

石躍 由佳 氏の在学期間短縮に関わる学位論文審査の要旨

論文題目

微小管切断活性をもつ AAA タンパク質 spastin の線虫ホモログの構造と機能
(Structure and function of the *Caenorhabditis elegans* homologue of spastin, a member of AAA proteins with microtubule-severing activity)

AAA (ATPases Associated with various cellular Activities) タンパク質のひとつであるヒト spastin は、重篤な神経変性を来す遺伝性痙性対麻痺の病因因子として同定された。最近、ヒトおよびショウジョウバエの培養細胞を用いた実験により、spastin が微小管切断活性を示すことが報告されているが、spastin がどのように微小管と相互作用し、どのようなメカニズムで微小管を切断するかは明らかではない。本論文では、これらを理解するために、spastin の線虫ホモログである SPAS-1 の生化学的および細胞生物学的な解析を行った。

野生型および変異型 SPAS-1 のタンパク質を大腸菌で作製し、ATPase 活性の測定、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いたオリゴマー状態、プルダウン法と表面プラズモン共鳴法を用いた tubulin との相互作用等について解析した。また、野生型および変異型 SPAS-1 を哺乳類の培養細胞で発現し、tubulin の免疫染色を用いて微小管の状態を検討した。X 線構造解析モデルに基づき、各種の変異型 SPAS-1 を用いて、SPAS-1 の微小管切断機能に重要なアミノ酸残基を同定した。

その結果、培養細胞を用いた系により、SPAS-1 が微小管切断活性を有することを明らかにした。そして、SPAS-1 の ATPase 活性が tubulin あるいは微小管を添加することにより促進されること、SPAS-1 のアミノ末端領域 (microtubule binding domain: MTBD) で tubulin と直接相互作用することを見出した。また、ゲル濾過クロマトグラフィーにより、SPAS-1 の 6 量体形成は濃度依存的におこり、ATP を必要としないことを明らかにした。一方、変異体を用いた解析から、SPAS-1 の微小管切断活性には、リング状オリゴマーの pore に位置する保存された芳香族残基とその周辺および pore 内部に位置する複数の塩基性残基が重要であることを明らかにした。表面プラズモン共鳴法を用いて、SPAS-1 が酸性残基の豊富な tubulin カルボキシル末端ペプチドと特異的に相互作用することを見出した。

これらの解析に基づいて、SPAS-1 による微小管切断のメカニズムとして、(1) SPAS-1 は MTBD を介して微小管と結合し、ATP 非依存的に 6 量体を形成し、(2) リング状オリゴマーの pore 周辺に位置する塩基性残基によって tubulin カルボキシル末端を認識し、(3) SPAS-1 の ATP 依存的な構造変化により微小管から tubulin が外される。これらのステップを繰り返すことで、微小管脱会合がおこるモデルを提唱した。

審査において、①SPAS-1 による微小管切断活性の制御メカニズム、②2 量体の tubulin、重合した微小管に対する SPAS-1 の作用の違いの有無、③SPAS-1 の多量体形成に関する考察、④SPAS-1 の ATPase 変異体と pore 近傍変異体を用いた結果の考察、⑤ATPase 活性の測定方法、⑥spastin 異常による上位運動ニューロンの変性機構、⑦エネルギー依存性の微小管切断の生物学的な意義、⑧SPAS-1 と spastin の組織発現と細胞内局在、⑨遺伝性痙性対麻痺の治療的アプローチへの考察、などについて質問が出され、発表者からは適切な答えと討論がなされた。

本論文は、SPAS-1 による微小管切断のメカニズムを明らかにするものであり、ヒト spastin と SPAS-1 の相同性が高いことから、SPAS-1 で見出される機構が spastin の生理機能および遺伝性痙性対麻痺の発症機序の理解、さらには本疾患の治療法の開発に繋がる可能性があるとして高く評価する。

在学期間短縮審査結果報告書

学位申請者名 : 石躍 由佳

専攻分野 : 細胞複製学

学位論文題名 :

微小管切断活性をもつ AAA タンパク質 spastin の線虫ホモログの構造と機能
(Structure and function of the *Caenorhabditis elegans* homologue of spastin, a member of AAA proteins with microtubule-severing activity)

指導 : 小椋 光 教授

書類審査の結果 :

ⓐ

不可

学位論文審査の観点と評価 :

① 成果の意義	(5	・	4	・	3	・	2	・	1)
② 発表能力	(5	・	4	・	3	・	2	・	1)
③ 専門分野の知識と思考力	(5	・	4	・	3	・	2	・	1)
④ 研究における主体性	(5	・	4	・	3	・	2	・	1)
⑤ 論文執筆の主体性	(5	・	4	・	3	・	2	・	1)

※[5段階評価の分類] 5 : 非常に優れている 4 : 優れている 3 : 平均的である 2 : やや劣っている 1 : 非常に劣っている

判定結果 :

ⓐ

不可

平成21年11月12日

審査委員長 細胞医学担当教授

中尾光善

審査委員 分子病理学担当教授

山本哲郎

審査委員 神経分化学担当教授

田中芝明

審査委員 細胞情報薬理学担当教授

中西宏之