

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

### 分裂酵母の減数分裂を終了させるための細胞周期制御

(Cell cycle control required for the termination of meiosis in fission yeast)

氏名 青井勇樹

#### 1 研究の背景

多くの真核生物は、新たな個体を生み出すために有性生殖をおこなう。有性生殖とは、配偶子の形成と融合という過程を踏んで、遺伝的に異なる個体を生み出す生殖のことをいう。減数分裂は、配偶子を形成する過程で用いられる分裂様式である。細胞周期の観点からみれば、減数分裂は、減数分裂前 DNA 合成、減数第一分裂、減数第二分裂、という3つの過程で構成される。減数分裂におけるこれら素過程の順序は、酵母からヒトまで広く保存されている。

2 倍体の生殖細胞は、1 回 DNA 複製をおこなったあと、2 回連続した核分裂を経て、1 倍体の配偶子に分化する。1 倍体の配偶子どうしが融合することによって、2 倍体の接合子が形成され、新たな個体が発生する。したがって、ゲノムの倍数性の維持という点から考えると、減数分裂における核分裂の繰り返し回数は、厳密に2回に限定されなければならない。この特徴的な細胞周期の制御は、APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome)の活性を調節することによって達成されることが考えられる。

APC/C は、細胞周期に必須の役割を果たすユビキチンリガーゼである[1]。APC/C を介したサイクリンの分解は、Cdk (cyclin-dependent kinase) の不活性化と、それに続く

分裂期の終了に欠かすことのできない過程である。細胞増殖期では DNA 複製と核分裂が交互に起きるのに対し、減数分裂期では DNA 複製ののちに核分裂が 2 回連続して起きる。このような細胞周期の改変がおこなわれる仕組みは、少なくとも部分的には、APC/C が減数分裂期に特異的な制御を受けるというモデルで理解できる。分裂酵母において、Mes1 は減数第一分裂から減数第二分裂にかけて APC/C を阻害し、サイクリン Cdc13 の分解を妨げる[2]。つまり Mes1 は、APC/C を減数分裂期特異的に阻害することによって、減数第二分裂の開始を保証する。また、カエル Erp1/Emi2 やシロイヌナズナ Osd1 も、減数分裂特異的な APC/C のインヒビターであり、減数第二分裂の開始に必要である[3, 4]。このように、「APC/C の阻害」を介した減数分裂に特異的な細胞周期制御のメカニズムは、種を越えて保存されている。

他方で、減数第二分裂を終了するときには「APC/C の再活性化」が必要であると考えられる。しかし、その詳細なメカニズムは不明である。減数分裂における核分裂の回数を 2 回に限定する仕組みを理解するためには、減数分裂の終了の時点で、どのように APC/C が再活性化されるか明らかにする必要がある。

本研究は、減数分裂を終了させるために必要な APC/C 制御の分子メカニズムの解明を目指した。そのために、まず減数分裂の終了に関与する因子を単離・同定することから始めた。

## 2 結果と考察

### *sms* 変異の解析

本研究室では、分裂酵母における *mes1* 変異のサプレッサー変異株として *sms* 変異株が単離されていた。*sms* 変異株は減数分裂の終了に関与すると考えられたため、本研究では、*sms* 変異の原因遺伝子の同定をおこなった。細胞内の全ゲノム情報を読み取るホールゲノムシーケンスを使用して変異解析をおこない、*sms1*, *sms5*, *sms7* の原因遺伝子を同定した。*sms1* 変異の原因遺伝子である *fzr1* は、APC/C の減数分裂特異的な活性化因子をコードする。APC-Fzr1 を介したサイクリン Cdc13 の分解は、正常な孢子（配偶子）を形成するために必要である[5]。いっぽう、*sms5* と *sms7* の原因遺伝子はどちらも新規遺伝子であった。ここでは、*sms5* および *fzr1* 遺伝子に着目して以下の実験をおこなった。

野生株、*sms5* 破壊株、*fzr1* 破壊株の細胞を、それぞれ減数分裂に誘導した。野生株では減数第二分裂ののちに細胞内に 4 つの核を形成した。これに対し、*sms5* 破壊株と *fzr1* 破壊株では、減数第二分裂の後に 4 つを超える異常に多い核を形成した。このような異

