

氏名(本籍)	権田幸祐(北海道)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第2248号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	生物科学研究科
学位論文題目	Studies on the Mechanisms for the Determination of the Division Plane in <u>Tetrahymena</u> Cytokinesis (テトラヒメナの細胞質分裂の分裂面決定機構の研究)
主査	筑波大学教授 理学博士 高橋三保子
副査	筑波大学教授 農学博士 酒井慎吾
副査	筑波大学教授 理学博士 林純一
副査	筑波大学助教授 理学博士 沼田治

論文の内容の要旨

動物細胞の細胞質分裂はアクチン繊維とミオシンから成る収縮環の収縮により細胞が2つにくびりきれられる一連の過程である。しかし「収縮環が形成される分裂面の位置の決定機構」や「収縮環の収縮機構」などその全貌は明らかにされていない。

繊毛虫テトラヒメナの温度感受性分裂停止突然変異株 *cdaA* 1 は制限温度下において分裂溝の形成が起こらない。大場らは *cdaA* 1 株と野性株の全蛋白質を2次元電気泳動法を用いて比較し、分子量 85kDa、等電点 4.7 の蛋白質 (p85) の移動度に差があることを見つけた。p85 は分裂溝の形成前に予定分裂面に出現し、その後分裂溝に局在した。一方制限温度下の *cdaA* 1 株において、このような p85 の局在は見られずにこれに続く分裂溝の形成も起こらないことから、p85 は「分裂面決定機構」に関与すると考えられる。

本研究で著者は、(1) 野性株と *cdaA* 1 株の p85 の一次構造、及び (2) p85 の分子機能を調べ「分裂面の位置の決定機構」における p85 の役割を解明した。

(1) 野性株と *cdaA* 1 株の p85 の一次構造

著者は野性株の p85cDNA のクローニングを行い、p85 のアミノ酸配列中に約 150 個のアミノ酸から成る繰返し構造が 2 種類含まれていること、カルモデュリン依存性蛋白質キナーゼタイプ II (カルモデュリン II キナーゼ) のカルモデュリン結合部位と相同性があることなどを明らかにした。次に *cdaA* 1 株の cDNA ライブラリーを作製し、*cdaA* 1 株の p85 cDNA のクローニングを行い、*cdaA* 1 株と野性株の p85 のアミノ酸配列の比較を行った。その結果、両者のアミノ酸配列の間に差は見られなかった。このことから野性株と *cdaA* 1 株の間での p85 の移動度の差は翻訳後の修飾によるものであり、*cdaA* 1 株においてはこの修飾に異常があると予想された。

(2) p85 の分子機能

p85 のアミノ酸配列中には、推定されるカルモデュリン結合部位が 3 ヶ所存在した。そこで著者は精製した p85 と大腸菌で発現・精製したカルモデュリンの間で共沈実験を行い、p85 は Ca^{2+} 依存的にカルモデュリンと共沈することから、p85 が Ca^{2+} 依存的にカルモデュリンと結合することを明らかにした。次に分裂期における p85 とカルモデュリンの局在性を検討し、両者が分裂溝に共局在することを明らかにした。さらに、 Ca^{2+} /カルモデュリンの特異的な阻害剤である W7 は p85 と Ca^{2+} /カルモデュリンの結合を阻害し、p85 の予定分裂面への局在も阻害

すること、この時カルモデュリンやアクチンの分裂面への局在も見られず分裂溝形成が完全に阻害されることなどを明らかにした。

以上の結果から、p85は一次構造中にカルモデュリン結合部位を3ヶ所保持し、 Ca^{2+} 依存的にカルモデュリンと結合すること、またW7による阻害実験の結果から、p85と Ca^{2+} /カルモデュリンの結合が分裂面の決定やこれに続く収縮環形成に重要な役割を担っていることが示唆された。p85とカルモデュリンの分裂溝への共局在性を合わせて考えると、両者は「分裂面の位置の決定機構」から「収縮環の収縮機構」までを協調的に制御している可能性がある。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は細胞質分裂の分裂面の位置の決定に関わるタンパク質、p85、の遺伝子をテトラヒメナよりクローニングし、p85の生化学的性状と分裂面決定機構における役割を明らかにしたものである。著者はp85が Ca^{2+} に依存してカルモデュリンと結合すること、p85とカルモデュリンが分裂溝に局在することなどを明らかにした。さらに Ca^{2+} /カルモデュリンの特異的阻害剤W7を用いてp85と Ca^{2+} /カルモデュリンの結合が「分裂面の位置の決定」と「収縮環の収縮」に関わることを示した。

細胞質分裂の「分裂シグナル」の実体は長い間謎であったが、著者の研究は Ca^{2+} シグナルが分裂シグナルの一翼を担うことを明らかにした。この研究は細胞質分裂の分子機構の解明に重要な知見を与えるものであり高く評価できる。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。