

## 論文審査の結果の要旨

氏名 岡田直幸

本論文は要旨（和文および英文）、序論、材料と方法、結果（1章1～3節、2章1～11節、3章1～3節）、考察と今後の展望、まとめ、謝辞および参考文献から構成される。

「序論」では体細胞分裂期の微小管再編成の様式、および Ran-GTP に依存したスピンドル微小管の形成システムについて概要が述べられ、Ran-GTP の標的因子である微小管結合タンパク質についてこれまでの知見が述べられている。また本論文の目的が Ran-GTP の標的因子である微小管結合タンパク質複合体 Alp7-Alp14 の局在制御機構の解明であることが述べられている。

「材料と方法」では、本研究で使用された大腸菌株、分裂酵母株および出芽酵母株の遺伝子型と実験方法の詳細について記載されている。

「結果」は大きく3章から構成されている。

第1章では Alp14 の部分欠失型変異体の解析により、Alp14 と Alp7 の結合領域および核外輸送シグナル(NES)配列を特定しており、NES 活性を失った点突然変異体である *alp14-L615A* 変異体を見出している。また Alp7-Alp14 複合体の核外排出が Alp14 の NES に依存することを示している。

第2章では Alp7-Alp14 複合体の分裂期特異的な核蓄積が CDK による Alp7 のリン酸化に依存することを示している。第1節では Alp7 の部分欠失型変異体を解析し、Alp7 の N 末端に分裂期核蓄積を制御する部位の存在を示唆している。続く第2節、第3節では、Alp7 の分裂期核蓄積が CDK による直接的なリン酸化で制御されると予想し、試験管内で CDK による Alp7 のリン酸化アッセイを行い、リン酸化を受ける5箇所のセリン・スレオニン候補残基を特定している。第4節では、この5箇所のリン酸化が生体内でも起きていることを示している。続く第5～7節においては、この5箇所をアラニンに置換した *alp7-5A* 変異体を作製してその表現型を追究しており、*alp7-5A* 変異体では 5A タンパク質の分裂期核蓄積が起こらず、スピンドル微小管の形成初期に異常が観察されることを示している。第8節では、CDK による Alp7 のリン酸化が核蓄積に影響を与えるメカニズムを解明するため、核輸送担体である Cut15/importin- $\alpha$  と Alp7 お

よび Alp7-5A との相互作用を出芽酵母ツーハイブリッド法により検出している。その結果、Alp7 と Cut15 の相互作用が検出され、これが Alp7-5A と Cut15 との相互作用に比較して強いことを示している。以上から、CDK による Alp7 の 5 箇所分裂期特異的なリン酸化が、Cut15 との相互作用を強めて核輸送活性を上げ、Alp7-Alp14 複合体の核蓄積を達成するというモデルを提唱している。第 9 節では 5 箇所のリン酸化部位の中で特に重要と思われる 116 番目のスレオニンを特定している。第 10 節、第 11 節では、他の分裂期キナーゼによるリン酸化制御が Alp7-Alp14 複合体の分裂期核蓄積に影響を与えるかについて点変異体を作製して解析し、この可能性を否定している。

第 3 章では、Alp7 の中央領域について部分欠失型変異体の解析を行い、この領域が分裂期の SPB(分裂酵母の中心体に相当する)への局在に必須であることを示している。特に 337 番目のイソロイシンが SPB への局在に必須の役割を果たすことを示し、Alp7 の SPB での足場タンパク質の候補として Pcp1 との相互作用を出芽酵母ツーハイブリッド法で示している。

「考察と今後の展望」では Alp14 のドメインの機能について、Alp14 で発見された NES 配列について、CDK による Alp7 のリン酸化の意義について、CDK によるリン酸化で局在が制御される微小管結合タンパク質について、また、Alp7 の局在制御と微小管の時空間的制御の関係性について論じられている。

「まとめ」では本研究で明らかにされた Alp7-Alp14 複合体の局在制御メカニズムについてあらためてモデルを提示し、細胞周期進行の研究における本研究の意義について議論している。

本論文は、スピンドル微小管形成に重要な Alp7-Alp14 複合体の局在制御が、CDK による Alp7 の直接的なリン酸化でコントロールされていることを明らかにした。また、CDK による細胞周期進行と微小管形成の時空間的制御がどのように結びついているのか、その一端を明らかにした点でも重要な結果であると言える。

なお、本論文は登田隆、山本正幸、佐藤政充との共同研究であるが、本論文で示されたデータは全て論文提出者が主体となって研究の分析および検証を行っており、論文提出者の寄与が十分であると判断する。したがって、審査委員会は全員一致で上記の者に博士(理学)の学位を授与できると認める。