

## 論文内容の要旨

### 論文題目

分裂酵母 Mei2 による MAP キナーゼと CTD キナーゼを介した  
減数分裂開始のフィードバック制御

(Mei2 ensures the commitment to meiosis through feedback regulation  
involving MAP kinase and CTD kinase in fission yeast )

氏名 助川 裕子

減数分裂は子孫に遺伝情報を伝える上で重要な機構である。しかし、その分子機構は体細胞分裂に比べ、未だ不明な点が多い。本研究は減数分裂を容易に誘導できる分裂酵母を用いて減数分裂を制御する分子機構を明らかにすることを旨とした。

分裂酵母の減数分裂を制御する重要な因子として、Mei2 が知られている。Mei2 は、その活性化型 Mei2-SATA を栄養増殖期の細胞に発現させると、一倍体からでも強制的に減数分裂を誘導することから、減数分裂開始のマスターレギュレーターと考えられている。近年、Mei2 は減数分裂の進行に重要な一群の遺伝子の発現を安定化していることが示された。しかしながら、この機能のみでは Mei2 の減数分裂誘導活性の全てを説明できない。本研究では、Mei2 の未解明の機能を明らかにすることを目標に、活性化型 Mei2-SATA が一倍体細胞で引き起こす異所的減数分裂の抑圧変異の探索を行った。この抑圧変異体の一つの原因遺伝子として SPCC4B3.08 を同定し、詳細に解析した。

SPCC4B3.08 は RNA Polymerase II の最も大きなサブユニットである Rpb1 の C-terminal domain (Pol II CTD) をリン酸化する CTDK-I の  $\gamma$  サブユニットと相同性を有するタンパク質をコードしていた。CTDK-I は  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  サブユニットで三量体を構成している。分裂酵母では  $\alpha$ ,  $\beta$  サブユニットの遺伝子はそれぞれ *Isk1*, *lsc1* と名付けられていたため、今回単離した遺伝子を *lsg1* と名付けた。*lsg1* が CTDK-I の  $\gamma$  サブユニットをコードすることを確認するため、*lsg1* 遺伝子破壊株を作製し、*Isk1* 遺伝子破壊株や *lsc1* 遺伝子破壊株の

表現型と比較した。*lsg1* 遺伝子破壊株は、*lsk1* 遺伝子破壊株や *lsc1* 遺伝子破壊株と同様、生育には欠損がみられないものの、アクチン重合阻害剤であるラトランキュリン A 感受性を示した。また、*lsk1*, *lsc1* 遺伝子を破壊することでも活性化型 Mei2-SATA の致死性を抑圧した。これらの結果から *lsg1* は CTDK-I の  $\gamma$  サブユニットをコードし、CTDK-I の不活性化が活性化型 Mei2-SATA の致死性を抑圧することが示された。

CTDK-I サブユニット遺伝子破壊株では生育にはほとんど影響がみられなかったが、接合・減数分裂に欠損がみられた。一倍体細胞に窒素源飢餓によって接合を誘導したところ、CTDK-I サブユニット遺伝子破壊株では顕著に接合率が低下した。そして、二倍体の CTDK-I サブユニット遺伝子破壊株では、孢子形成率が低下した。さらに、二倍体における減数分裂の進行の様子を FACS 解析により観察した。野生型株では窒素源飢餓培地に移してから 2h で G1 期停止した細胞が観察され、4~6h で減数分裂前 DNA 合成が観察されたものの、CTDK-I サブユニット遺伝子破壊株では、G1 期停止が 8h と大幅に遅れ、減数分裂前 DNA 合成は 24h 経過してもほとんど観察されなかった。

CTDK-I サブユニット遺伝子破壊株ではなぜ接合率・孢子形成率が低下するのかを調べるため、接合・減数分裂に必須の転写因子をコードする *ste11* の発現をノザンプロット解析により調べた。その結果、*lsg1* 遺伝子破壊株では、野生型株に比べて *ste11* の転写量が非常に少ないことが分かった。また、CTDK-I の各サブユニット遺伝子破壊株において *ste11* を過剰発現したところ、接合率・孢子形成率の低下が回復した。これらの結果より、CTDK-I サブユニット遺伝子破壊株における接合率・孢子形成率の低下は、*ste11* の転写量の低下が大きな要因であると考えられる。

