

# 博士論文審査報告書

## 論文題目

分裂酵母の紡錘体形成に寄与する  
新規メカニズムの解析

Analysis of novel mechanisms that  
contribute to spindle assembly  
in fission yeast

申請者

白杉	豊
Yutaka	SHIRASUGI

生命医科学専攻 細胞骨格ロジスティクス研究

2020年2月

## 1. 論文内容の要旨

遺伝情報を司る染色体は、分裂期に形成される紡錘体によって次世代の細胞へ分配される。紡錘体は、細胞骨格の1種である微小管が2つの極（紡錘体極）の間で束ねられてできた構造体である。紡錘体極の役割を果たす構造体として、高等生物の中心体や酵母のSPB (spindle pole body)が挙げられる。紡錘体が正常に形成されるためには、中心体ないしSPBが分離して移動し、空間的に離れた2つの極を形成する必要がある。分裂酵母では、微小管結合タンパク質であるCut7 (5型キネシン)が微小管をスライドさせることによって2つのSPBを互いに引き離す。すなわちCut7は分裂酵母においてSPBを互いに分離する「外向きの力」を作り出すことで、紡錘体形成に必須の役割を果たす。Cut7を欠損した細胞 (*cut7Δ* 株)は致死であるが、Cut7とは逆に内向きの力を発生させる14型キネシンPkl1をCut7と同時に欠損させた細胞 (*cut7Δ pkl1Δ* 株)では、Cut7による外向きの力が存在しないにも関わらずSPBが分離し、生育可能である。このことから細胞にはCut7に依存せずとも外向きの力を生み出す機構が備わっており、それがSPBの分離を促進すると考えられる。申請者は、Cut7非依存的にSPBが分離する分子メカニズムを追究する目的で、*cut7Δ pkl1Δ* 株の解析を行なった。

まず*cut7Δ pkl1Δ* 株は体細胞分裂の結果と異なり、減数第一分裂ではSPBが分離しないことを見いだした。この株において、内向きの力を発生させる別の14型キネシンであるKlp2を欠損させると、減数第一分裂のSPB分離が改善した。当該結果は、Cut7非依存的な外向きの力が減数第一分裂では十分に機能しないことを示している。

次に申請者は、*cut7Δ pkl1Δ* 株の体細胞分裂ではSPBが分離するのに対して減数第一分裂では分離しない原因を追究した。その結果、減数第一分裂においてのみ特徴的に見られる染色体の形態のせいで、その時期にCut7非依存的な外向きの力が発生しにくいことを明らかにした。減数第一分裂では、相同染色体が腕部のキアズマによって連結し二価染色体を作り、さらに姉妹動原体はまとめられて1つの動原体として振る舞う。申請者は、キアズマの形成に必要なRec12と姉妹動原体をまとめる因子Moalを*cut7Δ pkl1Δ* 株で欠損させることで、減数第一分裂の時期の染色体を人工的に体細胞分裂時の形態へと改変させた。このような*cut7Δ pkl1Δ rec12Δ moalΔ* 株を観察した結果、*cut7Δ pkl1Δ* 株と比較して減数第一分裂のSPB分離が改善した。すなわち、体細胞分裂型の染色体はSPBを分離するための外向きの力を発生させることが示された。

さらに申請者は、動原体が外向きの力を発生させるための力学的な支点として機能することを明らかにした。動原体の挙動を*cut7Δ pkl1Δ* 株の体細胞分裂で経時観察したところ、動原体がSPBの近傍に移動した直後に、その動原体を中心にしてSPBが2個に分離する様子が確認された。他方、減数第一分裂では、二価染色体の動原体どうしが離れやすく、SPBを分離するための

支点としては機能しづらいと推察した。

最後に申請者は、動原体が微小管と結合することで外向きの力が発生することを示した。動原体が微小管と結合するために必須の動原体因子 Nuf2 の変異 *nuf2-2* を *cut7Δ pk11Δ* 株に導入すると、SPB の分離が遅延した。

