

学位論文（要約）

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)

平成 25 年 12 月博士（理学）申請

東京大学大学院 理学系研究科
生物化学専攻

岡田 直幸

Abstract

微小管は、細胞周期に応じてその構造を大きく変化させる。真核細胞では間期から分裂期に移行する際に、細胞質に形成されていた間期微小管が消失し、分裂期スピンドル微小管へと再編成される。

本研究では、分裂酵母の微小管結合タンパク質である Alp7-Alp14 (TACC-TOG) 複合体の局在制御の機構を解析することで、微小管再編成の分子メカニズムの解明を目指した。Alp7-Alp14 は、間期には細胞質微小管に局在するが、分裂期には核蓄積して核内に形成されたスピンドル微小管、SPB(酵母の中心体に相当する構造)に局在し、双極性微小管の形成に寄与する。しかしながら Alp7-Alp14 がどのように分裂期に核蓄積して SPB へ局在するのか、その局在制御機構は未だ明らかではない。

そこで本研究では Alp7 および Alp14 の多数の部分欠失型変異体、あるいは点突然変異体を作製して、Alp7-Alp14 複合体の局在制御に不可欠なドメインを探索した。その結果、Alp14 に核外輸送シグナル配列(NES)が存在することが判明した。また Alp7-Alp14 は間期において、Alp14 の NES により複合体として核外排出されていることが判明した。さらに Alp7 の NLS 近傍のセリン・スレオニン残基の点変異が、Alp7-Alp14 の分裂期における核蓄積の低下をもたらすことを発見した。これらの変異箇所は *in vitro* において CDK によるリン酸化修飾を受けることが確認され、*in vivo* においてもリン酸化を受けることが明らかとなった。リン酸化を模倣した変異型 Alp7 は分裂期のみならず間期においても核蓄積した。以上の解析に基づき、Alp7-Alp14 は細胞周期を通じて核・細胞質間をシャトルするが、Alp7 の CDK によるリン酸化で核輸送が加速されて分裂期における核蓄積を達成すると考えられる。

また、部分欠失型を用いたドメイン解析により Alp7 が分裂期 SPB に局在するため必要とされる領域を特定した。出芽酵母ツーハイブリッド法により、この領域は SPB タンパク質である Pcp1 と相互作用することが明らかになった。

本研究により、分裂期の微小管結合タンパク質 Alp7-Alp14 の局在制御のシステムが明らかになり、細胞周期と微小管再編成がどのように結びついているのか、その一端が明らかになった。

Abstract

Microtubules change their formation and location drastically during the cell cycle. In eukaryotes, the cytoplasmic array of microtubules is formed during interphase, and then reorganized into spindle microtubules at mitotic onset.

In fission yeast, Alp7/TACC (transforming acidic coiled-coil protein)-Alp14/TOG (tumor overexpressed gene) is a conserved MAP (microtubule-associated protein) complex, which undergoes nucleocytoplasmic shuttling throughout the cell cycle. Upon the mitotic entry, Alp7-Alp14 accumulates in the nucleus and then localizes to the spindle microtubule and SPB (Spindle pole body), while Alp7-Alp14 localizes to cytoplasmic microtubule during interphase. Although the Alp7-Alp14 complex is crucial for the spindle integrity, it remains largely unknown how this complex achieves its nuclear accumulation and SPB localization during mitosis.

To investigate how the localization of Alp7-Alp14 is determined, we analyzed a series of truncation and point mutants of Alp7 and Alp14. As a result, we found out the NES (Nuclear Export Sequence) in Alp14. This NES is also critical for the nuclear export of Alp7. Thus, Alp7 and Alp14 are exported from the nucleus as a complex, dependent on the NES of Alp14. We also found that Alp7 is phosphorylated by the cyclin-dependent kinase (CDK) in vitro, and phosphorylation sites were biochemically identified. The phospho-resistant Alp7 mutant protein failed to accumulate in the nucleus during mitosis, whereas the phospho-mimetic version accumulated in the nucleus even in interphase. These results suggest that the CDK-phosphorylation of the Alp7 play a key role for its nuclear accumulation during mitosis.

We also limited the region critical for Alp7 interaction to SPB. It found that this region interact with SPB component, Pcp1, using by yeast two-hybrid assay.

Therefore, our results clarified the mechanisms of mitotic nuclear accumulation of the Alp7-Alp14 complex, and its contribution to the spatiotemporal regulation of the microtubule organization during the cell cycle.

目次

略語表	1
序論	2
材料と方法	11
結果	
第 1 章 Alp14 のドメイン解析および NES の決定	32
1.1 Alp14- Δ mid-GFP は間期細胞でも核蓄積する	
1.2 Alp14 の L615 は核外輸送に必須の機能を有する	
1.3 インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため本項については非公開	
第 2 章 Alp7-Alp14 複合体の分裂期特異的な核蓄積システムの探索	43
2.1 Alp7 の N 末端領域が分裂期核蓄積に重要である	
2.2 CDK および Plo1 は <i>in vitro</i> で Alp7 をリン酸化する	
2.3 ペプチドアレイによる Alp7 のリン酸化サイトの決定	
2.4 Alp7 は <i>in vivo</i> においてもリン酸化される	
2.5 <i>alp7-5A</i> , <i>alp7-5E</i> 変異体の表現型の解析	
2.6 <i>alp7-5A</i> 変異体は制限温度で分裂初期に単極性微小管が観察される	
2.7 レプトマイシン B による NLS 活性の評価	
2.8 出芽酵母ツーハイブリッドアッセイによる Alp7 と Cut15/importin- α の相互作用の検定	
2.9 Alp7-T116 が NLS 活性調節に中心的役割を果たす	
2.10 インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため本項については非公開	
2.11 <i>alp14-3A, 3D, 7A, 7D</i> (CDK コンセンサス変異体)変異体は体細胞分裂期において野生型と同様の表現型を示す	
第 3 章 Alp7 の SPB 局在化の解析	69

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られて居ないため、本章については非公開

考察と今後の展望・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・76

まとめ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・86

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・89

文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・90

<略語表>

CFP: cyan fluorescent protein

CDK: cyclin-dependent kinase, サイクリン依存性キナーゼ

GEF: guanine nucleotide exchanging factor

GFP: green fluorescent protein

GST: glutathione S-transferase

LMB: leptomycin B, レプトマイシン B

MAP: microtubule-associated protein

NES: nuclear export signal, 核外輸送シグナル

NLS: nuclear localization signal, 核局在シグナル

TACC: transforming acidic coiled-coil

TBZ: thiabendazole, チアベンダゾール

TOG: tumor overexpressed gene

SAF: spindle assembly factors

SPB: spindle pole body, スピンドル極体

<序論>

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、細胞は染色体ゲノムの異数性が引き起こされ、遺伝子発現のバランスを大きく崩して細胞死や癌化につながる。このような事態を防ぐために、細胞が分裂に際して行う染色体分配の過程はきわめて正確に完了される必要がある。

細胞は増殖期において、ゲノム DNA の複製・分裂準備を行う間期と、実際に染色体分配および細胞分裂を行う分裂期を繰り返している。真核生物においては、分裂期に染色体を分配する装置として、複製された中心体を極とした紡錘体が形成される。紡錘体の主たる構成要素である微小管は GTPase である α -チューブリンと β -チューブリンのヘテロ 2 量体が直線状に重合してできる高分子ポリマーであり、その末端は重合および脱重合を繰り返しダイナミックにその構造を変化させる(Kirschner and Mitchison, 1986)。

分裂期に形成されるスピンドル微小管(紡錘体微小管)は、2 つの中心体を 2 極として再配置し、その伸長端であるプラス端を染色体の動原体に接着して双極性の紡錘体を形成する。その後、分裂後期への進行とともにスピンドル微小管は脱重合されて、複製された染色体は両極へと分配される。以上のように分裂期に形成されるスピンドル微小管は染色体分配を正確に完了させるための役割をになう分裂装置である(Karsenti and Vernos, 2001) (図 1)。

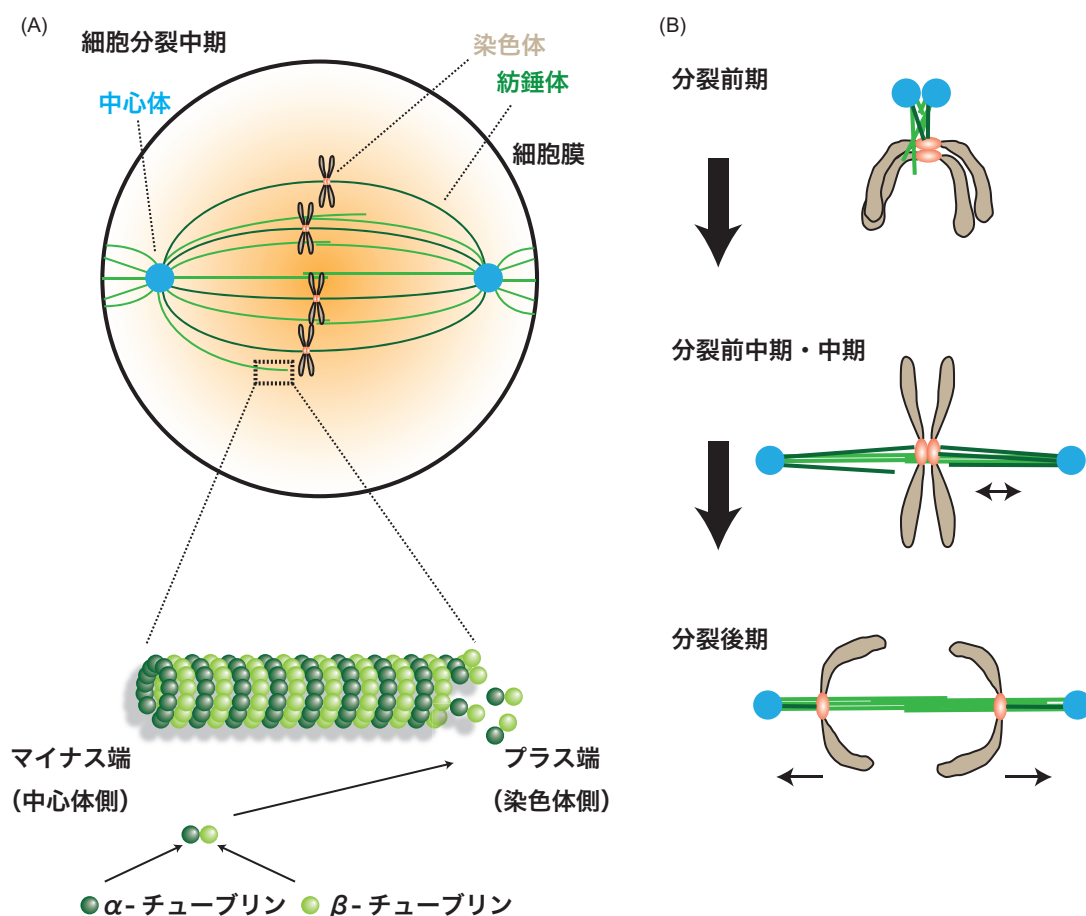


図1 細胞分裂の際に形成される紡錘体はダイナミックに変化する微小管で構成されている

(A) 分裂期の紡錘体は2つの中心体から形成されたスピンドル微小管によって構成されている。スピンドル微小管は α -チューブリン、 β -チューブリンのヘテロ2量体が重合して構成され、マイナス端は中心体と結合し、プラス端は染色体上の動原体へと伸長する。(B) 分裂期染色体分配と微小管の変化の様子。分裂前期に中心体から形成された微小管は中心体を2極として再配置し、分裂中期に染色体を赤道面に整列させる。分裂後期になると動原体と着着した微小管は脱重合され、染色体を2極へと分配する。

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の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、分裂期スピンドル微小管へと再編成される(Hagan and Hyams, 1988; Hayles and Nurse, 2001)(図2A)。この分裂期移行にともなって起きる微小管の再編成はスピンドル微小管の形成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。

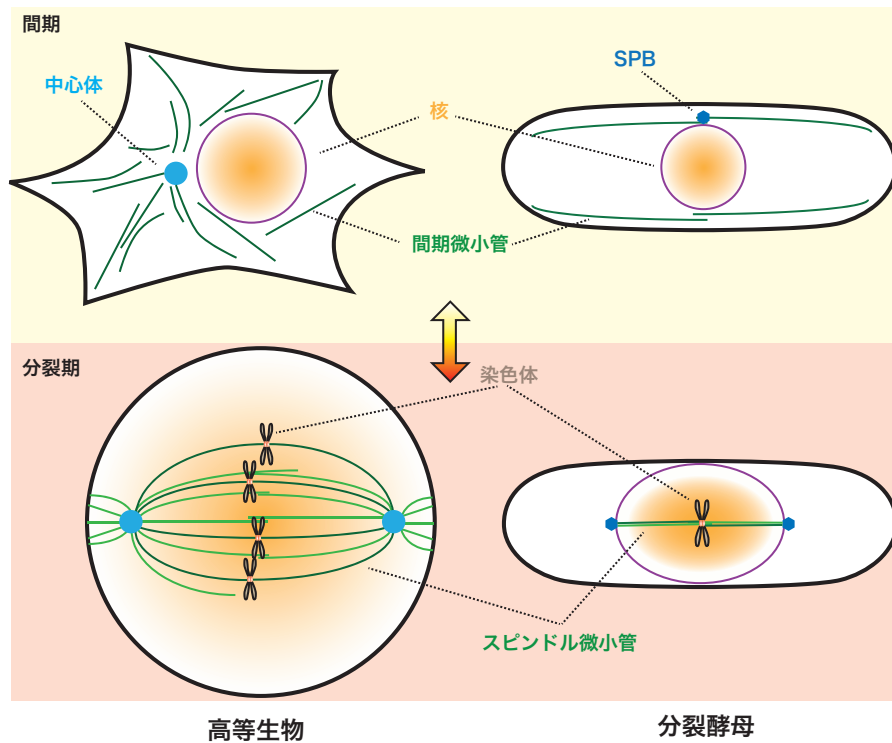
本研究では分裂酵母の微小管結合タンパク質複合体の局在制御機構に着目して、細胞が間期から分裂期に移行する際に微小管が再編成される機構の解明を目指した。

本研究で用いた分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は世代時間が短く、1 倍体で体細胞分裂を繰り返すため、遺伝学的解析に優れている。また、ヒトに代表される真核生物の細胞分裂の様式がよく保存されていながら、1 倍体の染色体数が 3 本と少ないため染色体分配が極めて単純化されている点や、分裂期が極めて短時間で完了する点などは、染色体分配を可視化してそのシステムを理解するために適している。

微小管結合タンパク質 (Microtubule-Associated Proteins, MAPs) は微小管に結合してその重合・脱重合のバランスを調整し、微小管の再編成に密接に関わっている。例えば高等生物においては、スピンドル微小管の形成に重要な役割を果たす微小管結合タンパク質として、TPX2, NuMA, HURP のような SAF (Spindle Assembly Factor) と呼ばれる一群のタンパク質がある (Gruss et al., 2001; Kufer, 2002; Koffa et al., 2006; Silljé et al., 2006)。これらのタンパク質は細胞の核輸送をつかさどる Ran GTPase の標的タンパク質として知られている。Ran は核内においては GTP 結合型 (Ran-GTP) として、細胞質においては GDP 結合型 (Ran-GDP) として存在しており、Ran-GTP は核輸送担体であるインポーチンと結合してその積荷タンパク質の解離を促進する (Clarke and Zhang, 2001; Dasso, 2001)。高等生物においては分裂期に入ると核膜が崩壊して、染色体近傍に存在する RanGEF (guanine nucleotide exchange factor) 依存的な Ran-GTP の濃度勾配が形成される (Bischoff and Ponstingl, 1991; Matsumoto and Beach, 1991; Carazo-Salas et al., 1999; Ohba, 1999; Wilde, 1999; Carazo-Salas et al., 2001)。すなわち分裂期の染色体近傍では RanGEF

によって、Ran-GTP が高濃度で存在し、染色体から離れるに従い、Ran-GTP の濃度は低下して Ran-GDP の濃度が高くなる。Ran-GTP は先述した標的タンパク質である SAF の解離を促すため、SAF は染色体近傍に豊富に存在する。このように染色体近傍に局在した SAF の働きにより、スピンドル微小管の形成が保証されている(Gruss and Vernos, 2004) (図 2B)。

(A)



(B)

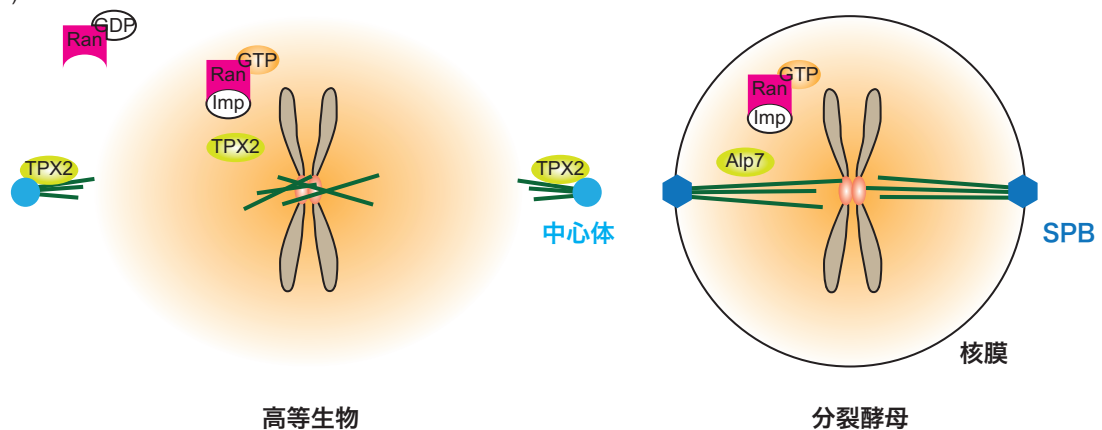


図2 微小管は間期と分裂期でその形態を大きく変化させる

(A) 高等生物と分裂酵母における、間期および分裂期の微小管構造のモデル。いずれも間期は細胞質に微小管が形成されているが、分裂期にはスピンドル微小管へと再編成される。(B) 分裂期のスピンドル微小管形成と、それに関わる SAF の Ran-GTP による局在制御のモデル。高等生物では核膜崩壊のあと染色体近傍が、分裂酵母では核内が Ran-GTP の濃度の高い領域 (橙色) となっている。

分裂酵母においても間期には円筒状に並んだ細胞質微小管が形成されており、分裂期への移行とともに間期微小管は消失して分裂期スピンドル微小管へと再編成される。分裂酵母は分裂期に核膜が崩壊しない“closed mitosis”を行う生物種であるため、分裂期においても Ran-GTP は核内に留まり、Ran-GDP は核外に豊富に存在する (図 2A)。すなわち分裂酵母においては、間期と同様に分裂期においても Ran 依存的な核輸送が保たれている。この一方で、スピンドル微小管は核内に形成されるため(Hagan, 1998)、この形成過程に関わる微小管結合タンパク質は分裂期に核輸送される必要がある。これは、Ran 依存的なスピンドル微小管の形成システムは、分裂酵母に代表される“closed mitosis”を行う生物種と、核膜崩壊をとともなう“open mitosis”を行う高等生物の間で進化していることを示す。

分裂酵母において、上述した SAF がいかにして核膜という空間的隔絶を乗り越えて、時期特異的なスピンドル微小管の形成に寄与するのかは未だ知見がない。Ran に依存したスピンドル形成の原始的な形を持つ分裂酵母でこの点を解明することは、真核細胞において細胞周期と微小管構造の制御がどのように結びつけられているのか解明するための手がかりとなる。

近年、分裂酵母における重要なスピンドル微小管の制御因子として微小管結合タンパク質 Alp7/TACC (transforming acidic coiled-coil) が見つかった (Oliferenko and Balasubramanian, 2002; Sato et al., 2004; Sato and Toda, 2007)。Alp7 は間期において細胞質微小管に局在するが、分裂期には核内に蓄積して、SPB (スピンドル極体、酵母の中心体に相当する器官) およびスピンドル微小管上に局在してスピンドル微小管の形成に重要な役割を果たす。

また Alp7 は分裂酵母における Ran の標的因子であることも解明されており、分裂酵母の Pim1/RanGEF の点突然変異によるスピンドル微小管の形成不全を、Alp7 の強制核局在により部分的に抑圧できることが判明している (Sato and

Toda, 2007)。一方で、Alp7 の NLS (核移行シグナル) に点突然変異を導入して、その核移行能を完全に失わせた *alp7-RARA* 変異体では分裂初期に単極性スピンドル微小管に代表される微小管の形成異常が観察される (図 3A)。

このように、Alp7 は分裂期の核におけるスピンドル微小管形成に極めて重要な機能を担い、分裂酵母における Ran の標的、すなわち SAF として振る舞う。

また Alp7 はスピンドル微小管の形成に寄与するために、Alp14/TOG (tumor overexpressed gene) との相互作用が重要であることが知られている (Sato et al., 2004)。Alp7 の属する TACC ファミリータンパク質は C 末端に保存された TACC ドメインを有し、TACC ドメインの一部を介して TOG タンパク質と相互作用して機能する。例えばヒトにおいては TACC-1, TACC-2, TACC-3 と ch-TOG が、アフリカツメガエルでは Maskin と XMAP215 が、ショウジョウバエでは D-TACC と Msps、線虫では TAC-1 と ZYG-9 がそれぞれ相互作用してスピンドル微小管の形成維持に働いている (Lee et al., 2001; Bellanger and Gönczy, 2003; Le Bot et al., 2003; Peset et al., 2005)。TOG タンパク質は HEAT リピートで構成された TOG ドメインを持ち、チューブリン分子を直接結合して、微小管の伸長端であるプラス端において微小管のダイナミクスを調整するのに働くと考えられている (Al-Bassam et al., 2007; Brouhard et al., 2008)。(図 3B)

