

論文審査の結果の要旨

氏名 岩瀬政行

本論文は4章からなり、第1章では本論文の出発点となった *SHS 1* 遺伝子を取得した経緯を述べ、第2章では、*SHS 1* 遺伝子について詳しい機能解析を行い、第3章では、*SHS 1* 遺伝子相互作用する遺伝子として分離した *NIS1* 遺伝子の解析を行い、第4章では *NIS1* と相互作用する遺伝子として分離した *REI1* 遺伝子の機能解析について述べている。これらの因子はいずれも出芽酵母の細胞質分裂に関わり、本論文ではこれらの働きモデルを提案している。以下に論文の内容を説明する。

第一部（第1章、第2章、第3章）セブチン遺伝子 *SHS 1* とセブチン複合体との関係解析および *SHS 1* と相互作用する遺伝子

1-1、*SHS1* 破壊株における他のセブチンの局在

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。セブチン変異株においてセブ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。*Δshs1* 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、この時セブチンリングはバッドネックに観察された。注目すべき点は、セブ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 *Δshs1* 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ブチン複合体の形成、配列には機能していないが、バッドネックにセブチン複合体が作られた後にセブチン複合体の機能化に働いているセブチンであることが分かった。

1-2、*CDC10* と *SHS1* の関係

SHS1 が具体的にどの様に他のセブ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なった。*Δcdc10* 株は許容温度ならセブ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、*Δcdc10 Δshs1* 株は *Δcdc10* 株の許容温度でも致死性を示し、また、セブチンリングは形成されず、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* が存在しないセブチン複合体においては、*Shs1* はセブチン複合体の形成、配列にも必要であることが分かった。

1-3、*CDC11* と *SHS1* との関係

次に *CDC11* との関係性を調べた。*Δcdc11* 株において *SHS1* を破壊すると、*Δcdc11* 株の高温感受性を部分的に相補することができた。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。また、*Δcdc11* 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。

1-4、*shs1* 変異株の単離

Shs1 がどのよう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* と結合できなかった。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 欠けた株を作り、*shs1-100c* 株と名付け、その表現型を調べた。

1-5、*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られ、次に *Δcdc10*、*Δcdc11* 株との掛け合わせ実験を行ない関係性を調べた。その結果、*Δcdc10shs1-100c* 株は *Δcdc10 Δshs1* 株同様に合成致死性を示し、*Δcdc11shs1-100c* 株は *Δcdc11 Δshs1* 株同様に *Δcdc11* 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。

第二部 (第 4 章)、*Rei1* の機能解析、及び mitotic signaling network の研究

2-1、*rei1* の表現型

Ybr267w は *Nis1* を bait にした two-hybrid スクリーニングで単離された。このスクリーニングにおいて、同時に mitotic signaling network の構成員である *Nap1* も単離された。このことから *Rei1* は *Nap1*、セプチンが含まれる経路において機能しているのではないかと考え、*Δrei1* 株と *Δnap1* 株との掛け

合わせ実験を行ない、その表現型を調べた。*REI1* 単独の遺伝子破壊株は形態的な欠損は見られなかったが、 $\Delta nap1 \Delta rei1$ 株は $\Delta nap1$ 株よりもさらに芽が伸長した株となった。同様の表現型が $\Delta cla4 \Delta rei1$ 株、 $\Delta gin4 \Delta rei1$ 株でも見られた。これらの株の伸長した芽は、さらに*SWE1* を破壊することで相補された。以上の結果から *Rei1* も mitotic signaling network の構成員の一つであると考えられた。

2-2、Gin4 キナーゼ活性の測定

mitotic signaling network における *Rei1* の位置付けを行なうため、Gin4 キナーゼの活性を測定した。Gin4 よりも上流に位置付けされている *NAP1* の破壊株では Gin4 キナーゼ活性は既に報告があるように低下していたが、 $\Delta rei1$ 株、 $\Delta rei1 \Delta nap1$ 株では野生型株並みの活性が測定された。興味深いことに $\Delta nap1$ 株よりも極性成長に異常が見られる $\Delta nap1 \Delta rei1$ 株では、 $\Delta nap1$ により低下した活性が *REI1* を破壊することで回復していた。この結果から、*Rei1* は Gin4 キナーゼのインヒビターになっていると考えられ、また、Gin4 キナーゼの活性は芽の極性成長の変換には必要無いのではないかという疑問が生じ次の実験を行なった。

2-3、Gin4K48A の表現型

キナーゼ不活性型の Gin4K48A を作成し、Gin4 キナーゼ活性が芽の極性成長の変換に本当に必要であるかどうか調べてみた。その結果、Gin4K48A はキナーゼ不活性型であるにも関わらず $\Delta gin4$ により引き起こされる極性成長の変換の異常を相補することができた。この結果から、Gin4 のキナーゼ活性は芽の極性成長の変換には必要無いことが分かった。

2-4、mitotic signaling network の構成員同士の二重破壊株の表現型

mitotic signaling network の構成員は遺伝子破壊株が相加的な表現型を示すものが報告されているが、 $\Delta nap1 \Delta shs1$ 株の表現型も同様であった。これは mitotic signaling network が直線的な経路ではないことの裏付けの一つになると思われる。

以上のように本論文は出芽酵母の新奇の細胞質分裂関連遺伝子を同定しその機能解析を行い、従来の細胞分裂ネットワークのモデルを改訂した。公表された論文は共著であるが、実験計画の立案と執行は申請者によるものであり、共同研究者は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。