

論文審査の結果の要旨

氏名 浅川和秀

本論文は出芽酵母の細胞周期 M 期の終了の分子機構について解析したものである。第 1 章では、M 期終了ネットワークの一員である Tem1GTPase の機能解析から、その標的蛋白質として Cdc15 を見出した。Cdc15 上に Tem1 結合ドメインを同定し、その領域に突然変異を導入し、両者の結合の可能性をサポートする結果を得た。Tem1 と Cdc15 との結合は Cdc15 キナーゼを活性化することはなかったことから、Tem1 は Cdc15 の細胞内局在を制御する可能性を指摘した。第 2 章では、Cdc15 の機能を調べる目的で、cdc15-2 温度感受性株からの復帰変異体を分離し解析した。そのうちの一つに細胞質/核間の蛋白質輸送に関与する蛋白質 Kap104 をコードする遺伝子に生じた変異体であった。Kap104 の不活性化がどのようにして cdc15 を抑圧するかについて検討を加えたところ、CDK の阻害因子 SIC1 の発現に必要な因子 Swi5 の輸送を通して CDK 活性を制御し、Kap104 の不活性化が cdc15 変異体の M 期終了を促進していることを明らかにした。以下に各章の要約を示す。

第 1 章 **Tem1 と Cdc15 との相互作用についての解析**：Cdc15 のアミノ末端に存在するキナーゼドメインに隣接した、82 アミノ酸からなる領域が Tem1 結合領域である。部位特異的変異導入により Tem1 結合領域に変異を持った変異 *cdc15* を作製した。*cdc15-LF* 変異は、Tem1 と Cdc15 の結合を減少させ、温度感受性増殖を引き起こした。*cdc15-LF* 株の温度感受性増殖は、*TEM1* の大量発現、あるいは活性化型 *TEM1* (*TEM1-1*) の発現によって抑圧された。特に *TEM1-1* による *cdc15-LF* 株の温度感受性の抑圧が顕著だったことから、活性化型 Tem1 と Cdc15 の結合が M 期終了に必要なと考えられた。Cdc15-LF の *in vitro* キナーゼ活性は野生型 Cdc15 のそれと大きな差は見られなかった。一方、Cdc15-LF は 37°C における SPB 局在に欠損を示した。Cdc15 の Tem1 結合領域は、Cdc15 の SPB への局在制御に関与していると考えられた。以上の結果から、M 期終了において活性化された Tem1 が Cdc15 の SPB 局在を制御して M

期終了を促進していることが示唆された。

第2章 M期/G1期遷移における Cdc15 の機能についての解析：M期終了における Cdc15 の関連因子を探索したところ、importin β 様タンパク質をコードする *KAP104* の変異 (*kap104-rcf* 変異) が、*cdc15-2* 株の温度感受性を抑圧することを発見した。制限温度 34°Cにおいて、*cdc15-2* 株はスピンドルを保持したまま M期終期で停止した。一方、*cdc15-2 kap104-rcf* 株はスピンドルを脱重合して M期を終了し、その後 DNA の再複製を行い二度目の M期へと進行したことから、*kap104-rcf* 変異が M期終了を促進していると考えられた。34°Cにおいては、*cdc15-2 kap104-rcf* 株は出芽周期をくり返し、数珠状の細胞になった。Zymolyase 処理によって細胞壁を消化しても数珠状の形態は失われないことから、*cdc15-2 kap104-rcf* 株は細胞質分裂に欠損を示すと考えられた。これらの結果は、M期終期で停止した *cdc15-2* 株においては、M期終了を促進するだけでは、細胞質分裂を誘導するには十分ではないことを示している。すなわち、Cdc15 は M期終了のみならず、細胞質分裂においても重要な役割をはたしていると考えられた。M期終了において CDK (サイクリン依存性キナーゼ) インヒビター Sic1 の十分な発現には *SIC1* の転写活性化因子 Swi5 が必要であり、Swi5 は M期終了において Cdc15 依存的に核内に蓄積することが知られている。37°Cにおいて M期後期/終期における Swi5 の核への蓄積は、*cdc15-2* 株では顕著でないが、*cdc15-2 kap104-rcf* 株では観察された。*kap104-rcf* 変異は Swi5 を核に蓄積させることで M期終了を促進していると予想された。

以上のように、本論文は Tem1 と Cdc15 を通して M期終了の機構の理解におおきな進歩をもたらした。公表された論文は共著であるが、実験計画およびその執行は申請者によるもので、他のものは実験補助者とアドバイザーである。以上の評価に基づき、本研究は博士 (理学) の学位に十分値するものであることが、審査委員全員の一致により認められた。