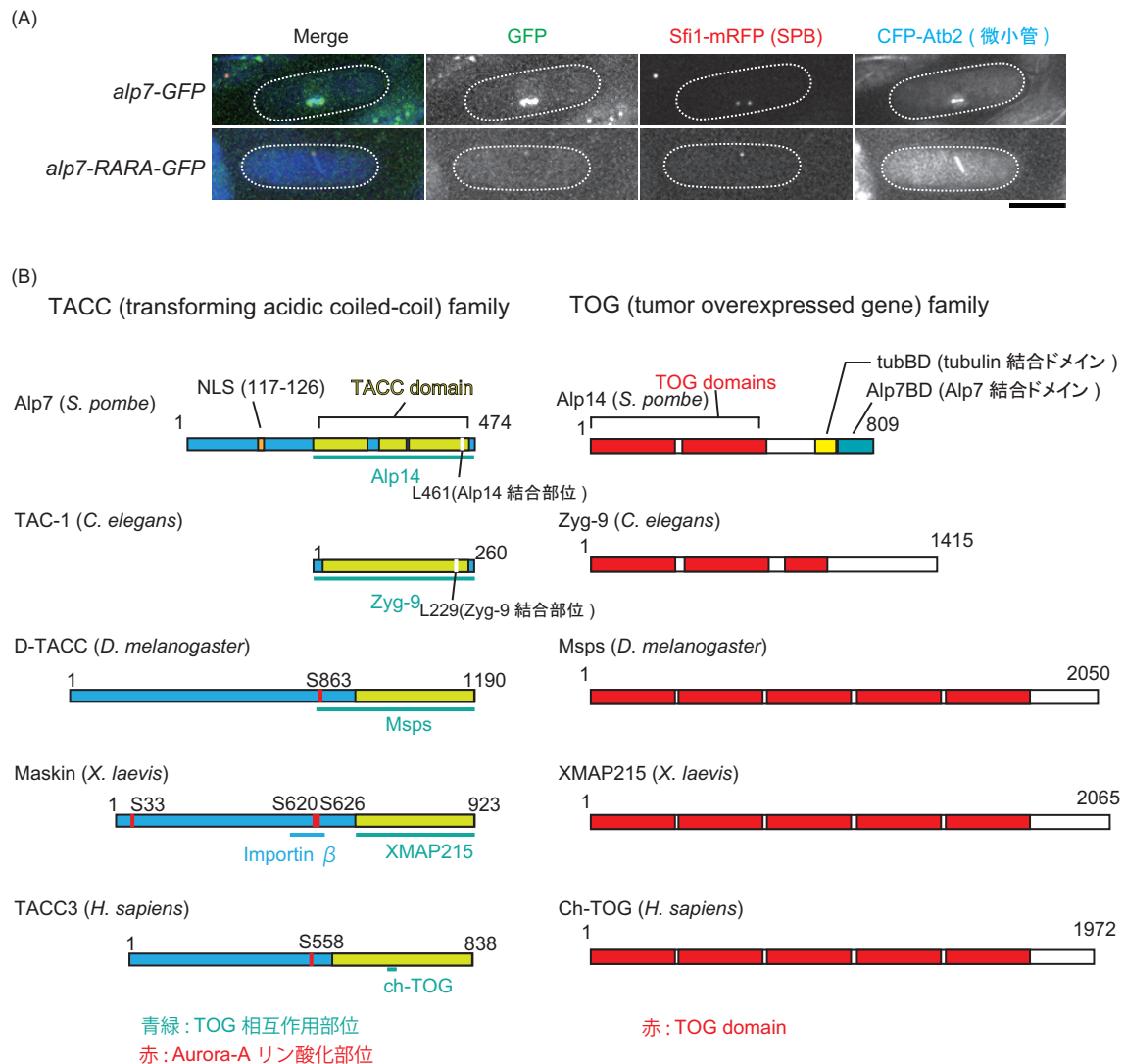


図 3 TACC タンパク質および TOG タンパク質は高等生物まで保存されている。

A) NLS の不活性化型変異体である Alp7-RARA-GFP は分裂期のスピンドル微小管上に局在しない。

スケールバー: 5 μ m (B) 各生物種における TACC タンパク質 (左) および TOG タンパク質 (右) の模式図。

分裂酵母の Alp7/TACC も Alp14/TOG と相互作用して Alp7-Alp14 複合体を形成し微小管上に共局在する (Sato et al., 2004)。先述したように、Alp7 は間期と分裂期で細胞質と核を行き来するシャトルタンパク質であり、NLS を有することが明らかであるが、輸送制御に関わるその他のドメインは未だ明らかではない。同様に Alp14 についても、いかにして輸送が制御されているのかは解析

されていない。分裂酵母の SAF である Alp7-Alp14 複合体の輸送制御のメカニズムを明らかにすることは、間期と分裂期における微小管再編成機構の分子メカニズムの解明につながる。

そこで本研究では Alp7 および Alp14 の部分欠失型変異体を多数作製して、その輸送のために重要なドメインの探索を行うこととした。

第 1 章では Alp14 のドメイン解析により、Alp14 に核外輸送シグナル (NES) が存在することを見出し、Alp7-Alp14 複合体の核外排出がどのように起きているのか明らかにした。

第 2 章では Alp7-Alp14 複合体の分裂期における核蓄積過程がいかにして制御されているのか解析を行い、Alp7 の N 末端の CDK によるリン酸化が生理的に重要な意義を持つことを見出した。

第 3 章では Alp7 が SPB にどのように局在するのかについて解析を行い、Alp7 が SPB に局在するために必須のアミノ酸残基を特定した。

本論文では以上 3 章の解析を通じて、分裂酵母の Alp7-Alp14 複合体について明らかになったこと、および間期から分裂期に移行する際の微小管再編成機構について議論を行う。

<材料と方法>

1. 菌株

(1) 大腸菌株

XL1-Blue: *endA1*, *gyrA96*, *hsdR17(rk-mk+)*, *lac*, *recA1*, *relA1*, *supE44*, *thi-1*,
F'[proAB, lacIqZ::M15, Tn10(tetr)]

BL21c: F⁻, dcm, ompT, hsdS (rB-mB⁻), gal, λ (DE3)

(2) 分裂酵母・出芽酵母株

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られて居ないため、本項については非公開

2. 培地

(1) 大腸菌培養

大腸菌の培養は LB 培地、TY 培地または 2×YT 培地で行った。これらの培地に対し、必要な際には適宜、終濃度 40 mg/ml ampicillin または 10mg/ml kanamycin を添加して用いた。寒天培地（プレート）として使用する際には、1 L 当たり 20 g の寒天を添加した。下にそれぞれの培地の組成を示す。

<LB: 1 % Bacto Tryptone, 0.5 % Yeast extract, 1 % NaCl, pH 7.6>

<TY : 1 % Polypepton, 0.5 % Yeast extract, 0.5 % NaCl, pH 7.0>

<2×YT : 1.6% Bacto Tryptone, 1% Yeast extract, 0.5% NaCl, 2% Glucose, pH~7.6>

(2) 酵母培養

分裂酵母の培養には、完全栄養培地としてYEを、最少合成培地としてSDまたはEMMを用いた。分裂酵母の接合および胞子形成を誘導する際にはSSAあるいはSPA培地を用いた。SSA培地は窒素源が少量含まれており、細胞が増殖してコロニーを形成した後に接合および胞子形成を行う。一方で、SPA培地は窒素源を全く含まず、細胞は直ちに接合および胞子形成を行う。各培地の1L当たりの組成を以下に示す。プレートを作製する際には、それぞれに20gの寒天を添加した。

・YE（完全培地）：

kan^r, *hph^r*, *nat^r*, *bsd^r* 遺伝子挿入株の選択時には、YEプレートにG418 (Geneticin, 終濃度0.1 mg/ml)、Hygromycin B (終濃度 0.1 mg/ml)、ClonNat (終濃度0.1 mg/ml)、Blasticidin S (終濃度 0.03 mg/ml)を、それぞれ添加して用いた(Sato et al., 2005)。

ウラシル要求性株の選択時にはYEプレートに5-FOA（5-フルオロオロチン酸、

終濃度1mg/ml) を添加して用いた。

<Yeast extract 0.5 %, glucose 3 %, adenine 0.005 %>

・ Low Ade :

アデニン要求性を持つ *ade6* 変異株を使用する際、その遺伝型を確認する為に用いた。YE 培地のアデニンを通常の 1/10 量 (0.0005%)加えた培地である。このプレート上では、アデニン非要求性の株は白く、アデニン要求性変異である *ade6-M210* 変異株は赤く、*ade6-M216* 変異株はピンク色のコロニーを形成する。

・ SD (合成選択培地) :

アミノ酸類を含まず、栄養要求性の確認および形質転換体の選択をする際に使用した。栄養要求性株の培養の際には、必要な栄養素 (*1参照)を添加して用いた。

<Yeast nitrogen base w/o a.a. 0.67 %, glucose 1 %>

・ EMM+N (最少選択培地) :

Edinburgh minimal mediumの略称で、主に蛍光顕微鏡下で生細胞観察を行う際に用いた。この培地はチアミンを含有しないため、*nmt*プロモーターの抑制が解除され、下流に導入した遺伝子の転写が増大する。栄養要求性株の培養の際には、必要な栄養素 (*1)を添加して用いた。

<フタル酸カリウム 14.7 mM, Na₂HPO₄ 15.5 mM, NH₄Cl 93.5 mM, glucose 2%, 50×Salt stock (*2), 10,000×Mineral stock (*3), 1,000×Vitamin stock

(*4)>

・ SSA (合成孢子形成培地) :

<20×SSA (*5), glucose 1 %, 1M CaCl₂ 0.68 mM, 1N NaOH (pH ~5.9),
KH₂PO₄ 0.1 M, (NH₄)₂SO₄ 1 %, KOH 0.075 M, MgSO₄ · 7H₂O 0.8 mM,
FeCl₃ · 6H₂O 1.85 μM, 1,000×Vitamine stock (*4)>

・ SPA (孢子形成培地) :

<glucose 1 %, KH₂PO₄ 0.1 %, 1,000×Vitamine stock (*4), agar 3 %>

*1 培地に添加した栄養素

<adenine 50μg/ml, uracil 50μg/ml, L-leucine 50μg/ml, lysine 50μg/ml,
arginine 50μg/ml, histidine 50μg/ml>

*2 50×Salt stock :

<MgCl₂ · 6H₂O 260 mM, CaCl₂ · 2H₂O 5.00 mM, KCl 670 mM, Na₂SO₄ 14.1
mM>

*3 10,000×Mineral stock :

<H₃BO₃ 80.9 mM, MnSO₄ · 4H₂O 23.7 mM, ZnSO₄ · 7H₂O 13.9 mM,
FeCl₃ · 6H₂O 7.40 mM, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O 2.47 mM, KI 6.02 mM,
CuSO₄ · 5H₂O 1.60 mM, クエン酸 47.6 mM>

*4 1,000×Vitamin stock :

<パントテン酸 4.20 mM, ニコチン酸 81.2 mM, ミオ-イノシトール 55.5 mM,

ビオチン40.8 μ M>

*5 20×SSA :

<L-アスパラギン酸 75.1 mM, KH_2PO_4 294 mM, Na_2HPO_4 28.2 mM,
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 40.6 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 303 mM, 1,000×Vitamin stock (*4),
trace elements (*6)>

*6 trace elements :

< H_3BO_3 80.9 mM, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.60 mM, KI 6.02 mM, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 7.40 mM,
 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 23.7 mM, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 2.47 mM, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 13.9 mM>

(3) 出芽酵母培養

出芽酵母の培養には、完全栄養培地として YPD 、最少合成培地として SD を用いた。SD 培地には、出芽酵母の増殖を補助するための混合アミノ酸 (drop out)が添加されている。プレートとして使用する際には 1L 当たり 20 g の寒天を添加した。

<YPD: 1% Yeast extract, 2% polypeptone, 2% glucose>

3. 大腸菌プラスミドと組換え DNA 操作

DNA の制限酵素による切断、結合、平滑末端化、アガロースゲルによる電気泳動、大腸菌への形質転換などの操作は、標準的なプロトコールに従って行った(Sambrook et al., 1989)。プラスミドベクターとして pUC119 (Stratagene)、pGEX-KG (Stratagene)または TOPO TA ベクター (invitrogen)を使用し、宿主として XL1-Blue または BL21c の大腸菌株を用いた。大腸菌への DNA の形質

転換は 18°C 法(Inoue et al., 1990)により行った。

4. 部位特異的変異導入

クローニングした遺伝子に対して、部位特異的に変異を導入する際には、PrimeSTAR Mutagenesis basal kit (TaKaRa)を用いた PCR を行った。変異を導入したプライマーオリゴを購入し、付属のプロトコールに従って PCR による変異導入を行った。

5. 塩基配列の決定

シーケンサーとして Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzer を用いた。サンプルは同社の BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit を用いて付属のプロトコールに従い調製した。

6. 分裂酵母からの DNA の調製

分裂酵母のゲノム DNA の回収には以下の方法を用いた。1.5~5 ml の適当な培地で培養した細胞を遠心集菌するか、プレートから楊枝にてかきとった細胞を 0.2 ml の breaking buffer (2 % Triton X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA)に懸濁し、0.3 g のガラスビーズ ($\phi = 0.5$ mm)、および 0.2 ml のフェノール／クロロホルム溶液を加え、FastPrep-24(MP Biomedical)を用いて激しく攪拌して細胞を破碎した。攪拌後、0.2 ml の TE 溶液を添加して室温で 5 分間遠心し、上清を回収した。1 ml のエタノール、塩として 40 μ l の 3M 酢酸ナトリウム溶液を加えて DNA を沈降させ、風乾した後に TE 溶液に溶解して DNA 溶液とした。

7. 分裂酵母の一般的な取扱いと遺伝学的解析

分裂酵母の一般的な遺伝学的解析は Gutz らの方法に従った。

分裂酵母の形質転換は岡崎らにより改良された酢酸リチウム法(Okazaki et al., 1990)を改変しておこなった。YE 培地にて培養した細胞 (対数増殖期の細胞) を遠心集菌した後、酢酸リチウム/TE 溶液 (0.1 M 酢酸リチウム pH7.5、10mM Tris-HCl pH 7.5、1mM EDTA pH 8.0)に懸濁した。懸濁液を 0.1 ml ずつマイクロチューブに分注し、DNA (0.1~1mg, 約 10 μ l)、carrierDNA としてニシン DNA を加え、酢酸リチウム/TE 溶液に終濃度 40 % (w/v)で溶解したポリエチレングリコール (#4000) を 260 μ l 添加して 25°C または 30°C で 1 時間以上培養した。その後 42°C で 5~15 分間熱ショックを与えた。熱ショック後上清を遠心除去し、細胞を滅菌水に懸濁して YE 培地に広げた。1~2 日後に選択培地にレプリカを行い目的のコロニーを選別した。

交配の際には、 h^{90} 株または接合型の異なる細胞(h^+ と h)同士をアミノ酸溶液(*1)に懸濁し、SPA 培地上にスポットした。25°C または 30°C で 1~2 日培養して孢子形成を誘導した後に、ランダム・スポア処理をおこない、子孫の細胞を得た。

ランダム・スポア処理は以下のようにしておこなった。孢子形成している細胞を SPA プレート上よりかきとり、カタツムリから抽出した消化酵素グルスラーゼ (NEN) により約 1 時間培養して孢子嚢を溶解し、孢子を遊離させた。滅菌水で孢子を洗浄した後で滅菌水に再懸濁し、適当な培地に孢子を蒔いた。

8. 分裂酵母株の作製

遺伝子破壊株、融合タンパク質発現株の作製には、Bahler らによって確立された方法を用いた(Bähler et al., 1998)。3GFP のように複数の蛍光タンパク質をタンデムに持つ融合タンパク質発現株の作製は改変されたプラスミドを PCR の鋳型 DNA として使用した (Sato et al., 2009)。

mCherry-チューブリンまたは CFP-チューブリンを観察するために、Z2-mCh-Atb2 株および Z2-CFP-Atb2 株を作製した。これらの株は 2 番染色体の *zfs1*⁺近傍における ORF を持たない領域に、Patb2-mCh-Atb2-*hyg*^r または Patb2-mCh-Atb2-*bsd*^rあるいは Patb2-CFP-Atb2-*nat*^rを挿入して作製されたものである。これらの株は、内在性 *atb2* 遺伝子を保持したままであるため、2 コピーの *atb2* 遺伝子を持つこととなる(Sato et al., 2009)。

alp14 および *alp7* の部分欠失型変異体の作製には pCR2.1 あるいはその改変されたプラスミドに、それぞれ野生型の *alp14*, *alp7* 遺伝子を ORF の上流、下流 500bp をふくめてクローニングしたプラスミド(pCR2.1-*alp14*, pHA-*alp7*FL)を作製し、これに対して PCR を用いて部分欠失型の遺伝子断片を増幅した。増幅した部分欠失型遺伝子断片をそれぞれ *ura4* 遺伝子による *alp14* 破壊株、*alp7* 破壊株 (*alp14::ura4*⁺, *alp7::ura4*⁺) に対し形質転換し、ウラシル合成経路の阻害剤である 5-FOA (5-フルオロオロチン酸) を含む YE 培地により選択した。

点突然変異株の作製は上記の pCR2.1-*alp14*, pHA-*alp7*FL に対して PCR により変異が導入された遺伝子断片を作製し、*alp14::ura4*⁺, *alp7::ura4*⁺ に対して形質転換をおこなった。

9. スポットテストによる温度感受性および TBZ 感受性の解析

YE プレートで培養した新鮮な細胞を回収して滅菌水に懸濁し、細胞濃度を $2 \times 10^5 \text{ cell}/\mu\text{l}$ になるよう調製した。これを 10 倍ごとに希釈した希釈細胞懸濁液を $2 \times 10^{-1} \text{ cell}/\mu\text{l}$ の濃度まで計 7 種類作製し、 $2 \times 10^5 \text{ cell}/\mu\text{l}$ の濃度から順にアッセイ用のプレートに 5 μl ずつスポットした。その後 2 日から 4 日培養を行い、写真に撮影した。

10. 蛍光顕微鏡による観察

DeltaVision-SoftWoRx システム (Applied Precision)を用いて、生細胞の経時観察を行った。レクチンコートしたガラスボトムディッシュ上に細胞を吸着させ、EMM 液体培地を加えることで観察用のサンプルを作製した。(図 14, 18D, 22A)の実験を除いて、観察は全て 25°Cの条件下で行った。それぞれのタイムポイントにおいて Z 軸に沿って、0.4 μ m おきに 10 セクションずつ撮影した。その後、SoftWoRx を用いてデコンボリューション処理によりバックグラウンドノイズの低減を行い、Max intensity projection あるいは Sum intensity projection にて Z 軸に沿って撮影した画像を 1 つに投影した。

11. シグナルの定量化

GFP シグナルの定量化は DeltaVision-SoftWoRx システム (Applied Precision)付属の Data Inspector によりおこなった。核内と細胞質の 6 \times 6 pixel における GFP シグナル強度の平均値をそれぞれ定量化し、核内シグナル強度の細胞質シグナル強度に対する比率を計算した。

12. レプトマイシン B を用いた蛍光顕微鏡による観察

上記 10 項と同様にガラスボトムディッシュに細胞を吸着させた観察用サンプルを作製し、25°Cにおいて撮影を行った。最初のタイムポイント (T=0) の直後に液体培地中にレプトマイシン B を終濃度 200ng/ml の濃度になるように加え、引き続き経時観察を行った。

13. 分裂酵母からのタンパク質調製と免疫沈降

約 1×10^8 cells の細胞数で採取した細胞培養液を 4°Cで遠心によって集菌した。氷冷した 1ml の Cdc2 stop buffer (50mM NaF, 10mM EDTA pH8.0, 1mM NaN₃, 150mM NaCl, 1mM PMSF)で 1 回洗い、100 μ l の HB buffer (25mM

MOPS pH7.2, 15mM MgCl₂, 5mM EGTA, 60mM β-glycerophosphate, 0.1mM Na-orthovanadate, 0.1mM NaF, 15mM p-nitrophenylphosphate, 1% Triton-X100, 1mM DTT, 1mM PMSF, 0.2% NP-40, 1/10 tablet complete mini (Roche))に懸濁した。約 500μl のガラスビーズ(SIGMA)を入れて、細胞破砕機 (Fast Prep-24, MP Biomedical)を用いて speed 5.5、25 秒間の処理を 2 回行い、約 9 割の細胞が破砕されている状態にした。遠心により上清を抽出し、これをタンパク質調製液とした。これに更に 6×SDS-PAGE sample buffer(*1)を添加して total extract とした。

免疫沈降を行う場合はこのタンパク質調製液に対し、Dynabeads Protein G (Life technology)、および GFP 抗体を加えて 4℃において 2 時間転倒混和した。上清を取り除いたビーズを HB buffer で 4 回洗浄したのちに 50μl の HB buffer を加え、これに SDS sample buffer を加えて免疫沈降サンプル (IP) とした。

14. SDS-PAGE とウェスタンブロッティング

SDS sample buffer を添加したサンプルを 95℃で 3 分間加熱して変性させた後、SDS-ポリアクリルアミドゲル (4-12 % gradient Criterion XT Precast Gel, BIO-RAD)、自作のアクリルアミドゲル (10% アクリルアミド, mono:bis rate = 29.8:0.2)、あるいは終濃度 50μM の Phos-Tag (Wako)を添加したゲル(8%アクリルアミド, mono:bis rate = 37.5:1)で分離した。泳動分離したタンパク質を iBlot システム (Life technologies)により、ニトロセルロース膜へと転写した。自作のアクリルアミドゲルと Phos-Tag ゲルは Wet transfer により PVDF 膜へと転写した。1 次抗体として、抗 GFP マウスモノクローナル抗体 (7.1 and 13.1, Roche, 1:1000)、抗 Myc マウスモノクローナル抗体 (9E10, Sigma, 1:400)、抗 α-tubulin 抗体 (B5-1-2, Sigma, 1:2000)、抗 HA マウスモノクローナル抗体 (16B12, Life technologies, 1:400)を用いた。2 次抗体には horseradish

peroxidase を結合させた抗マウス IgG 抗体 (Amersham Biosciences, 1:10000) を用いた。タンパク質の検出には ECL Prime Western Blotting System (Amersham Biosciences)を用いて発光させたルミノールを LAS-1000 plus (Fuji film)を用いて検出した。

