The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Shs1p : A Novel Member of Septin That Interacts with Spa2p, Involved in Polarized Growth in Saccharomyces cerevisiae
Author(s)	三野, 彰久
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41758
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【25】

氏　　名	三野彰久（みの あきひさ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　15230　号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学　位　論　文　名	Shs 1 p : A Novel Member of Septin That Interacts with Spa 2 p, Involved in Polarized Growth in *Saccharomyces cerevisiae* （Shs 1 p : 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において極性成長に関与する Spa 2 p と相互作用する新しいセプチンファミリーメンバー）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　高井　義美 （副査） 教　授　谷口　直之　　教　授　中村　敏一

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

Rho低分子量G蛋白質（以下、Rhoと略す）は、アクチン細胞骨格の再編成を制御することにより、細胞質分裂をはじめ、種々の細胞機能を制御していることが明らかにされているが、その詳細な分子機構には不明な点が多い。私の所属する研究室では、出芽酵母にもRhoが保存されていることに着目し、その機能の解析を行ってきている。これまでに、Rhoは出芽時には芽の先端部に、細胞質分裂時には収縮輪に局在し、アクチン細胞骨格の再編成を介してこれらの細胞機能を制御していることを明らかにしている。さらに、Rhoの標的蛋白質として、酵母から動物細胞まで広く保存されているフォルミンファミリーメンバーに属するBni 1を単離し、Bni 1の変異株が、細胞質分裂や細胞の極性形成の異常といった表現型を示すことや、Bni 1がプロフィリンを介してアクチンの重合過程を制御していることを明らかにしている。最近、私共は、Bni 1の結合分子として、Spa 2を見い出している。Spa 2は出芽部位や収縮輪に局在し、細胞質分裂に関与することが報告されている。さらに、私共は、Spa 2変異株を用いた検討により、Spa 2がBni 1の出芽部位への局在に必要であることを明らかにしている。しかしながら、このBni 1－Spa 2複合体が、どのような機構を介して細胞質分裂や出芽を制御しているのかについては未だ不明な部分が多い。そこで、本研究では、Spa 2に結合する蛋白質をYeast two-hybrid法を用いて検索し、得られた遺伝子産物の解析を行った。

【方法ならびに成績】

1）Spa 2結合蛋白質の単離

Spa 2の400－550アミノ酸領域が、Spa 2の出芽部位や収縮輪への局在に必要であることが報告されている。そこで、その領域に結合する蛋白質の同定をYeast two-hybrid法を用いて行った。出芽酵母のゲノムライブラリーを用い、2 x 10^6個のクローンについてスクリーニングした結果、15個の陽性クローンを得た。それらの塩基配列を決定したところ、15個すべて、出芽酵母ゲノムのデータベースには登録されているが、その機能が解析されていないYDL225wであった。欠失変異体を用いた解析を行ったところ、Spa 2の400－550 アミノ酸領域と、YDL225wのC末端側の282－552アミノ酸領域が相互作用した。YDL225wは、552アミノ酸残基からなる蛋白質であり、N末端側にヌクレオチド結合性を持つと考えられているP-loop motifを、C末端側にcoiled-coil domainを持っていた。また、データベースサーチによりYDL225wは、セプチンファミリーにホモロジーを有することが明らかとなった。セプチ

ンファミリーとは、Cdc 3、Cdc10、Cdc11、Cdc12を主たるメンバーとするGTP結合蛋白質群であり、細胞質分裂時に収縮輪とともにフィラメントを形成し、細胞質分裂において必須な役割を果たす。この新規セプチンは出芽酵母セプチンの7番目のメンバーに相当するので、Shs 1（Seventh Homolog of Septin）と命名した。Shs 1とセプチンメンバーのひとつであるCdc 3とのホモロジーは約30%であった。

