

論文内容の要旨

論文題目 「分裂酵母 Mei2 タンパク質が形成するドット状構造の時間的空間的挙動」

氏名 島田 忠之

分裂酵母 Mei2p タンパク質は、減数分裂の進行に必須の役割を持つタンパク質で、減数分裂前 DNA 合成及び、減数第一分裂の進行の二つのステップに機能していると考えられている。また、Mei2p の細胞内の局在を観察すると、Mei2p は減数第一分裂前期の核内にドット状の構造を形成しており、このドット形成が第一分裂に密接に関与していることが知られている。減数分裂前 DNA 合成から減数第一分裂前期にかけて、核は細胞内で伸長した形態を取りその形態からホーステール核と呼ばれている。ホーステール核は、高等真核生物の中心小体にあたる構造体の紡錘極体 (SPB) に引っ張られる形で核内を往復運動する。Mei2p ドットの位置はこの往復運動する核の中で、常に前方の特定の位置に存在することが知られている。本研究では、この Mei2p が形成するドット状の構造体が核内のどのような位置に存在するかを明らかにすることを試みた。

哺乳類培養細胞に Mei2 タンパク質と、Mei2p と相互作用する RNA 分子である meiRNA を共に発現した場合、核内の Mei2p は核小体内に集約するという知見があることから、まず、Mei2p ドットが核小体と相互作用している可能性について検証した。減数分裂期のホーステール核において、核小体に特異的に存在するタンパク質である Gar2p でマーク

した核小体と、Mei2p の位置関係を比較したが、Mei2p ドットは核小体内には含まれておらず、むしろ核小体とは一定の距離をおいて存在した。

そこで、ホーステール核において、特異的に染色体配置が乱れる変異体を用いて Mei2p ドットを観察したところ、染色体配置の乱れに応じて、Mei2p ドットの核内の位置が変化した。このことから、Mei2p ドットが染色体に依存してその局在位置を決定している可能性が示唆された。

染色体に依存して Mei2p ドットの局在が決定されているのかを確認するために、一倍体細胞に減数分裂を誘導するシステムを利用した。一倍体に強制的に減数分裂を誘導する場合、細胞が接合フェロモンのシグナルを受け取ったか否かで第一分裂の染色体分配様式が変化することが知られている。接合フェロモンを受容した場合、複製された二本の染色分体は同一極に分配されるが、受容しなかった場合、二本の染色分体は反対極に分配される。そこで、これらの二つの減数分裂誘導方法により一倍体を減数分裂させ、減数第一分裂後期の核が二つ観察される時期の Mei2p ドットの局在を観察した。すると、Mei2p ドットは染色分体の分配と同じように、フェロモンを受容した場合は片方の極にだけ、受容しなかった場合には両方の極に分配された。そのため、Mei2p ドットは染色体と挙動を共にすることが明らかにされた。

分裂酵母には 3 本の染色体が存在するため、Mei2p ドットがそのいずれかの染色体と特異的に挙動を共にしているかを調べることにした。特定の染色体をラベルした一倍体細胞に対し、フェロモン受容を伴う方法で減数分裂を強制的に誘導し、Mei2p ドットと高い頻度で同じ核に分配される染色体が存在するか確認した。その結果、二番染色体が Mei2p ドットとほぼ 100%同一極に分配されたため、Mei2p ドットは二番染色体と挙動を共にしていると考えられた。

続いて、二番染色体上の定められた領域に Mei2p ドットが局在するかを検討した。この検討では強制的に減数分裂を誘導した一倍体細胞ではなく、通常の二倍体細胞の減数分裂のホーステール期においても、Mei2p が二番染色体と挙動を共にしているのかを確認を兼ねた。ホーステール核においては、染色体のテロメア領域が SPB に集まっていることが知られており、SPB からの物理的な距離が、テロメアからの遺伝学的な距離とほぼ対応していることも明らかにされている。そのため、まず二番染色体上のさまざまな領域を標識した細胞において、その標識部位と Mei2p ドットの位置関係を調べることにした。その結果、Mei2p ドットはテロメアから 400kb の地点を標識した場合に、その標識部位と近接して存在することが確認された。しかし、染色体の両端が SPB 部分に存在するため、Mei2p がどちらの染色体腕部に存在するかは判明しない。そこで、*taz1* の変異体を用いることにした。*taz1* 変異体はホーステール核においてテロメアが SPB に集合しないとい

