

論文の内容の要旨

論文題目

14-3-3 タンパク質による分裂酵母の減数分裂制御因子 Mei2p の制御機構

氏名 佐藤政充

細胞の分裂様式には、体細胞分裂と減数分裂という 2 種類が存在する。体細胞分裂は、動植物の体細胞や酵母細胞などが通常に増殖する場合の分裂様式である。これに対して減数分裂は、生殖細胞の産生に必要な分裂様式である。減数分裂は、体細胞分裂と同様に、酵母から高等な哺乳類に至るまで真核細胞生物において幅広く保存された分裂様式であるが、その制御過程については、体細胞分裂において得られているほどの知見が得られていない。そこで本研究では、減数分裂機構の解明のためのモデル生物として優れている分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を用いて解析を行った。

分裂酵母は通常、富栄養条件下では一倍体細胞として栄養増殖するが、培地中の栄養源(主に窒素源)が枯渇すると、異なる接合型の一倍体細胞同士による接合、減数分裂、そして孢子形成という一連の有性生殖過程に導かれる。減数分裂過程は、減数分裂前 DNA 合成、減数第一分裂、減数第二分裂からなる。分裂酵母 *mei2* 変異株は、減数分裂前 DNA 合成の前で減数分裂過程が停止する変異体のひとつとして得られた。遺伝子クローニングの結果、*mei2* 遺伝子は RNA 結合タンパク質をコードすることが分かった。

その後の解析から、分裂酵母の減数分裂が進行するためには Mei2 タンパク質(Mei2p)の活性化が必要十分であることが明らかとなった。体細胞分裂時には、Mei2p は Pat1 キナーゼによるリン酸化を受けてその機能が抑えられているが、減数分裂誘導条件下に Pat1 キ

ナーゼは不活性化され、脱リン酸化型の Mei2p が蓄積して減数分裂が開始する。Mei2p は減数分裂前 DNA 合成および減数第一分裂という減数分裂の異なる 2 つの段階において減数分裂の進行に必須の活性を担っている。

また、GFP と Mei2p の融合タンパク質の局在観察の結果から、Mei2p の減数分裂における挙動についても興味深い知見が得られている。体細胞分裂周期にある細胞では GFP-Mei2p は細胞質に存在する。Mei2p が必要とされる減数分裂前 DNA 合成開始時も同様に細胞質局在を示すが、その後、減数第一分裂の進行に必須の機能を果たすために、Mei2p は meiRNA と呼ばれる RNA 分子と結合して、核内でドット状に局在する。meiRNA 欠損株は減数第一分裂の前で停止する減数分裂不能の表現型を示し、Mei2p の核内ドットを形成しない。しかし、Mei2p に核移行シグナル(NLS)を付加すると、核内に高濃度に蓄積した Mei2-NLSp がドットを形成し、meiRNA 欠損株の減数分裂不能を高い効率で抑圧することが可能であった。このことから、meiRNA は減数第一分裂開始時に Mei2p を核内に移行させる活性をもつ可能性が想定されていた。しかし、Mei2p が常時、核-細胞質間を行き来(シャトル)している場合には、meiRNA が Mei2p の核への移行を促進する可能性に加えて、meiRNA が Mei2p を核内に繫留してドット形成能を高めている可能性がある。これらの可能性を検討するために、本研究ではまず核外輸送因子 exportin 1 の阻害剤である leptomycin B (LMB)を用いて解析した。

1. LMB を用いた Mei2p の核-細胞質間輸送の解析

体細胞分裂により増殖している細胞では、Mei2-GFP は細胞質に存在する。しかし LMB を添加すると、Mei2-GFP の核への蓄積が観察された。これは meiRNA 欠損株においても同様であった。すなわち、Mei2p は meiRNA 非依存的に核内に流入し、exportin 1 に依存した経路で細胞質に排出される、核-細胞質間をシャトルするタンパク質であることが明らかとなった。さらに、meiRNA を過剰発現させた細胞に LMB を添加しても、GFP-Mei2p の核蓄積率は野生型と同等であった。しかしながら、meiRNA を過剰発現させた株では、野生型と比較してきわめて高い頻度で GFP-Mei2p が核内にドットを形成していた。逆に meiRNA 欠損株ではドットが殆ど形成されなかった。以上の事実から、meiRNA は Mei2p の核内への輸送を助けるのではなく、核内に流入した Mei2p を核内に繫留してドット状に局在させることで減数分裂を進行させるという機能を持つことが示唆された。以上の結果をまとめると、体細胞分裂条件下では Mei2p は核-細胞質間をシャトルしているが、減数分裂条件下では、少なくとも一部の Mei2p が meiRNA と結合することによって核内に繫

