

氏名（本籍）	知念 拓実 （ 長野県 ）		
学位の種類	博 士（ 農 学 ）		
学位記番号	博 甲 第 7165 号		
学位授与年月日	平成26年11月30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	Analysis of the Effect of Glaziovianin A and the Derivatives on Microtubule Dynamics (Glaziovianin Aとその類縁体の微小管ダイナミクスに対する作用解析)		
主査	筑波大学准教授	博士（農学）	臼井 健郎
副査	筑波大学教授	農学博士	松本 宏
副査	筑波大学教授	博士（理学）	田中 俊之
副査	筑波大学教授	博士（農学）	高谷 直樹

論 文 の 要 旨

ブラジル原産マメ科植物から単離したイソフラボン系化合物であるglaziovianin Aは、動物細胞に異常な紡錘体（染色体配向異常、多極紡錘体など）を誘導して細胞周期をG2/M期で停止させる。これまでに本物質が、*in vitro*チューブリン重合アッセイで既存の微小管重合阻害剤と異なり、重合遅延を引き起こすこと、細胞内微小管伸長先端に局在するEB1タンパク質の局在を消失させる一方で、間期の微小管ネットワークの形態には影響をほとんど及ぼさないことなどが明らかとなっていた。以上の結果は、glaziovianin Aが微小管の伸長・短縮といった細胞内微小管ダイナミクスを抑制することを示唆しているが、その詳細は不明であった。

本研究ではglaziovianin A及びその類縁体を用いて、glaziovianin Aの微小管ダイナミクスへの作用を解析した。さらにその結果を元に、細胞内微小管ダイナミクスの機能を明らかにすることを目的に解析を行った。

1) glaziovianin Aの α/β -チューブリン上の結合部位を、既存のチューブリン重合阻害剤であるcolchicine、vinblastineと比較した。 $[^3\text{H}]$ -colchicine、 $[^3\text{H}]$ -vinblastineのチューブリンへの結合に対する影響を検討したところ、glaziovianin Aはcolchicineのチューブリン結合を阻害した。このことからglaziovianin Aはチューブリン上のcolchicine部位に結合すると考えられたが、colchicineとは異なりvinblastineの結合促進は認められなかった。以上の結果から、glaziovianin Aはcolchicine結合部位に結合するものの、既存のcolchicine部位結合性の微小管作用薬とは異なる構造変化をチューブリンに対して引き起こしていると考えられた。

2) glaziovianin Aの細胞内微小管ダイナミクスに対する作用を、EGFP- α -チューブリン発現細胞を用いて検討した。薬剤の存在・非存在下での微小管先端の動きを顕微鏡下、経時的に観察し、微小管ダイナミクスに対する作用を検討した。微小管ダイナミクスを表わすパラメーターとして、微小管の伸長及び短縮速度と、状態変化を表わすカタストロフ・レスキューの頻度を算出したところ、glaziovianin Aは微小管の伸長・短縮速度を半分以下にするとともに、カタストロフ頻度を約半分に減少させた。この結果、伸長及び短縮している微小管の割合を減少させ、伸長・短縮が止まった「ポーズ」と呼ばれる状態の微小管割合を増加させた。このことからglaziovianin Aは新たな微小管ダイナミクス阻害剤であり、細胞内微小管ダイナミクスの機能を特異的に解析するツールとして有用であると予想された。

3) 微小管が細胞内で常に重合・脱重合を繰り返す極めて動的な構造であることは知られているが、この微小管ダイナミクスの細胞内機能は不明であった。そこでglaziovianin Aをケミカルプローブとして用いることで、微小管ダイナミクスの細胞内機能を検討することにした。EGF依存性エンドサイトーシスについて検討したところ、glaziovianin Aによって微小管ダイナミクスが阻害された状態ではエンドソームの輸送阻害、

及びEGF受容体の活性低下が遅延することが明らかとなった。これらのことから、微小管ダイナミクスはエンドサイトーシスの進行に重要であると考えられた。

4) 出芽酵母を用いてglaziovianin Aのチューブリン阻害機構を詳細に解析するにあたり、遺伝学的解析が可能な薬剤超感受性株の構築を行った。細胞膜上の薬剤排出ポンプとその転写因子をコードする12遺伝子を破壊し、さらに孢子形成能を回復させた12gene Δ HRS株を作製したところ、様々な薬剤に対する感受性向上が見られたものの、glaziovianin A及び高活性類縁体である σ -propargyl glaziovianin Aに対する感受性は見られなかった。そこで薬剤排出系に加えて、さらに薬剤透過性に関わるERG6遺伝子を破壊した株の作製を検討することにしたが、形質転換能や孢子形成能を失い、酵母の利点である遺伝子操作性を損なうことが予想された。そこで培地条件依存的にERG6遺伝子を発現制御可能な株の作製を行った。12gene Δ HRS株のERG6遺伝子上流に、ガラクトースによって転写誘導することが出来るGALIプロモーターを挿入することで、12gene Δ HRS-iERG株を作製した。作製した株は、グルコース培地条件下ではERG6遺伝子の発現が抑制されて多くの薬剤に対し感受性を示す一方、ガラクトース培地条件下ではERG6遺伝子が発現し、形質転換能、及び孢子形成能が回復した。この株もglaziovianin Aには感受性を示さなかったが、高活性類縁体の σ -propargyl glaziovianin Aに対しては感受性を示したことから、今後のglaziovianin A類の解析に有用であると考えられる。

審 査 の 要 旨

微小管は真核細胞に普遍的に存在している細胞骨格の一つであり、細胞内において常に重合・脱重合を繰り返す、極めて動的な構造体であることが知られている。しかしながらこの微小管ダイナミクスの機能についてはほとんど分かっていない。本論文では、天然化合物であるglaziovianin A、及びその高活性類縁体が微小管ダイナミクスを阻害することを明らかにし、さらにこの阻害活性を元に、glaziovianin Aをプローブとして用いることで細胞内微小管ダイナミクスがエンドサイトーシスの制御に関わっていることを明らかにした。これら一連の研究成果はこれまで不明であった細胞内微小管機能の一端を明らかにしており、非常に高く評価できる。また、glaziovianin Aの阻害機構を解析するために作成した出芽酵母株、12gene Δ HRS株、及び12gene Δ HRS-iERG株は、glaziovianin A類以外にも多くの薬剤に対する感受性向上が見られており、同時に遺伝学的解析も可能なことから、今後のchemical biology研究に広く利用できる有用なツールでもあり、これらの株を作製した点においても高い評価を与えられる。

平成26年9月25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（農学）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。