(*1)6×SDS-Page sample buffer 10ml : 7ml 4×Tris-Cl/SDS,pH6.8(*2), 3ml glycerol, 1g SDS, 0.93g DTT, 1.2mg bromphenol blue

(*2) 4×Tris-Cl/SDS pH6.8 : 0.5M Tris-Cl pH6.8, 0.4% SDS

15. GST 組換えタンパク質の大腸菌からの精製

GST-Alp7、GST-Alp7-N、GST-Alp7-C、GST-Alp7-5A、GST-Alp7-T116A、GST-Alp14、GST-Alp14-8A および GST-Plo1 を精製するために、それぞれの遺伝子をプラスミド pGEX-KG にクローニングして、大腸菌 BL21c に形質転換した。得られたコロニーを 2×YT 液体培地を用いて、37℃で適当な濃度 (OD600: 0.4)になるまで培養した。0.2mM IPTG (Novabiochem)を加えて 3 時間 25℃で培養して発現誘導を行った。4℃で細胞を回収し、PBS buffer で洗浄し、5ml PBS buffer + 3% NP40, 10mM DTT, 1mM PMSF, 1/6 tablet Complete (Roche)に懸濁して超音波処理によって細胞を破碎した。遠心処理により分離した上清に Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare)を加えて 4℃で 1 時間転倒混和した。Poly-Prep Chromatography Column (BIO-RAD)に充填して、PBS buffer で 2 回洗った後 1ml の L-Glutathione 溶液 (50mM Tris-HCl pH8.0, 3mg/ml L-Glutathione)を用いて溶出した。

16. CDK1-cyclinB 複合体の精製

CDK1-cyclinB 複合体は分裂酵母より精製した。精製には p13^{suc1} agarose を用いて精製を行うか、分裂酵母 Cdc2 の C 末端に対して GST タグを付加した株より精製した。

p13^{suc1} agarose を用いた方法では、*nda3* 低温感受性株を 30℃で 0.5 × 10⁷ cells/ml の細胞濃度になるまで培養し、17℃に移した後 13 時間培養して分裂中期での停止を誘導した。細胞を集菌して Cdc2 Stop buffer で洗浄した後、液体窒素で凍結した。250μl × 2 本の細胞ペレットに対してそれぞれ 250μl の HB buffer および約 300μl のガラスビーズを加えて細胞破砕機で細胞を破砕した。上記の方法にてタンパク質精製液を作製し、500μl に対して、HB buffer で平衡化した p13^{suc1} agarose conjugate 100μl を加えて、4℃で 1.5 時間転倒混和した。HB buffer で 3 回洗浄した後に 100μl の HB buffer を加え CDK 複合体精製液とした。

nda3-KM311 cdc2-GST 株を用いた抽出では 250μl × 2 本の細胞ペレットに対してそれぞれ 250μl の HMKGD buffer (10mM HEPES pH7.9, 5mM MgCl₂, 150mM KCl, 10% Glycerol, 0.2% NP-40, 0.5mM DTT) および約 300μl のガラスビーズを加えて細胞破砕機で細胞を破砕した。同様に上記の方法にてタンパク質精製液を作製し、500μl に対して、HMKGD buffer で平衡化した Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) 100μl を加えて、4℃で 1.5 時間転倒混和した。HMKGD buffer で 3 回洗浄した後に 100μl の Elution buffer を加え CDK 複合体精製液とした。

17. CDK および GST-Plo1 による *in vitro* キナーゼアッセイ

in vitro キナーゼアッセイは Tsukahara らの方法に従って行った (Tsukahara et al., 2010)。

CDK および Plo1 による *in vitro* リン酸化アッセイでは大腸菌から精製した

組み換えタンパク質 GST-Alp7、GST-Alp7-N、GST-Alp7-C、GST-Alp7-5A、GST-Alp7-T116A、GST-Alp14 と Histone H1 (Calbiochem)および Casein (SIGMA) を基質として用いた。20 μ g/ml BSA, 200 μ M cold ATP を含む 8.5 μ l HB buffer(CDK のキナーゼ反応)または 8.5 μ l KB buffer (GST-Plo1 のキナーゼ反応; 50mM Tris-HCl pH7.5, 10mM MgCl₂, 1% TritonX-100)に 1.5 μ l 10mCi/ml [γ -³²P]ATP (PerkinElmer Life & Analytical Sciences)、10 μ l CDK1 複合体または GST-Plo1、および基質 30 μ l を加えて、30℃で 30 分リン酸化反応を行った。6 \times SDS-Page sample buffer を加えて 95℃で 5 分加熱処理をした。10 %または 4-12 %の SDS-ポリアクリルアミドゲル (コスモ・バイオ)で分離した後、クマシー染色 (Bio-safe Coomassie, BIO-RAD)を行ってタンパク質の分子量および泳動量を確認した。ゲルを乾燥させた後、ゲルに含まれる放射能を Amersham Hyperfilm MP (GE ヘルスケア・ジャパン)を用いて検出した。

18. Alp7 のペプチドアレイを用いた CDK によるリン酸化部位の決定

Alp7(474 残基)の N 末端から 2 アミノ酸おきに 20 アミノ酸のペプチドを 237 個合成し、それぞれをセルロース膜にスポットしたペプチドアレイシートを作製した。Alp7 のペプチドアレイは英国癌研究所の登田研究室との共同研究により、英国癌研究所で作製していただいた。50% EtOH, 10% CH₃COOH 混合液で平衡化したペプチドアレイシートを PBS で 2 回洗った後、リン酸化反応液 (10mM Tris-Cl pH8.0, 50 μ M cold-ATP, 100 μ M MgSO₄, 100 μ g/ml BSA)を用いて室温で 2 時間反応した。さらに、10 μ l 10mCi/ml [γ -³²P]ATP および 200 μ l CDK を加えて 30℃で 3 時間反応した。PBS で 3 回洗った後に乾燥させて、ペプチドアレイシートに含まれる放射能を Amersham Hyperfilm MP (GE ヘルスケア・ジャパン)を用いて検出した。

19. λ -ホスファターゼによる処理

*alp7-GFP nda3-KM311*変異体を30℃で18時間培養し、その後17℃に移して6.5時間培養して分裂中期での停止を誘導した。集菌後、上記の方法12に従いタンパク質調製液を作製した。GFP抗体 (A11122)を用いて免疫沈降を行い、洗浄後のビーズに対して λ -phosphatase buffer (50mM Tris-HCl [pH 7.5], 100mM NaCl, 0.1mM EGTA [pH 8.0], 2mM dithiothreitol, 0.01% Brij-35, 2mM MnCl₂) を加えて3サンプルに分注した。サンプル1はそのまま、サンプル2には Lambda Protein Phosphatase (New England Biolabs)を加えて、サンプル3には Lambda Protein Phosphatase とさらに Phosphatase inhibitor (10mM EGTA, 10mM Na-orthovanadate, 20mM β -glycerophosphate, 15mM p-nitrophenylphosphate) を加えて30℃にて20分間転倒混和して脱リン酸化反応を行った。反応後の各サンプルから上清を取り除き、HB bufferおよびSDS sample bufferを加えて、これをSDS-PAGEに用いるサンプルとした。

20. 出芽酵母ツーハイブリッド法による相互作用の検出

alp7-N(1-209), *alp7-N(1-209)-5A*, *alp7-210-360* の DNA 断片を PCR により増幅し、pGBKT7 (Clontech)にクローニングして、これらを bait として用いた。同様に *cut15-80-522* の遺伝子断片を PCR により増幅し pGADT7 (Clontech)にクローニングして、これを prey とした。また prey として他に、*pcp1-FL*, *pcp1- Δ 400-900*, *pcp1-1-400*, *pcp1-901-1208* がクローニングされた pGADT7 を用いた。それぞれのコントロールとしては T 抗原がクローニングされた pGBKT7-T、p53 がクローニングされた pGADT7-53 を用いた。これらのプラスミドを出芽酵母 AH109 株に酢酸リチウム法により形質転換し、アッセイを行

った。

選択培地としては SD-LW-H+5mM 3AT (3-amino-1,2,4-triazole)培地、および SD-LW-H-A を用いた。

< 結果 >

第 1 章 : Alp14 のドメイン解析および NES の決定

1.1 Alp14- Δ mid-GFP は間期細胞でも核蓄積する

我々の先行研究により、分裂酵母の微小管結合タンパク質 Alp7 は間期には細胞質微小管上に局在し、分裂期には核内のスピンドル微小管上に局在することが明らかであった(Sato et al., 2004; 2009)。この事実は、細胞周期の進行にともなって Alp7 が細胞質と核内とをシャトルするタンパク質であることを示している。

また、相互作用するタンパク質である Alp14 との結合に Alp7 の 461 番目のロイシンが必須であることが示されている。このロイシンをアラニンに置換した *alp7-L461A* 変異体においては Alp7 が間期、分裂期を通じて核蓄積する様子が観察されていた(Sato et al., 2009)。

このことから Alp7 の L461 が担う働きとして以下の 2 つの可能性が考えられた。

1. Alp7 の L461 は Alp14 との結合サイトであり、Alp14 が核外輸送シグナルである NES を持つ。すなわち、Alp7 と Alp14 は複合体として核外へと排出されている。

2. Alp7 の L461 は Alp14 との結合サイトおよび NES として働いており、Alp14 と核外輸送因子 Crm1 はこの Alp7-L461 をめぐって競合している。すなわち Alp7 と Alp14 は別々に核外へと排出されている(図 4)。

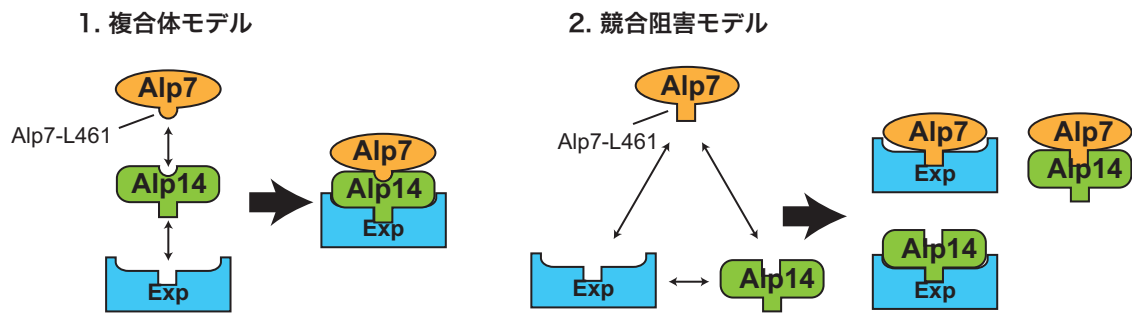


図4 Alp7-L461 の役割の2つの可能性

1. 複合体モデルでは Alp7-L461 は Alp14 の結合部位として機能し、Alp14 とエキスポーチンの相互作用を介して Alp7-Alp14 複合体として核外へと排出される。
2. 競合阻害モデルでは Alp7-L461 は Alp14 およびエキスポーチンの結合部位として二重の働きを持ち、Alp14 とエキスポーチンは Alp7-L461 をめぐって競合的に結合する。Alp7 と Alp14 は別々に核外排出される。

これら 2 つの仮説のどちらが正しいのか検証するため、まず、Alp14 に NES が存在しているか追究することとした。そこで、内在性の *alp14* 遺伝子を部分欠失型 *alp14* により置換した 7 種類の部分欠失型変異株を作製した。それぞれの部分欠失型 *alp14* 遺伝子に蛍光タンパク質 GFP をコードする遺伝子を融合して発現させ、微小管の構成タンパク質である α -チューブリン分子に CFP を融合した CFP-Atb2 とともにその局在の観察を行った。同時にその機能を確認するため、スポットテストにより温度感受性および微小管重合阻害剤である TBZ への感受性の有無を検討した。

その結果 N 末端に存在する保存された TOG ドメインを欠失させた Δ TOG-GFP, Δ TOG1-GFP, Δ TOG2-GFP が間期には細胞質微小管上、分裂期にはスピンドル微小管上へ局在していた(図 5A)。このうち Δ TOG 変異体では *alp14* 破壊株と同程度の温度感受性および TBZ 感受性が観察された(図 5B)。一方、2 つの TOG ドメインのうち 1 つを欠いた Δ TOG1, Δ TOG2 変異体は温度感受性を示さず、機能を維持していた。これらの事実から、保存された TOG ドメインは

Alp14 の微小管への局在に影響を与えない機能ドメインであり、Alp14 は少なくとも 1 つの TOG ドメインがあれば機能することが判明した。

続いて C 末端を欠失させた 4 変異体の解析を行った。Alp7 との結合ドメイン (Sato et al., 2004) を欠失させた $\Delta C1$ -GFP, $\Delta C2$ -GFP は微小管への局在が失われ、Alp7 との結合が複合体の微小管への局在に重要な役割を果たすことが確認された。一方でチューブリンと結合する活性を持つチューブリン結合ドメイン (Nakaseko et al., 2001) を欠失した $\Delta tubBD$ -GFP は、その微小管への局在は減弱したものの間期に細胞質微小管、分裂期にスピンドル微小管上に結合し、局在の時期特異性は維持されていた。

興味深いことに中央領域 (アミノ酸番号 501-641) を欠失させた Δmid -GFP は分裂期のみならず間期においても核内に蓄積している様子が観察された。このことから、 Δmid 変異体において欠失させた領域内に核外輸送シグナルである NES (Nuclear Export Sequence) が存在すると考えられた。

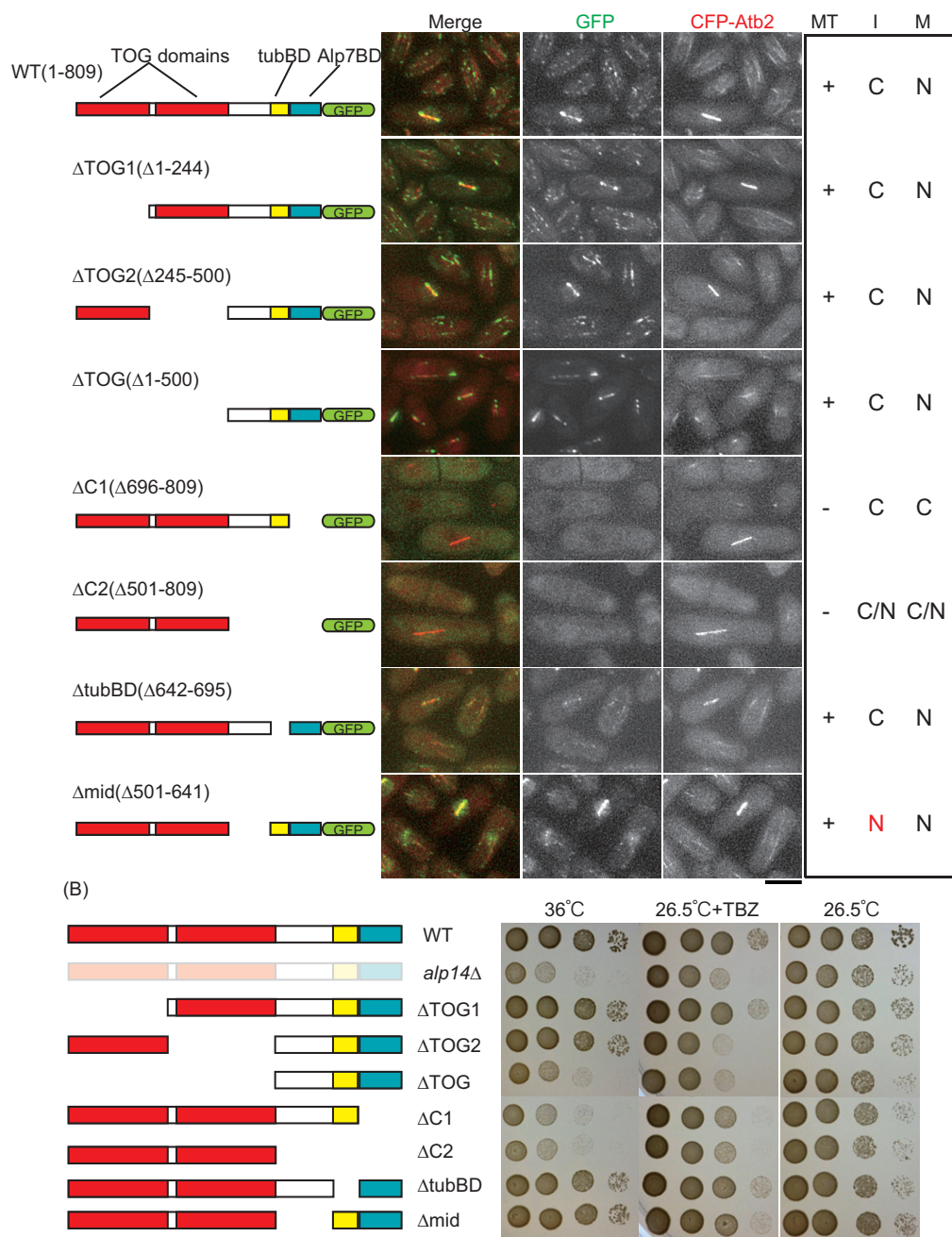


図5 部分欠失型 Alp14 の局在と変異体の表現型

(A) 7 種類の部分欠失型 Alp14: Δ TOG1(Δ 1-244), Δ TOG2(Δ 245-500), Δ TOG(Δ 1-500), Δ C1(Δ 696-809), Δ C2(Δ 501-809), Δ tubBD(Δ 642-695), Δ mid(Δ 501-641) の局在を微小管マーカー CFP-Atb2 とともに観察した。右表はそれぞれの局在のまとめ。MT: 微小管、I: 間期、M: 分裂期、C: 細胞質、N: 核。スケールバー: 5 μ m (B) スポットテストを用いた部分欠失型変異体の温度感受性および TBZ 感受性の解析。

1.2 Alp14 の L615 は核外輸送に必須の機能を有する

前節の Δmid 変異体において欠失させた 141 残基の領域をさらに約 20 残基ずつ 7 つに分割し、それぞれを欠失させた 7 変異体を作製して微小管マーカーの mCherry-Atb2 とともに観察を行った。

この結果、 $\Delta 601-620$ 変異体を除く 6 種類の変異体については、間期細胞において変異型 Alp14 が野生型と同様の局在を示したが、 $\Delta 601-620$ 変異体においては Δmid 変異体と同様の間期核蓄積が観察された(図 6A)。そこでこの 601-620 領域が NES 活性に十分であるか解析するため、GST-GFP に Alp14-601-620 を融合して adh1 プロモーターより発現させ(GST-GFP-14NES)、核膜マーカーである Cut11-3mRFP とともに細胞内における局在を観察した(図 6B)。この結果、GST-GFP は細胞質と核質において GFP シグナルに大きな差異はみられなかったが、GST-GFP-14NES は細胞質に優勢的に局在し、GFP シグナルは核から抜けて観察された。それぞれのタンパク質について核と細胞質の GFP シグナルを定量化して平均値を取り、細胞質に対する核内のシグナルの比を取ったものが図 6B の右グラフである。定量化の結果、14NES(601-620)の付加により細胞質に対する核内の GST-GFP シグナル比は約 1/3 にまで減弱することが明らかになった。

以上から、Alp14-601-620 が NES 活性に十分であることが示された。

続いてこの 20 残基の領域内に存在する NES 活性に必須のアミノ酸を限定するための実験を行った。先行研究により、核外輸送因子エクスポーチンが直接認識するシグナル配列はロイシン、イソロイシン等の疎水性アミノ酸が優先的に含まれることが多いことが既に知られている(Bogerd et al., 1996; Fukuda et al., 1996)。そこで Alp14 の 601-620 に存在する疎水性アミノ酸であるロイシン

をそれぞれアラニンに置換した4変異体を作製し、その局在の観察を行った。
この結果、4変異体のうち唯一615番目のロイシンをアラニンに置換した *L615A*
変異体で間期の細胞において強い核蓄積が確認された(図 6C)。