留されてドット状に局在し、その結果減数分裂を進行させるという制御機構の存在が示唆された。

2. 14-3-3 タンパク質 Rad24p による、Mei2p を介した減数分裂制御機構の解析

次に、Mei2p が減数分裂を制御する分子機構をさらに解析するために、two-hybrid 法を用いて Mei2p と相互作用する因子を検索した。その結果、いくつかのタンパク質が Mei2p と相互作用する候補として得られた。本研究ではその中から分裂酵母の 14-3-3 タンパク質である Rad24 タンパク質(Rad24p)に注目して解析を進めた。14-3-3 は酵母から高等真核生物に至るまで高度に保存されており、様々なタンパク質と相互作用することで、細胞周期制御やシグナル伝達など、多岐にわたる細胞内現象において重要な役割を担うことが知られている。14-3-3 と結合する様々なタンパク質の配列比較から、14-3-3 はリン酸化された特定のモチーフに結合することが明らかとなっている。本研究では Mei2p の Pat1 キナーゼによるリン酸化部位がこの 14-3-3 結合モチーフに相同性を有することに着目し、免疫沈降実験などによって、Rad24p が脱リン酸化型の Mei2p よりも Pat1 キナーゼによってリン酸化された Mei2p とより強く結合することを実証した。

一方、遺伝学的な解析から、Rad24p は減数分裂を抑制する活性を持つという結果が得られた。すなわち、二倍体の *rad24* 遺伝子破壊株は、増殖条件下でも高頻度に減数分裂を開始した。また、Rad24p の過剰発現は、*pat1-114* 温度感受性変異株の高温での減数分裂を抑圧した。これらの観察から、Rad24p が Pat1 キナーゼによる Mei2p の活性抑制機構に関与している可能性が強く示唆された。

さらに、*rad24* 遺伝子を破壊することによって、*meiRNA* 欠損株の減数分裂不能が抑圧された。すなわち、*meiRNA* 欠損株は Mei2p のドットを形成できないが、*rad24* を破壊することによって Mei2p のドット形成能が回復し、減数分裂が進行できたと考えられた。言い換えると、Rad24p は Mei2p のドット形成を抑制しているといえる。このことは、*rad24* 破壊株内で GFP-Mei2p を発現させると、本来核内ドットを形成しない増殖条件下でもドット形成が見られたという事実によっても裏付けられる。

Rad24p がどのような分子機構で Mei2p のドット形成を抑制しているかを追究した。アフリカツメガエル卵母細胞での 14-3-3 による Cdc25 の局在制御の実験では、14-3-3 はリン酸化された Cdc25 と結合することによって、Cdc25 の核移行を阻害しているとされる。ところが分裂酵母 *rad24* 破壊株において Mei2p の核移行速度は野生型と同等であり、14-3-3 は Mei2p の核移行を阻害しないことが分かった。また、核内に強制的に移行させた Mei2-

NLSp は *rad24* 破壊株の核内で高頻度にドットを形成したが、野生株の核内ではドット形成率が低かった。以上の結果は、Rad24p は Mei2p の核移行段階ではなく、核内に移行した Mei2p のドット形成過程を直接阻害していることを示唆している。

Mei2p のドット形成を阻害する Rad24p と促進する meiRNA の作用が互いに関連しているかについて検討した。*in vitro* での実験の結果、Rad24p は Pat1 キナーゼによってリン酸化された Mei2p に強く結合することによって、リン酸化型 Mei2p の meiRNA との結合を阻害することが示された。

以上をまとめて、減数分裂の開始制御機構として従来のモデルをより具体化した以下のモデルが導かれた。体細胞分裂時にわずかに発現される Mei2p は、核-細胞質間をシャトルしているが、Pat1 キナーゼによるリン酸化を受けているため 14-3-3 が結合している。その結果 Mei2p は meiRNA と効率よく結合できずにドット形成に至らず、exportin 1 によって核外に排出される。これに対して減数分裂条件下では、Pat1 キナーゼが不活性化され、また Mei2p の発現も増加する結果、脱リン酸化型の Mei2p が蓄積するが、これらには 14-3-3 が結合しないか、ごく弱い結合しかしない。従って減数分裂条件下で発現が増大した meiRNA は 14-3-3 による阻害を受けずに Mei2p と結合し、ドット状の Mei2p-meiRNA 複合体を形成して減数分裂を進行させる。

このように、meiRNA は Mei2p の核内への輸送を助けるのではなく、Mei2p を核内に繋留してドットを形成させることによって減数分裂を進行させること、および Pat1 キナーゼによる Mei2p の不活性化機構は、少なくとも部分的には 14-3-3 による Mei2p のドット状局在阻害の結果であることが明らかとなった。