

論文内容の要旨

論文題目 : **Analysis of genes involved in cytokinesis**

of *Saccharomyces cerevisiae*

(出芽酵母の細胞質分裂関連遺伝子の機能に関する研究)

岩瀬 政行

セプチン遺伝子 *SHS1/SEP7* とセプチン複合体との関係解析

序 :

細胞が増殖するためには細胞質分裂が必須である。その細胞質分裂において中心的な働きをしているのがセプチンである。出芽酵母では、セプチンは細胞質分裂の他に、出芽位置の決定、M期サイクリン依存的芽の極性成長の変換に機能していることが知られている (図1)。出芽酵母のセプチンは *CDC3*、*CDC10*、*CDC11*、*CDC12*、*SPR3*、*SPR28*、*SHS1/SEP7* の7遺伝子にコードされ、このうち *SPR3*、*SPR28* は孢子形成条件でのみ発現していて通常は発現していない。セプチンはお互い同士で複合体を形成していて、さらにその複合体が重合して繊維状構造をとって、細胞質分裂面バッドネックに局在していると考えられている。近年、セプチンは様々な生物において「セプチン」としての解析は進んできているが、個々のセプチンの解析、およびセプチン同士の関係解析はほとんど行なわれていない。また、出芽酵母において一番最後にゲノムプロジェクトによりその存在が明らかとなった *SHS1* に関してはバッドネックに局在するという以外は何も情報がなかった。

私は博士過程において、*Shs1* がどのように「セプチン」として機能しているのか知るために、*SHS1* と他のセプチン遺伝子との遺伝学的関係を調べることにより解析を行なった。

結果と考察 :

1、*SHS1* 破壊株における他のセプチンの局在

Cdc3、*Cdc10*、*Cdc11*、*Cdc12* はお互い同士依存してバッドネックに局在していることが知られてい

る。セプチン変異株においてセプチンがバッドネックにない制限温度では細胞質分裂ができないため、細胞は増殖できない。 $\Delta shs1$ 株は制限温度において細胞質分裂ができず増殖できないが、この時セプチンリングはバッドネックに観察された(図2)。注目すべき点は、セプチンリングがバッドネックに形成されているにも関わらず $\Delta shs1$ 株は細胞質分裂に異常をきたし増殖できないことである。Shs1は通常の細胞においてはセプチン複合体の形成、配列には機能してないが、バッドネックにセプチン複合体が作られた後にセプチン複合体の機能化に働いているセプチンであることが分かった。

2、CDC10とSHS1の関係

SHS1が具体的にどの様に他のセプチンと関わって機能しているのかを調べるために掛け合わせ実験を行った。 $\Delta cdc10$ 株は許容温度ならセプチンリングはバッドネックに形成され、細胞は増殖することができる。しかし、 $\Delta cdc10 \Delta shs1$ 株は $\Delta cdc10$ 株の許容温度でも致死性を示し(図3A)、また、セプチンリングは形成されず(図3B)、そのために増殖できないことが分かった。この結果から、Cdc10が存在しないセプチン複合体においては、Shs1はセプチン複合体の形成、配列にも必要であることが分かった。

3、CDC11とSHS1との関係

次にCDC11との関係を調べた。 $\Delta cdc11$ 株においてSHS1を破壊すると、 $\Delta cdc11$ 株の高温感受性を部分的に相補することができた(図4A)。この時、セプチンリングはバッドネック付近に形成されるようになっていた(図4B)。また、 $\Delta cdc11$ 株においてShs1を過剰発現すると致死となることから、Cdc11が存在しないセプチン複合体においては、Shs1の存在はセプチン複合体の形成を阻害し、そのためにShs1がないと増殖が可能になると思われる。

4、shs1変異株の単離

Shs1がどの様にセプチン複合体において働いているのかさらに具体的に調べるためにShs1とCdc12の結合に注目した。Shs1はセプチンの中ではCdc12とtwo-hybrid結合において非常に強く結合する。そこで、Cdc12と結合できないshs1株を取得し、その表現型を調べることでShs1がどのように機能しているのか知ろうとした。まず、Shs1のどの領域がCdc12と結合しているのか調べたところ、全長以外はいずれの領域のShs1も全長のCdc12と結合できなかつた(図5)。これは結合領域が複数あるのか、あるいは構造的に全長でないと結合できないためであると考えられる。そこで、ゲノム上のSHS1のC末端100bp欠けた株(図5最下段)を作り、shs1-100c株と名付け、その表現型を調べた。