以上の結果から Alp14 が NES 活性を持ち、その活性は 615 番目のロイシン
残基に依存していることが明らかとなった。

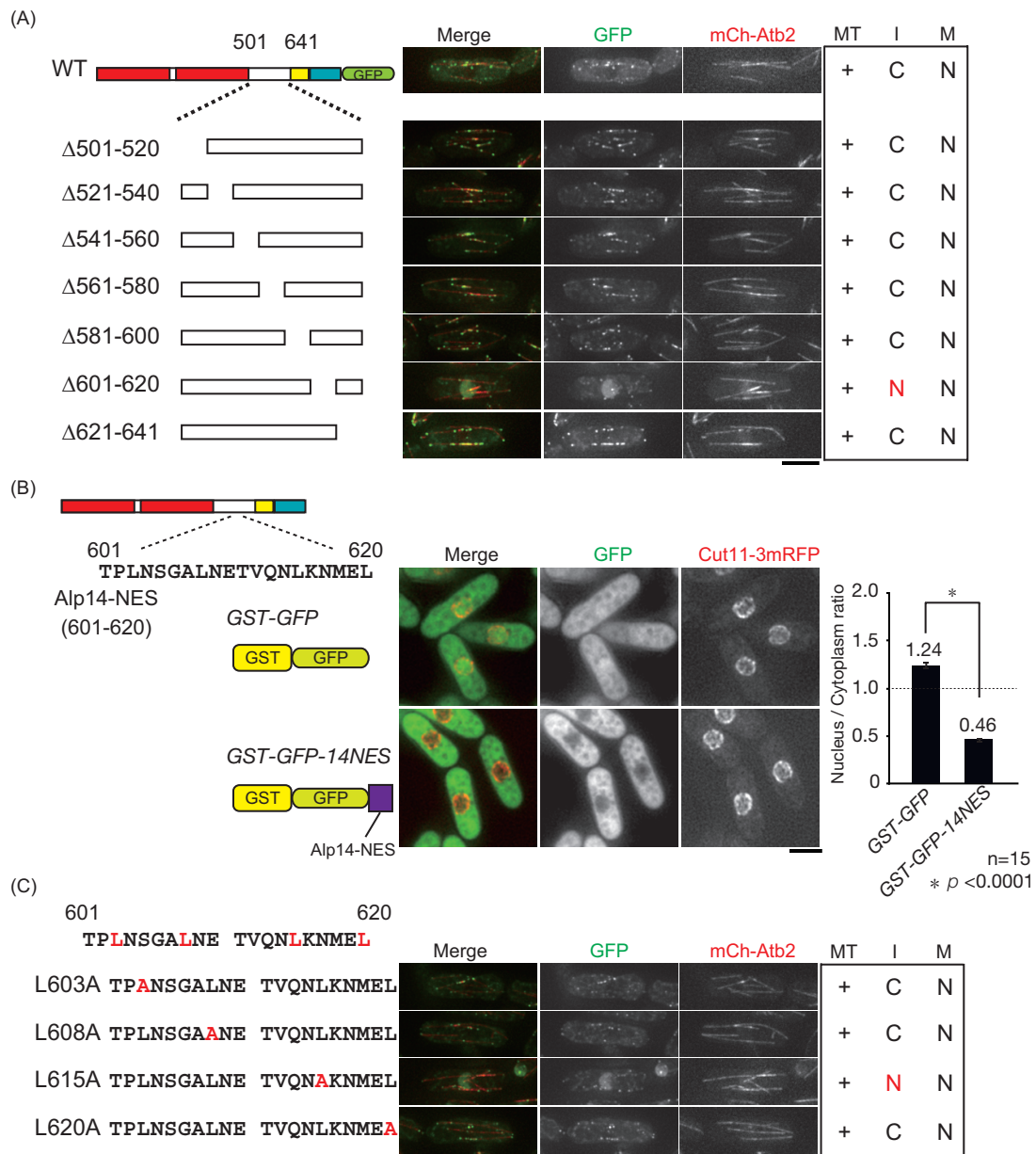


図6 部分欠失型 Alp14 の局在と変異体の表現型

(A) Alp14-501-642 領域を約 20 残基ずつ欠失させた部分欠失型 Alp14 の局在を微小管マーカー mCh-Atb2 とともに観察した。右表はそれぞれの局在のまとめ。MT: 微小管、I: 間期、M: 分裂期、C: 細胞質、N: 核。(B) 左: Alp14-601-620 領域を GST-GFP に融合し、その局在を核膜マーカーである Cut11 とともに観察した。右: GFP シグナルの核/細胞質の比を定量化した。n: 細胞数, p: Student の t 検定による p 値。(C) Alp14-601-620 の 20 残基に存在するロイシンをアラニンに置換した 4 変異体の局在を微小管マーカーとともに観察した。スケールバー: 5 μ m

次に *alp14-L615A* 変異体において相互作用タンパク質である Alp7 に mCherry タンパク質を融合して、その局在の観察を行った。(図 7A) で示したように、野生型においては Alp14-GFP と Alp7-mCherry は間期には細胞質微小管上で共局在している。一方で、*L615A* 変異体においては Alp14-L615A-GFP と同様に、Alp7-mCherry も間期の細胞において核蓄積した。

このことから、Alp7-Alp14 は複合体として輸送されており、その核外輸送過程は Alp14 に依存していた。すなわち、章頭の 1 つ目の仮説である「複合体モデル」が正しいことが示唆された。野生型および *L615A* 変異体において Alp7 との相互作用を免疫沈降により検出したところ、変異体においても野生型同様の相互作用が確認され、タンパク質の発現量にも大きな差異は認められなかった(図 7B)。

以上をモデル図としてまとめたものが(図 7C)である。微小管結合タンパク質 Alp7-Alp14 は複合体として輸送されており、Alp7 に存在する NLS によって核へと移行している。間期においては、核へと輸送された複合体は Alp14 に存在する NES によって直ちに排出され、結果として Alp7-Alp14 複合体は細胞質の微小管上へと局在することとなる。

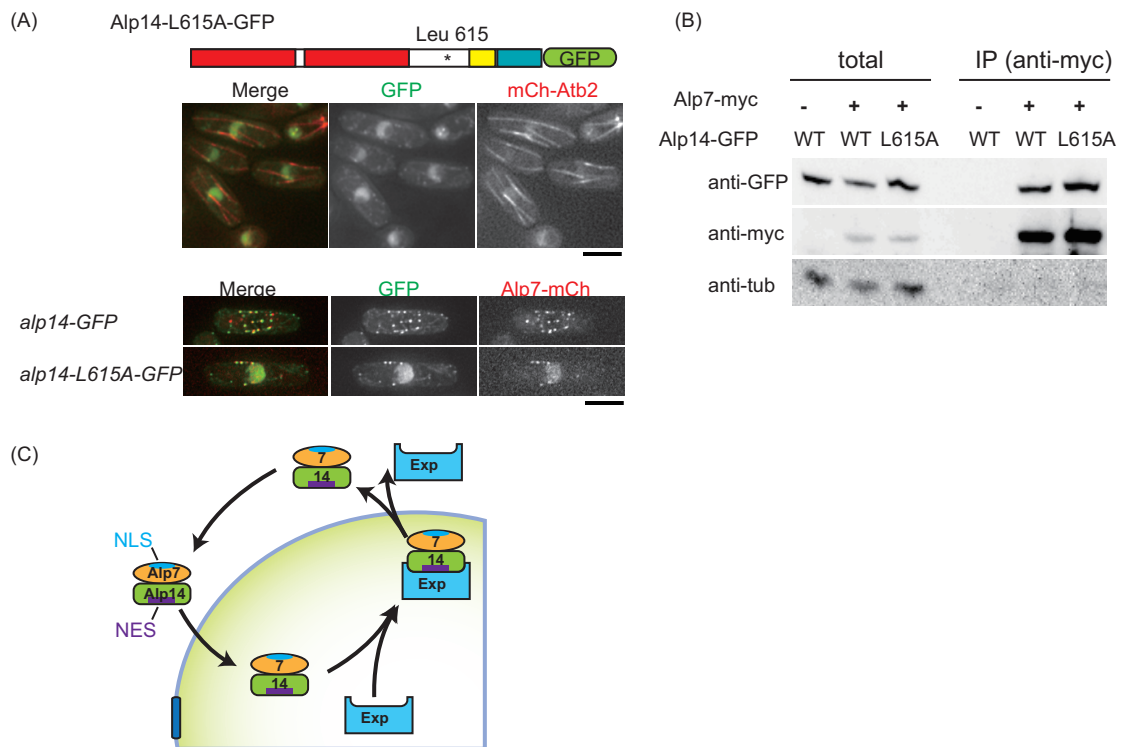


図 7 Alp14-L615A は Alp7 とともに間期核に蓄積する

(A) Alp14-L615A-GFP の局在を微小管マーカー mCh-Atb2 (上) あるいは Alp7-mCh (下) とともに観察した。スケールバー：5 μ m (B) 野生型 (WT) と L615A 変異体で、Alp7-myc を免疫沈降し、Alp14-GFP, Alp14-L615A-GFP が共沈するか調べた。

(C) Alp7-Alp14 複合体の間期核外排出システムの模式図。Alp7-Alp14 は Alp7 に存在する NLS によって核内に輸送され、Alp14 に存在する NES によって細胞質へと排出される。

1.3

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため本項については非公開

第 2 章 : Alp7-Alp14 複合体の分裂期特異的な核蓄積システムの探索

2.1 Alp7 の N 末端領域が分裂期核蓄積に重要である

前章の解析により Alp7-Alp14 は間期であっても複合体として Alp7 の NLS によって核輸送され、Alp14 によって核外に排出されるシャトルするタンパク質複合体であることが判明した。それではいかにして、Alp7-Alp14 は分裂期にのみ核蓄積を達成しているのだろうか。

先章の Alp14 のドメイン解析では見出すことのできなかった、局在の時期特異性を制御している領域を明らかにするため、Alp7 のドメイン解析を行うことで分裂期における核蓄積を制御している領域の探索を行った。*alp7* 遺伝子を変異型 *alp7* に置換し、GFP をコードする遺伝子を融合して発現させ、微小管マーカー mCh-Atb2 とともにその局在の観察を行った。

先章において Alp7 の核外排出が Alp14 の NES に依存していることを示した。このことから、時期特異的な核蓄積のシステムを解析するためには、Alp7 と Alp14 の相互作用が必要だと考えられる。また、既に先行研究で Alp7 の C 末端領域が Alp14 との結合に重要であることが示されている。そこで、この C 末端領域を残して中央領域を欠失させた *alp7-Δ210-418* 変異体を作製した。Alp7-Δ210-418-GFP は微小管への局在は失われたものの、間期には細胞質に局在し、分裂期には核蓄積した。このことから Alp7 の 210-418 の領域には分裂期特異的な核蓄積を生み出す制御に関わる配列は存在しないと考えられた。続いて *alp7-Δ210-418* 変異体に残っている N 末端領域 (1-209) について、NLS 配列 (117-126) を保持したまま、それ以外の部分を 6 領域に分け、1 箇所ずつ欠失させた計 6 種類の部分欠失型変異体を作製し、それらの局在を観察した(図

9)。5 種類の変異型タンパク質は野生型とほぼ同様の局在であったが、 $\Delta 61-116$ -GFP は分裂期における核蓄積の低下およびスピンドル微小管への局在の低下を示した。このことから、Alp7 の N 末端に存在する NLS 近傍の領域 (61-116) に分裂期の核蓄積を支配する制御ドメインの存在が示唆された。

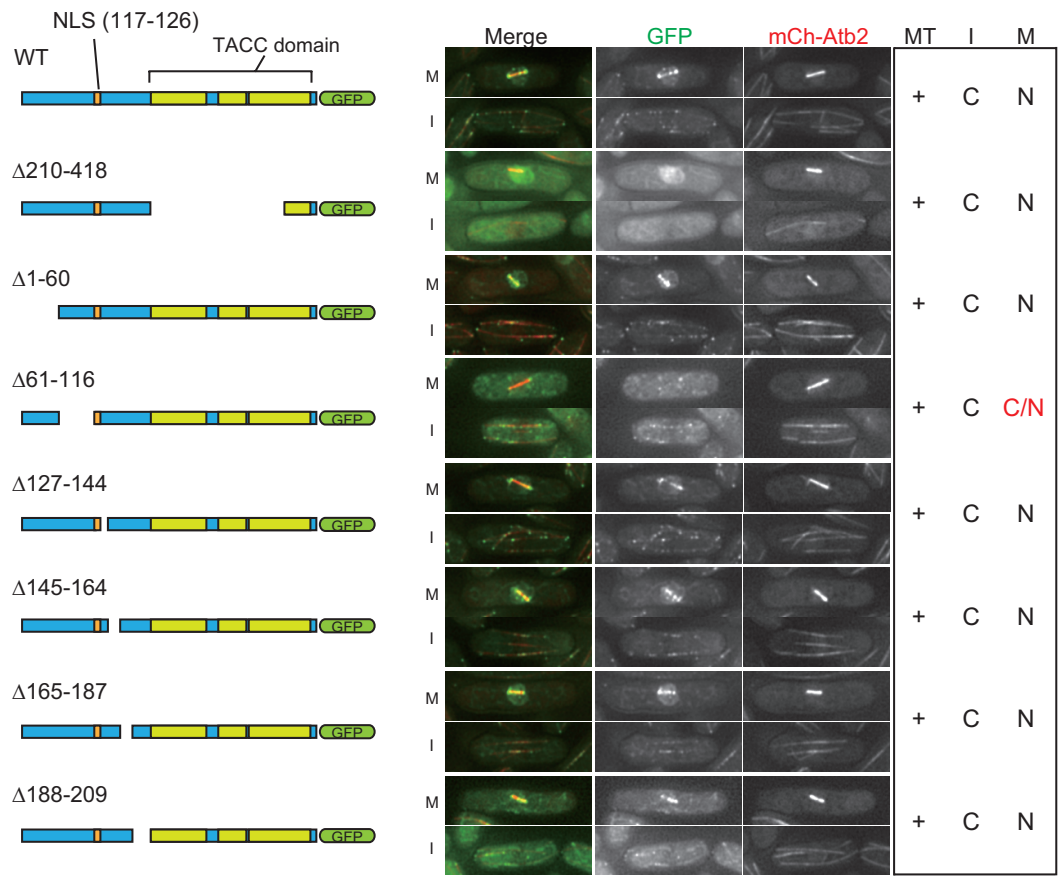


図 9 Alp7- $\Delta 61-116$ -GFP は分裂期に核蓄積が低下する

野生型 Alp7 および 7 種類の Alp7 変異体: $\Delta 210-418$, $\Delta 1-60$, $\Delta 61-116$, $\Delta 127-144$, $\Delta 145-164$, $\Delta 165-187$, $\Delta 188-209$ を微小管マーカー mCh-Atb2 とともに観察した。右表はそれぞれの局在のまとめ。MT: 微小管、I: 間期、M: 分裂期、C: 細胞質、N: 核。スケールバー: 5 μ m

2.2 CDK および Plo1 は *in vitro* で Alp7 をリン酸化する

先行研究により Alp7 の分裂期核蓄積は CDK 活性が必要であることが既に判明していた(Sato et al., 2009)。CDK の ATP アナログ感受性変異体(*cdc2-asM17* 変異体)を用いて追実験を行った結果、ATP アナログである 1NM-PP1 を添加してから 10 分後の細胞においては Alp7 の分裂期核蓄積が低下していた(図 10A)。したがって、分裂期の代表的なキナーゼである CDK およびその下流のポロキナーゼ Plo1 によって Alp7 がリン酸化を受ける可能性があり、これが分裂期における Alp7 の局在制御をもたらすことが想定された。そこで大腸菌で発現精製した組換えタンパク質 GST-Alp7, GST-Alp14, GST-Alp7-N(1-209), GST-Alp7-C(210-474)、および GST-Plo1 と、分裂酵母から精製した CDK 複合体を用いて *in vitro* におけるリン酸化アッセイを行った。

この結果 Alp7 は *in vitro* において CDK および Plo1 によるリン酸化を受けることが判明した(図 10B)。また CDK においては特にその N 末端フラグメントである GST-Alp7-N(1-209)が効率よくリン酸化されることが明らかとなった。

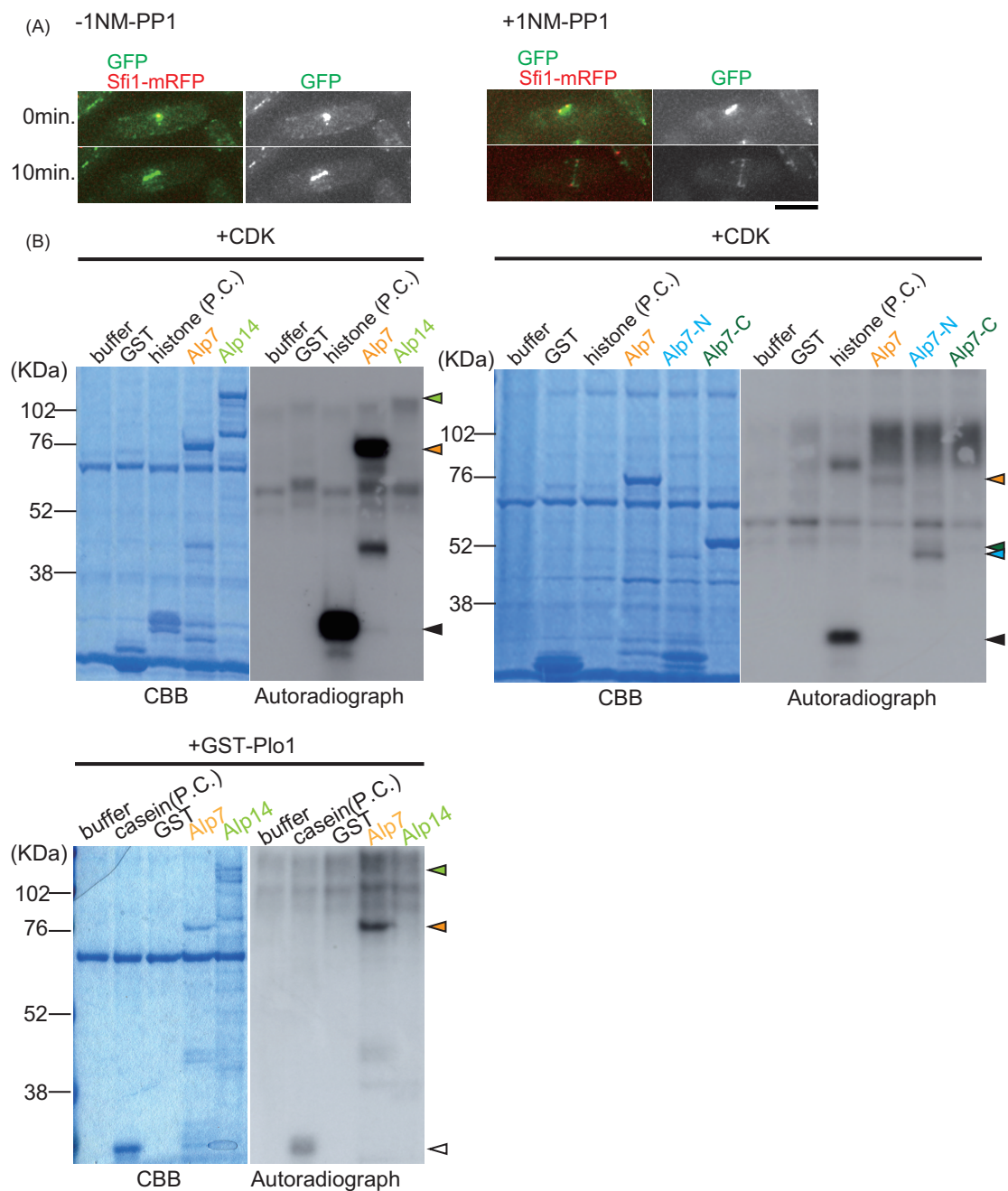


図 10 Alp7 の N 末は *in vitro* において CDK によりリン酸化される

(A) *cdc2-as*(ATP-analog sensitive) 変異体の分裂期の細胞に、ATP アナログ (1NM-PP1) を加え (0min.)、生細胞観察した。左：ATP アナログを加えていない細胞、右：ATP アナログを加えた細胞、スケールバー：5 μ m (B) 分裂酵母より Sucl beads により精製した CDK および大腸菌から発現精製した GST-Plo1, GST-Alp7, GST-Alp14, GST を用いて *in vitro* におけるリン酸化アッセイを行った。それぞれの対応するバンドの高さに矢頭を付記した。橙：GST-Alp7, 黄緑：GST-Alp14, 青：GST-Alp7-N(1-209), 濃緑：GST-Alp7-C(210-474), 黒：histone H1, 白：casein

2.3 ペプチドアレイによる Alp7 のリン酸化サイトの決定

続いて CDK による Alp7 の N 末端のリン酸化について追究するため、Alp7 のペプチドアレイを用いて CDK によるリン酸化候補部位の決定を試みた。Alp7 (全長 474 残基) の N 末端より 2 残基おきに、20 残基ごとのペプチド鎖を計 227 点スポットしたセルロース膜を作製した (図 11A)。このアレイシートは英国癌研究所の登田隆博士の研究室との共同研究により作製していただいた。このアレイシートと分裂酵母から精製した CDK を用いてリン酸化反応を行い、*in vitro* においてどのペプチド鎖がリン酸化を受けるかを検討した。

この結果 Alp7 の N 末端にリン酸化を受ける連続したスポットが観測された (図 11B)。これらの連続したスポット群をクラスターと名付けると、Alp7 には全長で 2 箇所のクラスターがみられる。クラスター1 は Alp7 のアミノ酸番号 43-74 の領域に、クラスター2 は 97-126 に対応しており、この領域からリン酸化される可能性が高いアミノ酸残基として S50, S51, T100, T116 の 4 つのアミノ酸を選び出した。このうち T100 および T116 は CDK の認識コンセンサス配列の S/T-P に対応している。この 4 残基に加え、Alp7 の NLS(117-126)の直後に存在する CDK コンセンサス配列の T-P に対応する T131 を加えた、計 5 つのセリン・スレオニン残基をアラニンに置換した Alp7-5A タンパク質の作製を試みた。リン酸化される可能性が高い候補残基を選び出す際には、デンマーク大学が提供しているリン酸化部位予測ソフトウェアである NetPhos Yeast 1.0 (h) を用いた。

大腸菌から発現精製した GST-Alp7 および GST-Alp7-5A と、分裂酵母より精製した CDK を用いて *in vitro* におけるキナーゼアッセイを行ったところ、Alp7 で検出されたリン酸化シグナルは Alp7-5A において顕著に減退することが判明した (図 11C)。

これらの結果から Alp7 の N 末の 5 つのセリン・スレオニン (S50, S51, T100, T116, T131) が CDK によるリン酸化の標的サイトであることが示唆された。

