

## 論文内容の要旨

### 論文題目

Studies of the mechanism of the exit from mitosis by the Tem1/Cdc15 pathway in *Saccharomyces cerevisiae*  
(Tem1/Cdc15 経路による出芽酵母細胞周期 M 期終了機構に関する研究)

浅川和秀

**概要:** 真核細胞は複製された染色体を有糸分裂によって分配し、細胞質分裂によって二つの娘細胞を生み出す。このとき遺伝情報が娘細胞に正確に受け継がれるためには、核分裂周期と細胞分裂周期が適切に連携しなくてはならない。細胞周期 M 期終了から細胞質分裂にかけては、特にこの連携が必要とされる。

出芽酵母においては、姉妹染色分体をそれぞれの娘細胞に分配した後、紡錘体極 (SPB, Spindle Pole Body) に局在する低分子量 GTPase Tem1 が活性化されることが、適切な時期に M 期を終了することを可能にしている (図 0)。しかし、活性化された Tem1 がどのように M 期終了のシグナルを伝えるのかについては未知であった。Tem1 と複合体を形成する M 期終了に必須なプロテインキナーゼ Cdc15 は、Tem1 と協調して M 期終了を制御している可能性が高いと考えられた。

Tem1 と Cdc15 の相互作用について解析を行ったところ、Tem1 と Cdc15 の結合が M 期終了に必須であり、Cdc15 が Tem1 のターゲットであることが明らかになった。また、M 期終了における Cdc15 の関連因子を探索する過程で、Cdc15 の機能が M 期終了のみならず細胞質分裂にも必要であることを発見した。出芽酵母 Tem1/Cdc15 経路は、M 期から G1 期への移行に際して核分裂周期と細胞分裂周期を連携させる重要なシグナル伝達経路であると考えられた。

### 結果と考察

**Tem1 と Cdc15 との相互作用についての解析:** Cdc15 のアミノ末端に存在するキナーゼドメインに隣接した、82 アミノ酸からなる領域が Tem1 結合領域である (図 1 A)。部位特異的変異導入により Tem1 結合領域に変異を持った変異 *cdc15* を作製した (図 1 B)。*cdc15-LF* 変異は、Tem1 と Cdc15 の結合を減少させ、温度感受性増殖を引き起こした (図 2、3 A)。*cdc15-LF* 株の温度感受性増殖は、TEM1 の大量発現、あるいは活性化型 TEM1 (TEM1-1)

の発現によって抑圧された (図 3 B)。特に *TEM1-1* による *cdc15-LF* 株の温度感受性の抑圧が顕著だったことから、活性化型 Tem1 と Cdc15 の結合が M 期終了に必要であると考えられた。Cdc15-LF の *in vitro* キナーゼ活性は野生型 Cdc15 のそれと大きな差は見られなかった (図 4)。一方、Cdc15-LF は 37°C における SPB 局在に欠損を示した (図 5)。Cdc15 の Tem1 結合領域は、Cdc15 の SPB への局在制御に関与していると考えられた。以上の結果から、M 期終了において活性化された Tem1 が Cdc15 の SPB 局在を制御して M 期終了を促進していることが示唆された。

**M 期/G1 期遷移における Cdc15 の機能についての解析:** M 期終了における Cdc15 の関連因子を探索したところ、importin  $\beta$  様タンパク質をコードする *KAP104* の変異 (*kap104-rcf* 変異) が、*cdc15-2* 株の温度感受性を抑圧することを発見した (図 6、7)。制限温度 34°C において、*cdc15-2* 株はスピンドルを保持したまま M 期終期で停止した (図 8)。一方、*cdc15-2 kap104-rcf* 株はスピンドルを脱重合して M 期を終了し、その後 DNA の再複製を行い二度目の M 期へと進行したことから、*kap104-rcf* 変異が M 期終了を促進していると考えられた。34°C においては、*cdc15-2 kap104-rcf* 株は出芽周期をくり返し、数珠状の細胞になった (図 8 C、j)。Zymolyase 処理によって細胞壁を消化しても数珠状の形態は失われないことから、*cdc15-2 kap104-rcf* 株は細胞質分裂に欠損を示すと考えられた (図 9)。これらの結果は、M 期終期で停止した *cdc15-2* 株においては、M 期終了を促進するだけでは、細胞質分裂を誘導するには十分ではないことを示している。すなわち、Cdc15 は M 期終了のみならず、細胞質分裂においても重要な役割をはたしていると考えられた。M 期終了において CDK (サイクリン依存性キナーゼ) インヒビター Sic1 の十分な発現には *SIC1* の転写活性化因子 Swi5 が必要であり、Swi5 は M 期終了において Cdc15 依存的に核内に蓄積することが知られている。37°C において M 期後期/終期における Swi5 の核への蓄積は、*cdc15-2* 株では顕著でないが、*cdc15-2 kap104-rcf* 株では観察された (図 10)。*kap104-rcf* 変異は Swi5 を核に蓄積させることで M 期終了を促進していると予想された。