5、shs1-100cの表現型

shs1-100c株は調べた結果、野生型株となんら変わる表現型を示さず、局在も野生型のShs1同様にバッドネックだった(図6)。これらのことから、shs1-100c変異によるShs1の機能的欠損はCdc12と結合できないことだけであると考えられ、次に $\Delta cdc10$ 、 $\Delta cdc11$ 株との掛け合わせ実験を行ない関係を調べた。その結果、 $\Delta cdc10 shs1-100c$ 株は $\Delta cdc10 \Delta shs1$ 株同様に合成致死性を示し、 $\Delta cdc11 shs1-100c$ 株は $\Delta cdc11 \Delta shs1$ 株同様に $\Delta cdc11$ 株の高温感受性を相補した。以上の結果から、Shs1はCdc12と結合することによりセプチン複合体に対して機能していると考えられる。

まとめとShs1の機能の考察：

SHS1は通常条件ではセプチン複合体の形成、配列には必要ないが、セプチン複合体の機能化に必要なであ

ることが分かった。しかし、 $\Delta cdc10$ 株ではセプチン複合体の形成、配列にも必要で、逆に $\Delta cdc11$ 株ではセプチンの配列を阻害していることを発見した。これらの結果から、Shs1はセプチン複合体の状態によりセプチン複合体に対する機能を変えていくことが考えられる。その機能はCdc12と結合することで行なわれていると思われる(図7)。

Septin genes

CDC3, CDC10, CDC11, CDC12, (SPR3, SPR28, SHS1/SEP7)

septin complex

septin filament

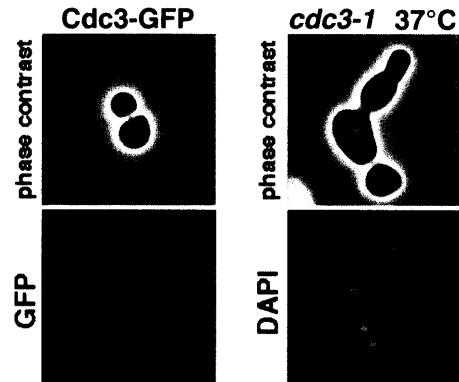


図1、セプチンの局在と変異株の表現型

セプチンの一つである Cdc3の細胞内における局在は細胞質分裂面バッドネックで、その変異株は制限温度下で細胞質分裂できなくなつた多核の細胞になり、芽は異常に伸長し、出芽パターンはランダムとなる。

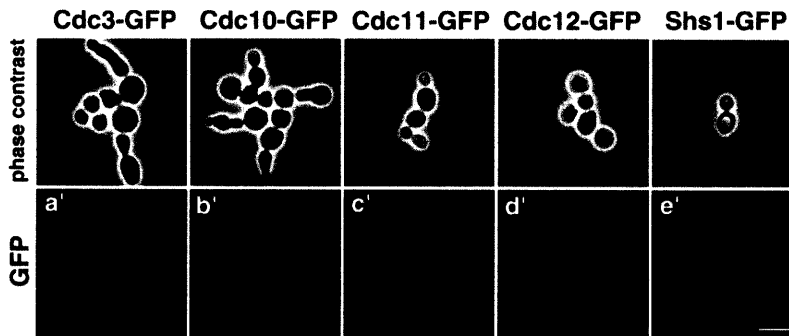


図2、 $\Delta shs1$ 株において他のセプチンはバッドネック局在している

$\Delta shs1$ 株を制限温度である 20°C で6時間培養した細胞において他のセプチンの局在を観察した。他のセプチンはいずれもつながった細胞の一番外側のバッドネックに局在することができた。セプチンがつながった細胞の一番外側のバッドネックにしか局在していないのは、細胞周期の進行に伴い内側のバッドネックからは既に分解、移動してしまったためであると考えられ、Shs1はセプチンの分解、移動には機能していないことも分かった。

