

氏名（本籍）	櫛田 康晴 （ 福島県 ）		
学位の種類	博 士 （ 理学 ）		
学位記番号	博 甲 第 6904 号		
学位授与年月日	平成26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	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Studies on Molecular Mechanisms of Mitosis, Meiosis and Amitosis in <i>Tetrahymena thermophila</i> (<i>Tetrahymena thermophila</i> における有糸分裂、減数分裂、無糸分裂の分子機構の研究)		
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	稲葉 一男
副査	筑波大学教授（連携大学院）	理学博士	上田 太郎
副査	筑波大学准教授	博士（理学）	中野 賢太郎

論 文 の 要 旨

本論文は繊毛虫テトラヒメナの二核性に着目し、無傷の染色体を含む小核と、高度に倍数化され断片化された短い染色体を含む大核について、分裂期における核内微小管構造の働きの解明を目指した。

栄養増殖期において、小核は有糸分裂をおこなうが、染色体が倍数化・断片化されている大核は、紡錘体を伴わない特異な分裂様式すなわち無糸分裂を行う。大核の染色体は動原体を失っているため、染色体と微小管の動原体を介した1対1の結合は見られず、無糸分裂では二極性の紡錘体の形成は起こらない。有性生殖（接合）時には、小核が減数分裂を経て交配し、受精核から新しい小核・大核が分化する。このとき旧大核が分解され、新大核によって次世代へと形質が遺伝する。

まず、無糸分裂のメカニズムの解明を目指し、微小管重合中心である γ -チューブリンの局在を大核分裂の経時変化に沿って、蛍光抗体法を用いて観察した。大核分裂開始時には、 γ -チューブリンは大核内全体に出現し、ランダムな方向に微小管を形成したが、その後 γ -チューブリンは大核の中心部に集積し、放射状の微小管構造を形成した。はじめランダムであった微小管の方向性が放射状へと変化することが、その後の大核分裂に重要であることが明らかになった。

また、 γ -チューブリンの発現量を下げることにより、大核分裂が異常になることを明らかにし、 γ -チューブリンが大核分裂に不可欠であることを示した。

次に、大核の中心部に γ -チューブリンが集積する現象は、微小管マイナスエンドモーターの働きによるものではないかと考え、テトラヒメナの微小管マイナスエンドモーターの解析を行った。マイナスエンドモーターとして、細胞質ダイニンとキネシン-14が知られているが、細胞質ダイニンは既に大核分裂には関与しないことが示されている。そこで、テトラヒメナのゲノム上から2つのキネシン-14ファミリー遺伝子 (*KINI4A*, *KINI4B*) を同定し、この2つの遺伝子を同時にノックアウト (KO) した。結果として、2つのキネシン-14遺伝子をKOした細胞においても、大核は正常に分裂し、細胞も正常に増殖したため、キネシン-14の発現は無糸分裂に必須ではないと結論した。

一方、キネシン-14のKO実験によって、小核分裂に関して新たな知見が得られた。*KINI4A*のKO細胞で、

栄養増殖期の小核の有糸分裂における染色体分配が異常となり、しばしば染色体が紡錘体の中間部分に取り残された。このことは、紡錘体構造と染色体の結合が断たれていることを示しており、KIN14Aタンパク質が動物細胞のキネシン-14の機能と同様に、動原体微小管を紡錘体に接続させることを示す。さらに、*KIN14A*-KO細胞では有性生殖（接合）期の減数分裂の紡錘体の形態異常が認められ、正常な染色体の分配が完全に阻害された。減数分裂でも有糸分裂と同様に、KIN14Aタンパク質が動原体微小管を紡錘体に接続させることが示唆された。減数分裂時に、小核は相同染色体の対合のために、核内微小管の重合によって細長く伸長する（クレッセント期）。相同染色体の対合が完了すると、核内微小管の束が短くなって減数分裂紡錘体となる。*KIN14A*-KO細胞においては、クレッセントの短縮時に核内微小管の束の短縮が阻害され、紡錘体の両端から微小管が長くはみ出した異常な形態となった。EGFP-KIN14Aを強制発現させたところ、蛍光シグナルが短縮中のクレッセントの両端に集積していた。これは、KIN14Aタンパク質の微小管マイナス端集合活性により、短縮中のクレッセントの両極に微小管のマイナス端が集合し、最終的に紡錘体の両極を形成することを示す。したがって、*KIN14A*-KO細胞では、紡錘体極にマイナス端が集合しないため、染色体が紡錘体と正しく相互作用できなくなり、結果として染色体の不分離が起こると結論した。

本論文は大核分裂において、 γ -チューブリンが微小管の方向性を決め、大核分裂に不可欠であることを明らかにした。また、大核と小核の分裂では、微小管モータータンパク質すなわちKIN14Aタンパク質を使い分けていることを明らかにした。

審 査 の 要 旨

本論文は、大核と小核の核分裂機構の違いの全容を明らかにするための、重要な手がかりを与えるものである。また、二核性の理解にも大きく貢献するもので、細胞生物学領域の研究として、高く評価できる。審査では、大核分裂における γ -チューブリンの局在から、 γ -チューブリンの機能に関する議論がなされ、試験管内での実験の必要性が指摘された。また、大核分裂における微小管のダイナミクスに関わるモータータンパク質に関して質疑が行われ、微小管モータータンパク質キネシンの遺伝子破壊や局在性の解明による問題解決の筋道が著者によって示唆された。審査における質疑においても、著者は適切かつ論理的な議論を展開し、博士（理学）の資格を十分有することが明らかになった。

平成26年2月3日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。