**まとめ:** 姉妹染色分体が母・娘細胞のそれぞれに分配された後、活性化された Tem1 が Cdc15 機能を高進させ M 期終了を指令すると考えられる。Tem1 は Cdc15 の SPB 局在の制御に関与している可能性が示唆された。*cdc15* 変異によって引き起こされる欠損のうち、M 期終了におけるものを特異的に抑圧する *kap104* 変異を単離したことで、Cdc15 は M 期終了のみならず、細胞質分裂にも必要であることが明らかになった。出芽酵母においては、共通の因子 Cdc15 を M 期終了と細胞質分裂のそれぞれにおいて使い分けるメカニズムが存在し、M 期/G1 期遷移を制御していると予想される。このようなメカニズムは、真核細胞がどのように核分裂周期と細胞分裂周期を連携させているのかを考える上で重要である (図 11)。

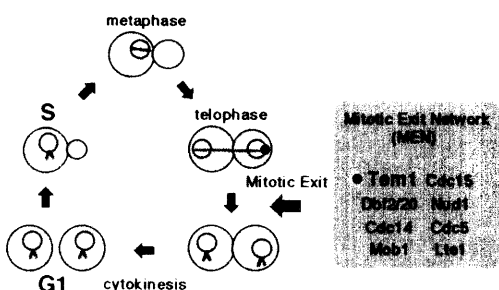


図 0 出芽酵母の細胞周期と M 期終了制御をつかさどる因子群 G1 期初期に増殖の為の環境や様々な条件が整ったことを確認して、細胞周期を開始する。出芽によって娘細胞を成長させる一方で、S 期において DNA 複製を行う。M 期中期 (metaphase) から M 期終期 (telophase) にかけて、スピンドル (緑線) により姉妹染色分体が母細胞と娘細胞へ分配される。その後、SPB に局在する Tem1 (赤マル) によって M 期終了を制御する因子群 (MEN、Mitotic Exit Network) が活性化され、細胞は M 期を脱出する。母細胞と娘細胞の間で細胞質分裂が起こり、二つの G1 期の細胞が生まれる。

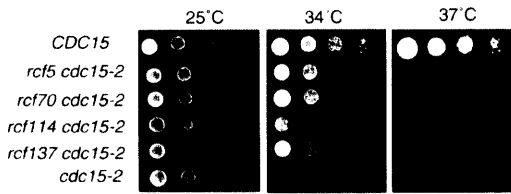


図6 *cdc15-2*株の温度感受性を抑圧する変異 (*rcf*変異) の単離 *cdc15-2*株を低い制限温度 (34°C) 下で培養し、突然変異によって増殖が可能になった株を単離した。その突然変異を *rcf*変異と名付けた (revertant of *cdc15-2*)。一つの遺伝子に起こった突然変異に起因する *rcf*変異は4つの相補群に分類された (*rcf5*, *rcf70*, *rcf114*, *rcf137*)。25°C、34°C、37°Cにおける *rcf cdc15-2* 二重変異株の増殖の様子を示した。OD<sub>600</sub>=1の培養液を10分の1ずつ希釈して寒天培地上にスポットした。