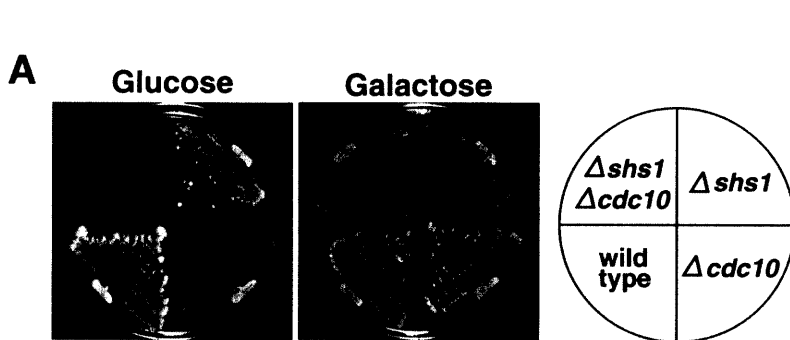
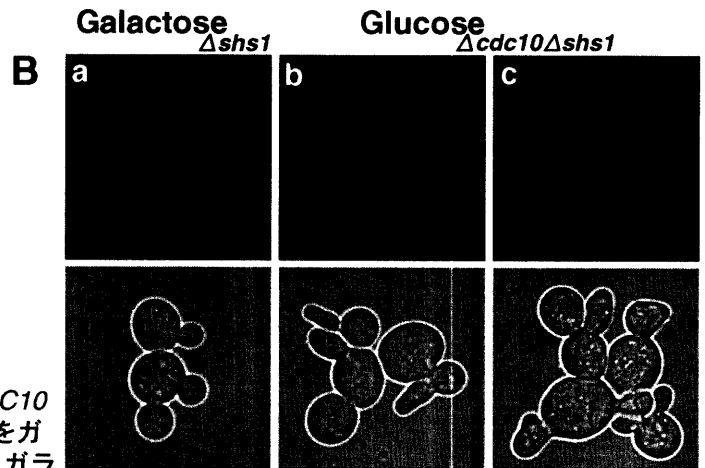


図3、 $\Delta cdc10 \Delta shs1$ 株は合成致死性を示す

(A) $\Delta cdc10$ 株に *GAL1*プロモーター下で発現するように作った *CDC10*のプラスミドを導入した株と $\Delta shs1$ 株とを掛け合わせた二倍体株をガラクトース培地において四分子解析し、得られた分離体をそれぞれガラクトース培地、グルコース培地に塗った。その結果、 $\Delta cdc10 \Delta shs1$ 株はグルコース培地において増殖することができなかった。(B)(A)で得られた $\Delta cdc10 \Delta shs1$ 株に *GAL1-CDC10*のプラスミドを導入した株をガラクトース培地で培養し(a)、その後グルコース培地で8時間培養し、セプチン(Cdc12-GFP)の局在を観察した(b,c)。ガラクトース培地ではCdc12はバッドネックに局在が見られたが、グルコース培地に移すことで局在がなくなった。



