

論文内容の要旨

論文題目：分裂酵母の減数第二分裂移行期における細胞周期制御機構の解析
(Analysis of cell cycle regulation for the transition to meiosis II in fission yeast)

氏名 伊澤 大介

細胞は、体細胞分裂を繰り返すことによって増殖する。数を増すだけなら体細胞分裂で十分であるが、異なった遺伝情報の組み合わせをもつ子孫を残すために、生物はより複雑な分裂様式である減数分裂を生み出した。減数分裂によって生殖細胞が作られ、父方由来の精子と母方由来の卵が会い新しい個体、つまり子孫が形成される。減数分裂に異常があると配偶子の染色体の倍数性が異数化し、その結果、子孫は死に至るか重大な疾患を引き起こしてしまう。減数分裂は種を維持するために重要な過程である

体細胞分裂周期では、DNA 合成期である S 期と核分裂期である M 期が繰り返し行われ、この順序は様々な機構によって厳密に制御されている。一方、減数分裂周期では、一回の DNA 複製の後に二回の連続した核分裂（減数第一分裂、減数第二分裂）が行われ、染色体の倍数性が半減する（図 1A）。さらに、体細胞分裂では常に姉妹染色体が異なる細胞に分配されるが、減数第一分裂では相同染色体が同極に分配し、減数第二分裂で姉妹染色体が異なった極に分配される。これら減数分裂周期と体細胞分裂周期の相違は、減数分裂周期に特異的に発現する因子によって生じている。減数分裂周期の進行には体細胞分裂周期と同じ因子が基軸となっているが、減数分裂特異的因子が体細胞分裂周期に働く因子に働きかけ、または、入れ替ることによって、特徴ある減数分裂を可能にしている。

M 期の進行にもっとも重要な役割を果たす MPF (M-phase Promoting Factor)は、

キナーゼである CDK (分裂酵母では Cdc2) と制御サブユニットである Cyclin B (分裂酵母では Cdc13) からなり、様々な因子をリン酸化することにより M 期を促進する。M 期の最も大規模な現象は、M 期中期 (metaphase) から M 期後期 (anaphase) にかけて起こる姉妹染色体の分離であり、その過程には APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) とその活性化因子である Cdc20 (分裂酵母では Slp1) が重要な役割を果たす。染色体の分離は、染色体間の接着を解消するセパリンとその阻害因子であるセキュリンによって制御され、APC/C が Cdc20 によって活性化されるとセキュリンの分解が促進されセパリンが活性化し染色体の分離が誘導される。この時、Cyclin B の分解も APC/C によって促進され、体細胞分裂では MPF が完全に不活性化される (図 2A)。この MPF の完全な不活性化は、次の細胞周期に移行するために必要不可欠である。このように M 期の開始から染色体の分離にかけて大規模な制御が行われ、この機構は酵母からヒトまでに見られる共通の機構である。

分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) は、栄養源が豊富な環境では体細胞分裂を繰り返すが、栄養源が不足すると他の接合型の細胞と接合し減数分裂過程に進行する。分裂酵母において、1960 年代に減数分裂のできない変異体が取得されており、その中の一つである *mes1* 変異体は減数第二分裂が完全に不能である (図 1B)。その表現型から *mes1* 遺伝子は減数第二分裂への移行に非常に重要な役割を果たしていることが示唆されるが、その機能はまったく未知であった。本研究では、分裂酵母の *mes1* 遺伝子の機能解析を通じて、減数第一分裂から減数第二分裂への移行期における細胞周期制御機構を解析した。

