

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 14 年度博士課程進学

氏 名 鎌田 綾子

指導教員名 堀之内 未治

論文題目

分裂酵母のポストゲノム情報を利用した核外輸送因子 Crm1 の機能解析

真核生物の核は核膜によって細胞質と隔てられているため、核と細胞質間を移動する物質は核膜孔を通過しなければならないことから、核-細胞質間での物質輸送はシグナル伝達や細胞周期制御に重要であると考えられている。分子量が約 40kDa 以上の物質は核膜孔を自由拡散して通過することが出来ず、能動的な輸送システムを必要とする。典型的な核-細胞質間の輸送システムとして、核移行シグナル(NLS)依存的な核内輸送と、核外移行シグナル(NES)依存的な核外輸送が挙げられる。核外輸送に関しては、醗酵学研究室をはじめいくつかの研究室により、Crm1 という蛋白質が NES の受容体そのものであること、そのメカニズムはヒトから酵母に至るまで真核生物において高度に保存されていることなどが明らかになってきた。醗酵学研究室で真菌の形態異常を指標とした抗真菌抗生物質の探索から発見されたレプトマイシン B (LMB) は、Crm1 に直接結合することにより Crm1 依存的な核外移行を阻害することから、核外輸送を解析する上での有用なツールとして用いられてきた。しかしながら、個々の因子が様々な局在制御を受けることが判明しつつも、生命現象における核外移行の役割、すなわち細胞中でどれだけの蛋白質が能動的に核外輸送を受けているかについては未だ明らかになっていない。一方、2002 年に分裂酵母のゲノムプロジェクトが終了し、分裂酵母のゲノム情報全てを利用できるようになった。そこで本研究では、分裂酵母において蛋白

質核外移行の特異的阻害剤 LMB を用いて核-細胞質間をシャトルする蛋白質、あるいは核外輸送の制御を受ける蛋白質についてゲノムワイドに検索し、その個々の機能を探索することで、細胞内における Crm1 依存的核外移行の全容を解明することを目的とした。

1. 分裂酵母のゲノムGFPライブラリーからの核外移行蛋白質の探索

分裂酵母のゲノム断片と GFP を融合させた分裂酵母のゲノム GFP ライブラリーを用い、GFP 融合蛋白質の細胞内局在が LMB 添加により変化するような ORF をスクリーニングした。このスクリーニングに用いた GFP ライブラリーの特性上、ゲノム ORF の C 末が欠けているため、解析を進めるにあたり得られた核外移行蛋白質について ORF 全長をクローニングし GFP と融合させて、細胞内局在を観察した。この結果、既知蛋白質として細胞周期依存的に Crm1 により核外輸送されることが知られている細胞周期制御因子 Cdc25 等が得られた他、微小管結合蛋白質 Nem1 と Alp7 という微小管に局在し、LMB により特徴的な局在変化を示す蛋白質を見いだした。

2. 分裂酵母の全遺伝子発現ライブラリーを用いた核外移行蛋白質の探索

2002 年の分裂酵母ゲノムプロジェクト終了を受けて、理化学研究所吉田化学遺伝学研究室にて分裂酵母の全ての遺伝子について全長 ORF を PCR によりクローニングし YFP 融合させた分裂酵母 ORF ライブラリーが作成され、すべての蛋白質の局在の同定が行われた。そこでこのライブラリーと局在情報に基づき、ゲノムライブラリーでは網羅できなかった部分を含め、より包括的な核外移行蛋白質のスクリーニングを行った。スクリーニングの結果、約 5000 の遺伝子産物中 285 (約 5%) の核外移行蛋白質が LMB によって局在に変化が生じた。これらの蛋白質は、分裂酵母内で Crm1 依存的に核外移行の制御を受けていることを示唆する。またゲノムライブラリーからのスクリーニングで見いだした微小管の構造変化と同様の局在変化を呈する蛋白質も 79 種類得られた。

3. 得られたNES含有蛋白質の機能解析

3-1 微小管結合蛋白質 Nem1

得られた核外移行蛋白質の一つ、セリン、プロリンに富む SPBC25B2.07c は細胞質と微小管様の構造体に局在し、LMB 処理により核に多く局在するようになるという非常に興味深い局在変化を示したことから、Nem1 (Nuclear exported protein associated with microtubule) と命名し、解析を行った。遺伝子破壊では野生株との差異はほとんどみられなかったが、過剰発現により生育阻害を示し、細胞極性の喪失、異常な隔壁の

形成等が見られたことから、機能的にも微小管に関与することが示唆された。この過剰発現による形態異常は、核形態の異常も伴うため、この蛋白質が過剰に存在すると染色体分配等の核機能が阻害されると考えられる。また、LMB に対する応答領域を検討したところ、C 末端領域に NES が存在することが示唆された。その他にアミノ酸の一次配列上、Cdc2 キナーゼによるリン酸化を受けうる配列を数ヶ所見いだした。このことは、Nem1 が細胞周期依存的にリン酸化により何らかの制御を受けている可能性を示唆する。

