



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1519号
学位記番号	第1090号
氏名	折井 みなみ
授与年月日	平成 28年 3月 25日
学位論文の題名	<p>PP1-dependent Formin Bnr1 dephosphorylation and delocalization from a cell division site (プロテインホスファターゼ1依存的なフォーミン Bnr1 の分裂面からの脱局在と脱リン酸化)</p> <p>PLOS ONE Published: January 15, 2016 DOI:10.1371/journal.pone.0146941</p>
論文審査担当者	主査： 岡本 尚 副査： 近藤 豊, 中西 真

論文内容の要旨

細胞が二つの娘細胞に分かれる細胞質分裂は、分裂溝の形成、収縮環の形成・収縮、そしてアブシジョンといった一連のプロセスからなる。この一連のプロセスに狂いが生じると、細胞質分裂は失敗し、染色体が倍数化・異数化して細胞のガン化が促進されることが知られている。なかでも、収縮環（アクチンやミオシンからなるリング状の構造体）を形成する制御は極めて重要である。収縮環に含まれる直鎖状アクチンを重合するのは、フォーミンファミリーのタンパク質である。真核生物のモデルである出芽酵母はフォーミンを二つ有しており、一つ目のフォーミン **Bnr1** は収縮環形成前の M 期前期までは分裂面に局在するものの、収縮環形成時に脱局在し細胞質全体に局在する。もう一つのフォーミン **Bni1** は **Bnr1** と入れ替わるように分裂面へと移行する。これまでにこのようなフォーミンの局在変化が観察されていたものの、その制御機構はほとんど不明であった。

本研究では、生細胞内でフォーミン交替を観察するために、**Bnr1** に 3xGFP、**Bni1** に mCherry の蛍光タンパク質をそれぞれ融合し、ライブセルイメージングを行った。その結果、一細胞内で **Bnr1** の分裂面からの脱局在と **Bni1** の分裂面への局在が観察された。

次に、フォーミン交替の分子メカニズムを検討するために、収縮環形成時期における **Bnr1** の翻訳後修飾を検討した。まず、微小管脱重合剤であるノコダゾールで処理して G2 期に同調した。その後、新たな培地にリリースして M 期進行を促し、一定時間ごとにサンプリングして **Bnr1** の翻訳後修飾の変化をウエスタンブロッティングで検討した。その結果、**Bnr1** は分裂面からの脱局在と同時に、移動度の早いバンドとして検出されることが分かった。この移動度の変化が脱リン酸化によるものかどうかを検討するために、**Bnr1** を細胞破碎液から免疫沈降し、アルカリフォスファターゼで処理した。すると、移動度の早いバンドと同じ移動度を示すバンドが検出された。以上より、**Bnr1** は分裂面からの脱局在と同時に脱リン酸化されることが明らかになった。

次に、この脱リン酸化に関与するフォスファターゼを探索した。これまでに、ヒトのプロテインホスファターゼ 1 (PP1) の出芽酵母ホモログである **Glc7** が細胞質分裂期に分裂面に局在することが明らかになっていたことから、**Glc7** が **Bnr1** を脱リン酸化する可能性を検討した。**Glc7** の機能が低下した *glc7-129* 細胞をノコダゾールで同調してリリースし、M 期の進行を追って解析したところ、**Bnr1** の脱リン酸化はコントロールに比較して顕著に遅延することが明らかになった。**Bnr1** の分裂面からの脱局在も有意に遅延していた。さらに、**Bni1** の分裂面への局在と収縮環の形成も遅延していた。これらの結果から、**Glc7** が **Bnr1** の脱リン酸化に関与することが示唆された。哺乳類 PP1 を用いて、細胞破碎液から免疫沈降した **Bnr1** とインキュベートしたところ、PP1 は **Bnr1** を脱リン酸化した。この結果は **Glc7** が **Bnr1** を脱リン酸化するという我々の仮説と一致している。

次に **Glc7** の制御サブユニットの中で **Bnr1** の脱リン酸化に関与するものを探索した。SCMD データベースという、出芽酵母の非必須遺伝子破壊株を自動形態解析プログラムで網羅的に解析したデータベースを利用して *in silico* スクリーニングを行った。**Glc7** の制御サブユニット 21 個の遺伝子をそれぞれ破壊した細胞のうち、最も分裂環形成率の低いものとして *ref2Δ* (*REF2* 遺伝子破壊株) が同定された。

そこで、*REF2* が **Bnr1** の脱リン酸化及び脱局在に関与する可能性を検討した。*ref2 Δ* をノコダゾールで同調・リリースして経時的に解析したところ、**Bnr1** の脱リン酸化と脱局在が顕著

に遅延していた。さらに、**Bni1** の分裂面への局在と収縮環の形成も同様に遅延していた。これらの結果から、**Ref2** が **Bnr1** の脱リン酸化に関与することが示唆された。

