

## 論文内容の要旨

### 論文題目

Mmi1p, a YTH-family RNA-binding protein, is essential to repress expression of meiosis-specific genes during the mitotic cell cycle in fission yeast  
(YTH ファミリーの RNA 結合タンパク質 Mmi1p は、分裂酵母の体細胞分裂周期における減数分裂特異的遺伝子群の発現抑制に必須である)

氏名 張ヶ谷有里子

有性生殖サイクルにおいて、減数分裂は世代から世代へと遺伝情報を伝達する生殖細胞を形成するために必須の機構である。減数分裂では、遺伝情報を半減させるために特殊化した、一回の S 期とそれに続く二回の M 期から構成される細胞周期、およびそれらと協調した配偶子特異的な形態形成などの事象が種を越えて広く保存されている。減数分裂特有の事象の遂行のためには、減数分裂遺伝子の緻密に制御された発現が必要であり、逆に体細胞では、減数分裂特有の反応が引き起こされないように減数分裂遺伝子の発現が抑制されることが重要である。分裂酵母において、主要な転写因子をコードする *mei4* や染色体接着分子をコードする *rec8* などの減数分裂特異的因子の mRNA は体細胞分裂期に発現させると極めて不安定であり、このような不安定性はコード領域または 3'UTR に存在する DSR (destabilizing region) とよばれる領域に依存していることが明らかになっていた。本研究では、DSR の RNA 配列に結合して減数分裂特異的 mRNA に不安定性を与えるトランス因子 *mmi1* (meiotic mRNA instability) の単離同定および機能解析を行った。

分裂酵母においては、RNA 結合タンパク質 Mei2p の活性化が減数分裂への分化誘導を規定している。Mei2p は分化誘導因子であるのみならず、減数分裂前 DNA 合成および減数第一分裂の開始にも必須の機能を果たしており、Mei2p の分子機能の解明は分裂酵母の減数分裂機構を理解する上で重要な位置を占める。Mei2p は栄養源枯渇に伴って発現誘導を受

け、核と細胞質間をシャトルしているが、その一部は *sme2* 遺伝子座から転写される meiRNA とよばれる noncoding RNA と直接相互作用し、*sme2* 遺伝子座に特徴的な単一の点状構造(Mei2p ドット)を形成する。*sme2* 遺伝子座(meRNA)欠損株では Mei2p ドットは観察されず、細胞周期は減数第一分裂の前で停止する。ところが、*sme2* 遺伝子欠損株に核移行配列 NLS を付加した Mei2p (Mei2p-NLS)を発現させた場合や DSR を過剰発現させた場合には減数分裂の進行が回復する。以上のような事実およびその他の実験的証拠から、Mei2p ドットが DSR を有する減数分裂特異的遺伝子群と相互作用して減数第一分裂の開始に役割を果たすことが示唆されていたが、その具体的な分子機序については不明であった。本研究では、新たに同定した *Mmi1p* の制御機構の解析により、Mei2p ドットの機能についてひとつの示唆を得た。

### Mmi1p の単離・同定および機能解析

次に述べるような遺伝学的スクリーニングシステムを利用して、DSR を有する遺伝子群の発現抑制に必要なトランス因子を同定した。*ura4* レポーター遺伝子の 3'-UTR に *mei4* の DSR を挿入すると mRNA が不安定化され、遺伝子の発現が起きない。これを親株として変異原処理し、ウラシル非要求性となる株を取得した。このうち 4 株で体細胞分裂期にも内在性の *mei4* mRNA が検出された。相補性検定の結果、これら 4 株はすべて同一の遺伝子座位に変異をもつことがわかり、この遺伝子座を *mmi1* (meiotic mRNA instability)と名付けた。*mmi1* 遺伝子を同定するため、DSR の不安定化機能の欠損が致死性につながるような以下の系を構築した。染色体接着因子 *Rec8p* の非切断型を体細胞分裂期に強制発現すると染色体分配が著しく阻害され、細胞は生育不能となることが知られている。ここで、非切断型 *rec8* 遺伝子の 3'-UTR に DSR を挿入すると、遺伝子発現が起きず、細胞は生育可能となった。一方、DSR の不安定化機構が欠損する *mmi1* 変異体においては、遺伝子が発現し、細胞が致死となることがわかった。そこで、この株に分裂酵母遺伝子発現ライブラリーを導入し、DSR 不安定化機能を相補するクローンを単離したところ、すべて同一の予測 ORF、SPCC736.12c を含むことがわかった。また、4 株の変異体のゲノムの塩基配列を決定したところ、この ORF の C 末端領域にそれぞれ別のミスセンス変異が見いだされた。また、これらの変異を有する株を再構築したところ、*mmi1* 変異株の表現型が再現され、SPCC736.12c が *mmi1* 遺伝子であるという確証が得られた。*mmi1* の予想遺伝子産物は、カルボキシル末端 YTH ドメインにおいて、ヒト、マウス、ラットの核タンパク質 YT-521B と 20%程度の弱い相同性を示した。YTH ドメインは、出芽酵母、ハエ、シロイヌナズナなど真核生物に広く見いだされ、構造生物学的見地から RNA に直接結合することが示唆されている。