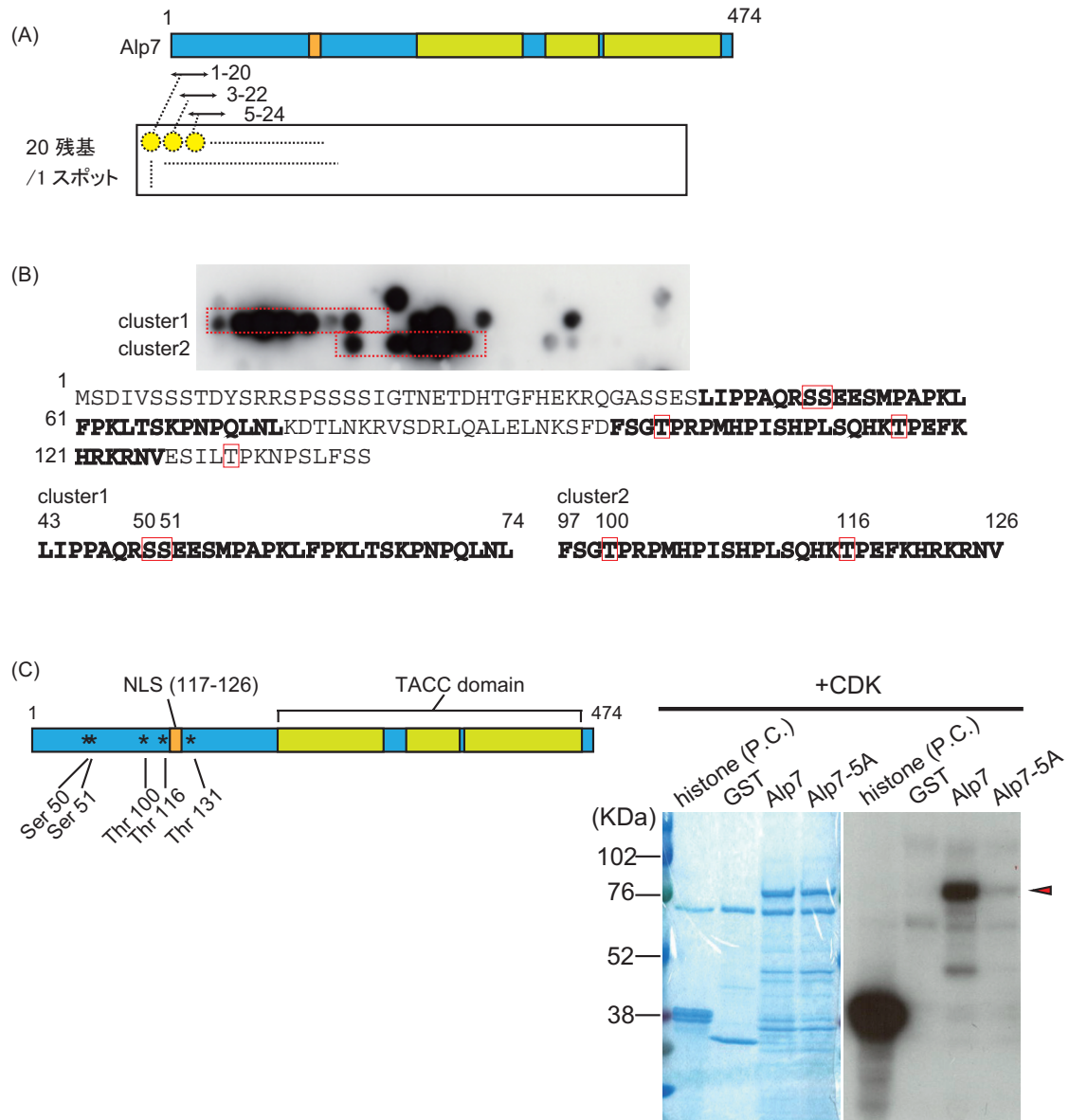


図 11 Alp7-N 末端の 5 箇所のセリン・スレオニンが CDK によってリン酸化される

(A) Alp7 を短鎖ペプチドに区切りスポットしたペプチドアレイの模式図。(B) ペプチドアレイを用いてリン酸化アッセイを行い、リン酸化が検出されたスポット群に対応する 2 領域 (cluster1: 43-74, cluster2: 97-126) を太字で表した。(C) 左: Alp7-5A タンパク質の変異部位の模式図。右: 野生型 Alp7 および Alp7-5A タンパク質を用いた *in vitro* のリン酸化アッセイを行った。Alp7 のバンドを赤矢頭で表した。

2.4 Alp7 は *in vivo* においてもリン酸化される

上記までで見つかった *in vitro* における Alp7 のリン酸化部位が、*in vivo* におけるリン酸化を受けるのか確かめるため、SDS-PAGE 後のウェスタンブロッティングにより Alp7 のリン酸化によるバンドシフトがみられるか検討した。

タンパク質の精製には分裂期の細胞の割合を増やすために、微小管の構成因子である β -チューブリンの低温感受性変異体(*nda3-KM311*, (Toda et al., 1983; Umesono et al., 1983; Hiraoka et al., 1984))を用いた。*nda3-KM311* 変異体は低温条件下で培養すると細胞が分裂中期に停止する。この変異体を用いて、許容温度の 30°C で培養した細胞群を制限温度の 17°C に移して 6.5 時間培養し、集菌してタンパク質を抽出および精製した。SDS-PAGE により分離し、ウェスタンブロッティングによりリン酸化のバンドシフトの有無を検討した。

この結果 Alp7-GFP には泳動度の違う 2 つのバンドが検出された(図 12A)。このうち泳動度の低い上側のバンドは、 λ -プロテインホスファターゼによって処理することで下側のバンドと重なることが判明した。またホスファターゼと同時にホスファターゼの阻害剤を加えると Alp7-GFP の 2 つのバンドは未処理のレーンと同様にそのままであり、バンドシフトはリン酸化によるものであると分かった。

続いて *alp7-GFP nda3-KM311* 変異体、および *alp7-5A-GFP nda3-KM311* 変異体を作製し、非同調培養である 30°C および分裂期停止する 17°C でそれぞれ培養を行い集菌し、タンパク質を抽出した。これらのサンプルを Phos-Tag を含むアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE により分離した。Phos-Tag はタンパク質のリン酸化を認識してキレートすることでトラップし、リン酸化タンパク質のアクリルアミドゲル中での泳動度を低くする薬剤である。ウェスタンブロッティングにより GFP のバンドを検出したところ、野生型においては分裂期

に停止する 17°C の条件下で複数のバンドシフトが検出されたのに対し、*in vitro* のリン酸化部位である 5 箇所(S50 S51 T100 T116 T131)をアラニンに置換した 5A 変異体では 17°C においてもバンドシフトがみられなかった (図 12B)。このことは *in vivo* において、変異を導入した 5 箇所が分裂期におけるリン酸化を受ける事実を示唆している。

さらに、この Alp7 で検出されたリン酸化が分裂期特異的であるか調べるため、細胞分裂を同調させて、各経時時間において Alp7-GFP および Alp7-5A-GFP のバンドがどのように検出されるか解析を行った。

タンパク質の抽出にはまず分裂期特異的なホスファターゼである *cdc25* の温度感受性変異体(*cdc25-22*, (Russell and Nurse, 1986))を用いて、25°C で培養した細胞集団を制限温度である 36°C にて 4 時間培養し、分裂期直前の G2 期に停止させた。その後、培養条件を再び 25°C に戻して同調的に分裂期を開始させ、この瞬間を T=0 と定めて、その後 20 分おきに細胞を回収してそれぞれタンパク質を抽出した。細胞の同調性は(図 12C)のグラフに記した。

この結果、分裂期開始 20 分後および 40 分後 (T=20,40)において、野生型より抽出した Alp7-GFP のバンドシフトが検出された(図 12C)。分裂期開始より 20 分後、40 分後は前期および前中期の細胞集団の割合が最も高くなる時間である。一方で、5A 変異体では、T=20,40 のサンプルにおいてもバンドシフトはみられなかった。

以上の事実から、我々は Alp7-GFP が *in vivo* においてもリン酸化を受けていると結論した。

Alp7 に存在する CDK コンセンサス配列および Plo1 コンセンサス配列を(図 12D)に図示した。

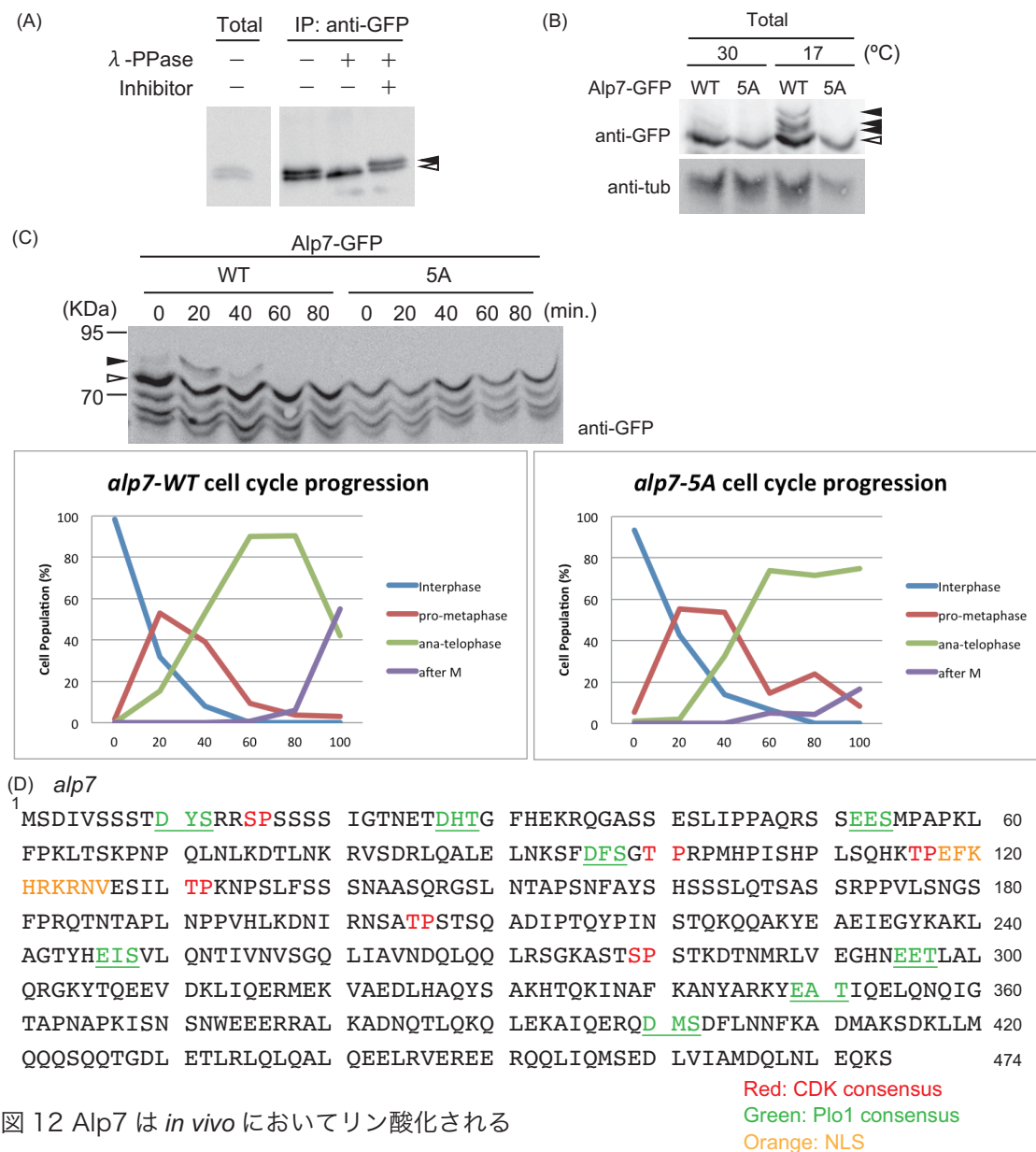


図 12 Alp7 は *in vivo* においてリン酸化される

(A) *alp7*-GFP *nda3*-KM311, *alp7*-5A-GFP *nda3*-KM311 変異体を用いて分裂中期に停止させた細胞培養液からタンパク質を調製して、免疫沈降したサンプル、免疫沈降後に λ -ホスファターゼで処理したサンプル、さらにインヒビターにより処理したサンプルを泳動しウエスタンブロッティングにより GFP のバンドを検出した。黒矢頭：リン酸化バンド、白矢頭：非リン酸化バンド。(B) *alp7*-GFP *nda3*-KM311, *alp7*-5A-GFP *nda3*-KM311 変異体について Phos-Tag ゲルを用いて非同調培養 (36°C) および分裂期停止 (17°C) させた細胞培養液から調製したサンプルを泳動し、ウエスタンブロッティングにより GFP のバンドを検出した。黒矢頭：リン酸化バンド、白矢頭：非リン酸化バンド。(C) *cdc25-22* 変異体を用いて細胞培養液を分裂期前に停止したのち、分裂期を同調して進行させた。上：20 分おきに細胞を回収してタンパク質を調製し、泳動の後ウエスタンブロッティングにより Alp7-GFP および Alp7-5A-GFP のシグナルを検出した。下：細胞の同調性をグラフ化した。黒矢頭：リン酸化バンド、白矢頭：非リン酸化バンド。(D) Alp7 のアミノ酸配列。赤：CDK コンセンサス配列、緑：Plol コンセンサス配列、橙：NLS

2.5 *alp7-5A*, *alp7-5E* 変異体の表現型の解析

上記の解析により、Alp7-5A (S50A, S51A, T100A, T116A, T131A) は CDK によるリン酸化を受けない非リン酸化型 Alp7 と考えられた。そこで生体内におけるこのリン酸化の意義を検討するため、非リン酸化型である *alp7-5A* 変異体、およびリン酸化模倣型である変異体 *alp7-5E* 変異体の作製を行った。作製された変異体の Alp7-5A および Alp7-5E に GFP を融合して観察を行ったところ、Alp7-5A-GFP は分裂期における核蓄積が顕著に低下していた(図 13A)。一方で Alp7-5E-GFP は分裂期だけではなく、間期核にも蓄積している様子が観察された。さらに、*alp7-5A* 変異体の核蓄積の低下について定量的な評価を行うため、核膜マーカーである Cut11-3mRFP とともに観察を行い、分裂期の核内と細胞質の GFP シグナル比を定量化した(図 13B,13C)。この結果、野生型では分裂期には核内の GFP シグナルが細胞質の GFP シグナルの約 3.5 倍の強度であるのに対し、5A 変異体では核内と細胞質の GFP シグナルはほぼ等強度であった。このことから、5A 変異体では Alp7-5A タンパク質の分裂期特異的な核蓄積が起きていない可能性が考えられた。

続いて *alp7-5A*, *alp7-5E* 変異体の表現型を調べるため、温度感受性および TBZ 感受性をスポットテストにより調べた。この結果、*alp7-5E* 変異体では温度感受性・TBZ 感受性とも観察されなかったが、*alp7-5A* 変異体は 36°C において強い温度感受性を示した(図 13D)。この温度感受性は SV40 の T 抗原由来の NLS を Alp7 の N 末端に付加することで抑圧された。このことは *alp7-5A* 変異体で見られた温度感受性は核蓄積の低下によるものであることを示している。

また *alp7-5A* 変異体において、Alp7-5A タンパク質の安定性、および相互作用タンパク質である Alp14 との相互作用が保たれているかについてウェスタンブロッティングにより確認を行った(図 13E)。この結果、Alp7-5A タンパク質は

野生型タンパク質と同様に発現が確認され、Alp14 との相互作用も保たれていることが明らかになった。

これらの結果から Alp7 の N 末端の 5 箇所のいずれかが CDK によりリン酸化され、これが Alp7 複合体の分裂期特異的な核蓄積の達成に重要であると考えられた。

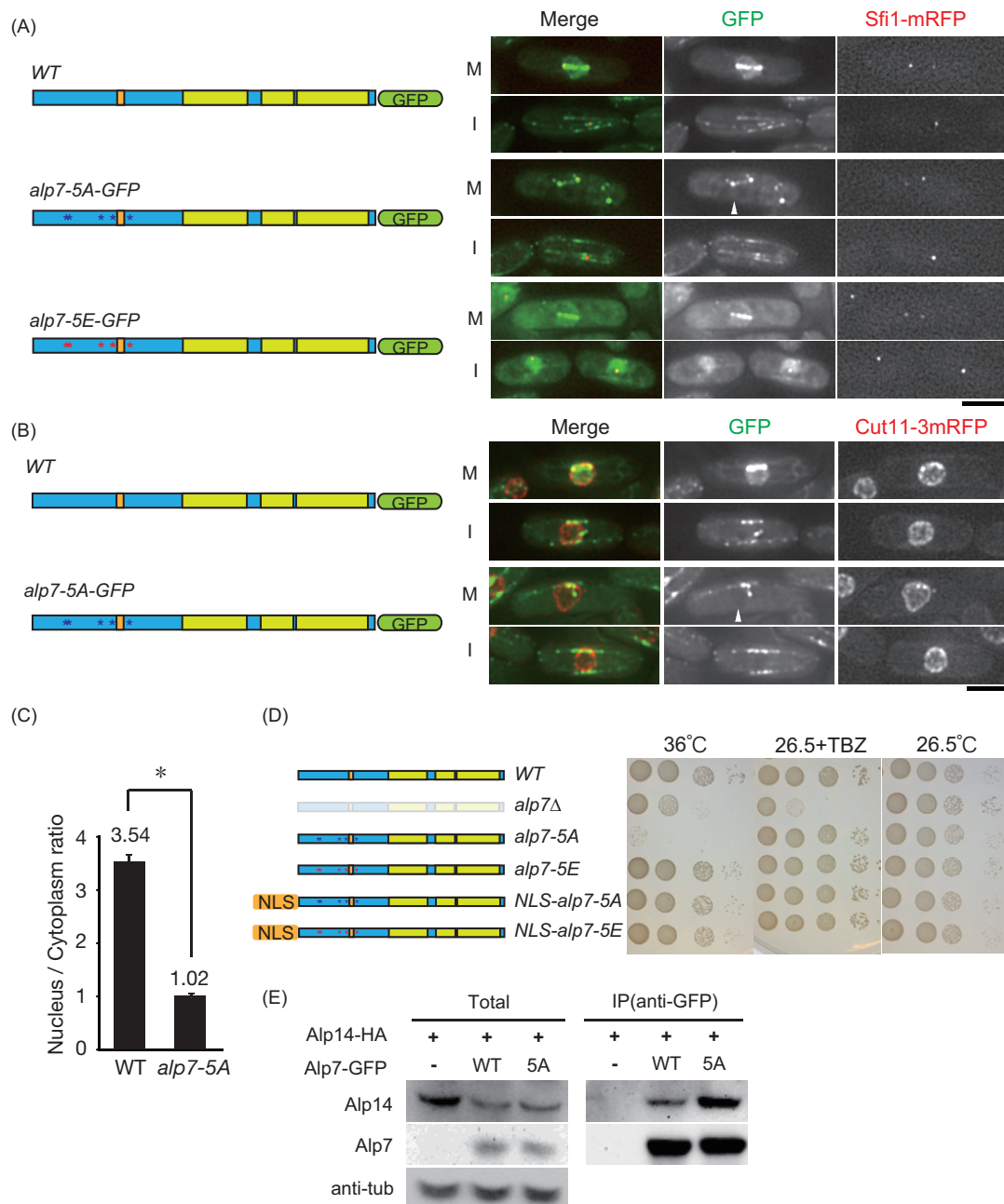


図 13 *alp7-5A* 変異体では、Alp7-5A-GFP の分裂期の核蓄積が顕著に低下する

(A) Alp7-GFP, Alp7-5A-GFP, Alp7-5E-GFP の局在を SPB マーカーである Sfi1-mRFP とともに観察した。スケールバー：5µm (B) Alp7-GFP, Alp7-5A-GFP を核膜マーカーである Cut11-3mRFP とともに観察した。スケールバー：5µm (C) 野生型および *alp7-5A-GFP* 変異体について 核質と細胞質の GFP シグナルを定量化し、核質／細胞質のシグナル比をグラフ化した。細胞数：n=15, p 値：* $p=5.35 \times 10^{-35} < 0.0001$ (Student' s t-test) (D) *alp7-5A*, *alp7-5E*, *NLS-alp7-5A*, *NLS-alp7-5E* 変異体の温度感受性および TBZ 感受性をスポットテストにより調べた。(E) Alp7-5A-GFP タンパク質の安定性および Alp14 との相互作用についてウエスタンブロッティングにより調べた。

2.6 *alp7-5A* 変異体は制限温度で分裂初期に単極性微小管が観察される

36°Cにおいて温度感受性を示した *alp7-5A* 変異体は、制限温度下で分裂期にどのような異常を示すのだろうか。この点について明らかにするため、微小管マーカーの mCherry-Atb2 とともに 36°Cで生細胞観察を行った。

(図 14A) に示したように、許容温度の 25°Cの時と同様に、Alp7-5A-GFP は 36°Cの分裂期においても核蓄積しなかった。

続いて分裂前期の細胞について経時観察を行ったところ、*5A* 変異体においては細胞質の微小管がなかなか消失せずに残っており、単極性のスピンドル微小管 (monopolar spindle) がみられた(図 14B)。また分裂中期の細胞では細胞質の星状体微小管が異常に安定化され、核内のスピンドル微小管は観察開始から 20 分以上経過しても伸長しなかった。

これらの結果は、Alp7-5A タンパク質が核に移行できずに細胞質で微小管の安定化をもたらしており、かつ核内でのスピンドル形成に欠陥が生じていると解釈できる。安定化された細胞質の微小管の存在がスピンドル微小管の形成・伸長過程に影響を与えている可能性が示唆された。