次に、CTDK-I により制御される遺伝子には *ste11* 以外にどのようなものがあるかを調べるため、マイクロアレイ解析により、窒素源飢餓培地に移して 2.5 時間後における *lsg1* 遺伝子破壊株と野生型株の全遺伝子の発現量を比較した。*lsg1* 遺伝子破壊株では、野生型株と比較して 22 遺伝子が 2 倍以上の発現量を示し、64 遺伝子が半分以下の発現量を示した。そして、発現量が低下した 64 遺伝子のうち 33 遺伝子が Ste11 により制御されることが知られている遺伝子だった。また、Ste11 の上流の因子の発現に注目してみると、*atf1*, *pcr1*, *rst2* 等 *ste11* の発現を制御することが知られている遺伝子の発現は、*lsg1* 遺伝子破壊株と野生型株でほとんど変化がみられなかった。これらの結果から、CTDK-I は *ste11* の発現を直接制御していることが示唆される。

これまでに、*Lsk1* は Pol II CTD の 7 アミノ酸のリピート配列中の 2 番目のセリンをリン酸化することが報告されている。次に、2 種類の *rpb1* 変異株、*rpb1-12xCTD*, *rpb1-12xS2ACTD* 株の表現型を調べた。*rpb1-12xCTD* 株は 12 個の野生型リピート配列 (YSPTSPS) からなる Rpb1 をコードし、*rpb1-12xS2ACTD* 株は 2 番目のセリンがアラニ

ンに置換された 12 個のリピート配列(YAPTSPS)からなる Rpb1 をコードする。その結果、*rpb1-12xS2ACTD* 株では接合率・胞子形成率が顕著に低下し、*ste11* の転写量も低下していた。そして、*rpb1-12xS2ACTD* 株の接合率・胞子形成率の低下は *ste11* の過剰発現により回復した。これらの結果から CTDK-I は Pol II CTD の Ser-2 をリン酸化して *ste11* の転写を促進していることが強く示唆される。

CTDK-I サブユニット遺伝子破壊株では減数分裂に欠損がみられたため、減数分裂を誘導した時の Pol II CTD のリン酸化状態を調べた。窒素源飢餓培地に移して減数分裂を誘導すると、野生型株では Ser-2 のリン酸化が増加することが観察され、*lsg1* 遺伝子破壊株では Ser-2 のリン酸化がまったくみられなかった。これらのことから、窒素源飢餓により CTDK-I 依存的に Pol II CTD Ser-2 のリン酸化が誘導されることが示唆される。

次に窒素源飢餓により Pol II CTD Ser-2 のリン酸化が増加する機構の解明を目指した。窒素源飢餓のシグナルを受けて活性化される、ストレス応答性 MAPK Sty1 の遺伝子を破壊したところ、窒素源飢餓による Ser-2 のリン酸化の増加が大幅に抑えられた。また、Sty1 MAPK 経路の MAPKK である Wis1 の活性化型を発現させて Sty1 MAPK を活性化させたところ、窒素源が豊富な状況であっても、Ser-2 のリン酸化が増加することが観察された。このリン酸化は *lsk1* 遺伝子破壊株では観察されず、Sty1 MAPK の活性化による Ser-2 のリン酸化の増加は CTDK-I 依存的であると考えられる。以上のことより、窒素源飢餓のシグナルを受けて活性化された Sty1 は、CTDK-I による Pol II CTD Ser-2 のリン酸化を促進していると考えられる。

また、活性化型 Meï2 の発現により引き起こされる異所的減数分裂時の Pol II CTD Ser-2 のリン酸化状態を観察した。窒素源が豊富な状況で、人為的に Meï2-SATA を発現したところ、予想外に Pol II CTD Ser-2 のリン酸化が増加するのを観察した。そして、このリン酸化の増加が Sty1 MAPK 経路、CTDK-I 依存的であることを *lsk1*, *sty1* 遺伝子を破壊し、確認した。これまで Sty1 は *meï2* の上流の因子として知られていたが、この結果により、活性化型 Meï2 は上流の因子にフィードバック制御を行っていることが示唆された。更なる解析により、活性化型 Meï2 からのフィードバックシグナルは、Sty1 MAPK 経路の MAPKKK である Wis4 と Win1 の両方に向かっていることが示された。

以上の結果から、分裂酵母では図 1 に示すような機構により減数分裂が制御されていると考えられる。

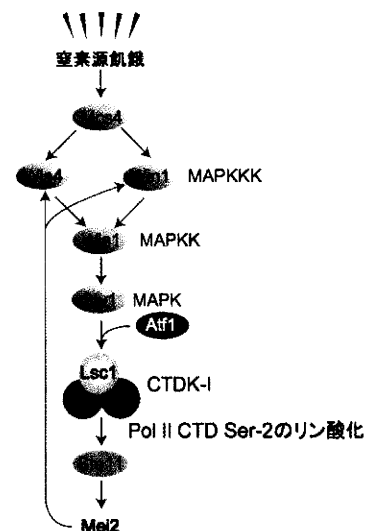


図1 分裂酵母における新たな減数分裂制御機構