

論文内容の要旨

論文題目 **Study of the spacio-temporal regulation of the factors involved in mitotic exit in budding yeast**

(出芽酵母 M 期終了制御因子の空間的な挙動の解析。)

氏名 吉田 知史

導入

細胞分裂周期において M 期終了のタイミングは非常に重要である。染色体を安定に保持するには、核分裂の完了後に核同士の間には細胞質分裂面がある状態で M 期を終了しなければならない。出芽酵母では核が娘細胞（芽）に分配されてから M 期終了に必要な Tem1 GTPase が活性化すると考えられている。活性化した Tem1 は Cdc15 kinase とスピンドル極体（SPB）の細胞質側で結合し、最終的に Cdc14 を活性化することで M 期を終了させる。Cdc14 は M 期 Cdk によりリン酸化された基質を脱リン酸化することにより M 期終了を司る phosphatase で、M 期 Cdk の不活性化に必須である。Cdc14 を大量発現すると細胞は M 期に進行することができないことから Cdc14 は M 期後期にのみ活性化されるように厳密に制御されていると考えられる。Cdc14 はその阻害因子 Net1 により核小体に封じ込められているが、M 期後期に細胞全体に放出されて Cdk を不活性化する。*tem1*, *cdc15* 変異株の最終表現型は Cdc14 が核小体に留まった状態で M 期終期停止するので Tem1/Cdc15 が Cdc14 を放出させると考えられていた。では SPB の細胞質側に局在している Tem1/Cdc15 がどうやって空間的に隔たった核小体中の Cdc14 を制御するのであろうか？また、M 期終了の時期を決定するのは核の位置（Tem1 の活性化）だけなのであろうか？私は Cdc14 の局在変化を詳細に調べることで Tem1 がどのように Cdc14 の活性化に貢献するのか、それから M 期終了のタイミングを決定する要因がどのようなものを明らかにしようと考えた。

結果

1. Tem1/Cdc15 非依存的な Cdc14 放出のメカニズムが存在する。

私は Cdc14 の挙動を容易に検出するために染色体上の CDC14 の carboxyl 末端に GFP を 5 つタンデムに融合し、完全に機能的で局在観察も可能な Cdc14-GFP 株を作成することに成功した。Cdc14-GFP は核分裂の開始とほぼ同時に核小体から放出され、M 期が終了し細胞質分裂が始まると同時に核小体に戻った。tem1 および cdc15 温度感受性変異株での Cdc14-GFP の局在を詳細に解析するため、細胞周期を同調させて経時的に Cdc14-GFP の局在変化を観察したところ、Cdc14 は制限温度下の cdc15 変異株でも M 期後期開始時に核小体から一過的に放出されていた。ただし、cdc15 変異株では M 期が終了できないにも関わらず Cdc14 はやがて核小体へ戻ってしまった。同様の結果は tem1 の変異株においても観察された。したがって tem1 や cdc15 変異株では Cdc14 の放出がおこらないというモデルは正しくなく、一過的な Cdc14 の放出を見過ごしてしまったものと考えられる。

これらの結果は Cdc15 とは独立に核分離開始時に Cdc14 の放出を引き起こす別のメカニズムが存在すること、また cdc15 変異株では Cdc14 を放出した状態に維持できないため M 期終了ができないことを示唆する。そこで私はまず Tem1/Cdc15 と独立な経路を探るために微小管毒ノコダゾールで核分裂を阻害したときの Cdc14 の局在を観察した。微小管に損傷がある場合 M 期の進行はスピンドルチェックポイントにより阻止されることがわかっている。出芽酵母にはキネトコアと微小管の bi-polar attachment が確立するまで姉妹染色体分離を阻害する Mad2 経路と核の位置を monitor して核分配が完了するまで M 期終了を阻害する Bub2 経路の 2 つのスピンドルチェックポイントが存在する。ノコダゾール存在下では細胞は M 期中期で停止し、Cdc14-GFP は核小体に保持されたままであった。ところがスピンドルチェックポイント因子である Mad2 あるいは Bub2 を欠損した株では一部の細胞で Cdc14 の放出がおこり、多少の遅延はあるもののやがて次の細胞周期へと進行した。この結果は Cdc14 の核小体からの放出がスピンドルチェックポイントにより阻害されていることを意味する。また mad2 bub2 の 2 重破壊株はノコダゾール存在下でそれぞれの単独破壊株と比べて Cdc14 の放出が顕著におこり、まったく M 期の遅延はおこらなかった。したがって Cdc14 の放出は Mad2 経路と Bub2 経路に独立に制御されていることになる。Bub2 は Tem1 を不活性化することが知られているので BUB2 破壊株での Cdc14 の放出は Tem1 の活性化によるものと考えられる。では Mad2 経路の下流で Cdc14 を制御するものはなんだろうか？ Mad2 チェックポイントは Pds1/Securin を安定化することで姉妹染色体分離に必須な Esp1/Separase 機能を阻害することが知られている。PDS1 破壊株でも MAD2 破壊株と同様に Cdc14