*mmi1* 遺伝子を破壊すると、細胞は著しい生育阻害を示した。さらに解析を行うため、PCR を用いたランダム変異導入により *mmi1* の温度感受性変異株を作製したところ、制限温度下において、*mei4* のみならず、*rec8* およびそのほかに DSR を有することが知られていた *ssm4*, *spo5* 遺伝子の異所的発現が見られた。一方、*mmi1 mei4* 二重破壊株を作製したところ、生育が部分的に回復した。このことから、Mmi1p は栄養増殖時における減数分裂特異的 mRNA の不安定化に必須であり、Mmi1p による減数分裂特異的遺伝子の発現抑制が細胞の栄養増殖にとって重要であることが示唆された。

分裂酵母では、DNA マイクロアレイを用いた網羅的解析により、減数分裂の進行にともなう数百におよぶ遺伝子群が次々と発現誘導されていくことが明らかにされている。このような遺伝子群のうちどの程度が *mmi1* に依存した発現制御を受けているかを検討するため、関西先端研究センターの堤、近重、平岡博士との共同研究によって、*mmi1* 温度感受性変異株における遺伝子発現プロファイルを解析した。その結果、*mmi1* 機能の欠損特異的に発現が上昇する 12 遺伝子群が同定され、この中には、すでに *mmi1* の制御を受けていることが明らかになっている *ssm4*, *spo5*, *rec8* 遺伝子が含まれていた。基準を厳しく定めたため *mei4* 遺伝子は選ばれなかった。12 遺伝子は、減数分裂期における発現プロファイルが明らかにされていない 1 遺伝子を除き、すべてが減数分裂期に発現上昇する遺伝子として同定されているものであった。したがって、今回の解析においては、false positive は排除されているが、false negative が発生しており、*mmi1* がさらに多くの遺伝子群の制御に関与している可能性が残されている。

最後に、Mmi1p の RNA 結合能について検討したところ、精製した組み換え Mmi1 タンパク質は、*mei4* および *ssm4*, *spo5*, *rec8* 中の DSR に相当する RNA 配列に対して、*in vitro* で特異的に結合することがわかった。

### Mmi1p の制御機構の解析

Mmi1p を大過剰に発現すると、細胞の栄養増殖や栄養源枯渇にともなう増殖停止には著しい影響が見られないが、減数分裂前 DNA 合成の開始が阻害された。このことから、減数分裂初期の進行には、Mmi1p 機能の適切な制御が重要であると考えられた。減数分裂期に Mmi1p を制御する因子は何であろうか。上で述べたように、DSR を過剰発現した場合、*sme2* 遺伝子(meRNA)欠損株の減数分裂周期停止が抑圧される。この観察に対する一つの説明としては、大過剰の DSR RNA が Me2p と結合し meRNA の機能を代替した可能性が考えられるが、Me2p と DSR とは直接の結合を示さないことは、この仮説に適合しない。もう一つの説明としては、DSR RNA が Mmi1p の遺伝子発現抑制機能を飽和することによって、内在性の DSR を含む遺伝子群の発現が促進され、Me2p ドットの遺伝子発現促進機

能が補償されたという可能性があげられる。この可能性を検証するため、*sme2* 破壊株に *mmi1* の機能低下型変異を導入したところ、減数分裂の進行が回復した。Mei2p ドット形成不全による減数分裂周期停止は Mmi1p の機能を低下させることにより抑圧されることが分かり、Mei2p ドットが Mmi1p の機能抑制に関与する可能性が示唆された。

では、Mei2p ドットによる Mmi1p の制御は具体的にどのような分子メカニズムで行われているのであろうか。Mmi1p に対する抗体を用いた発現解析では、Mmi1p は減数分裂中期までほとんど量的に変動せず、発現抑制以外の制御機構の存在が示唆された。次に、Mmi1p の細胞内局在を調べるため、本来の遺伝子座から Mmi1p の GFP 融合タンパク質を発現する株を作製して顕微鏡観察をおこなったところ、栄養増殖期の細胞においては複数個の核内ドットが観察されたのに対し、細胞が減数分裂に進入すると核内の一点の強いシグナルに収束することが観察され、このような劇的な局在パターンの変化が Mmi1p の制御に関連していることが予想された。CFP 融合 Mmi1p および GFP 融合 Mei2p を発現する株を作製して顕微鏡観察をおこなったところ、Mmi1p が収束する核内の一点と Mei2p ドットとが一致することがわかった。また、Mmi1p の一点への収束は *mei2* あるいは *sme2* に依存することから、Mei2p ドットが Mmi1p を係留することが示唆された。さらに、ウサギ網状赤血球抽出液中で *in vitro* 合成した Mei2p と大腸菌より精製した GST 融合 Mmi1p を用いて Mei2p と Mmi1p との直接の結合が示された。以上により、Mei2p は Mmi1p をドットに隔離して減数分裂特異的 mRNA の安定な発現を保証しているというモデルを提唱した。