mes1 変異株における減数第二分裂の不能の原因を探るため、MPF の活性化状に着目した。野生株と *mes1* 変異株において、MPF の制御サブユニットである Cyclin B/Cdc13 の発現解析と MPF 活性 (Cdc2 キナーゼ活性) の測定を行い比較した。Cdc13 の発現解析は、蛍光タンパク質 GFP で Cdc13 を標識し生細胞でその極在の観察を観察した。野生株では、体細胞分裂と異なり、第一分裂後期に紡錘体上の Cdc13 は分解され消失するが、核内の Cdc13 は分解されず残存していた。第二分裂後期では、体細胞分裂と同様に核内の Cdc13 も分解され消失した。Cdc2 キナーゼ活性は、減数第一分裂の開始から減数第二分裂の終了直前まで高活性状態に保たれ、MPF 活性が維持されていることが示唆された。しかし、*mes1* 欠損株では、第一分裂後期に Cdc13 は核内から急速に消失し、Cdc2 キナーゼ活性も野生株に比べて早く低下した。*mes1* 欠損による第二分裂不能は、Cdc13 を第一分裂後特異的に発現させることによって抑圧された。したがって、Mes1 は Cdc13 を安定化することによって MPF 活性を維持し、第二分裂への移行を可能にすると考えられる。

Mes1 の下流因子を単離するスクリーニングの結果、*mes1* 変異株の多コピー抑圧因子として、C 末端領域が欠けた断片型 Slp1 が単離されていた。Slp1 は APC の活性化因子 (Cdc20 の相同因子) であり、M 期後期にセキュリンと Cyclin B の分解を促進する。また、*slp1* の高温感受性変異 *slp1-362* が *mes1* 欠損を抑圧し減数第二分裂を可能にすることからも、両者の間に強い遺伝学的相互作用が示唆された。実際、免疫沈降実験から両者は物理的に相互作用することが示された。体細胞分裂時の Mes1 過剰発現は、APC/C の活性を下げたときのように M 期中期の細胞周期停止を引き起こし、タンパク質間の相互作用の実験から、Mes1 が Slp1 の基質(Cdc13)への結合を阻害することも明らかとなった。また、Mes1 は減数分裂特異的な APC/C 活性化因子 Mfr1 とも相互作用し、Mfr1 と Cdc13 の結合も阻害した。これらの結果から、Mes1 は減数分裂特異的な APC/C 阻害因子であることが示唆された。Mes1 は第一分裂後に APC/C を阻害することで、Cyclin B が安定化し MPF 活性を維持され、第二分裂への移行を保證していると推測される (図 2B)。

Mes1 は減数第一分裂と減数第二分裂の間のごく限られた時期にしか発現しておらず、Mes1 自身の発現も厳密に制御されていると考えられる。その制御機構についても解析を行った。Mes1 は、APC/C の分解シグナル配列である D-box と KEN-box を持っており、Mes1 の D-box、KEN-box の変異体を作製した。Mes1 D-box 変異体は、Slp1 への結合能を失っていたが、減数分裂期には正常に分解され消失した。Mes1 KEN-box 変異体は Mfr1 への結合能が減少していたが、やはり分解はされていた。しかし、Mes1 D-box KEN-box 二重変異体は、Slp1 及び Mfr1 への結合能が完全に失われて、減数分裂期の分解はまったく起きず安定化されていた。ところが、体細胞分裂期に発現させると、Mes1 D-box KEN-box 二重変異体は安定化されず分解された。*in vitro* の系で、Mes1 は APC/C によってユビキチン化されなかった。これらの結果から、Mes1 が APC/C の潜在的な基質である可能性を否定しきれないが、Mes1 の D-box 及び KEN-box は APC/C 活性の抑圧には必要であるものの、Mes1 の分解には主要な働きをしていない可能性も示唆された。

本研究から、Mes1 は APC/C 阻害因子であることが明らかとなった。現在までに、複数の APC/C 阻害因子が報告されている。正常な染色体分配を保證する紡錘体チェックポイントタンパク質 Mad2 や動物の細胞周期において M 期への進行を制御する Emi1 などがあり、どれも細胞周期において重要な役割を果たしている。それらの因子と Mes1 の間に一次配列上の相同性は見られず、APC/C 阻害因子としての性質も異なっていることから、Mes1 は新規な APC/C 阻害因子であるといえる。減数分裂周期における MPF の活性化状態は、卵の成熟過程の研究からその詳細が明らかにされている。減数