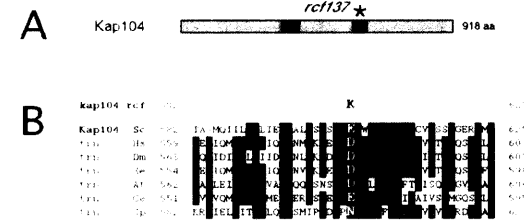
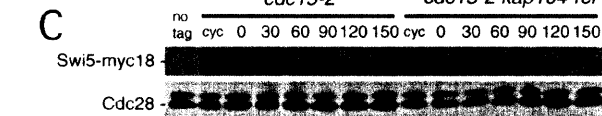
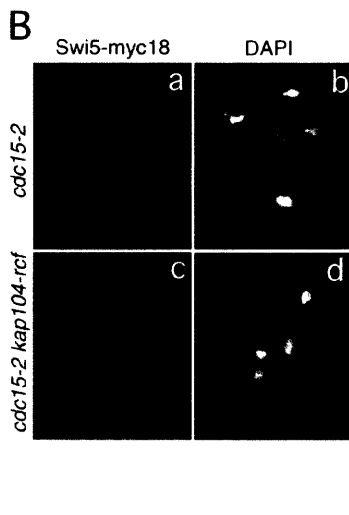
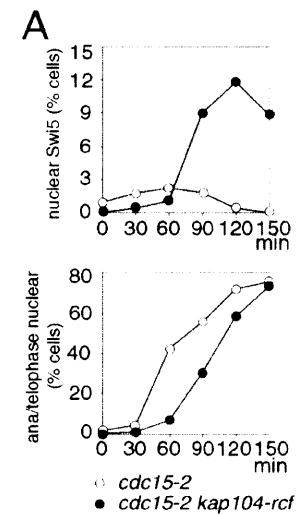


図7 *rcf137*変異は importin β様タンパク質をコードする *KAP104*に起こった変異である。A. *Kap104*の模式図と *rcf137*変異の位置。 *Kap104*は importin β superfamilyの transportin subfamilyに属する。 importin β様タンパク質は分子全体にわたって18個の HEAT リピートを保持している。 *rcf137*変異 (以降、 *kap104-rcf*変異と呼ぶ) は12番目の HEATモチーフ内 (青四角) に存在した。 Ran相互作用領域を黒四角で示した。 B. *Kap104-rcf*では604番目のグルタミン酸残基がリシン残基に変化している。様々な生物種の transportin の12番目の HEATモチーフの比較を示した。 Sc: 出芽酵母、 Hs: ヒト、 Dm: ショウジョウバエ、 Xe: アフリカツメガエル、 At: シロイヌナズナ、 Ce: 線虫、 Sp: 分裂酵母



C. Swi5-myc18の細胞内量を抗 myc抗体を用いたウエスタンブロッティング法により検出した Lane cycは25°Cの非同調培養から回収した Swi5-myc18を表す。コントロールとして Cdc28のタンパク質量を示した。

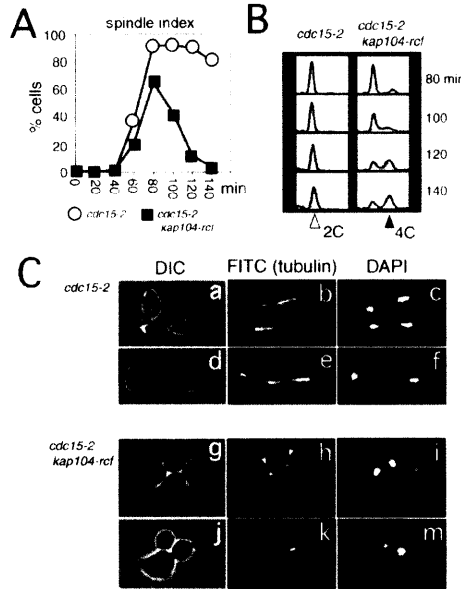


図9 *cdc15-2 kap104-rcf*株は細胞質分裂に欠損を示す。図8で示した実験において、回収した細胞を Zymolyase 処理した後、抗チューブリン抗体を用いた間接蛍光抗体法によりチューブリンを可視化し、スピンドルと細胞の形態を観察した。複数の細胞体が連なった細胞 (chained or branched、図8 j参照) の割合を黒四角で、母細胞、娘細胞が一つずつで一本のスピンドルを保持している細胞 (dumbbell) を青マルで示した (n > 200)。実験を行った140分間において、最初の母細胞と最初の娘細胞の間での分裂は観察されなかった。また、 *kap104-rcf*変異のみでは細胞質分裂の欠損は示さなかった (データは示さない)。

