

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

分裂酵母の微小管結合タンパク質複合体 Alp7-Alp14 (TACC-TOG) の局在制御機構  
(Spatial control of the microtubule-associated protein complex  
Alp7-Alp14 (TACC-TOG) in fission yeast)

氏名 岡田 直幸

細胞は増殖するために遺伝情報の運び手である染色体ゲノムを複製し、それを 2 つの娘細胞へと分配する体細胞分裂を行う。染色体の分配の異常が起きると細胞は遺伝子発現のバランスを大きく崩し、細胞死につながるほか染色体ゲノムの異数性を引き起こし癌化の原因となりうる。このような事態を防ぐために、染色体分配はきわめて精確に完了される必要がある。真核生物の細胞分裂では、染色体分配の精確性を保証し、必須の役割を果たす分裂装置である紡錘体が形成される。

紡錘体を構成する細胞骨格である微小管は細胞周期に応じてその形態を大きく変化させる。微小管は間期には細胞質において網目上に構成され、細胞極性の確立および細胞内物質輸送に重要な役割を果たしている。細胞が間期から分裂期に移行するのに際して、細胞質に形成されていた間期微小管は消失し、分裂期の紡錘体微小管へと再編成される。この分裂期への移行にともなって起きる微小管再編成は紡錘体微小管の形成およびその維持に重要な過程であると考えられるが、その詳細な分子メカニズムは未だ明らかでない。

本研究では分裂酵母を用いて、微小管結合タンパク質複合体 Alp7-Alp14 (TACC-TOG) の局在制御機構に注目し解析を行うことで、分裂期に移行する際に微小管が再編成される分子メカニズムの解明を目指した。分裂酵母では分裂期において核膜崩壊が起こらないため、紡錘体は核内に形成される。Alp7-Alp14 は間期に細胞質微小管上に局在するが、分裂期には核蓄積して核内に形成された紡錘体微小管上に局在し、その安定化および双極性微小管の形成に寄与する。Alp7-Alp14 がどのように分裂期に特異的な核蓄積を達成するのか、またその生物学的意義は何であるのかについては未だ明らかではない。

そこで Alp14 の多数の部分欠失型変異体を作製して GFP を融合し、Alp7-Alp14 複合体の局在制御に不可欠なドメインを探索した。この結果、Alp14 の中央領域を欠失させた Alp14-Δ601-620-GFP が細胞周期を通じて恒常的に核蓄積した。さらに、この領域内の 615 番目のロイシンをアラニンに置換した変異体においても、Alp14-L615A-GFP および Alp7 がともに恒常的に核蓄積した。以上から、Alp7-Alp14 は Alp14 の核外輸送シグナル(NES)

により核外排出されることで核-細胞質間をシャトルするタンパク質複合体であることが判明した。

続いて Alp7-Alp14 複合体が、いかにして分裂期特異的な核蓄積を達成しているのか追究を行った。Alp14 のドメイン解析において分裂期核蓄積が顕著に低下する変異体を取得出来なかったため、Alp14 と複合体を形成する Alp7 に注目し、ドメイン解析を行った。この結果、Alp7-Δ61-116 変異型タンパク質の分裂期における核蓄積は顕著に低下した。この事実から考えて、Alp7 の N 末端に分裂期特異的な修飾が存在しており、これが Alp7-Alp14 複合体の分裂期における核蓄積をもたらすことが予想された。

既に我々の先行研究により、Alp7 の N 末端には核輸送シグナルである NLS が存在し、また Alp7 の分裂期の核蓄積が CDK の活性に依存することが示されている。そこで Alp7 の N 末端に CDK による直接的なリン酸化が存在することを想定し、*in vitro* において CDK によるリン酸化アッセイを行ったところ、Alp7 の N 末端にリン酸化が認められた。このリン酸化部位を特定するため、Alp7 を短鎖ペプチドに区切り固定化したペプチドアレイを用いて CDK によるリン酸化アッセイを行った。リン酸化が強く検出された領域からリン酸化の候補となるセリン・スレオニンを 4 残基抽出した。これら 4 残基に加えて、N 末端に存在する NLS 近傍の CDK リン酸化コンセンサス配列のスレオニン 1 残基の計 5 箇所をアラニンに置換した Alp7-5A(S50S51T100T116T131A)タンパク質を大腸菌から発現精製して、同様にリン酸化アッセイを行った。この結果、野生型 Alp7 で検出されたリン酸化は、5A タンパク質において顕著に低下していた。このことから抽出した Alp7N 末の 5 箇所が CDK によりリン酸化されることが示唆された。