以上の結果から、動原体が力学的な支点として機能することで Cut7 非存在下において SPB を分離するための外向きの力を発生させることが明らかとなった。

## 2. 論文審査結果

2020 年 1 月 6 日に開催した公聴会では、論文の内容に関する口頭発表とその内容についての議論が行われた。その概要を以下に示す。

- 1) 減数第一分裂で Ase1 が十分に機能しない可能性について議論がなされた。申請者は、Ase1 が体細胞分裂と減数第一分裂で同様の局在を示すことを確認している。しかしながら Ase1 が減数第一分裂で十分に機能するか否かについてはさらなる検証が必要だと結論づけた。
- 2) Ase1 のような補助的な紡錘体形成機構を持たない生物種が存在する可能性について議論がなされた。申請者は、分裂酵母が真核生物の中でもシンプルな生物であることに触れ、少なくとも真核生物の間では Ase1 などによる紡錘体形成機構が広く保存されていると回答した。
- 3) 博士論文で引用された総説について、最新のものを用いる必要性が指摘された。
- 4) キネシンの進む方向が何によって決定するのかについて質疑がなされた。キネシンの進行方向はモータードメインと胴体を結ぶネックリンカーの構造によって決定することが説明された。また、キネシンが進むための ATP がどこから供給されるのかについて議論がなされた。
- 5) Pk11 と Klp2 が同一の微小管上に存在し得るのかについて議論がなされた。申請者は、1 本の微小管上に複数のキネシンが結合することは可能であると述べた。さらに、これらのキネシンによって発生する力の大きさが発現量や局在によって制御される可能性について議論がなされた。
- 6) *cut7Δ pk11Δ nuf2-2* 株では、Ase1 による力のみで SPB が分離するのかについて議論がなされた。*nuf2-2* 株は温度感受性変異体であり、Nuf2 の機能が完全には失われていないと考えられる。このことから申請者は、*cut7Δ pk11Δ nuf2-2* 株においても動原体による外向きの力が部分的に機能し、それが Ase1 とともに SPB の分離を促進したと回答した。
- 7) 生理的条件下では動原体による外向きの力が SPB の分離に貢献しない可能性について議論がなされた。申請者は、*swi6Δ* 株や *nuf2-2* 株で SPB の分離が遅延が見られなかったことから、動原体を介した外向きの力は Cut7 存在下では SPB 分離に寄与しないと回答した。

- 8) 体細胞分裂時に動原体がどのように固定されているのかについて議論がなされた。申請者は、2つの SPB から伸長した複数本の微小管が動原体と結合することで、動原体が SPB の近傍に固定されると回答した。
- 9) 多重変異体が正しく作製されているのかについて質疑がなされた。申請者は抗生物質を添加した寒天培地や PCR により遺伝子型が正しいことを確認しており、二倍体である可能性を排除していることを報告した。
- 10) Pkl1 や Klp2 による内向きの力が存在する意義について議論がなされた。*pk11Δ* 株では紡錘体の形態が異常になることが先行研究で報告されている。そのため申請者は、Pkl1 や Klp2 による内向きの力が Cut7 による外向きの力と拮抗し、紡錘体の形態の維持に貢献していると説明した。
- 11) それぞれのキネシンや動原体がどの程度の力を発生させるのかについて質疑がなされた。各キネシンが発生させる力を測定した先行研究を確認する必要性が指摘された。また、ヒト培養細胞では動原体の数が多いため、より強い力が発生する可能性について議論がなされた。
- 12) *cut7Δ pk11Δ nuf2-2* 株で SPB の分離が遅延した結果から、動原体が微小管の末端と結合することで力を発生する可能性について議論がなされた。申請者は、*nuf2-2* 変異体が側方結合にも異常を示す可能性を考慮し、この問題に答えるためにはさらなる実験が必要であると回答した。
- 13) 今後の展望とそのために必要な技術について議論がなされた。本研究では、動原体が微小管の末端と結合して力を発生させるのか、あるいは微小管の側面と結合して力を発生させるのかについて明らかにすることが出来なかった。これらを明らかにするために、申請者は電子顕微鏡を用いて動原体と微小管の結合の仕方を解明する必要があると説明した。

以上の口頭発表ならびに質疑応答を通して、申請者が十分な学識を有していることを確認した。本研究は、染色体分配において必須の役割を担う紡錘体が形成される際に、動原体を介して発生する力が寄与することを提案するものであり、当該研究分野の発展に貢献する研究内容であると考え、博士（理学）の学位論文として相応しいと判断した。

2020年2月

審査員

主査 早稲田大学 教授 博士（理学） 東京大学 佐藤政充

副査 早稲田大学 教授 博士（医学） 慶應義塾大学 合田亘人

副査 早稲田大学 教授 理学博士 東京大学 仙波憲太郎