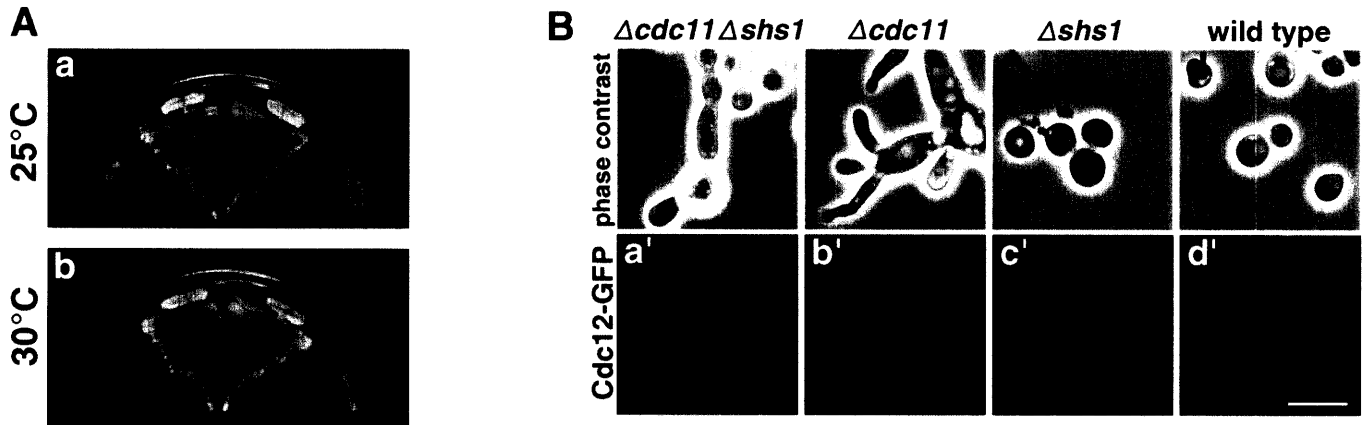


図4、 $\Delta cdc11$ 株では Shs1は阻害的に働く
 (A) $\Delta cdc11$ 株と $\Delta shs1$ 株とを掛け合わせた二倍体株を四分子解析し、その分離体を 25°C、30°Cのプレートに塗った。30°Cにおいて、 $\Delta cdc11$ 株は増殖できないのに対して、 $\Delta cdc11 \Delta shs1$ 株は増殖することができた。(B)30°Cにおけるセブチン(Cdc12-GFP)の局在を観察した。 $\Delta cdc11$ 株では Cdc12はほとんど観察されなかったが、 $\Delta cdc11 \Delta shs1$ 株ではバッドネックの周辺に Cdc12の局在が見られた。この時、Cdc12は内側のバッドネックに残ったままであることから Cdc11はセブチンの分解、移動に必要であることも分かった。

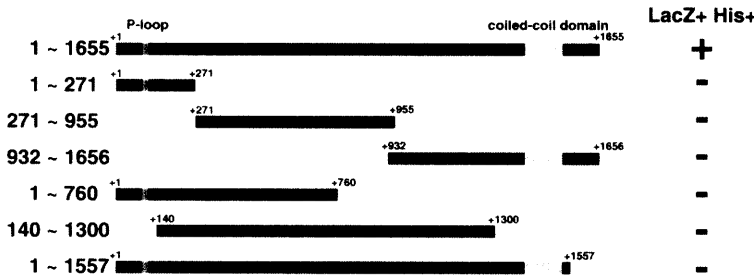
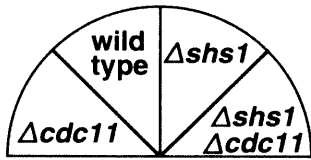


図5、Cdc12と結合する Shs1の領域の探索
 Shs1の様々な領域と全長の Cdc12との結合を two-hybrid 法において調べたが、Shs1の全長以外は結合しなかった。



図6、shs1-100cの局在
 shs1-100cに GFPを融合し、その局在を観察した。shs1-100c-GFPは野生型の Shs1同様にバッドネックに局在していた。

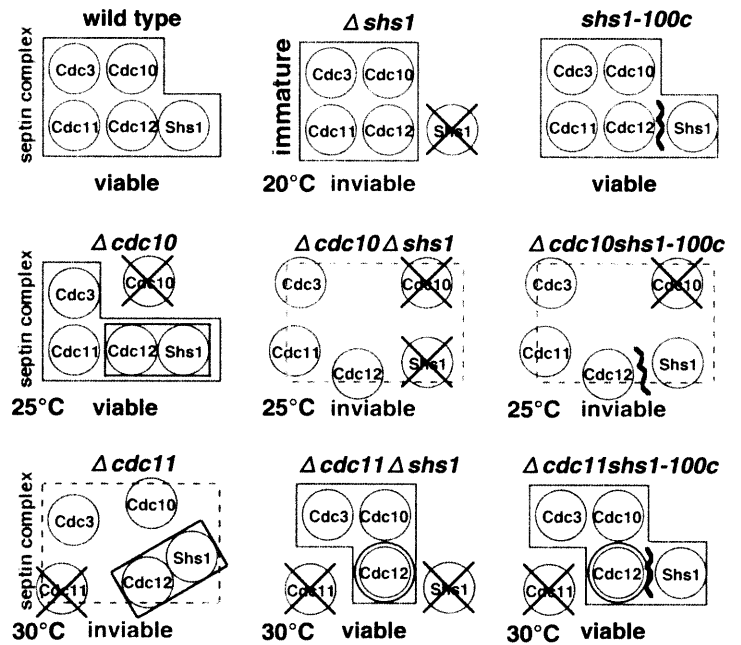


図7、セブチン複合体のモデル図

$\Delta shs1$ 株では制限温度下においてセブチン複合体をバッドネックに形成することはできるが、Shs1がないと機能的なセブチン複合体ではなく細胞質分裂できない(上段真ん中)。 $\Delta cdc10$ 株では Shs1が Cdc12と結合しないだけでセブチン複合体は形成されず、細胞質分裂できず増殖することはできない(中段)。 $\Delta cdc11$ 株では Shs1はセブチン複合体の形成に阻害的に働くが、バッドネックに存在していても Cdc12と結合していなければ、セブチン複合体を維持することができ、部分的に細胞質分裂できて増殖することができる(下段)。