続いて *in vivo* における上記 5 箇所のリン酸化の重要性を追究するために、非リン酸化型 *alp7-5A* 変異体およびリン酸化模倣型の *alp7-5E* 変異体を作製してその表現型の解析を行った。この結果、5A 変異体においては Alp7-5A-GFP の分裂期核蓄積が低下しており、36°C において顕著な温度感受性を示すことが判明した。一方でリン酸化模倣型である *alp7-5E* 変異体においては、分裂期のみならず間期においても 5E タンパク質が核蓄積している様子が観察された。5A 変異に加えてさらに SV40 の T 抗原由来の NLS を N 末端に付加した *NLS-alp7-5A* 変異体においては 5A 変異体でみられた温度感受性が抑圧された。

以上の結果から、Alp7 の N 末端の CDK によるリン酸化が Alp7-Alp14 複合体の分裂期における核蓄積を制御しており、5A 変異体が示した温度感受性は Alp7 タンパク質が分裂期に核蓄積しないことによる障害であると考えられる。

上記で得られた 5A 変異体での微小管の状態を調べるために、微小管マーカーである mCherry-Atb2 とともに 36°C における生細胞観察を行ったところ、分裂初期に単極性の紡錘体に代表される紡錘体微小管の形成異常が認められた。また野生型においては分裂開始

時に消失しているはずの細胞質微小管が、5A 変異体では消失せずに存在していた。これらの観察結果から、Alp7 の核蓄積が分裂初期に紡錘体微小管への局在を促し、微小管形成を保証していることが明らかとなった。

CDK によるリン酸化が Alp7 の分裂期における核蓄積を促進する分子メカニズムを探るため、分裂酵母の核輸送担体である Cut15/Importin- $\alpha$  に注目した。出芽酵母ツーハイブリッドアッセイを用いて野生型 Alp7 および Alp7-5A,5E タンパク質の N 末端(1-209)と Cut15 の NLS 相互作用ドメイン(80-522)の相互作用の検出を試みたところ、野生型 Alp7,5A,5E タンパク質のいずれも Cut15 と相互作用することが明らかになった。このことから Alp7 の NLS を Cut15/Importin- $\alpha$  が認識して核輸送していることが判明した。また Alp7-5A タンパク質でも Cut15 との相互作用が検出されたことから、CDK のリン酸化は Alp7 の NLS 活性を完全にオン・オフで切り替えているわけではなく、分裂期特異的にその活性を高めている可能性が示唆された。

Alp7 は分裂期には核蓄積して紡錘体微小管上に局在するが、紡錘体微小管の形成の起点である SPB(分裂酵母の中心体に相当する器官)にも強く局在することが示されている。紡錘体微小管の形成の制御には Alp7 の核蓄積に加えて、分裂期の SPB への局在も重要な働きがあると考えられた。

そこで分裂期の SPB に Alp7 が局在するシステムを調べるため、Alp7 のドメイン解析を行ったところ、Alp7 の中央領域(210-360)が分裂期 SPB への局在に必須であることが判明した。この SPB 局在ドメイン(210-360)内のアミノ酸置換を行い 337 番目のイソロイシンをアラニンに置換したところ、Alp7-I337A-GFP の分裂期 SPB への局在が顕著に低下した。この変異体は紡錘体微小管の形状に異常が観察され、微小管の重合阻害剤である TBZ に対し若干の感受性を示した。

続いて Alp7 タンパク質の分裂期 SPB への局在の足場を探索するため、ヒト pericentrin のホモログである SPB タンパク質 Pcp1 に注目した。高温条件で Pcp1 が SPB に局在できなくなる *pcp1-128* 変異体を用いて、36°Cにおける Alp7 の SPB 局在を観察したところ、Pcp1 のシグナルが消えている細胞においては Alp7 の SPB 局在が失われている様子が観察された。そこで Alp7 の SPB 局在ドメインと Pcp1 の相互作用を出芽酵母を用いたツーハイブリッドアッセイにより解析したところ、SPB 局在ドメインと Pcp1-C 末(901-1208)の間に相互作用が検出された。この結果から、Alp7 タンパク質は Pcp1 を足場として分裂期 SPB に局在することが明らかとなった。

以上の解析から、Alp7-Alp14 複合体は Alp7-NLS 近傍の CDK のリン酸化を受けて核輸送が加速され、分裂期核蓄積を達成していることが判明した。核蓄積した複合体は Pcp1 を