2）Shs 1破壊株の解析とShs 1の局在

Shs 1遺伝子を破壊したところ、24度、35度それぞれの条件下における生育速度は野生型と同様であったが、細胞形態には明らかな異常が見られた。すなわち、細胞は分裂できずに多核となり、いくつもの細胞が連なった形態を示した。これは、セプチンの変異株の表現型とよく似ており、Shs 1が、セプチンと同様、細胞質分裂において機能していることを示している。また、Shs 1 Spa 2二重変異株を作成したところ、Shs 1の細胞質分裂異常が促進され、Shs 1はSpa 2と遺伝子的に相互作用することが明らかとなった。したがって、Shs 1とSpa 2との結合は生理的に意味があるものと考えられる。一方、Shs 1のC末端側にGFPを結合させたShs 1－GFPを作製し、その局在を検討した結果、Shs 1－GFPは他のセプチンファミリーメンバーと同様、収縮輪に局在していた。

3）Shs 1と他のセプチンメンバーとの相互作用

セプチンフィラメントは、少なくともCdc 3、Cdc10、Cdc11、Cdc12の4つのセプチンファミリーのメンバーの複合体であり、メンバー間で相互作用することが報告されている。そこで、Yeast two-hybrid法により、Shs 1が他のメンバーと相互作用するか否かを調べたところ、Shs 1はCdc12と特異的に結合することが明らかとなった。この結果は、Shs 1がCdc12との相互作用を介して他のセプチンファミリーと協調し、細胞質分裂を制御していることを示唆している。

【総括】

本研究では、Rho－Bni 1－Spa 2系の細胞機能をさらに解析するために、Spa 2の出芽部位や収縮輪への局在に必要十分であることが示されている400－550アミノ酸領域に結合する蛋白質を検索し、Shs 1を得た。遺伝学的、細胞生物学的解析から、Shs 1はセプチンファミリーの新しいメンバーであり、細胞質分裂において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。Shs 1の破壊株でSpa 2の局在を調べたが、正常であった。この結果より、Spa 2は他のセプチンか、あるいは、未知の分子との結合を介して局在していると考えられる。これまで、Rhoによる細胞質分裂の制御機構は不明であったが、本研究によりRhoが、Rho－Bni 1－Spa 2－Shs 1複合体を介して、細胞質分裂を制御している可能性が示唆された。また、私の所属する研究室では、Bni 1のホモログに相当するBnr 1も、何らかの蛋白質を介してセプチン系と相互作用することを明らかにしている。従って、出芽酵母においてRhoは、フォルミン系を介してセプチン系を制御して細胞質分裂に関与するものと考えられるが、この機構が動物細胞でも機能しているか否かにつき、今後、検討する必要がある。

最近、私の所属する研究室では、Bni 1が、アクチン系のみならず微小管の機能も制御し、核分裂の方向を決定していることを明らかにしている。従って、Bni 1は、Rhoによって制御され、アクチン系、セプチン系、微小管系といった細胞骨格系のオーガナイザーとして、中心的な機能を果たしていると考えられる。また、Spa 2の動物細胞におけるホモログは未だ見い出されておらず、今後、Spa 2ホモログの探索も重要な研究課題であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本申請者は、本研究において、酵母Rho 1の標的蛋白質であるアクチン系を制御するBni 1の出芽部位への局在に必要なSpa 2と相互作用する分子を検索した。その結果、Spa 2は新規のセプチンである、Shs 1と結合することを明らかにした。Shs 1は、他のセプチンと同様細胞質分裂部に局在し、細胞質分裂に必須の役割を果たすことも明らかにした。また、Shs 1が、他のセプチンと共にフィラメントを形成し、細胞質分裂を制御する可能性を示した。さらに、Shs 1とSpa 2間の遺伝学的な関連も明らかにした。以上の結果より、Rho 1は、Bni 1を介し、セプチン系とアクチン系を共に制御し細胞質分裂を総合的に制御していることが示唆された。

本研究は、実験結果自体の意義もさることながら、今後の発展性にも期待できるものがあり、生命科学への貢献度が極めて高い研究であるといえる。したがって、学位授与に十分値すると考えられる。