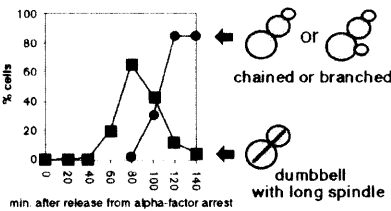


図10 *kap104-rcf*変異は Swi5の核への蓄積を促進する。内在性の *SWI5*を *SWI5-myc18*に置換した *cdc15-2*株、あるいは *cdc15-2 kap104-rcf*株をヒドロキソ尿素でS期に停止させ、再びヒドロキソ尿素の無い37°Cの培地で培養した。経時的に回収して、抗 myc抗体を用いた間接蛍光抗体法によって Swi5-myc18を検出した。 Swi5-myc18の核局在が検出された細胞の割合 (A上) と、細胞周期進行のコントロールとして M期後期/終期の核を保持した細胞の割合 (A下) を示した (n > 200)。典型的な細胞の染色像を示した (B)。 a、cは Swi5-myc18 (FITC 融合二次抗体を使用) を、b、dは DAPI染色像を示している。

図11 Tem1/Cdc15経路によって制御される M期/G1期遷移のモデル図 姉妹染色分体が母細胞と娘細胞に分配されると、SPBに局在する Tem1が活性化され、さらに Cdc15を活性化して M期終了を促進する。 Kap104 依存性の核・細胞質輸送経路が Swi5の核内量を制御して M期終了を阻害している可能性が考えられる。 Kap104機能が Cdc15によって制御されているかについては明らかではない。 Cdc15は M期終了における機能とは別に、細胞質分裂においても必須な役割を果たしている。細胞質分裂における Cdc15の制御因子あるいはターゲットは未知であるが細胞質分裂においても Tem1が Cdc15の活性化因子として機能している可能性がある。 M期終了と細胞質分裂において、 Cdc15を順序よく活性化させるメカニズムが存在し、 M期/G1期遷移の成功に貢献していると考えられる。

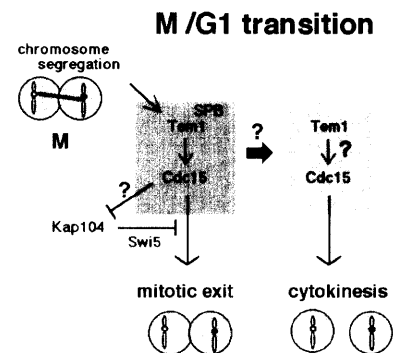


図11 *kap104-rcf*変異による M期終期停止を解除し、核分裂周期を進行させる。 A. B. フェロモン処理によって細胞周期 G1期に同調させた *cdc15-2*株、あるいは *cdc15-2 kap104-rcf*株をフェロモンの無い培地に戻し、34°Cで培養した。経時的に細胞を回収し、スピンドルを一つ保持した細胞 (M期後期・終期の細胞) の割合 (n > 200) と、DNA含量を計測し、細胞周期進行の様子を調べた。 *cdc15-2*株がスピンドルを保持したまま停止したのに対して、 *cdc15-2 kap104-rcf*株はスピンドルを脱重合した (A)。 FACS解析によって DNA含量を測定したところ、 *cdc15-2*株が2C含量で停止したのに対し、 *cdc15-2 kap104-rcf*株では4C含量の細胞の割合が増加した (B)。 *cdc15-2 kap104-rcf*株は34°Cにおいても M期を終了し、次の S期へと細胞周期を進行させたことがわかった。 C. *cdc15-2*株、あるいは *cdc15-2 kap104-rcf*株の34°Cにおける表現型。