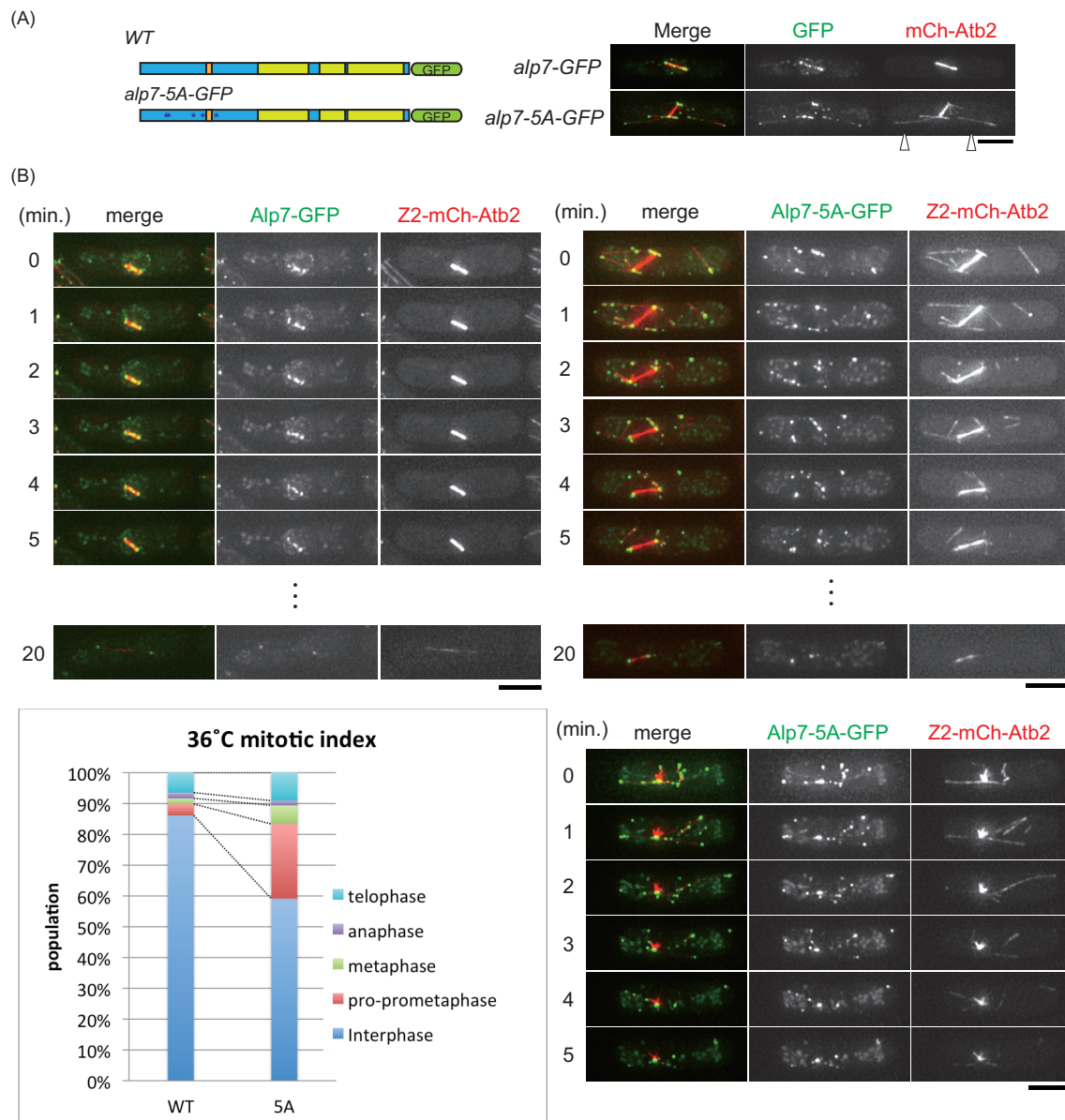


図 14 Alp7-5A は細胞質微小管が安定化しており、分裂初期に単極性のスピンドル微小管が観察される

(A) Alp7-5A-GFP を微小管マーカー mCh-Atb2 とともに 36°C で生細胞観察した。白矢頭：異常に伸長した細胞質の星状体微小管 (B) 36°C における経時観察。左上：野生型、右上：5A 変異体 (分裂中期)、右下：5A 変異体 (分裂初期)、左下：野生型と 5A 変異体における細胞周期の各時期の細胞の割合、スケールバー：5μm

2.7 レプトマイシン B による NLS 活性の評価

先述の *alp7-5A* 変異体では分裂期における核蓄積が低下していた。これは Alp7 の NLS 近傍のリン酸化がその活性を制御しているからだと考えられるが、*5A* 変異体において NLS そのものが活性を失い、核移行自体が起きていない可能性はないだろうか。

この点について解析するため、核外輸送担体である Crm1/Exportin の阻害剤であるレプトマイシン B (Leptomycin B, (Kudo et al., 1998))を用いてエクスポーチンを不活性化し、それぞれの変異体の間期細胞で Alp7 の核蓄積が起こるかどうかを経時的に観察した。

野生型細胞においては、レプトマイシン B を添加して 30 分後では、間期の細胞の約 50% で Alp7 が蓄積していた。添加の約 40 分後では、ほぼ全ての細胞において Alp7-GFP が核蓄積した。これに対し *alp7-5A* 変異体では、添加 40 分後に約 50%、約 50 分後にほぼ全ての細胞において 5A-GFP の核蓄積が観察された(図 15A)。変異型タンパク質が核蓄積している細胞の割合の 5 分おきの経時的な変化を(図 15B)に示した。

この結果は *5A* 変異体に核輸送の活性が残っていることを示しており、*5A* 変異体でみられた分裂期核蓄積低下の原因が、核輸送活性の完全な喪失によるものではないことが明らかになった。

また *alp7-5E* 変異体においても同様の実験を行ったところ、間期細胞で観察されていた 5E-GFP の弱い核蓄積が、レプトマイシン B の添加 20 分後にはほぼ全ての細胞で明瞭な核蓄積として観察された。このことも、*5E* 変異体において核輸送が早まっていることを示している。

以上の結果から、*5A* 変異体においては核輸送活性が残っており、*5A* タンパク質はリン酸化されないために、分裂期においてもその活性が変化しないと結

論した。

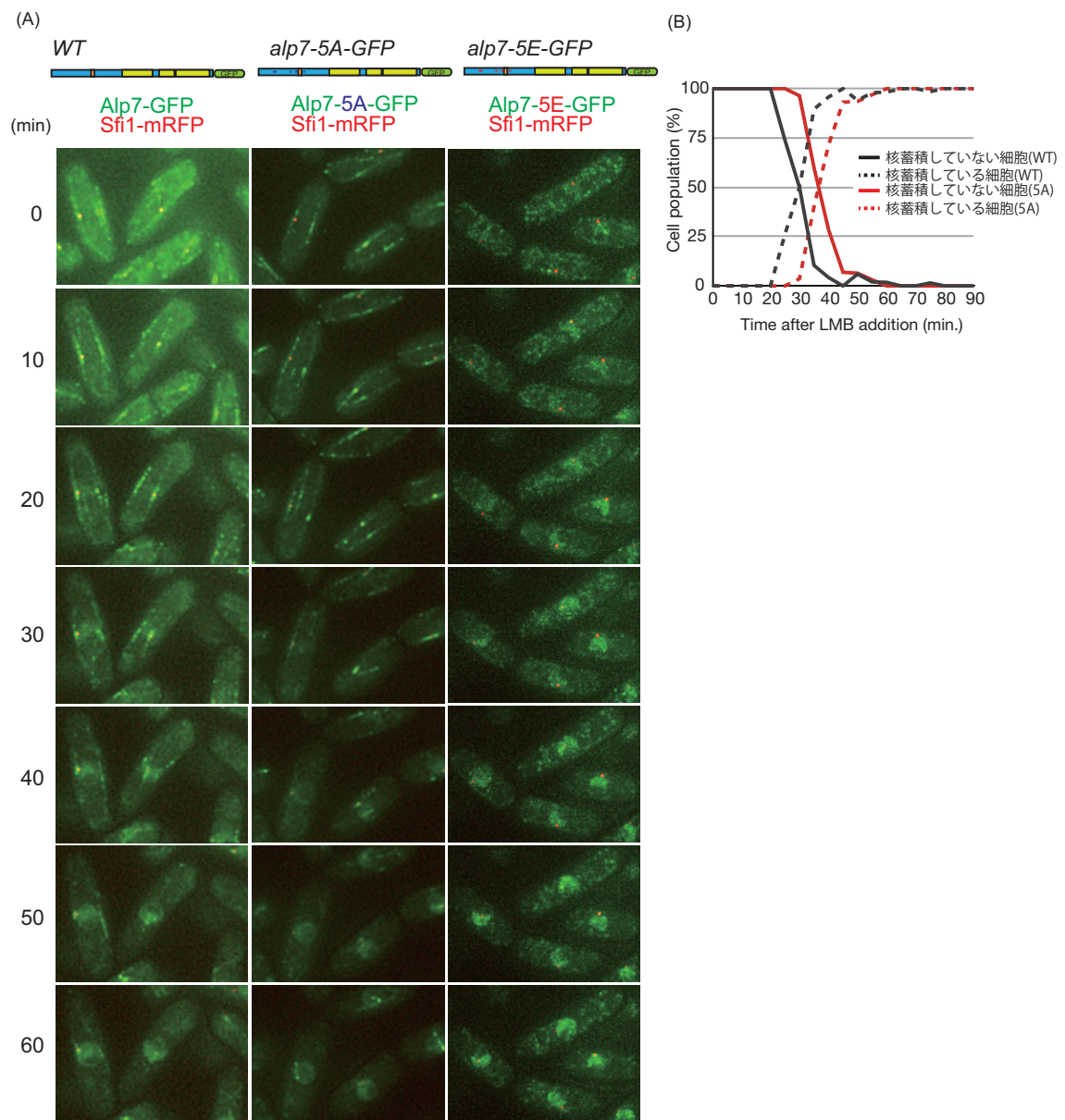


図 15 Alp7-5A-GFP はエクスポーチン阻害剤であるレプトマイシン B により核内に蓄積する

(A) 野生型 *alp7⁺*, *alp7-5A* 変異体, *alp7-5E* 変異体の培養液にエクスポーチン阻害剤であるレプトマイシン B を終濃度 200ng/μl になるように加え経時観察を行った。スケールバー: 5μm (B) 野生型と 5A 変異体において GFP シグナルが核蓄積していない細胞 (実線) と核蓄積している細胞 (点線) の割合の経時的な変化。

2.8 出芽酵母ツーハイブリッドアッセイによる Alp7 と Cut15/importin- α の相互作用の検定

前節までで、Alp7 の N 末端に存在するリン酸化が核輸送を制御することが明らかとなった。それではどのような分子メカニズムによって核輸送は制御されているのだろうか。仮説として Alp7 の N 末端に存在する NLS と核輸送担体 importin タンパク質の相互作用が制御されている可能性が考えられた。

この可能性を探索するため、出芽酵母ツーハイブリッドアッセイを用いて、分裂酵母の importin- α ファミリーに属するタンパク質 Cut15 と Alp7 の相互作用の検討を試みた。importin- α ファミリーは正電荷アミノ酸をリッチに含む (KR-rich)、典型的な NLS 配列を直接的に認識することが知られている (Conti et al., 1998)。

Cut15 の N 末端には importin- β 結合ドメインが存在しており、このドメインが出芽酵母の importin- β と結合してしまうことで Alp7 との相互作用の検出を阻害する可能性があった。そこでまず Cut15 の全長 (Cut15-FL) の他にこのドメインを欠失させた部分欠失型 Cut15 の作製を目指した。Cut15 の出芽酵母ホモログである Kap- α の構造は既に解析されており (Conti et al., 1998)、Cut15 との相同性も高かった (Identities: 58%, Positives: 76%, NCBI Blast2 による相同性)。これに基づき、Kap- α の構造を参考に、NLS 認識に関わるドメインのみを残した部分欠失型 Cut15 (Cut15-80-522) を作製した。同様に Alp7 についても N 末端 (1-209) を残した部分欠失型 Alp7-N-WT, Alp7-N-5A, Alp7-N-5E を作製した。

以上の過程から、Cut15 については Cut15-FL および Cut15-80-522 と Gal4AD の融合タンパク質を、Alp7 については Alp7-FL-WT, Alp7-FL-5A, Alp7-FL-5E, Alp7-N-WT, Alp7-N-5A, Alp7-N-5E と Gal4BD の融合タンパク質

を発現させ、これらの相互作用を検討した(図 16A)。

この結果、Cut15-FL と Alp7-N-WT および Cut15-80-522 と Alp7-N-WT, Alp7-N-5A, Alp7-N-5E の間に相互作用が検出され、特に Cut15-80-522 を用いた時にこれらの相互作用は顕著であった。

そこで、Cut15-80-522 と Alp7-N を用いて相互作用をさらに追究した。この結果、Alp7-N-WT, Alp7-N-5A, Alp7-N-5E のいずれも選択培地上(-LW+3AT)で Cut15-short(80-522)との相互作用が検出された(図 16B)。より厳しい条件の選択培地 (-LWHA)では 5A において若干相互作用の低下が観察された。

これらの事実から Cut15/importin- α は Alp7 の NLS を認識して結合しており、Alp7-5A および Alp7-5E においてもこの結合は保たれていることが判明した。この事実も、変異を導入した 5 箇所が NLS と Cut15 との結合を完全に ON/OFF で切り替えているわけではなく、その活性を間接的に制御している可能性を示している。

図 16C に Alp7-Alp14 複合体の Cut15 による輸送システムの仮説の模式図を記した。Alp7 のリン酸化により Cut15 との相互作用が高まることで核輸送が優勢になり、Alp7-Alp14 複合体が分裂期に核蓄積するモデルを仮説として考えている。

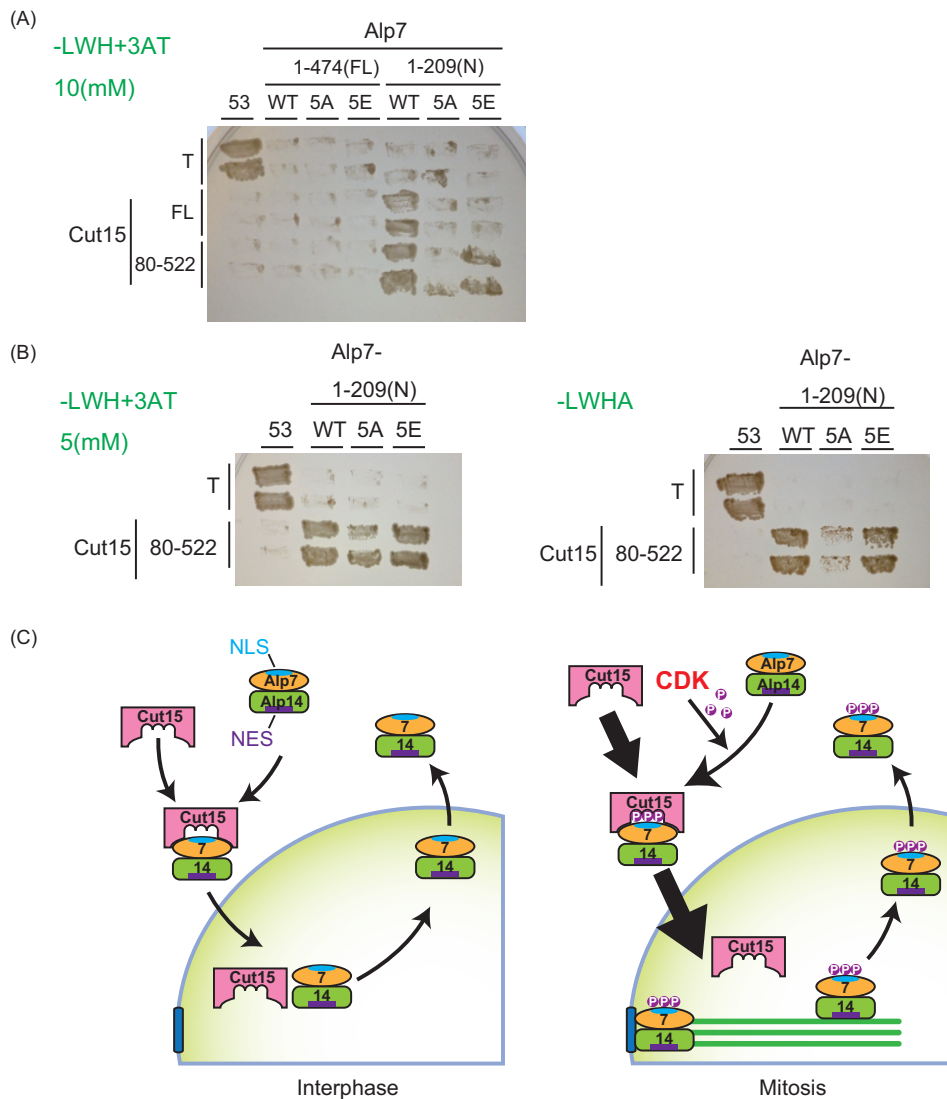


図 16 Cut15-short(80-522) は Alp7-N-WT(1-209), Alp7-N-5A(1-209) および Alp7-N-5E(1-209) と相互作用する

(A) 出芽酵母ツーハイブリッドアッセイによりインポートン- α である Cut15-FL(1-542) および Cut15-short(80-522) と Alp7-FL-WT(1-474), FL-5A, FL-5E, N-5A, N-5E の相互作用を SD-LWH+3AT(10mM) 培地上で検定した。(B) Cut15-short(80-522) と Alp7-N-WT(1-209), Alp7-N-5A(1-209), Alp7-N-5E(1-209) の相互作用を検定した。左上: SD-LWH+3AT(5mM) 培地、右上: SD-LWHA 培地 (C) Cut15 による Alp7-Alp14 複合体の輸送モデルの仮説。リン酸化された Alp7 は Cut15 による核輸送が優勢になる。

2.9 Alp7-T116 が NLS 活性調節に中心的役割を果たす

上記までの *alp7* 変異体の 5 箇所の変異部位の中で NLS 活性制御に中心的役割を果たしているアミノ酸はどの変異部位だろうか。Alp7 のドメイン解析およびリン酸化アッセイの結果から、最も重要な変異部位として NLS 直前に存在する CDK のリン酸化コンセンサスサイトのスレオニンである T116 に注目した。

大腸菌から GST と融合した GST-Alp7-T116A を発現精製し、*in vitro* において CDK によるリン酸化アッセイを行った。この結果、Alp7-T116A では野生型 Alp7 に比べて、わずかにそのシグナルの減少が見られた(図 17A)。このことから T116 は確かに Alp7 のリン酸化部位であると考えられる。そこで続いて、*in vivo* における表現型を確認するため、*alp7-T116A* 変異体を作製してスポットテストにより温度感受性を調べたところ、この *T116A* 変異体は 36°C において顕著な温度感受性を示した(図 17B)。

また *alp7-T116A* 遺伝子に GFP 遺伝子を融合し、Alp7-T116A-GFP の局在を観察した。この結果、*T116A* 変異体では *5A* 変異体で観察されたように、分裂期特異的な核蓄積が大幅に低下してスピンドル微小管への局在も失われた(図 17C)。同様にリン酸化模倣型変異体である *T116E* 変異体および *T116D* 変異体を作製しその表現型を解析した。この結果 *T116E* 変異体においては、*T116A* 変異体ではほとんど局在が観察されなかった変異型 Alp7 のスピンドル微小管上への局在が観察され、*T116A* 変異体において顕著であった温度感受性が若干抑圧されることが明らかになった。

続いて *5A* 変異体の 5 箇所の変異部位のうち、T116 を除いた 4 箇所をアラニンに置換した *alp7-4A (S50A S51A T100A T131A)* 変異体を作製した。この結果、*alp7-4A* 変異体は *5A* 変異体でみられたような温度感受性を示さなかった(図 17D)。また、分裂期における Alp7-4A-GFP の局在を SPB マーカーの Sfi1-mRFP

とともに観察したところ、4A-GFP は野生型とほぼ同様に核蓄積した。

これらの事実から、5箇所の変異部位のうち Alp7 の T116 が NLS 活性調節の中心的役割を果たすアミノ酸であると考えられる。

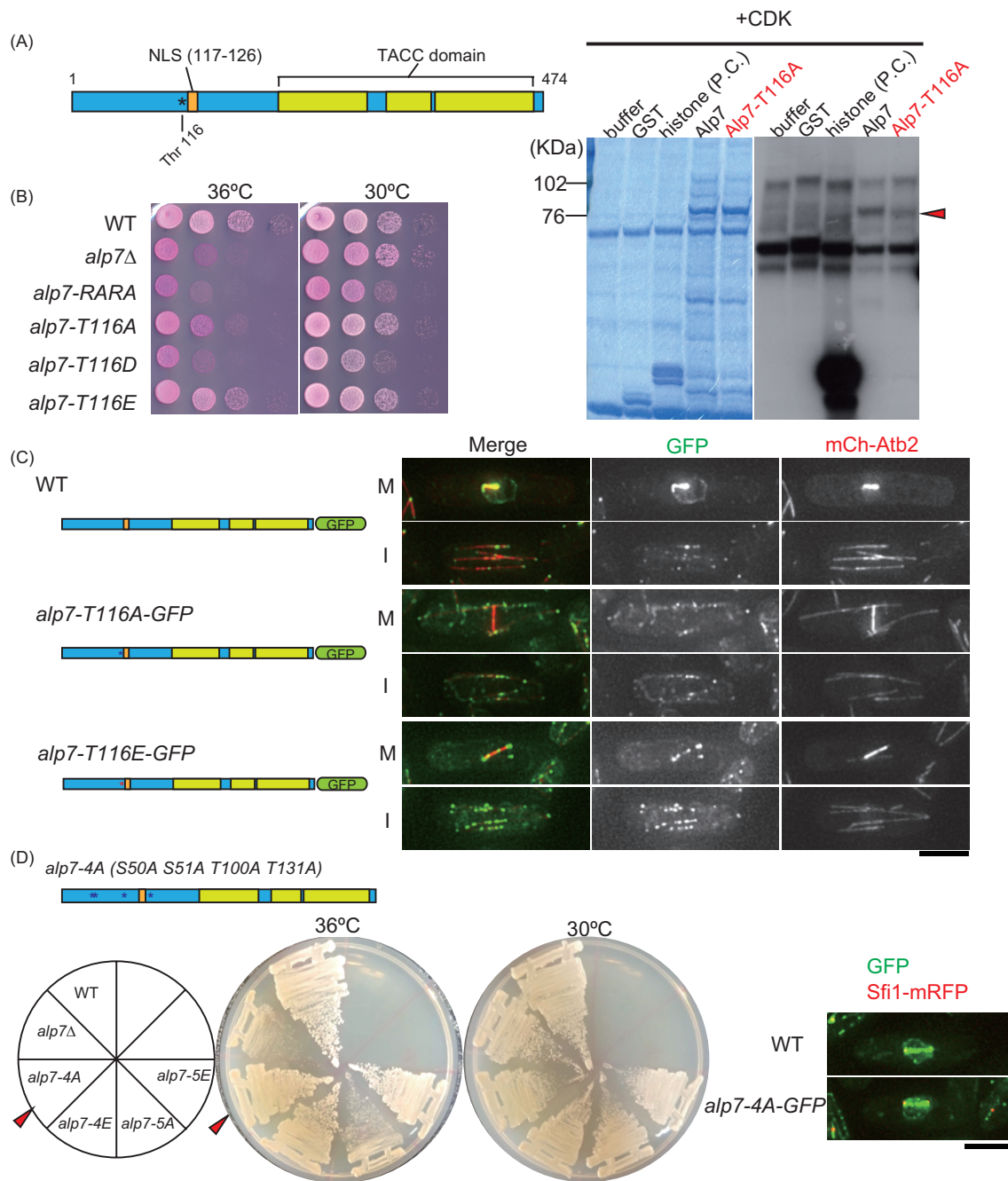


図 17 Alp7-T116A-GFP は核蓄積が低下し、T116A 変異体は温度感受性を示す

(A) Alp7-T116A を大腸菌から発現精製し CDK による *in vitro* のリン酸化アッセイを行った。赤矢頭は Alp7 のバンドを示す。(B) スポットテストにより *alp7*-T116A, *alp7*-T116D, *alp7*-T116E 変異体の温度感受性を調べた。(C) Alp7-T116A-GFP, Alp7-T116E-GFP を微小管マーカー mCh-Atb2 とともに観察した。スケールバー: 5 μ m (D) 5A 変異体で標的にした 5 箇所のうち、T116 を除いた 4 箇所をアラニンに置換した。左: YE 培地上で温度感受性を調べた。矢頭: *alp7*-4A 変異体。 右: Alp7-4A-GFP の分裂期における局在を SPB マーカー Sfi1-mRFP とともに観察した。スケールバー: 5 μ m