の一過的な放出がおこったことから M 期後期開始時の Cdc14 の放出は Separase が関与していると思われる(このことは最近報告された)。

II. Cdc5 kinase が Cdc14 の放出に必須である。

さらに私は M 期終了に必須で M 期に活性化する Cdc5 kinase の変異株では Cdc14 の放出がまったくおこらないことに気付いた。Cdc14 の放出は Mad2 や Bub2 を欠損した株でも Cdc5 がなければおこらないことから Cdc5 はこれらスピンドルチェックポイントよりも下流で Cdc14 を制御していると考えられた。そこで私は Cdc5 によるリン酸化が核小体の Net1-Cdc14 複合体を分離させるのではないかと考え、これらの因子が Cdc5 の基質である可能性を調べた。その結果以下のことが明らかになった。

1. スピンドルチェックポイント活性化時にも CDC5 を過剰発現すると Cdc14 の放出がおこること。またこの Cdc14 の放出には Cdc5 の kinase 活性が必要であること。
2. Net1 は Cdc14 が核小体から放出されている M 期後期にリン酸化されていること。
3. *cdc5* 変異株では M 期後期の Net1 のリン酸化も Cdc14 の放出もおこらないこと。
4. Cdc14 と結合している Net1 はリン酸化されていないこと。
5. M 期の酵母抽出液から免疫沈降した Cdc5 がバクテリアで発現精製させた Net1 をリン酸化しうること。
6. Cdc5 は M 期に核、SPB だけでなく核小体にも局在していること。

これらのことから Cdc5 による Net1 のリン酸化が Net1 と Cdc14 の結合を弱め、Cdc14 が核小体から放出されやすくなると考えられる。

III. Tem1 は Cdc14 の SPB 局在に関与する。

Cdc14-GFP は核小体だけでなく SPB にも局在した。Cdc14 の SPB 局在は細胞周期をとおして観察されるが、Cdc14 が核小体から放出されている M 期に最も SPB 局在が観察される細胞の割合が高かった。したがって Cdc14 の SPB 局在は核小体からの Cdc14 放出に依存するところが大きいと考えられる。制限温度下の *tem1* や *cdc15* の変異株でも Cdc14 の SPB 局在は観察されたが、Cdc14 の SPB 局在の頻度は細胞周期で大きな変化は見られなかった。*TEM1*, *CDC15* が Cdc14 の核小体からの放出に間接的に影響を与えること、さらに核小体からの Cdc14 の放出が SPB に局在する Cdc14 量に影響することを考えると *TEM1* 欠損株での Cdc14 の SPB 局在について

考察するのはむずかしい。そこで私は核小体からの Cdc14 の放出を考慮しなくてよいように NET1 の発現を抑え(*net1* 株とよぶ) Cdc14 が核小体から常に放出された状態にして Cdc14 の SPB 局在を観察した。*net1* 株では Cdc14-GFP は細胞周期を通して SPB に強く局在した。*net1* 株で TEM1 を破壊($\Delta tem1$)すると Cdc14-GFP の SPB 局在は顕著に強くなった。一方、Tem1 の不活性化因子 BUB2 を破壊した場合や、活性化型 Tem1 変異(TEM1-1)を導入すると Cdc14-GFP の SPB 局在はほとんど検出できなくなった。したがって Tem1 には SPB に集まった Cdc14 を細胞全体に放出させる機能があると考えられる。では Cdc14 が SPB に集まっているときとそうでないときではどちらが細胞内の Cdc14 の機能が亢進しているのだろうか? *net1* 株と比較すると *tem1 net1* 株では M 期後期の細胞の割合が高く、M 期の終了が遅延していた。したがって TEM1 破壊株で Cdc14 が SPB に過剰に集まった状態では Cdc14 が細胞全体に行き渡りにくく、結果的に M 期終了に時間がかかると考えられる。

まとめと考察

出芽酵母の Cdc14 の活性化 (細胞全体への放出) には (i) Separase の活性化。 (ii) Cdc5 の活性化。 (iii) Tem1 の活性化のいずれもが貢献していることが明らかになった。Separase の活性化時、つまり姉妹染色体が分離したときに Cdc14 が核小体から放出されるということは逆に言うと核分裂前の細胞ではたとえ核が娘細胞へ移動したとしても Cdc14 が核小体に留まっているので M 期が終了しにくいことを意味する。このように Cdc14 が幾重にも制御されていることで正確に遺伝物質を娘細胞に伝えることが可能になっているのだろう。動物細胞ではスピンドルチェックポイントの欠損や Separase、CDC5、CDC14 のヒト相同遺伝子の発現異常がいずれもスピンドルの異常、細胞質分裂の異常そして染色体数の異常を引き起こすことが知られている。したがって発ガンなどの細胞増殖異常のメカニズムを知る上でも出芽酵母での M 期終了制御はよいモデルになりうると考えられる。