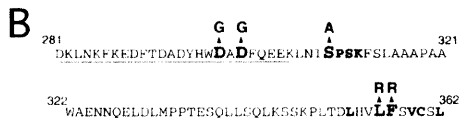
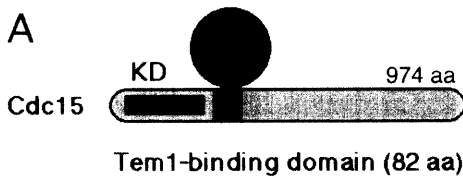
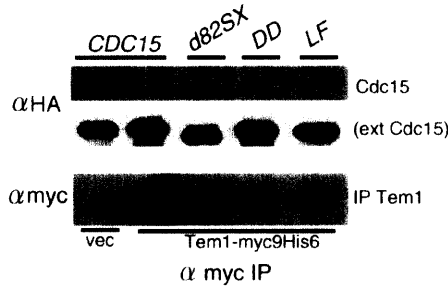


図1 Cdc15の Tem1-binding domain A. Tem1と Cdc15との結合にはキナーゼドメイン (KD、黒四角) に隣接する 82 アミノ酸からなる領域 (青四角) が必要である。B. Tem1-binding domainのアミノ酸配列と部位特異的に変異を導入したアミノ酸残基を示した。3種類の変異 *cdc15* (*cdc15-DD*、*cdc15-S309A*、*cdc15-LF*) を作製した。下線は電荷を持ったアミノ酸残基に富んだ領域を示している。中央部の SPSK 配列は、推定 CDK リン酸化部位である。LxLFxVVCxL 配列は分裂酵母 *Cdc15* ホモログ *Cdc7* キナーゼにも存在する配列である。数字はアミノ末端からのアミノ酸の数を表す。



Tem1-binding domainの欠失変異 (*d82SX*) や *cdc15-LF* 変異によって Tem1 との結合は失われ、*cdc15-DD* 変異によって減少した。CDC15; Cdc15-HA5, *d82SX*; Cdc15-d82SX-HA5, DD; Cdc15-DD, LF; Cdc15-LF

図2 *cdc15-LF* 変異は Tem1 との相互作用を減少させる。myc9His6 タグを付加した Tem1 (*Tem1-myc9His6*) を発現している酵母細胞に、それぞれ HA タグを付加した変異 *Cdc15* を発現させた。それぞれの酵母破砕液から抗 myc 抗体を用いて *Tem1-myc9His6* を免疫沈降させて、沈降物に含まれる変異 *Cdc15* を抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロッティング法により検出した。

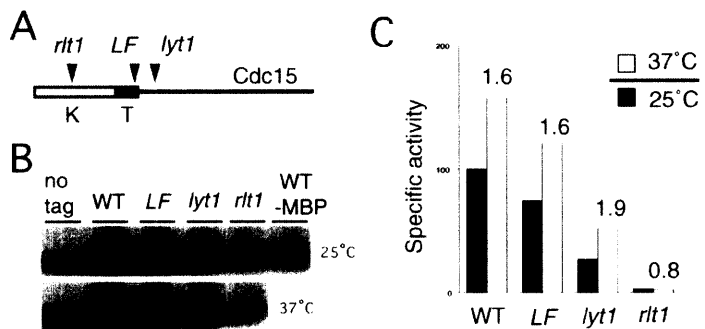


図4 Cdc15-LF のキナーゼ活性は温度感受性ではない。A. 温度感受性 *cdc15* 変異の分子内位置を示した。*cdc15-rlt1* 変異 (*rlt1*) はキナーゼドメイン (K) に、*cdc15-LF* 変異 (*LF*) は Tem1-binding domain (T) に、*cdc15-lyt1* 変異 (*lyt1*) は機能未知の中央領域に存在する。B. Cdc15 キナーゼアッセイ。HA タグを付加した *Cdc15* を酵母細胞で発現させ、抗 HA 抗体によって免疫沈降させた。基質として myelin basic protein (MBP) を用い、25°C と 37°C のそれぞれにおいて免疫沈降物に対してキナーゼアッセイを行った。MBP に付加された <sup>32</sup>P 量をオートラジオグラフィによって検出した。C. B の結果を定量してグラフ化して示した。数字は 37°C と 25°C におけるキナーゼ活性の比を表している。キナーゼドメインの変異が著しくキナーゼ活性を低下させるのに対して、Tem1-binding domain の変異は常温、あるいは高温においてもキナーゼ活性にそれほど影響を与えない。

