

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 鎌田 綾子

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探索し、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ものである。真核生物では、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る。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、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。以上のことから、本研究における網羅的解析による情報は重要であると考えられる。

### 1. 分裂酵母のゲノムライブラリーからの核外移行蛋白質の探索

分裂酵母のゲノムライブラリーを用いて核外移行蛋白質を探索した結果、微小管結合蛋白質 SPBC25B2.07c 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。

SPBC25B2.07c はその興味深い局在変化から、Nem1( Nuclear exported protein associated with microtubule ) と命名し、解析を行った。遺伝子破壊、過剰発現の結果より、Nem1 が微小管機能に関わることを明らかにした。また機能的核外移行シグナル(NES)として 53-62 番目のアミノ酸残基 LSASLQQVNI を同定した。

Alp7 は微小管上に点在し、LMB 処理により核内の束化微小管へと移行する特徴的な局在変化を示した。遺伝子破壊の結果、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、*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わっていることが強く示唆された。

### 2. 分裂酵母の全遺伝子ライブラリーからの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、本研究室にて分裂酵母の全ての遺伝子についての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。そこで申請者はこのライブラリーと局在情報に基づき、より包括的な核外移行蛋白質の探索を行った結果、約 5000 の遺伝子産物中 285 (約 5%) の核外移行蛋白質を同定した。また先に述べた微小管変化と同様の蛋白質も 79 種類同定した。

### 3. Crm1 と微小管との関わり

複数の蛋白質が微小管上で局在変化したことから微小管局在について解析を行い、Crm1 機能の失活により tubulin が核蓄積するとともに核内の束化微小管へと微小構造変化することを見いだした。この現象について申請者は以下の2つの仮説を立て、微小管構造変化の解明にのぞんだ。(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。まず *cdc* 変異株を用いて実験を行ったところ LMB 処理により紡錘体様の束化微小管が生じたことから、微小管変化は細胞周期非依存的であることが示された。また SPB などの局在を検討し束化微小管の性質を調べた結果、M 期の紡錘体微小管とは構造上も異なることが示された。これらの結果より(1)の仮説は否定された。そこで cold-shock の手法を応用して LMB の効果を検討したところ tubulin が核に蓄積し、さらに細胞質の微小管重合活性中心 iMTOC が失われていることを見いだした。また NLS-tubulin の過剰発現の結果から、tubulin の核蓄積のみでは束化微小管は生じないことを示した。以上の結果から、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を明らかにした。mitosis 中も核膜が崩壊しない分裂酵母にとって、M 期の核内における紡錘体微小管形成に関しても tubulin の核-細胞質間輸送が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示した。

本研究で得られた知見は、分裂酵母における核外移行を包括的に明らかにすると同時に、Crm1 の微小管制御への関与に関する研究の足がかりとなるものであり、また網羅的解析により得られた核外移行蛋白質のデータベースから今後の研究の展開も期待されるものである。よって審査委員一同は、本論文が、博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。