2.10

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため本項については非公開

2.11 *alp14-3A, 3D, 7A, 7D*(CDK コンセンサス変異体)変異体は体細胞分裂期において野生型と同様の表現型を示す

それでは分裂期特異的な局在制御に Alp14 が関わっている可能性はないだろうか。2.2 節のリン酸化アッセイにおいて、Alp14 の Plo1 によるリン酸化シグナルは検出されなかったが、CDK によるリン酸化が非常に弱いシグナルとして検出されていた。このため、Alp14 の CDK によるリン酸化が時期特異的な局在制御に関わっていることを想定して CDK のリン酸化コンセンサス変異体を作製した(図 19A)。

既に一章の Alp14 のドメイン解析の結果から、 $\Delta TOG(\Delta 1-500)$ で局在の時期特異性が保たれていることを確認していたので、Alp14 の 501-809 以降の CDK コンセンサス配列に的を絞り解析を行った。

NES 直前までの 3 箇所を変えた *3A*(S543A, S548A, T601A)、*3D*(S543D, S548D, T601D)および 501-809 に存在する全てのコンセンサス部位を変えた *7A*(S543A, S548A, T601A, S696A, S720A, S747A, S767A)、*7D*(S543D, S548D, T601D, S696D, S720D, S747D, S767D)変異体の計 4 種類の変異体を作製し、その局在を観察したが、いずれの変異体においても局在は野生型と同様であった(図 19B)。

このことから Alp14 には CDK による体細胞分裂期に特異的な局在制御は存在しないと考えられる。

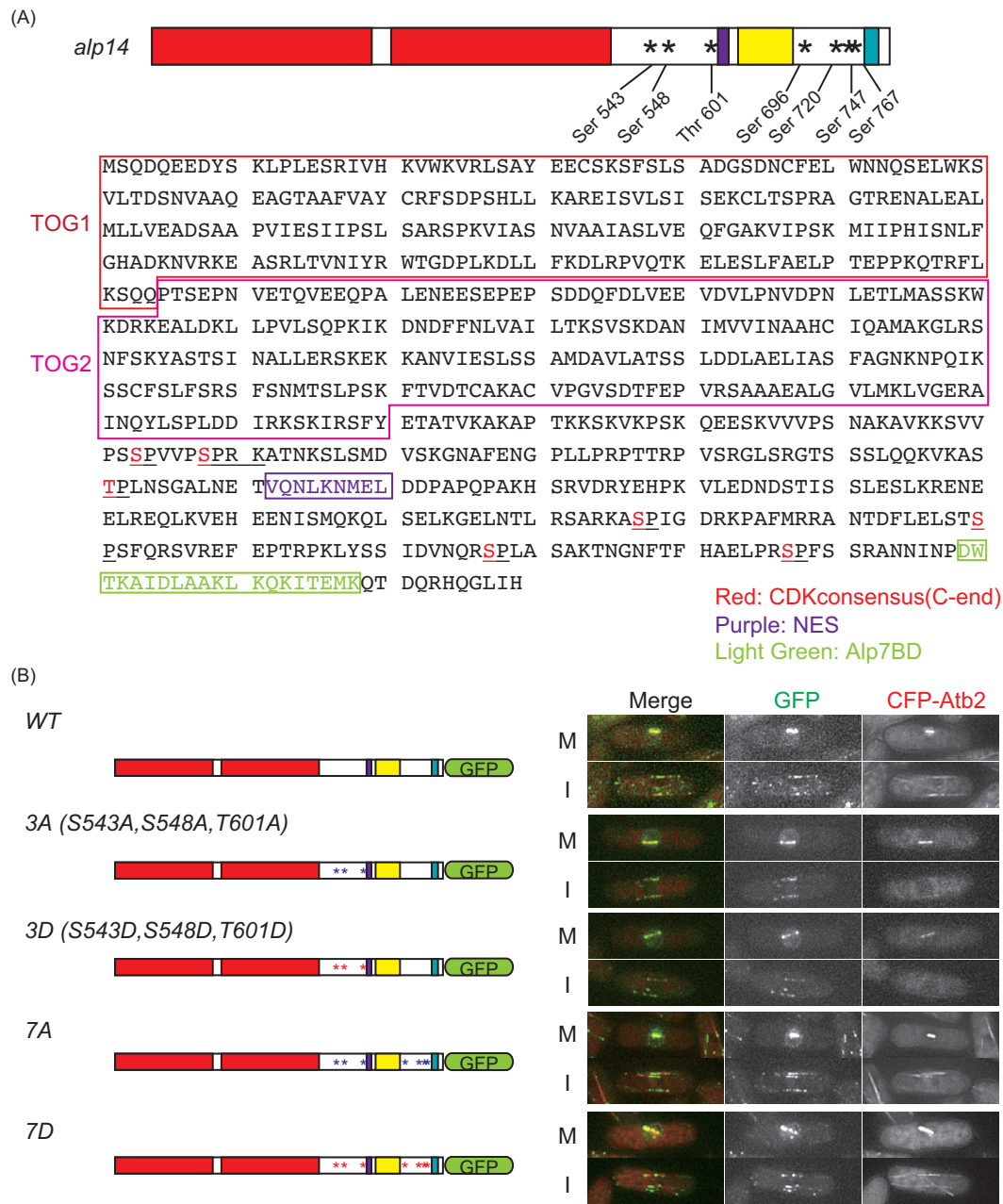


図 19 Alp14 の CDK リン酸化コンセンサス変異体は野生型と同様の局在を示す

(A) 上: *alp14-3A, 3D, 7A, 7D* 変異体において変異させたセリン・スレオニンの模式図。下: Alp14 のアミノ酸配列。変異させたセリン・スレオニンを赤字で示す。(B) *alp14-3A, 3D, 7A, 7D* 変異体の変異型 Alp14 に GFP を融合し、微小管マーカー CFP-Atb2 とともに観察した。スケールバー: 5µm

第 3 章 Alp7 の SPB 局在化の解析

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため本章については非公開

<考察と今後の展望>

第 1 章

1.1 Alp7-Alp14 複合体は Alp14 に存在する NES によって核内から細胞質へと排出される。

本研究の Alp14 のドメイン解析により Alp14 には核外輸送シグナルである NES が存在しており、Alp7-Alp14 は複合体として核外に排出されていることが明らかとなった。

先行研究(Sato et al., 2009)により、Alp7 のロイシン 461 は、

1. Alp14 との結合の活性

2. Alp7 の間期細胞質への排出

の 2 つの役割を担うことが示された。2 では Alp7 が Crm1/Exportin と結合する可能性を示唆しているが、Alp7 の L461 が Alp14 および Crm1/Exportin の結合ドメインとして競合的に機能するのかは不明であった。本研究の Alp14-L615A 変異体の解析によって、Alp14 には NES 活性があり、Alp7 の核外への排出は Alp14 に依存することが判明した。このことは Alp7-L461 は Alp14 との結合サイトとして機能することで、間接的に Alp7 の排出に役割を果たすことを示唆している。

Alp7-Alp14 が複合体として核から細胞質へと排出されていることは、分裂期が終了し間期に移行する際に、微小管の形成場所が速やかに核内から細胞質へと切り替える過程で利点があると考えられる。すなわち複合体を形成している Alp7-Alp14 分子を優先的に核内から排出することで、核内での微小管新生・安定化の活性を最低限に抑制し、細胞質分裂時に形成される微小管を速やかに安定化することが可能となると考えられる。

1.2 Alp14 に存在する NES は疎水性アミノ酸が豊富な古典的 NES に分類される

NLS 配列は正電荷アミノ酸である K および R に富んだ明確なコンセンサス配列が古典的に良く知られているが、これに比べて NES 配列はコンセンサス配列の自由度が比較的高く、コンセンサス配列に該当しない NES も多く見出されている (Bogerd et al., 1996; Fukuda et al., 1996; Henderson, 2000; Engelsma et al., 2004; Fu et al., 2012; Xu et al., 2012)。従って、データベースとの比較によるアミノ酸配列中の NES の特定は NLS に比べて困難であると言える。

本研究では、部分欠失型変異体の作製を通じて特定した領域を抜き出し、GST-GFP タンパク質に融合してレポーターアッセイを行うことで、その NES 配列としての活性を確認した。この結果、Alp14 の 601-620 の配列が NES として十分な働きを持っていると考えられる。

特にこの 601-620 の 20 残基に含まれる 612-620 の 9 残基 (VQNLKNMEL) は、Crm1/Exportin が認識する古典的アミノ酸配列 φ -X₂₋₃- φ -X₂₋₃- φ -X- φ (ただし φ =L, V, I, F, M のいずれか、X は任意) に該当する。今回見出された核外排出活性に必須のアミノ酸である L615 はこの配列の 3 番目の疎水性アミノ酸に相当する。このことから、Alp14 は Crm1/Exportin に直接認識されることが考えられる。Alp14 と Crm1 の in vivo における相互作用の追究は、この点を明らかにする上で重要な実験であると考えられる。しかし、解離が起きやすい輸送因子と積荷タンパク質の結合の検出はタンパク質抽出の際に解離してしまう可能性が高い。予め結合が保たれるようタンパク質抽出液中に GTP を過剰に添加するなど技術的工夫が必要だと考えられる。

1.3 Alp14 の機能ドメインは N 末端に存在する TOG ドメインであり、その微小管への局在は C 末端の Alp7 結合ドメインに依存する

本研究のドメイン解析により、Alp14 の N 末端の TOG ドメインは微小管への局在に影響しないことが明らかになった。この事実は過剰発現系を用いた実験や、*Xenopus laevis* のホモログタンパク質 XMAP215 の *in vitro* における TOG ドメインの解析(Widlund et al., 2011; Al-Bassam et al., 2012)から得られた結果を支持する。現在、TOG ドメインはチューブリン 2 量体を包み込むようにグリップするドメインとして機能しており、TOG タンパク質は微小管のプラス端に TOG ドメインがグリップしたチューブリン分子を会合させることにより微小管の重合を促進し安定化に寄与していると考えられている(Brouhard et al., 2008)。逆説的に、周囲のチューブリン分子の濃度次第で、この TOG ドメインに微小管からチューブリン分子を引きはがして脱重合する活性はないのだろうか。出芽酵母のホモログタンパク質 Stu2 において生体内で脱重合活性があるという報告が存在するが、他の生物種の TOG タンパク質についての報告は未だ存在しない(van Breugel et al., 2003)。また高等生物では 5 つの TOG ドメインを持つ生物が多いのに対し、分裂酵母や出芽酵母では TOG ドメインが 2 つしか存在していない(Ohkura et al., 2001)。これら酵母において TOG タンパク質はチューブリン分子をどのようにグリップしているのだろうか。

XMAP215 の *in vitro* における解析では、5 つ存在する TOG ドメインのうち、N 末端の 2 つのみでも機能することが既に示されている(Widlund et al., 2011)。また本研究のドメイン解析により、分裂酵母において TOG ドメインは少なくとも 1 つ存在すれば機能することが明らかになった。これらの事実から考えて、TOG ドメインはチューブリン分子をグリップする機能を重複して有しており、その数は少なくともタンパク質として機能するが、TOG ドメインの数が多いほ

ど、安定してチューブリン分子を捉えられると考えられる。

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため本段落については非公開

TOG タンパク質の構造解析は既に知見があるが、チューブリン分子を結合する、保存性の高い N 末端の TOG ドメインの構造に限られている (Al-Bassam et al., 2007; Ayaz et al., 2012)。Alp7-Alp14 は主に複合体として機能しているの、今後 Alp7-Alp14 複合体の全体構造が分かれば、チューブリン分子を微小管のプラス端でどのように重合するのか、その触媒としての具体的な機能の解明につながるだろう。

第 2 章

2.1 Alp7-N 末端の CDK によるリン酸化は分裂期特異的核蓄積を促進する

先行研究において、Alp7 の分裂期における核蓄積が CDK の活性に依存することが示されているが、その制御のメカニズムに関しては未知であった。

本研究の解析から、*in vitro* において Alp7 の N 末端が CDK によりリン酸化を受けることが明らかになった。また、このリン酸化部位は *in vivo* においても分裂期特異的にリン酸化されていることが確認された。

これらの結果から、Alp7 の N 末端の直接的な CDK によるリン酸化制御が時期特異的な核蓄積の達成に寄与していることが明らかになったと言える。これは核膜の崩壊しない分裂酵母において Ran-GTP 依存的な微小管形成と CDK による細胞周期のコントロールが微小管結合タンパク質 (MAP) の局在制御を介し

てリンクしている事実を示す重要な結果である。

微小管結合タンパク質が、CDK によってその局在を変化させる例は既にいくつかの知見がある。例えば、分裂酵母は Alp14 の他に、もう一つホモログの TOG タンパク質として Dis1 を持つ(Nabeshima et al., 1995; Nakaseko et al., 2001) が、Dis1 は CDK に直接リン酸化を受け、分裂期の動原体に局在することが既に知られている(Aoki et al., 2006)。このリン酸化がどのように Dis1 の局在を分裂期の動原体へと制御しているのかは未だ明らかではない。また微小管を束ねる働きを持つ Ase1/PRC1(Pellman et al., 1995; Loiodice et al., 2005; Yamashita et al., 2005)も CDK によりその局在を制御されることが知られている(Fu et al., 2009)。分裂酵母において Ase1 は分裂後期のスピンドル微小管の伸長に関わるキネシン Klp9 (kinesin-6 family)と結合する。Ase1 は CDK によりリン酸化され、分裂後期の開始まで Klp9 との結合が阻害されている(Fu et al., 2009)。またヒト HeLa 細胞でも微小管を束ねる NuSAP (Nucleolar and spindle associated protein)が CDK のリン酸化により中期スピンドル微小管への結合を阻害されていることが明らかになっている(Chou et al., 2011)。これらの場合、CDK のリン酸化は MAP の分裂期スピンドル微小管への結合、および構造変化の進行に阻害的に働いていると言える。

これに対し、本研究で見つかった CDK によるリン酸化は、MAP を分裂期の微小管に局在させるために促進的に働いていると考えられる。

2.2 *alp7-5A*, *alp7-5E* 変異体から考察される CDK による Alp7-Alp14 の輸送制御システム

alp7-5A, *alp7-5E* 変異体を用いた解析により、Alp7-5A-GFP は分裂期の核蓄積が顕著に低下していた。しかしレプトマイシン B を添加して NES を不活化し

た場合は、Alp7-5A-GFP は核蓄積した。これらの事実から Alp7-5A-GFP は核輸送活性を保持しているが、分裂期に核に蓄積できないと言える。5 箇所のリン酸化部位が Alp7 の NLS 近傍にあり、かつ NES が Alp14 にあることから考えて、リン酸化の影響は NES ではなく NLS を調節すると考えられる。すなわち、Alp7-Alp14 複合体の分裂期核蓄積は、Alp7 の N 末端のリン酸化により NLS 活性が分裂期特異的に上昇することで引き起こされると考えられる。リン酸化を模倣した *alp7-5E* 変異体においては、変異体タンパク質が分裂期だけでなく間期においても核蓄積している様子が観察された。これも分裂期の核輸送加速のモデルを示唆する結果であると言える。

分裂期に核輸送が加速する分子機構としては、出芽酵母ツーハイブリッド法で Alp7 および Alp7-5A と Cut15/importin- α の相互作用が検出されたことから、Alp7-N 末端のリン酸化が Alp7-NLS と Cut15 との相互作用を促進する可能性を現在の仮説として考えている。

現在、免疫沈降実験による Alp7 と Cut15 の相互作用の検出を考えており、Alp7 と Cut15 の相互作用に間期と分裂期で差があるのか、リン酸化部位の寄与はあるかについて解析を試みている。現在までの免疫沈降実験では Alp7 と Cut15 の相互作用を検出することに成功していない。考察 1.2 項でも論じたが、輸送因子と積荷タンパク質の結合を検出するために技術的工夫をする必要がありと考えられ、現在は過剰発現系を用いた免疫沈降を試みている。

また、レプトマイシン B を添加した実験において、*alp7-5A* 変異体では野生型に比べて核蓄積速度が約 10 分遅れていた。これは 5A 変異体においては間期の核輸送速度が若干ながら低下していることを示している。これと同様の結果として、出芽酵母ツーハイブリッドアッセイの実験で、Alp7-5A と Cut15 の相互作用は野生型 Alp7 と Cut15 の相互作用に比べて弱くなっていた。

これらは *5A* 変異体で *Alp7-5A* の NLS そのものに若干影響が出ていることを示す結果である。*Alp7-5A* で置換した 5 箇所のリン酸化部位に恒常的なリン酸化部位が含まれないのか、これらのリン酸化がいかにして分裂期特異的に NLS を活性化するのかを明らかにすることは重要な課題と言える。

5A 変異体で置換した 5 箇所のうち、T116 を除く 4 箇所(S50 S51 T100 T131)に変異を導入した *4A* 変異体では野生型と同様に *4A-GFP* の分裂期における核蓄積が観察された。一方で *T116A* 変異体では、*5A* 変異体と同様に分裂期の核蓄積が低下した。これらの事実から、特に 116 番目のスレオニンが重要なリン酸化部位であると考えられる。

今後の実験として、野生型、および非リン酸化型、リン酸化模倣型の各変異体を用いて、間期細胞と分裂開始直前の細胞にレプトマイシン B を添加して NES を不活化した上で、*Alp7-Alp14* の核蓄積速度に差があるか定量することを考えている。この実験によって、間期と分裂期における NLS 活性がリン酸化部位依存的に変化しているかについて、より厳密に議論できると考えている。

2.3 *Alp7* の核蓄積は、微小管の時空間特異的制御を達成する生理的意義を持つ

Alp7 の核蓄積の生理的意義は何であろうか。

野生型細胞では、分裂期の開始に先立ち細胞質の微小管は速やかに消失し、微小管の新生はスピンドル微小管の形成に集約されている。

しかし、*Alp7* の CDK によるリン酸化サイトをアラニンに置換した *alp7-5A*

変異体では温度感受性が観察され、分裂初期のスピンデル微小管の形成異常が観察された。*5A* 変異体においては、分裂期が開始してスピンデル微小管の形成が始まっても細胞質の微小管が極度に安定化されていた。核内で機能する Alp7 が極端に少ないこと、細胞質の微小管が安定化され残存していること、これらの 2 点がスピンデル微小管の形成不全、すなわち単極性スピンドルを引き起こしていると考えられる。また *5A* 変異体では分裂中期のスピンデル微小管伸長にも影響があった。これは細胞質の星状体微小管の伸長がスピンデル微小管の伸長を妨げる働きをしている可能性がある。

これらの事実は、間期から分裂期の移行に際して、微小管の形成される空間（分裂酵母においては細胞質と核内）が明確に切り替わること、すなわち微小管形成の時空間特異的制御の重要性を示唆している。

細胞質の微小管が分裂期に先立って速やかに消失することは、機能的なスピンドル微小管を形成する上で、細胞内のチューブリン濃度の観点から利点があると想像される。すなわち、細胞質微小管の消失により、細胞内に存在するチューブリン濃度を高め、間期微小管に比べてダイナミクスの高いスピンドル微小管を速やかに大量に構築できる点である。

in vitro 実験系において、微小管の形成速度がチューブリン濃度に依存して変化することは広く知られている(Walker et al., 1988)。分裂期のスピンデル微小管が形成される際にチューブリン濃度を高める目的で細胞質微小管が消失している可能性は充分考えられる。この可能性を探索する上で、微小管を構成するチューブリン分子に、本研究で明らかにされたような輸送制御が存在しているのかは非常に興味深い問題である。

分裂酵母において、同様に細胞周期の中で核・細胞質間をシャトルするタンパク質として kinesin-8 ファミリーに属する Klp5-Klp6 複合体が知られている

(Garcia et al., 2002)。このキネシン複合体も間期には細胞質、分裂期には核内のスピンドル微小管で機能するが、その核輸送は Klp5、Klp6 にそれぞれ NLS が存在して別々に核輸送されることが既に明らかとなっている(Unsworth et al., 2008)。また、Klp5 の NLS 近傍にも CDK のリン酸化コンセンサス配列が存在しており、この部位のリン酸化によって分裂期 NLS 活性の上昇が起きている可能性が考えられる。本研究で解析された CDK による分裂期核輸送の活性上昇が、核-細胞質間をシャトルするタンパク質全般にみられる普遍的なシステムなのか追究することは、今後の課題の 1 つと言える。

第 3 章

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため本章については非公開

<まとめ>

本研究により、微小管結合タンパク質である Alp7-Alp14 複合体が Alp14 の NES を介して核外排出されるシャトルするタンパク質複合体であることが明らかとなった。また Alp7-Alp14 複合体は Alp7-NLS 近傍の CDK によるリン酸化を介して核輸送を加速させて核蓄積し、スピンドル微小管形成を促進していることが判明した。複合体の核輸送は Cut15/Importin- α が Alp7-NLS を認識して直接結合することによって起きていた。CDK による Alp7-N 末のリン酸化が Cut15 との相互作用を分裂期特異的に高めている可能性が考えられる。