う表現型を示す。そのため、核内の染色体配置がランダムになるのだが、二番染色体短腕のテロメアから 400kb を標識した細胞では、常に Mei2p ドットと標識部位が近接して存在していた。これに対し、長腕をマークした細胞では Mei2p ドットと標識部位の平均距離が大きく増大した。そのため、Mei2p ドットは二番染色体の短腕に局在すると結論された。

二番染色体の短腕、テロメアから約 250kb の地点には *sme2* 遺伝子座が存在する。*sme2* は Mei2p と相互作用する RNA 分子である *meiRNA* をコードしており、*sme2* の過剰発現により *mei2* の温度感受性変異株を抑圧できることが分かっている。このように *mei2* と *sme2* には遺伝学的、物理的な相互作用が認められているため、Mei2p ドットと *sme2* コード領域の関係を調べた。

すると、Mei2p ドットは *sme2* コード領域に依存した位置に形成されることが分かり、例えば染色体内の *sme2* コード領域の位置を変えると核内の Mei2p ドットの位置も変化した。また、*sme2* 破壊株では Mei2p ドットが形成されないことが明らかにされているが、ドットを形成するためには細胞内に *sme2* コード領域の配列が存在するだけでなく、そこから *meiRNA* が転写されていることが必要であることも判明した。

以上より、Mei2p ドットは二番染色体上の *sme2* コード領域に *meiRNA* の転写活性に依存して形成されることが結論づけられた。

接合から減数分裂に到るさまざまな過程の中で Mei2p ドットが観察される時期がいつからいつまでなのかを明らかにすることを試みた。有性生殖過程の特異的な段階で停止する変異体を使用してそれぞれの最終表現型で Mei2p ドットが観察されるか否かを確認した。

その結果、Mei2p ドットは栄養源飢餓、フェロモンシグナルの受容の段階では形成されず、その後の、細胞同士が接着する前接合子形成の段階から観察された。また、Mei2p ドットは減数第一分裂の核分裂の進行に伴い消滅し、減数第二分裂開始前には観察されなくなる。ドットの形成は減数第一分裂の進行に関与しているにもかかわらず、ドット形成は接合段階から形成されているということになる。しかし、ドットを形成した前接合子が接合の段階をスキップして有性生殖過程を進行させてしまうようなことは観察されなかった。

Mei2p は栄養増殖時には Pat1 キナーゼによりリン酸化され、このリン酸化が抑制されることで活性化することが知られている。そこで、リン酸化がドット形成に与える影響を調べた。Mei3p は二倍体細胞に特異的に発現する Pat1 キナーゼの抑制因子であり、Mei3p が発現することで脱リン酸化型 Mei2p が蓄積すると考えられている。そこで、*mei3* 破壊

株において、Mei2p ドットが形成されるかを確認したが、接合した mei3 破壊株においても Mei2p ドットが観察された。つまり、少なくとも Mei3p による Pat1 キナーゼの阻害は、ドット形成に必要な事項ではないといえる。また、meiRNA は Mei2p ドット形成に必要であるが、前接合子形成の段階での Mei2p ドット形成にも meiRNA の発現は必要であった。

そこで meiRNA がドット形成に与える影響を見るために、接合フェロモンを受容した段階、および前接合子形成の段階で有性生殖過程を停止する 2 種の変異体と野生型株の meiRNA の発現を比較したが、フェロモンシグナルを受容して停止した細胞でも meiRNA は接合後の野生型細胞と同様に発現していた。このことと、Mei2p のドットは接合フェロモンを受容しただけでは形成されなかったことから、有性生殖過程に進行した細胞に meiRNA が発現すればドットが形成されるとはいえない。これらの結果、Mei2p ドットの形成には前接合子形成の段階で何らかの未知のシグナルが細胞に伝達されることが必要であるということが示唆される。

Mei2p がどのようにして減数分裂過程を制御しているのかは不明であるが、複合体内に存在する RNA の転写に依存して染色体上にドット状の構造を作り出すという、今回明らかになった Mei2p ドットの特徴と同様な性質を持つ核内小体が哺乳類培養細胞に存在する。これは Cajal body と呼ばれており、主にスプライセオソームの構築や mRNA のキャッピングに関与する snRNA の成熟に関与すると考えられている。哺乳類細胞以外には Cajal body は存在しないが、こういった似たような性質から、Mei2p ドットが減数分裂に特異的な遺伝子のスプライシングを制御することで減数分裂の進行を制御しているとも考えられる。Mei2p がドットを形成することで果たす機能を解明する上で、Cajal body との機能的な関連性を追求する価値があるといえる。