

## 分裂酵母の細胞質分裂におけるアクチン束化タンパク質の機能

森田 陸離 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 中野賢太郎 (筑波大学 生命環境系)

### 【研究背景・目的】

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* はモデル真核生物として研究が進み、細胞分裂の分子機構の知見が豊富に蓄積している。分裂酵母は動物細胞のように、アクチンからなる収縮環によって分裂する。収縮環の形成と動態を時空間的に制御する過程では、一連のアクチン結合タンパク質の秩序だったはたらきが必要である。その中でも、アクチン繊維を収縮環にまとめ上げるアクチン束化タンパク質は、特に重要な役割を担うと考えられる。

本研究では、分裂酵母の収縮環を構成するアクチン束化タンパク質のうち、IQGAP 様タンパク質と  $\alpha$ -アクチニンに注目した。これらは、アクチンとの結合にカルポニン様ドメイン (CHD) を用いる点で共通している。しかし、IQGAP 様タンパク質の CHD は1つだけだが、 $\alpha$ -アクチニンは2つの CHD が直列したアクチン結合ドメイン (ABD) をもつ。そのため、収縮環内で両タンパク質はアクチンへ異なる生理作用をもつと推察される。ところが、 $\alpha$ -アクチニンの遺伝子破壊、または IQGAP 様タンパク質の CHD を欠損しても、分裂酵母は細胞分裂が可能である。そこで、アクチンに対する両タンパク質の機能重複性を検討し、さらに各々に固有な生理機能を調べることを思い至った。単に一方の遺伝子のバックアップのために、もう一方の遺伝子を利用するだけであれば、機能ドメインの多様化の説明には不十分である。多くの真核生物は、同一細胞内に複数種類の CHD を有するアクチン調節タンパク質を発現する。本研究は、それらの細胞内アクチンに対する生理作用の協同性を知る第一歩であり、多彩な CHD ファミリーの分子進化の理解に大切である。

### 【アプローチおよびその結果】

#### (1) - 遺伝学的相互作用の解析

$\alpha$ -アクチニンの遺伝子破壊株と IQGAP 様タンパク質の温度感受性変異株のダブルミュータントを作成した。この温度感受性変異株は 30°C より高温下ではタンパク質の機能が生存に必要な活性を保てない。興味深いことに、30°C ではダブルミュータントのみがコロニーを形成できなかった。つまり、両タンパク質の機能が同時に減弱することで、細胞は増殖できないことが判明した。本実験の結果、これら2種類のアクチン束化タンパク質は、重複した機能を担うことが判明した。

#### (2) - $\alpha$ -アクチニンの生化学的性質の検証

IQGAP 様タンパク質の CHD はアクチンを束化することが生化学的に調べられている (高稲ら, 2009)。そこで、 $\alpha$ -アクチニンのアクチンに対する活性を調べ、先の報告と比較することを目指した。GST 融合型  $\alpha$ -アクチニンを大腸菌で発現し、その抽出液をグルタチオンビーズとインキュベートし、目的のタンパク質を精製した。その後、GST と  $\alpha$ -アクチニンの間の連結配列を特異的なプロテアーゼで切断し、 $\alpha$ -アクチニンのみを得た。

この  $\alpha$ -アクチニンを用いて、アクチン繊維との共沈実験を行った。超遠心によりアクチン繊維とともに沈降した  $\alpha$ -アクチニンの量から、アクチン繊維との結合の解離定数を求めた。さらに低速遠心により、 $\alpha$ -アクチニンが濃度依存的にアクチン繊維を束化する活性を調べた。また、蛍光標識したアクチン繊維を用いて、 $\alpha$ -アクチニンの束化構造を蛍光顕微鏡で記録した。現在、IQGAP 様タンパク質の CHD の活性との比較を進めるため、データを整理している。

(3) - リン酸化による IQGAP 様タンパク質の制御機構の解析  
高稲ら (2009) の先行研究では、IQGAP 様タンパク質の CHD (1~189 a. a.) に続く領域 (200~300 a. a.) が収縮環への特異的な局在性に関わることが示唆されている。この領域には、CDK (Cyclin-dependent kinase) の推定リン酸化部位が複数ある。そこで、該当するセリン及びスレオニンをアラニンに置換して非リン酸化型変異体に、またアスパラギン酸に置換して疑似リン酸化型変異体を用意した。これらの CHD を含む IQGAP 様タンパク質の 1~300 a. a. に蛍光タンパク質を付加して局在性を調べた。その結果、野生型および非リン酸化型分子が収縮環に局在するのに対し、疑似リン酸化型分子は収縮環に局在しなかった。今後、細胞内でこれらの部位が実際に CDK によりリン酸化されるか、そして、その生理的意義について検討を深める計画である。

### 【考察と展望】

本研究結果から、分裂酵母  $\alpha$ -アクチニンの収縮環アクチンへの細胞内作用と *in vitro* 活性が確かめられた。興味深いことに、IQGAP 様タンパク質の CHD は単独で束化活性を発揮する (高稲ら, 2009) のに対し、 $\alpha$ -アクチニンは ABD に連結したスペクトリンリピートドメインでホモダイマーを形成し、ABD を2つもつことでアクチンを束化すると思われる。両方とも、CHD を基盤としたアクチン結合タンパク質であるにもかかわらず、異なる束化様式をもつ理由は不明である。これらのタンパク質における僅かなアミノ酸残基の変異が、アクチンに対する活性を質的に変化させた可能性がある。今後、両タンパク質の生理機能や束化作用を分子レベルで究明することで、将来的に、CHD ファミリーの分子進化や、アクチン細胞骨格への機能の多様化の理解につながる、興味深い研究に発展すると期待できる。

また、CHD のアクチン結合性がリン酸化制御されるなら、細胞周期特異的に収縮環が形成され、収縮するメカニズムを解き明かすための重要な知見となる可能性が高い。酵母や動物細胞では、分裂中期にかけて CDK の活性が高く、分裂後期に Cdc14 ホスファターゼ活性が上がることで、細胞分裂に伴うダイナミックな染色体分離や細胞質分裂が秩序だつて進行する。今回、見いだした IQGAP 様タンパク質の CHD の収縮環への局在性のリン酸化制御の可能性が、収縮環の動態にどのような役割を担うのか、今後の研究の展開が多いに期待される。