

氏 名（本籍）	ふじ う けん た 藤 生 健 太（茨 城 県）
学 位 の 種 類	博 士（理 学）
学 位 記 番 号	博 甲 第 3528 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 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 Microtubules and Microtubule Associated Protein in the Macronuclear Division of <i>Tetrahymena</i> (纖毛虫テトラヒメナの核分裂における微小管結合蛋白質の研究)
主 査	筑波大学教授 理学博士 沼 田 治
副 査	筑波大学教授 理学博士 高 橋 三保子
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 吉 村 建二郎

論 文 の 内 容 の 要 旨

有糸分裂は染色体を娘細胞に分配する重要なプロセスである。真核生物は有糸分裂を行うが、先行研究から纖毛虫テトラヒメナの核は有糸分裂とは異なる様式で分裂すると考えられていた。電子顕微鏡観察から大核内に微小管が存在すること、微小管重合阻害剤で大核分裂が阻害されることが報告されており、大核分裂に微小管が関与することが示されている。微小管に依存する有糸分裂ではない大核分裂の機構を明らかにすることは、核の分裂機構を解明するうえで重要である。本研究では、第一にテトラヒメナにおける大核分裂時の微小管の局在と挙動について検証し、第二に大核内の微小管結合蛋白質の探索を行った。

従来の間接蛍光抗体法では大核の微小管の染色ができなかったため細胞処理法に改良を加え、大核内の微小管の観察に初めて成功した。染色の改良点として細胞の固定に 1.8%ホルマリンを用い、膜の可溶化に 10% Triton X-100 を用い、抗 α チューブリン抗体との反応時間を 11 時間にすることで大核内微小管の染色に成功した。レーザー共焦点顕微鏡を用いた観察から、微小管は間期の核には観察されないが、細胞分裂が始まると大核内に微小管が形成され (stage 1)、大核が楕円形になると大核中央部から大核の周辺部に向かって放射状に並び (stage 2)、大核が伸長し円筒形になると大核の長軸に平行に並び (stage 3)、大核が中央でくびれるとくびれから大核の伸長端に向かって放射状に並び (stages 4 and 5)、分裂が完了すると微小管が脱重合され大核内から消えた (stage 6)。大核内微小管の重合中心を調べた結果、大核の微小管の重合は大核内の無数の点状の領域で起きたので、有糸分裂でみられる中心体のような微小管重合中心が大核に存在しないことが判った。大核内の DNA の分布は微小管の局在に合わせて変動し、微小管重合阻害剤で微小管を脱重合させると、DNA の分布はなくなった。この結果は微小管が大核の染色体輸送に関与することを示している。一方、細胞質の微小管は大核の伸長端側で大核の表層と細胞膜の裏打ちをつなぐように局在しており、大核の伸長に関与していた。したがって、大核内微小管と細胞質微小管が協調して大核分裂を行っていることが明らかになった。

大核分裂における微小管の機能をより詳細に調べるため大核から微小管結合蛋白質の探索を試みた。大核内の微小管結合蛋白質が安定な状態で大核を単離するため従来の大核の単離法に改良を加え、バッファー

に 2mM EGTA, 10mM PIPES, pH 6.8 を用い、細胞の破壊には 0.1% NP-40 を用いた。この方法を用いて単離した大核を、超音波破碎後、DNase 処理を行い、遠心分離によって上清に可溶化された蛋白質を回収した。大核内の微小管結合蛋白質は豚脳微小管との共沈実験によって分離した。その結果、138kDa 蛋白質 (p138) をはじめとする複数の蛋白質が微小管とともに共沈し、0.3M NaCl + 5mM ATP 条件で微小管から解離してきた。DNase 処理を施さない大核の抽出蛋白質からはこれらの蛋白質のほとんどが見られなかったため、p138 は微小管とともに染色体とも相互作用する蛋白質であると結論した。P138 と微小管の相互作用が ATP 依存적であるかの検証を行った結果、p138 は微小管と ATP 依存的に相互作用し、微小管からの解離には ATP の加水分解が必要であることが示された。p138 を同定するため、内部アミノ酸の部分配列を決定し、3 種類のペプチドをコードする塩基配列を、The Institute for Genomic Research より公開されている *Tetrahymena thermophila* のゲノムプロジェクトのデータベースから検索した。これら三種類のアミノ酸配列をコードする塩基配列が同一のゲノム (scaffold #1173226) 上の 1.8kbp の領域中に確認された。このことから p138 をコードする遺伝子のゲノム配列が得られたと結論した。この 1.8kbp の領域を含む 10kbp の配列を元に BLAST 検索による相同性検索を行い、エキソン領域を予測し、cDNA のクローニングと配列解析を行い、推定アミノ酸配列を解析した。その結果、p138 は染色体特異的転写伸長因子 (chromatin specific transcription elongation factor) であるヒトの FACTp140 や酵母の CDC68 など、染色体に結合し分裂などに関与する蛋白質のホモログであることが判った。FACTp140 や CDC68 などは微小管と相互作用することは今まで報告されていないので、p138 は染色体結合蛋白質で微小管と相互作用する新規の蛋白質であること、さらに染色体と微小管と相互作用して大核分裂で重要な役割を担っていることが明らかになった。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は有糸分裂をしないと考えられていた繊毛虫テトラヒメナの大核分裂において、微小管がその局在をダイナミックに変化して積極的に大核分裂に関与することを世界に先駆けて明らかにした。また、大核分裂に関わる微小管結合蛋白質を探索し、染色体特異的転写伸長因子と類似性を持つ p138 の同定分離に成功した。本研究で著者は「テトラヒメナの大核分裂では微小管が動原体の無い染色体と p138 を介して相互作用し DNA を娘核に分配する。」という今まで全く知られていなかった染色体分配システムの存在を提示した。本研究は核分裂の際の染色体分配機構に新たな知見を加えるものであり、核分裂の進化を考える上でも重要な発見である。したがって、本研究は今後の研究の進展に貢献するものであり、高く評価できるものである。

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。