EB1、XMAP215^{Msp}、Sentin、kinesin-13^{Klp10A}、CLASP^{Mast/Orbit})を混合することにより、3状態全てを含む動的な微小管プラス端の振る舞いを再構成した。

まず、加える2つのタンパク質 (kinesin-13^{Klp10A}、CLASP^{Mast/Orbit}) をそれぞれ単独でチューブリンと混合し、その分子活性を調べた。kinesin-13 はツメガエルおよびヒトホモログで詳細な解析がされており、ショウジョウバエホモログ Klp10A においても同様に微小管脱重合活性を示した。次に、CLASP^{Mast/Orbit} は微小管のカタストロフを強く抑制し、伸長速度を低下させた。カタストロフ抑制活性については分裂酵母ホモログと同様であったが、伸長抑制活性は報告されておらず、酵母と昆虫、ひいては動物の CLASP では活性が少し異なる可能性が示唆された。また、この実験条件ではカタストロフがほぼ完全に抑制され、レスキュー活性は検証できなかった。これら2因子を加え、チューブリンおよび5つのタンパク質 (EB1、XMAP215^{Msp}、Sentin、kinesin-13^{Klp10A}、CLASP^{Mast/Orbit})を混合することにより、3状態全てを含む動的な微小管プラス端の振る舞いを再現することに成功した。この時、これまで *in vitro* では再現されていなかったポーズ状態と頻繁なレスキューが観察された。CLASP^{Mast/Orbit} 除くと、ポーズもレスキューもほとんど観察されないことから、4因子の存在下では CLASP^{Mast/Orbit} はポーズとレスキューを引き起こすことが示唆された。

さらに、動態の再現から一歩進み、微小管動態の制御についての解析を試みた。間期から分裂期に移行する際に、微小管はより動的になることが以前より知られているが、その分子機構は不明なままだった。そこで、分裂期特異的なキナーゼが微小管動態を制御しているのではないかと仮説を立てた。分裂期への移行に際して複数のキナーゼが活性化されることが知られているが、その中で、Plk1^{Polo} キナーゼが *in vitro* において CLASP^{Mast/Orbit} と kinesin-13^{Klp10A} をリン酸化修飾し、その活性を調節して微小管の動的不安定性を増加させることが示された。また、Plk1^{Polo} キナーゼ阻害剤による実験により、細胞内においても分裂期微小管の動態に Plk1^{Polo} キナーゼが寄与していることが示唆された。これらの結果から保存された5つのタンパク質が、細胞内で動的な微小管形成のための中心的な因子であり、Plk1^{Polo} によるリン酸化が間期から分裂期への微小管動態の転換に重要なイベントであることが示唆された。