第一分裂後、MPF 活性は低下するが完全に低下することなく中間程度にしばらく保たれ、その後急激に上昇し減数第二分裂へと移行する。MPF 活性の維持には、APC/C の活性抑制による Cyclin B の安定化が一つの要因であるが、他の生物において減数第二分裂移行期の APC/C 活性の抑圧機構は部分的にしか解明されていない。本研究では、Mes1 が APC/C 活性を抑圧することによって減数第二分裂の移行に決定的な役割を果たしていることを示し、APC/C 活性の抑圧機構に新しい知見をもたらした。

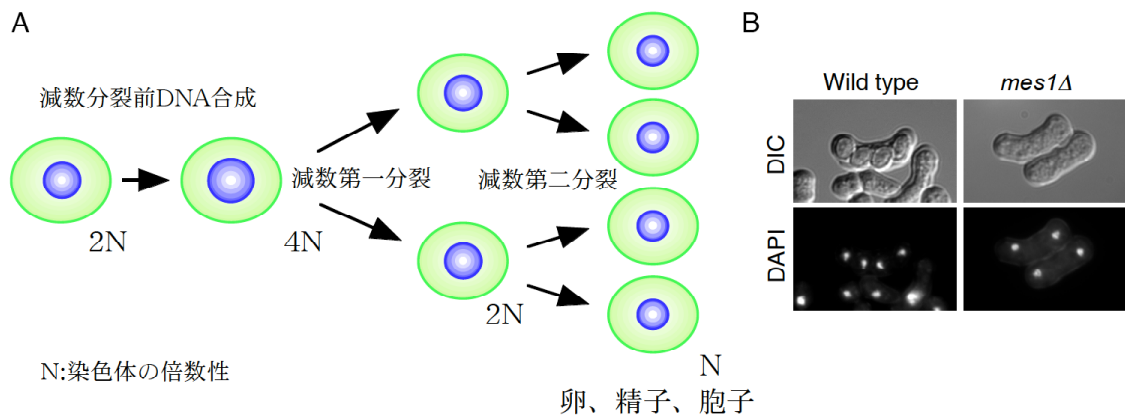


図 1 (A) 減数分裂：減数分裂周期では、一回の DNA 複製(減数分裂前 DNA 合成)を行った後、連続した二回の核分裂減数第一分裂 (meiosis I) と減数第二分裂 (meiosis II) を続けて行い、倍数性が半減した生殖細胞が形成される。(B) *mes1* 遺伝子：野生株は、減数分裂の結果それぞれ核を持った四つの胞子を形成する。一方、*mes1* 変異株は、減数第二分裂が起こらず、二核の状態で減数分裂周期を停止する。DAPI：核

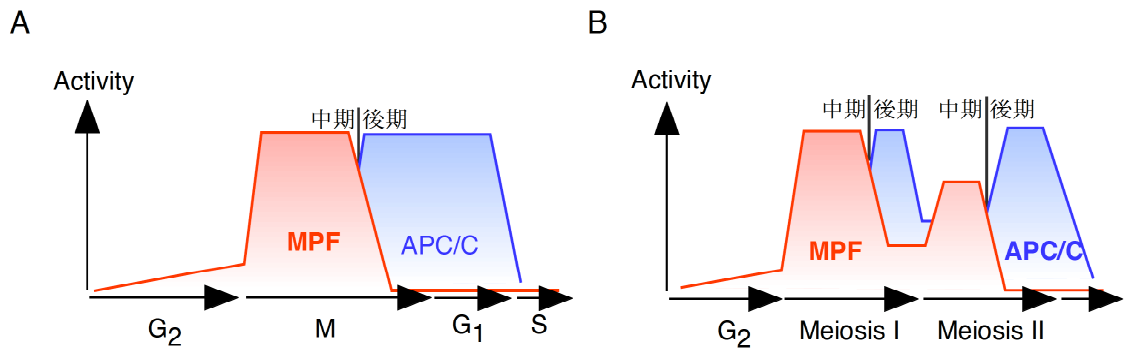


図 2 (A) 体細胞分裂期における MPF 活性と APC/C 活性：M 期後期に APC/C によって MPF が不活性化される。(B) 減数分裂期における MPF 活性と APC/C 活性：減数第一分裂後、Mes1 によって APC/C 活性が抑圧され、MPF 活性が維持される。