Alp7 が分裂期に核蓄積しない変異体では、細胞質微小管の異常な安定化・伸長が観察され、核内のスピンドル微小管の初期形成に大きな障害が観察された。

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないために
本段落については非公開

以上の解析結果を(図 23)にまとめた。

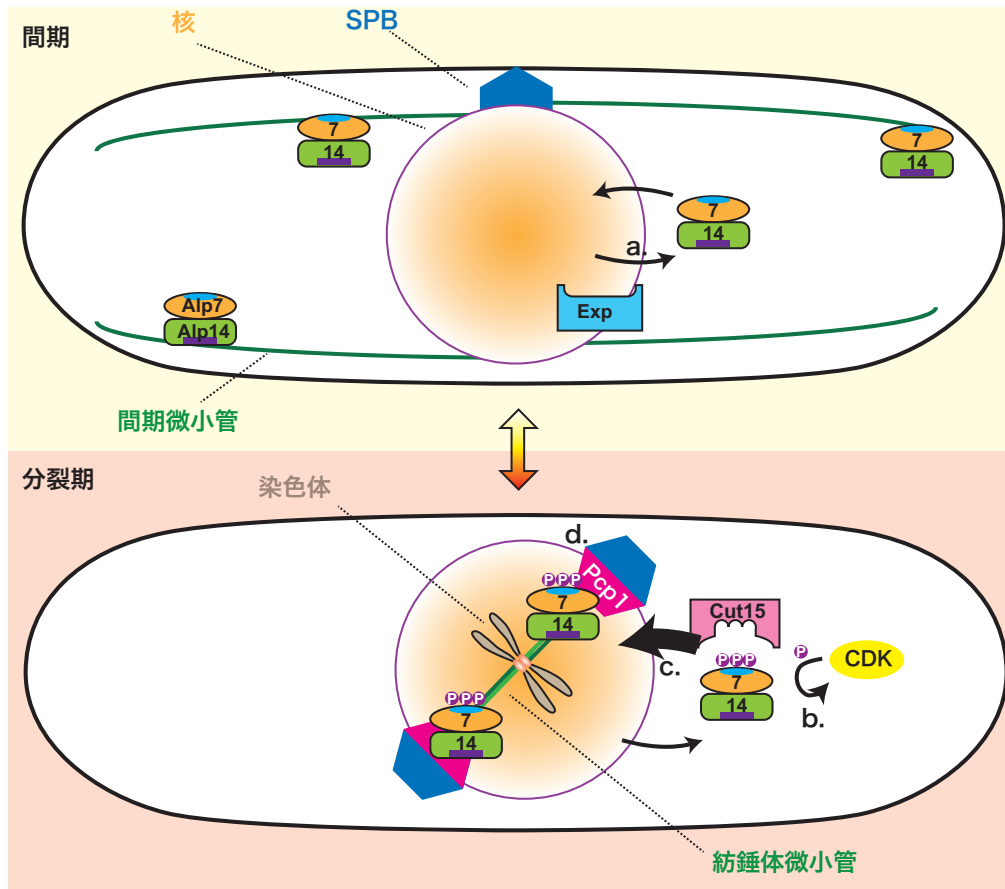


図 23 Alp7-Alp14 複合体は CDK のリン酸化により分裂期に核蓄積し、SPB タンパク質 Pcp1 と結合して紡錘体微小管の形成を促進する

- 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。

分裂酵母の SAF(Spindle Assembly Factor)である Alp7-Alp14 は複合体として働き、機能ドメインである Alp14 の局在を相互作用する Alp7 がコントロールしている。このタンパク質複合体は分裂期に核蓄積することで、核内の微小管形成の活性を高めて、染色体分配を正確に行うためのスピンドル微小管の初期形成過程に重要な働きをしている。

細胞周期と厳密にリンクしてその形成場所を変化させる微小管構造の再編成

のシステムは、今まで大きな謎であった。

本研究は細胞周期進行に残されたこの謎の解明に迫り、細胞周期の進行と微小管再編成の過程をリンクさせる 1 つの大事な鍵が、SAF である微小管結合タンパク質の局在制御であることを明らかにした。

細胞周期進行と微小管構造の変化の全貌の解明には

1. 微小管結合タンパク質の細胞周期依存的な輸送制御
2. 微小管形成起点である SPB の細胞周期依存的な制御の追究
3. 微小管構造の最小単位であるチューブリン分子そのものの時期特異的な輸送制御のメカニズム

の 3 点が大きな鍵になると考えられる。

今回明らかになった微小管結合タンパク質の制御の更なる詳細な分子メカニズムを追究するとともに、残された 2,3 の制御を明らかにしていくことが、この分野に残された使命と言える。

<謝辞>

本研究は早稲田大学先進理工学部生命医科学科の佐藤政充研究室、および東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻の山本正幸研究室で行われたものです。東京大学大学院の学生として東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻の飯野雄一研究室にお世話になりました。また研究環境を共有させていただいた塩見美喜子研究室のみなさまに感謝しています。

本研究の遂行にあたって日本学術振興会より研究遂行奨励費として支援をいただきました。

本研究を進めるにあたり、英国癌研究所の登田隆先生には実験に使用した株、および Alp7 のペプチドアレイをご提供していただき、登田研の Nhang-Heok Tang 氏を交え有益な議論をさせていただきました。Crm1 阻害剤のレプトマイシン B は理化学研究所の吉田稔先生にいただきました。plo.ts2 株は英国癌研 Paterson 研究所の Iain Hagan 博士にいただきました。pcp1-128 変異体は新井邦生博士からいただきました。また本研究に使用したプラスミドの一部は角井康貢博士および新井邦生博士にいただきました。この場を借りて感謝致します。

研究を遂行する環境を与えてくださり、有益な御助言を下さった山本正幸教授に感謝いたします。また研究生活を支えてくださった山本研究室のスタッフおよび学生の皆様、特に研究内容が近く常に議論してくださった角井康貢博士、太田緑博士、新井邦生博士に感謝致します。同じく研究生活を支えてくれた佐藤研究室のメンバーに感謝いたします。

最後に、研究環境を提供してくださり、実験の指導、助言、議論の全てに御支援をいただいた佐藤政充准教授に深く感謝いたします。また学生生活を支援して下さった飯野雄一教授、秘書の岩原由加子さんに感謝いたします。

そして研究生活を全面的にバックアップしてくれた父と母と多くの同輩友人達に心から感謝しています。

< 文献 >

Al-Bassam, J., Kim, H., Flor-Parra, I., Lal, N., Velji, H., and Chang, F. (2012). Fission yeast Alp14 is a dose-dependent plus end-tracking microtubule polymerase. *Molecular Biology of the Cell* *23*, 2878–2890.

Al-Bassam, J., Larsen, N.A., Hyman, A.A., and Harrison, S.C. (2007). Crystal structure of a TOG domain: conserved features of XMAP215/Dis1-family TOG domains and implications for tubulin binding. *Structure* *15*, 355–362.

Aoki, K., Nakaseko, Y., Kinoshita, K., Goshima, G., and Yanagida, M. (2006). Cdc2 Phosphorylation of the Fission Yeast Dis1 Ensures Accurate Chromosome Segregation. *Current Biology* *16*, 1627–1635.

Ayaz, P., Ye, X., Huddleston, P., Brautigam, C.A., and Rice, L.M. (2012). A TOG: $\alpha\beta$ -tubulin complex structure reveals conformation-based mechanisms for a microtubule polymerase. *Science* *337*, 857–860.

Bähler, J., Wu, J., Longtine, M., Shah, N., McKenzie, A., Steever, AB, Wach, A., Philippsen, P., and Pringle, J. (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces Pombe*.

Bellanger, J.-M., and Gönczy, P. (2003). TAC-1 and ZYG-9 Form a Complex that Promotes Microtubule Assembly in *C. elegans* Embryos. *Current Biology* *13*, 1488–1498.

- Bischoff, F.R., and Ponstingl, H. (1991). Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature* *354*, 80–82.
- Bogerd, H.P., Fridell, R.A., Benson, R.E., Hua, J., and Cullen, B.R. (1996). Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay. *Molecular and Cellular Biology* *16*, 4207–4214.
- Brouhard, G.J., Stear, J.H., Noetzel, T.L., Al-Bassam, J., Kinoshita, K., Harrison, S.C., Howard, J., and Hyman, A.A. (2008). XMAP215 Is a Processive Microtubule Polymerase. *Cell* *132*, 79–88.
- Carazo-Salas, R.E., Gruss, O.J., Mattaj, I.W., and Karsenti, E. (2001). Ran–GTP coordinates regulation of microtubule nucleation and dynamics during mitotic-spindle assembly. *Nat Cell Biol* *3*, 228–234.
- Carazo-Salas, R.E., Guarguaglini, G., Gruss, O.J., Segref, A., Karsenti, E., and Mattaj, I.W. (1999). Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for chromatin-induced mitotic spindle formation. *Nature* *400*, 178–181.
- Chou, H.-Y., Wang, T.-H., Lee, S.-C., Hsu, P.-H., Tsai, M.-D., Chang, C.-L., and Jeng, Y.-M. (2011). Phosphorylation of NuSAP by Cdk1 regulates its interaction with microtubules in mitosis. *Cc* *10*, 4083–4089.
- Clarke, P.R., and Zhang, C. (2001). Ran GTPase: a master regulator of nuclear structure and function during the eukaryotic cell division cycle? *Trends in Cell Biology* *11*, 366–371.

- Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G., and Kuriyan, J. (1998). Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin α . *Cell* *94*, 193–204.
- Dasso, M. (2001). Running on Ran: nuclear transport and the mitotic spindle. *Cell* *104*, 321–324.
- Ding, R., West, R.R., Morphew, D., Oakley, B., and McIntosh, J. (1997). The spindle pole body of *Schizosaccharomyces pombe* enters and leaves the nuclear envelope as the cell cycle proceeds. *Molecular Biology of the Cell* *8*, 1461.
- Engelsma, D., Bernad, R., Calafat, J., and Fornerod, M. (2004). Supraphysiological nuclear export signals bind CRM1 independently of RanGTP and arrest at Nup358. *Embo J* *23*, 3643–3652.
- Flory, M.R., Morphew, M., Joseph, J.D., Means, A.R., and Davis, T.N. (2002). Pcp1p, an Spc110p-related Calmodulin Target at the Centrosome of the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Growth & Differentiation* *13*, 47.
- Fong, C.S., Sato, M., and Toda, T. (2009). Fission yeast Pcp1 links polo kinase-mediated mitotic entry to γ -tubulin-dependent spindle formation. *Embo J* *29*, 120–130.
- Fu, C., Ward, J.J., Loiodice, I., Velve-Casquillas, G., Nedelec, F.J., and Tran, P.T. (2009). Phospho-Regulated Interaction between Kinesin-6 Klp9p and

Microtubule Bundler Ase1p Promotes Spindle Elongation. *Developmental Cell* 17, 257–267.

Fu, S.C., Huang, H.C., Horton, P., and Juan, H.F. (2012). ValidNESs: a database of validated leucine-rich nuclear export signals. *Nucleic Acids Research* 41, D338–D343.

Fukuda, M., Gotoh, I., Gotoh, Y., and Nishida, E. (1996). Cytoplasmic localization of mitogen-activated protein kinase kinase directed by its NH₂-terminal, leucine-rich short amino acid sequence, which acts as a nuclear export signal. *Journal of Biological Chemistry* 271, 20024–20028.

Garcia, M.A., Koonrugsa, N., and Toda, T. (2002). Two Kinesin-like Kin I Family Proteins in Fission Yeast Regulate the Establishment of Metaphase and the Onset of Anaphase A. *Current Biology* 12, 610–621.

Gergely, F., Kidd, D., Jeffers, K., Wakefield, J.G., and Raff, J.W. (2000). D-TACC: a novel centrosomal protein required for normal spindle function in the early *Drosophila* embryo. *Embo J* 19, 241–252.

Gruss, O.J., and Vernos, I. (2004). The mechanism of spindle assembly functions of Ran and its target TPX2. *The Journal of Cell Biology* 166, 949–955.

Gruss, O.J., Carazo-Salas, R.E., Schatz, C.A., Guarguaglini, G., Kast, J., Wilm, M., Le Bot, N., Vernos, I., Karsenti, E., and Mattaj, I.W. (2001). Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin α on TPX2 activity. *Cell* 104, 83–93.

Gutz, H., Heslot, E., Leupold, U. and Lopreno, N. (1974). *Shizosaccharomyces pombe*. in *Handbook of Genetics*. Plenum Publishing Corporation.

Hagan, I., and Hyams, J. (1988). The use of cell division cycle mutants to investigate the control of microtubule distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Cell Science* 89, 343–357.

Hagan, I.M. (1998). The fission yeast microtubule cytoskeleton. *Journal of Cell Science* 111, 1603–1612.

Hayles, J., and Nurse, P. (2001). Access : A journey into space : Nature Reviews Molecular Cell Biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 647–656.

Henderson, B. (2000). A Comparison of the Activity, Sequence Specificity, and CRM1-Dependence of Different Nuclear Export Signals. *Experimental Cell Research* 256, 213–224.

Hiraoka, Y., Toda, T., and Yanagida, M. (1984). The NDA3 gene of fission yeast encodes β -tubulin: A cold-sensitive *nda3* mutation reversibly blocks spindle formation and chromosome movement in mitosis. *Cell* 39, 349–358.

Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23–28.

Kakui, Y., Sato, M., Okada, N., Toda, T., and Yamamoto, M. (2013). Microtubules and Alp7–Alp14 (TACC–TOG) reposition chromosomes before meiotic segregation. *Nat Cell Biol* 15, 786–796.

Karsenti, E., and Vernos, I. (2001). The mitotic spindle: a self-made machine. *Science* *294*, 543–547.

Kinoshita, K., Noetzel, T.L., Pelletier, L., Mechtler, K., Drechsel, D.N., Schwager, A., Lee, M., Raff, J.W., and Hyman, A.A. (2005). Aurora A phosphorylation of TACC3/maskin is required for centrosome-dependent microtubule assembly in mitosis. *The Journal of Cell Biology* *170*, 1047–1055.

Kirschner, M., and Mitchison, T. (1986). Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell* *45*, 329–342.

Koffa, M.D., Casanova, C.M., Santarella, R., Köcher, T., Wilm, M., and Mattaj, I.W. (2006). HURP is part of a Ran-dependent complex involved in spindle formation. *Current Biology* *16*, 743–754.

Kudo, N., Wolff, B., Sekimoto, T., Schreiner, E.P., Yoneda, Y., Yanagida, M., Horinouchi, S., and Yoshida, M. (1998). Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Experimental Cell Research* *242*, 540–547.

Kufer, T.A. (2002). Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle. *The Journal of Cell Biology* *158*, 617–623.

Le Bot, N., Tsai, M.-C., Andrews, R.K., and Ahringer, J. (2003). TAC-1, a Regulator of Microtubule Length in the *C. elegans* Embryo. *Current Biology* *13*, 1499–1505.

Lee, M.J., Gergely, F., Jeffers, K., Peak-Chew, S.Y., and Raff, J.W. (2001). Msps/XMAP215 interacts with the centrosomal protein D-TACC to regulate microtubule behaviour. *Nat Cell Biol* 3, 643–649.

Loiodice, I., Staub, J., Setty, T.G., Nguyen, N.-P.T., Paoletti, A., and Tran, P. (2005). Ase1p organizes antiparallel microtubule arrays during interphase and mitosis in fission yeast. *Molecular Biology of the Cell* 16, 1756–1768.

MacIver, F.H., Tanaka, K., Robertson, A.M., and Hagan, I.M. (2003). Physical and functional interactions between polo kinase and the spindle pole component Cut12 regulate mitotic commitment in *S. pombe*. *Genes & Development* 17, 1507–1523.

Matsumoto, T., and Beach, D. (1991). Premature initiation of mitosis in yeast lacking RCC1 or an interacting GTPase. *Cell* 66, 347–360.

Nabeshima, K., Kurooka, H., Takeuchi, M., Kinoshita, K., Nakaseko, Y., and Yanagida, M. (1995). p93dis1, which is required for sister chromatid separation, is a novel microtubule and spindle pole body-associating protein phosphorylated at the Cdc2 target sites. *Genes & Development* 9, 1572–1585.

Nakajima, H., Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., and Nishida, E. (2003). Identification of a Consensus Motif for Plk (Polo-like Kinase) Phosphorylation Reveals Myt1 as a Plk1 Substrate*. *Journal of Biological Chemistry* 278, 25277–25280.

- Nakaseko, Y., Goshima, G., Morishita, J., and Yanagida, M. (2001). M phase-specific kinetochore proteins in fission yeast. *Current Biology* *11*, 537–549.
- Ohba, T. (1999). Self-Organization of Microtubule Asters Induced in *Xenopus* Egg Extracts by GTP-Bound Ran. *Science* *284*, 1356–1358.
- Ohkura, H., Garcia, M.A., and Toda, T. (2001). Dis1/TOG universal microtubule adaptors—one MAP for all? *Journal of Cell Science* *114*, 3805–3812.
- Okazaki, K., Okazaki, N., Kume, K., Jinno, S., Tanaka, K., and Okayama, H. (1990). High-frequency transformation method and library transducing vectors for cloning mammalian cDNAs by trans-complementation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Research* *18*, 6485–6489.
- Oliferenko, S., and Balasubramanian, M.K. (2002). Astral microtubules monitor metaphase spindle alignment in fission yeast. *Nat Cell Biol* *4*, 816–820.
- Pellman, D., Bagget, M., Tu, Y., Fink, G.R., and Tu, H. (1995). Two microtubule-associated proteins required for anaphase spindle movement in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology* *130*, 1373–1385.
- Peset, I., Seiler, J., Sardon, T., Bejarano, L.A., Rybina, S., and Vernos, I. (2005). Function and regulation of Maskin, a TACC family protein, in microtubule growth during mitosis. *The Journal of Cell Biology* *170*, 1057–1066.

Rajagopalan, S., Bimbo, A., Balasubramanian, M.K., and Oliferenko, S. (2004). A Potential Tension-Sensing Mechanism that Ensures Timely Anaphase Onset upon Metaphase Spindle Orientation. *Current Biology* *14*, 69–74.

Russell, P., and Nurse, P. (1986). *cdc25+* functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* *45*, 145–153.

Sambrook, J., Fritsch, E.F and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*.

Sato, M., and Toda, T. (2007). Alp7/TACC is a crucial target in Ran-GTPase-dependent spindle formation in fission yeast. *Nature* *447*, 334–337.

Sato, M., Dhut, S., and Toda, T. (2005). New drug-resistant cassettes for gene disruption and epitope tagging in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* *22*, 583–591.

Sato, M., Okada, N., Kakui, Y., Yamamoto, M., Yoshida, M., and Toda, T. (2009). Nucleocytoplasmic transport of Alp7/TACC organizes spatiotemporal microtubule formation in fission yeast. *EMBO Reports* *10*, 1161–1167.

Sato, M., Vardy, L., Garcia, M.A., Koonrugsa, N., and Toda, T. (2004). Interdependency of fission yeast Alp14/TOG and coiled coil protein Alp7 in microtubule localization and bipolar spindle formation. *Molecular Biology of the Cell* *15*, 1609–1622.

Silljé, H.H., Nagel, S., Körner, R., and Nigg, E.A. (2006). HURP is a Ran-importin β -regulated protein that stabilizes kinetochore microtubules in the vicinity of chromosomes. *Current Biology* 16, 731–742.

Tallada, V.A., Tanaka, K., Yanagida, M., and Hagan, I.M. (2009). The *S. pombe* mitotic regulator Cut12 promotes spindle pole body activation and integration into the nuclear envelope. *The Journal of Cell Biology* 185, 875–888.

Toda, T., Umesono, K., Hirata, A., and Yanagida, M. (1983). Cold-sensitive nuclear division arrest mutants of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Molecular Biology* 168, 251–270.

Tsukahara, T., Tanno, Y., and Watanabe, Y. (2010). Phosphorylation of the CPC by Cdk1 promotes chromosome bi-orientation. *Nature* 467, 719–723.

Umesono, K., Hiraoka, Y., Toda, T., and Yanagida, M. (1983). Visualization of chromosomes in mitotically arrested cells of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Current Genetics* 7, 123–128.

Unsworth, A., Masuda, H., Dhut, S., and Toda, T. (2008). Fission yeast kinesin-8 Klp5 and Klp6 are interdependent for mitotic nuclear retention and required for proper microtubule dynamics. *Molecular Biology of the Cell* 19, 5104–5115.

van Breugel, M., Drechsel, D., and Hyman, A. (2003). Stu2p, the budding yeast member of the conserved Dis1/XMAP215 family of

microtubule-associated proteins is a plus end-binding microtubule destabilizer. *The Journal of Cell Biology* *161*, 359–369.

Walker, R., O'brien, E., Pryer, N., Soboeiro, M., Voter, W., Erickson, H., and Salmon, E. (1988). Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *The Journal of Cell Biology* *107*, 1437–1448.

Widlund, P.O., Stear, J.H., Pozniakovsky, A., Zanic, M., Reber, S., Brouhard, G.J., Hyman, A.A., and Howard, J. (2011). XMAP215 polymerase activity is built by combining multiple tubulin-binding TOG domains and a basic lattice-binding region. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *108*, 2741–2746.

Wilde, A. (1999). Stimulation of Microtubule Aster Formation and Spindle Assembly by the Small GTPase Ran. *Science* *284*, 1359–1362.

Xu, D., Grishin, N.V., and Chook, Y.M. (2012). NESdb: a database of NES-containing CRM1 cargoes. *Molecular Biology of the Cell* *23*, 3673–3676.

Yamashita, A., Sato, M., Fujita, A., Yamamoto, M., and Toda, T. (2005). The roles of fission yeast *ase1* in mitotic cell division, meiotic nuclear oscillation, and cytokinesis checkpoint signaling. *Molecular Biology of the Cell* *16*, 1378–1395.

