

論文の内容の要旨

論文題目：分裂酵母 SCF 複合体の減数分裂期における役割の解析
(Analysis of the fission yeast SCF complex in meiosis)

氏名 岡本 真也

SCF 複合体は Skp1, Cullin-1, Rbx1, F ボックスタンパク質によって構成されるユビキチンリガーゼであり、真核生物に広く存在する。SCF 複合体は標的タンパク質をユビキチン化しタンパク質分解へと誘導することで細胞周期などの様々な生命現象を制御することが知られている。しかし、SCF 複合体が減数分裂にどのように関わっているのかについてはよく分かっていない。本研究では SCF 複合体の減数分裂における機能を明らかにするために、分裂酵母をモデル生物として SCF 変異体が減数分裂過程で示す表現型の解析を行った。

分裂酵母は栄養の豊富な環境下では体細胞分裂を繰り返し増殖するが、窒素源が枯渇すると増殖を停止し減数分裂過程へと移行する。一倍体の分裂酵母細胞はまず細胞周期を G1 期で停止し、次に接合型の異なる 2 つの細胞が接合する。そして 2 つの核が融合し減数分裂前期へと入る。減数分裂前期では DNA 複製および減数分裂組換えが行われる。その後、減数第一分裂、減数第二分裂と 2 回の連続した染色体分配を行い、4 つの一倍体胞子を形成する。この減数分裂過程に SCF 複合体が必要かどうかを調べるため SCF 変異体の減数分裂期における表現型を調べた。SCF 複合体の構成因子である *skp1* の温度感受性変異体を半制限温度下で減数分裂過程に誘導した結果、形成された胞子の数に異常を示すことが分かった。この結果から、SCF 複合体が正しく減数分裂を行うために必要である可能性が示唆された。

次に、*skp1* 変異体が示した異常が減数分裂過程のどの時期に生じているのかを調べるた

めにタイムラプス観察を行った結果、*skp1* 変異体では減数第一分裂においてスピンドル微小管が大きく曲がり折れる細胞が観察された。同様の表現型は体細胞分裂において報告されているが、なぜスピンドル微小管が曲がるのかは明らかになっていない。そこで、染色体分配に異常があるかどうかを調べるために、ヒストンを標識して観察を行った。その結果、*skp1* 変異体ではスピンドル微小管が折れ曲がる間も染色体の一部がつながったままになっていることが分かった。次に、このつながったままになっている部分が染色体のどの位置にあたるのかを調べるためにキネトコアとテロメアを標識したところ、*skp1* 変異体ではキネトコアはスピンドル極へと分配させていたのに対し、テロメアは一部がスピンドル極の間に留まっていることが分かった。さらに、減数分裂期特異的コヒーシンである *Rec8* を破壊することでスピンドル微小管が折れ曲がる表現型は抑圧され、テロメアもスピンドル極へと分配された。これらの結果から、*skp1* 変異体では減数第一分裂において染色体腕部の一部が分離できておらず、その結果、スピンドル微小管が折れ曲がるのだと考えられる。

次に、染色体腕部の不分離に減数分裂組換えが関わっている可能性を調べるために、減数分裂組換えの開始に必要な遺伝子である *rec12* を破壊した。その結果、*rec12Δ skp1* 二重変異体はスピンドル微小管が折れ曲がる表現型を示さなかった。このことから、*skp1* 変異体の減数第一分裂でスピンドルが折れ曲がる表現型は減数分裂組換えを介して生じていると考えられる。さらに、*skp1* 変異体において減数第一分裂で減数分裂組換えが活性化しているかどうかを調べるために、レコンビナーゼ *Rhp51/Rad51* の局在を観察した。野生株では減数分裂前期には *Rhp51* の点状局在が見られたが減数第一分裂に入ると点状局在は見られなくなった。一方、*skp1* 変異体では減数分裂前期に見られた点状局在が減数第一分裂まで持続していた。この結果から、*skp1* 変異体では減数分裂組換えの中間体が正しくプロセッシングされていない可能性が示唆された。

SCF 複合体のうち *Skp1*, *Cullin-1*, *Rbx1* は不変の構成因子だが、F ボックスタンパク質は可変であり分裂酵母には 18 種類存在すると考えられている。F ボックスタンパク質は SCF 複合体の中で基質認識を行うサブユニットであり、F ボックスタンパク質の種類によって基質特異性が決まる。本研究で示した *skp1* 変異体の異常はいずれかの F ボックスタンパク質が十分に働けなくなっているために生じている可能性が高い。そこで、F ボックスタンパク質の変異体のうち *skp1* 変異体と同様の表現型を示すものを探索した。その結果、*fbh1* という F ボックスタンパク質の破壊株が減数第一分裂においてスピンドル微小管が折れ曲がる表現型を示すことが分かった。*Fbh1* は F ボックスの他にヘリカーゼドメインを持ち、相同組換えに関わることが知られている。*fbh1* 破壊株が染色体腕部の分離に異常を示し、減数第一分裂において減数分裂組換えが活性化していたことから、*skp1* 変異体と同様の表現型

を示すことが確認された。

次に、*skp1* 変異体の表現型が *Fbh1* の機能低下によって説明できるのかどうかを調べるために、*skp1* と *fbh1* の遺伝学的関係を調べた。*skp1* 変異体に *Fbh1* を過剰発現したところ *skp1* 変異体の制限温度での増殖異常が部分的に抑圧された。また、*skp1* 変異体の温度感受性は DNA 損傷チェックポイントに必要な因子である *Rad3/ATR* を破壊することで部分的に抑圧されることが知られているが、*fbh1* 破壊株における増殖異常も *rad3* の破壊によって抑圧された。これらの結果から *Skp1* と *Fbh1* が共に働いている可能性が示唆された。

Fbh1 のヘリカーゼ活性とスピンドル微小管が折れ曲がる表現型の関係を調べるために、ヘリカーゼ変異体 (*fbh1-D485N*) を作製し観察を行った。その結果、*fbh1-D485* 変異体は減数第一分裂においてスピンドル微小管が折れ曲がる表現型を示し、減数分裂組換えの中間体のプロセッシングに *Fbh1* のヘリカーゼ活性が重要であることが示唆された。次に、Fボックスの重要性を調べるために Fボックス変異体を作製した。Fボックス変異体としては強い CPT (遺伝毒性物質) 感受性を示す *fbh1-P15A L26A* 変異体と弱い CPT 感受性を示す *fbh1-L14A P15A* 変異体を作製した。観察の結果、*fbh1-P15A L26A* 変異体は減数第一分裂においてスピンドル微小管が折れ曲がる表現型を示したが *fbh1-L14A P15A* 変異体は示さなかった、このことから、減数分裂組換えの中間体を正しくプロセッシングするためには *Fbh1* のヘリカーゼ活性に加えて *Fbh1* と *Skp1* の結合が必要である可能性が示唆された。