3-2 微小管結合蛋白質 Alp7

Alp7 は細胞極性の制御を担う因子としてクローニングされた蛋白質であり、通常は微小管様の構造体のみ点状に存在し、LMB 存在下で太く長い紡錘体様の構造体に局在するようになるという特徴的な局在変化を示した。Alp7 はその局在部位から微小管の機能に関与することが考えられたので、*alp7* 遺伝子破壊株を作製したところ、TBZ 感受性を示した。したがって、Alp7 は微小管の安定性に関与していることが示唆された。*alp7* 破壊株は TBZ のみならず予想外に LMB にも感受性を示したことから、Alp7 が蛋白質核外移行にも関わっている可能性が示唆された。さらに *crm1* 温度感受性変異株で *alp7* 破壊を行ったところ、許容温度下でも生育遅延が見られ、*crm1* 変異と *alp7* 破壊が合成的に影響したことから、Alp7 が微小管安定化と核外移行の双方に関与していることが強く示唆された。

4. Crm1 と微小管との関わり

上記のように微小管と相互作用する蛋白質が興味深い局在変化を示したことから、微小管そのものの局在について抗チューブリン抗体を用いた免疫染色により検討したところ、LMB 添加により tubulin そのものが核蓄積し、構造も変化していることを見いだした。また LMB による tubulin の局在変化は、*crm1* 温度感受性変異株で Crm1 を失活させたときにも同様であったことから、この微小管構造変化は Crm1 依存的であることが示された。この微小管構造の変化について詳細に検討するために GFP-tubulin を発現する株を構築し、time-lapse 解析を行った結果、LMB 添加後すみやかに細胞質微小管が消失し、核内に一本の紡錘体様の束化微小管を生じることが明らかになった。この LMB 添加により生じる束化した微小管は、微小管不安定化薬剤チアベンダゾールや MBC に耐性を示し、通常の M 期微小管とは異なる非常に安定な構造であることが示唆された。これらのことから、以下の 2 つの仮説を立てて、微小管構造についての現象の解明にのぞんだ。(1) LMB 添加により premature mitosis が起きて生理的な疑似紡錘体微小管が生じた。(2) LMB 添加により、核内に tubulin または微小管重合を引き

起こす未知の因子が蓄積し、その結果、核内で非生理的な微小管重合が起きた。これらの仮説を元の実験を行った。まず(1)の仮説を検討するために、spindle pole body (SPB)、微小管、キネトコア、核膜などの蛍光マーカー蛋白質を発現する株を構築し、蛍光観察により LMB 添加後の紡錘体微小管様構造体の性質を調べた。その結果 SPB、キネトコアともに微小管上には存在せず、M 期の紡錘体微小管とは異なることが示唆された。また M 期特異的なリン酸化残基を認識する抗体 MPM-2 を用いた実験でも、LMB 添加後に特に MPM-2 認識蛋白質が増えることもなく、さらに窒素飢餓や *cdc* 変異株を用いて細胞周期を G1 期に止めた細胞でも LMB を添加すると紡錘体微小管様構造が生じたことから、LMB 添加による微小管構造の変化は細胞周期には非依存的であることが示された。すなわち(1)の仮説は否定された。そこで次に分裂酵母の微小管を cold-shock 処理にて破壊し、shift-up して微小管の再生を観察する手法を用いて LMB の効果を検討したところ、tubulin が核に蓄積し、さらに細胞質における微小管重合活性中心 iMTOCs (interphase microtubule organizing centers) が失われていることを見いだした。これらのことから tubulin 自体が Crm1 依存的に核外移行していること、LMB 添加による Crm1 機能の失活により iMTOC が失われ細胞質微小管の消失が引き起こされることが示唆された。引き続き核内で微小管の重合が起こるメカニズムについて解析中である。

まとめ

本研究では分裂酵母のポストゲノム情報を用いて、Crm1 依存的核外輸送を受ける蛋白質を網羅的にスクリーニングし、285 の核外移行蛋白質を見いだすとともに、新規核外移行蛋白質 Nem1 と Alp7 の解析を行った。さらに tubulin 自体が Crm1 依存的に核外輸送を受けていること、Crm1 機能の失活により iMTOC が失われ細胞質微小管が消失を引き起し、おそらく核内に MTOC 活性が生じる結果、核内に束化した微小管が形成されるという予期しない結果を得た。高等真核生物と異なり、mitosis 中も核膜が崩壊しない close mitosis を行う分裂酵母にとって、M 期の紡錘体微小管形成に関しても tubulin の核-細胞質間物質輸送が大変重要であると容易に予想されるが、Crm1 がその制御の一端を担っているという予想外の結果を得ることができた。