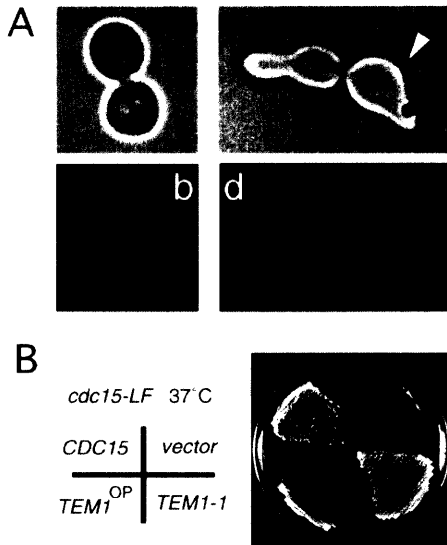


図3 *cdc15-LF* 株は温度感受性を示し、細胞周期 M 期終期で増殖を停止する。A. 制限温度 (37°C) における *cdc15-LF* 株の表現型。フェロモン処理によって細胞周期 G1 期に同調させた *cdc15-LF* 株をフェロモンの無い培地に戻し、37°C で培養した。80%~90% の細胞 ( $n > 200$ ) が、長く伸びたスピンドル微小管を保持したまま増殖を停止した。典型的な細胞の形態 (a, c)、DNA 染色像 (DAPI 染色、赤)、チューブリン染色像 (抗チューブリン抗体を用いた間接蛍光抗体法、緑) を示した (b, d)。矢頭は、フェロモン処理によって変形した母細胞を示す。B. *cdc15-LF* 株の温度感受性は、Tem1 の活性化によって抑圧される。*cdc15-LF* 株に 4 種類のプラスミドをそれぞれ導入して、制限温度 (37°C) での増殖の様子を調べた。CDC15; CDC15 発現プラスミド、TEM1; TEM1 高発現プラスミド、TEM1-1; 活性化型変異 TEM1-1 発現プラスミド、vector; コントロールプラスミド

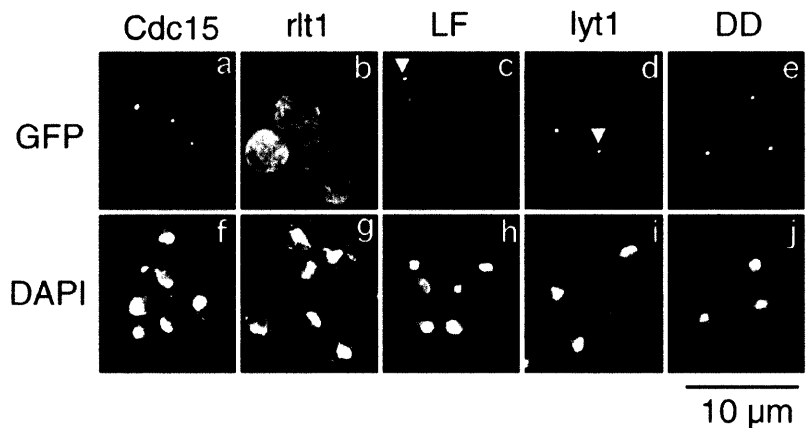


図5 Cdc15-LF は SPB への局在に欠損を示す。Cdc15 のカルボキシル末端に green fluorescent protein (GFP) を融合させた Cdc15-GFP を酵母細胞内で大量発現させると、DAPI 染色によって検出される核に接して一つないし二つの GFP の輝点が検出される (a, f)。これらの輝点は、SPB と共局在する (データは示さない)。Cdc15-LF-GFP を発現している細胞では、核周辺には明確な GFP の輝点は検出されず、著しく弱い輝点が観察されるものも存在した (c, h)。また、細胞質に GFP の輝点が検出されるものも存在した (矢頭)。キナーゼ領域の変異 (*rlt1*、図 4 A 参照) によって、Cdc15 の SPB への局在は失われ、細胞質の GFP シグナルが顕著になった。*cdc15-lyt1* 変異 (*lyt1*、図 4 A 参照) は Cdc15 の SPB 局在に対して顕著な影響は及ぼさなかった (d, i)。致死的な変異 *cdc15-DD* (図 1 B 参照、データは示さない) は、Cdc15 の SPB 局在を著しく促進した (e, j)。