足場に分裂期 SPB に局在し、紡錘体微小管の精確な形成に寄与している。

Alp7-Alp14 複合体の分裂期核蓄積は、細胞が間期から分裂期に移行する際に起きる微小管形成の時空間的な切り替えを促進する意義があると考えられ、本研究により細胞周期の進行と微小管形成の時空間的制御を結びつける新たな知見が得られた。今後は輸送担体 Cut15 と Alp7 の相互作用が、CDK によるリン酸化で分裂期に強くなっているのか、免疫沈降実験や *in vitro* の結合アッセイなどで確かめる必要がある。また Pcp1 タンパク質と Alp7 タンパク質の相互作用が分裂期特異的に制御されるかを追究していくことで、時期特異的な微小管再編成機構の全貌を明らかにすることが重要な課題である。

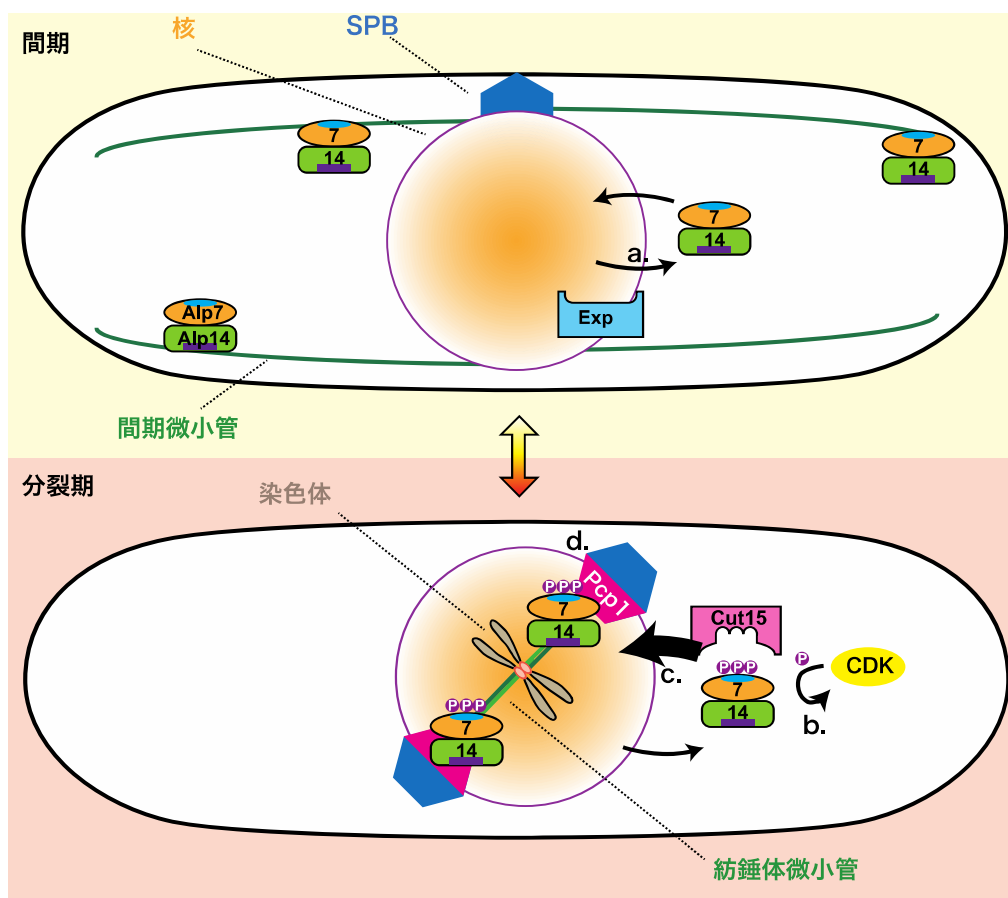


図 1 Alp7-Alp14 複合体は CDK のリン酸化により分裂期に核蓄積し、SPB タンパク質 Pcp1 と結合して紡錘体微小管の形成を促進する

- a. 微小管結合タンパク質複合体 Alp7-Alp14 は間期には核外排出が優勢で、細胞質微小管に局在して微小管を安定化している
- b. 分裂期に入ると Alp7-N 末の CDK によるリン酸化が起きる。c. リン酸化により Alp7-Alp14 複合体の核輸送が加速されて核蓄積する。d. 核蓄積した Alp7-Alp14 は Pcp1 との相互作用を介して SPB に局在して紡錘体微小管の形成を促進する。