



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">大阪大学の博士論文について</a>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

氏名	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を欠失させると抑制できることから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変異株も同様の表現型を示したことから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 はセプチソ複合体を形成することが報告されていることから Kcc4 も同様にセプチソ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ソファミリーの 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 はセプチソと複合体を形成し、セプチソ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ソやセプチソ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 がセプチソの 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ソパートナーの違いが Gin4 と Kcc4 のセプチソを通し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ソと複合体を形成し、Gin4 とは異なったセプチソファミリーである 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（セプチソ）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する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。