

Title	Gin4 of <i>S. cerevisiae</i> is a bud neck protein that interacts with the Cdc28 complex
Author(s)	奥崎, 大介
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42610">https://hdl.handle.net/11094/42610</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	おく ぎき だい せい 奥 崎 大 介
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 16041 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Gin4 of <i>S. cerevisiae</i> is a bud neck protein that interacts with the Cdc28 complex. (bud neck に局在する出芽酵母 Gin4 タンパク質は Cdc28 複合体と相互作用する。)
論文審査委員	(主査) 教授 野島 博  (副査) 教授 品川 日出夫 教授 杉野 明雄

## 論文内容の要旨

## 【目的】

出芽酵母の全ゲノム配列上には3つの類似するキナーゼをコードする *NIK1/HSL1*、*GIN4* そして *KCC4* 遺伝子が存在する。*NIK1/HSL1* は当研究室が分裂酵母の細胞周期で G2/M 期を正に制御する Nim1 キナーゼホモログとして報告し、別のグループからも M 期の阻害因子である Swe1 キナーゼを負に制御する因子として報告された。現在までに Nik1/Hsl1 は細胞周期の進行中に細胞骨格系に傷害が発生した時、マスターレギュレーターである M 期の Cdk/cyclin (Cdc28/B タイプサイクリン) 複合体の活性を抑えて修復するまで細胞周期の進行を遅延させると考えられている。本研究の目的は、*NIK1/HSL1* と類似する *GIN4* と *KCC4* の細胞周期制御への可能性と両遺伝子間の機能的分担を解明することにある。

## 【方法ならびに成績】

*GIN4* と *KCC4* mRNA の発現が *NIK1/HSL1* と同じように細胞周期に依存するかどうかを同調的に培養した酵母から抽出した mRNA をもとにノザン解析により調べると *GIN4* と *NIK1/HSL1* mRNA は G1/S 期をピークに増減する発現パターンが認められた。5' 上流配列には G1/S 期で発現する遺伝子群に見られる MCB (*Mlu* I cell cycle box) モチーフが存在している。また、3つのキナーゼには Cdc28 によってリン酸化される共通配列が存在し、Cdc28 の制御を受けている可能性が考えられた。*cdc28* 温度感受性変異株で Nik1/Hsl1 と Gin4 を欠失させた二重変異株の示す表現型はもとの親株と比べて制限温度の低下や許容温度下での細胞形態の異常を示し *CDC28* との遺伝学的な相互作用が認められた。この表現型は標的と考えられる Swe1 を欠失させると抑圧できることから Gin4 は Nik1/Hsl1 と同様に Swe1 を負に制御すると考えられる。また Kcc4 も Gin4 と併せて欠失させた *cdc28* 変異株も同様の表現系を示したことから *CDC28* との遺伝学的な相互作用があると考えられた。更に免疫沈降法によって Nik1/Hsl1 と Gin4 そして Cdc28 が複合体を形成することから物理的に Cdc28 複合体と相互作用することが示唆された。

次に、それぞれの細胞内の役割を知るために Nik1/Hsl1 と Gin4 及び Kcc4 欠損株の表現型をみるといずれの欠損株も核に異常は認められず、出芽に異常が認められた。また、Gin4 と Kcc4 を大量発現させると増殖を阻害し、細胞は Bud が伸び、細胞質分裂の異常が認められた。実際に細胞質分裂の制御に関わるかを GFP 蛍光タンパク質を付加した Gin4 と Kcc4 融合タンパク質を用いて細胞内局在を調べると両タンパク質ともに Bud neck に局在した。Bud neck には娘細胞の形成に必要なタンパク質群の足場となる細胞骨格がセプチンタンパク質によって形成されて

いることが知られている。Nik1/Hsl1 と Gin4 はセプチンと複合体を形成することが報告されていることから Kcc4 も同様にセプチンと結合すると考えられる。Two-Hybrid 法を用いて相互作用を調べると興味深いことに Kcc4 は Gin4 とは異なったセプチンファミリーの 1 つと結合し、その結合に必要な領域だけで Bud neck へ局在する結果を得ることができた。

#### 【総括】

今回は最も研究されている Nik1/Hsl1 と比較しながら Gin4 と Kcc4 の解析を進めた。Nik1/Hsl1 はセプチンと複合体を形成し、セプチンの結合状態に依存して Bud neck への局在とその活性が調節されている。細胞周期の進行過程でアクチンやセプチンの細胞骨格系の傷害が生じると Cdc28/B タイプサイクリンを負に制御する Swe1 と結合し、おそらくリン酸化によって Swe1 が安定化され傷害が修復するまで M 期を遅らせると考えられている。しかし、*NIK1/HSL1* 遺伝子が生育に必須でないこと、そして *GIN4* と *KCC4* の今回得られた解析結果から類推すると構造が似ている Gin4 と Kcc4 もこのモデルに当てはまると考えられる。一方、Bud neck での機能分担を知る手掛かりの 1 つとして Gin4 がセプチンの 1 つ Cdc3 と直接的に結合すると報告されているが、我々は新たに Kcc4 が Cdc11 と直接的に結合する結果を得た。このように結合するセプチンパートナーの違いが Gin4 と Kcc4 のセプチンを通じた制御機構に重要であると総括した。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、出芽酵母のタンパク質キナーゼ Nik1、Gin4、及び Kcc4 の細胞周期への関与と機能分担に関して、以下の事実を見出したものである。

- (1) *GIN4* と *NIK1* mRNA は細胞周期の G1/S 期で転写が増減するが、*KCC4* mRNA の発現は細胞周期で依存しない。
- (2) *GIN4*、*KCC4*、及び *NIK1* は *CDC28* と遺伝学的に相互作用する。
- (3) Gin4、Nik1、及び Cdc28 タンパク質は複合体を形成する。
- (4) Gin4 と Kcc4 欠損株に見られる細胞質分裂異常には違いがある。
- (5) Gin4 と Kcc4 は Nik1 と同様に Bud neck に局在する。
- (6) Kcc4 は Bud neck の細胞骨格を構成するセプチンと複合体を形成し、Gin4 とは異なったセプチンファミリーである Cdc11 と直接的に結合する。

以上の結果から、Gin4 と Kcc4 が Nik1 に類似する機能を持って、細胞周期を制御していること、および細胞骨格（セプチン）と細胞周期の制御が連動していると結論した。本研究は真核生物における細胞質分裂の分子制御機構に関して新たな知見を与えるものであることから学位の授与に値すると考えられる。