Ref2 はこれまでに RNA メタボリズムに関与するという報告があるが、細胞質分裂への関与は報告されていない。そこで **Ref2** の細胞質分裂における機能をさらに検討する目的で、細胞質分裂に重要なセプチンをコードする遺伝子 *CDC12* との合成致死性を検討した。その結果、確かに *REF2* と *CDC12* は合成致死となった。

以上の結果より、**Glc7/Ref2** 複合体は直接的あるいは間接的に **Bnr1** を脱リン酸化し分裂面から脱局在させることで **Bni1** の分裂面への局在を誘導し、収縮環形成を促進していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

【背景】

細胞質分裂とは細胞周期の最後に細胞が物理的に二分される現象であり、細胞質分裂が正常に終了するためには収縮環の形成・収縮などの多数のプロセスが適切な時期に適切な場所で行われることが必要である。なかでも収縮環（アクチン及びミオシンからなるリング状の構造体）を形成する制御は極めて重要である。収縮環に含まれる直鎖状アクチンを重合するのは、フォーミンファミリーのタンパク質である。出芽酵母はフォーミンを二つ有しており、一つ目のフォーミン **Bnr1** は収縮環形成前の M 期前期までは分裂面に局在するが、収縮環形成時に脱局在し細胞質全体に局在する。もう一つのフォーミン **Bni1** は入れ替わるように分裂面へと移行する。このようなフォーミンの局在変化が観察されていたものの、制御機構および生理的意義は不明であった。

【方法】

- ① **Bni1** と **Bnr1** に蛍光タンパク質を融合しライブセルイメージングでフォーミン交替を観察した。
- ② 分裂期進行の過程における **Bnr1** の翻訳後修飾を解析する目的で、微小管脱重合剤ノコダゾールを用いて細胞周期を同調し一定時間ごとにサンプリングし SDS-PAGE、ウェスタンブロットティングを行った。
- ③ **Bnr1** の翻訳後修飾がリン酸化であるかどうかを検討するために、免疫沈降した **Bnr1** を用いて脱リン酸化酵素で処理した。
- ④ **PP1(GLC7)** の **Bnr1** 脱リン酸化に及ぼす影響を検討するために **PP1** の機能が低下した *glc7-129* 変異株や **PP1** 制御サブユニット **REF2** 破壊株を用いて②と同様の解析を行い、さらにフォーミンの局在と収縮環形成を観察した。

【結果】

ライブセルイメージングを行った結果、一細胞内でフォーミンの交替が確認された。次に **Bnr1** の翻訳後修飾を検討した結果、**Bnr1** は分裂面からの脱局在と同時に脱リン酸化されることが明らかになった。**PP1** の機能が低下した *glc7-129* 細胞では **Bnr1** の脱リン酸化とフォーミンの交替、収縮環形成に欠損があった。これらの結果から **Glc7** が **Bnr1** の脱リン酸化に関与することが示唆された。次にデータベースサーチにより **Glc7** の制御サブユニット 21 個の遺伝子破壊株のうち、最も分裂環形成率の低いものとして *ref2Δ* (**REF2** 遺伝子破壊株) が同定された。実際に *ref2Δ* を解析したところ、**Bnr1** の脱リン酸化、フォーミンの交替、収縮環の形成が顕著に遅延していた。セプチン **CDC12** との合成致死性からも、確かに **REF2** はフォーミン交替と収縮環形成に関与することが示唆された。

【考察】

PP1 は **Bnr1** の脱リン酸化、フォーミンの交替、そして収縮環形成を制御することが明らかになったものの、**PP1** が直接 **Bnr1** と結合して脱リン酸化するかどうかは未だ不明である。ヒト培養細胞で **PP1** ファミリータンパク質の一つが分裂面に局在し細胞質分裂に必須であることから、類似の機構がヒトに存在する可能性がある。

【審査の内容】

主査の岡本教授から、**Bnr1** と **Bni1** の構造上の相違点について等 10 項目、第一副査の近藤教授から、哺乳動物細胞で **Bnr1** および **Bni1** に対応する分子は等 8 項目、第二副査の中西教授から出芽酵母を用いた研究の利点、欠点について等 2 項目の質問があり、これらに対して適切な回答が得られた。従って、学位申請者は学位論文について十分理解しているとともに、細胞生化学に関する知識を有していると考えられた。本研究は、細胞分裂時における収縮環形成制御に、**PP1** による **Bnr1** の脱リン酸化が重要な役割を果たしていることを明らかにしたものであり、細胞分裂を理解する上で意義のある研究と言える。以上を持って本論文の著者は博士（医学）の称号を与えるに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 岡本 尚 副査 近藤 豊、 中西 真