常な核が形成される仕組みを調べるため、細胞のライブ観察をおこなった。興味深いことに、*sms5* 破壊株と *fzr1* 破壊株では、“減数第三分裂”ともいえる新規の表現型を示した。すなわち、減数第二分裂の後に異常な分裂装置が再形成され、染色体が過剰に分離した。これより、*sms5* と *fzr1* 遺伝子は、減数分裂を終了させるために必要な因子であることが示唆された。

### Sms5 タンパク質の構造と局在の解析

つぎに、*sms5* 遺伝子の機能を知るために、コードされる Sms5 タンパク質のアミノ酸配列の特徴について調べた。アミノ酸配列のホモロジー検索をおこなったところ、Sms5 の N 末端には、菌類によく保存された転写因子の DNA 結合ドメインをもつことが予想された。転写因子として機能するならば、Sms5 は核内に局在するはずである。そこで、Sms5 の C 末端に GFP を融合した Sms5-GFP を細胞内で発現させた。Sms5-GFP は減数分裂期に発現し、減数第一分裂から減数第二分裂にかけて核内に局在した。しかし、DNA 結合ドメインに変異をもつ Sms5(R19Q)-GFP は、細胞質に拡散した。これらの結果は、Sms5 が転写因子として機能することを示唆した。

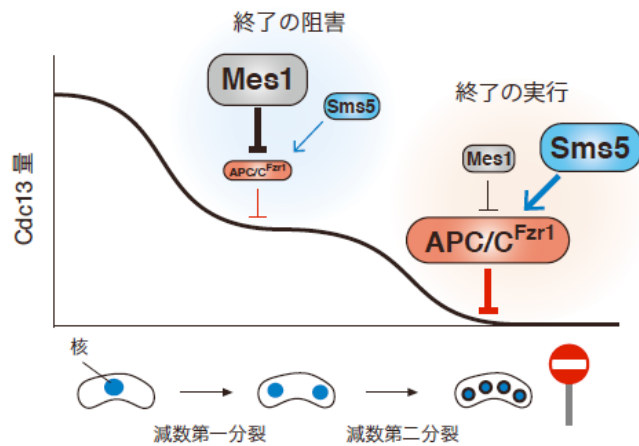
### 転写因子 Sms5 の解析

Sms5 が転写因子として働くならば、どのような遺伝子の転写を制御するのだろうか。前述のように、*sms5* と *fzr1* 遺伝子はともに減数分裂を終了するために必要であった。そこで、Sms5 タンパク質が *fzr1* 遺伝子の転写を制御する可能性を検討した。野生株と *sms5* 破壊株を減数分裂に同調的に誘導し、細胞から RNA を調製して *fzr1* mRNA を経時的に定量した。*sms5* 破壊株では、たしかに *fzr1* mRNA 量が有意に低下していた。クロマチン免疫沈降アッセイによって、Sms5 は *fzr1* 遺伝子のプロモーター領域に特異的に結合することがわかった。これらの結果は、*fzr1* が転写因子 Sms5 の重要なターゲット遺伝子であることを強く示唆した。また、*sms5* 破壊株では Fzr1 タンパク質の発現が低下していた。APC/C-Fzr1 の分解ターゲットであるサイクリン Cdc13 は、減数第二分裂の後も安定化していた。これらのタンパク質定量の結果は、Sms5 が *fzr1* 遺伝子の転写を制御するという結果に合致した。

## 3 結論

以上の結果から、次のモデルを提唱した (図)。減数分裂は核分裂を連続させるポテンシャルをもつ。減数第二分裂の後に、Sms5 を含む転写機構が Fzr1 の発現を上昇させ

る。これにともない APC/C-Fzr1 の活性が上昇し、Mes1 による阻害効果を打ち消すことによって、サイクリン Cdc13 の分解を促進する。その結果、Cdk が不活性化され、分裂装置の再形成が阻止され、最終的に生存可能な配偶子の形成が保証される。



図：減数分裂を終了させるための APC/C の制御モデル

## 参考文献

1. Peters, J.-M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 644–656.
2. Izawa, D., Goto, M., Yamashita, A., Yamano, H., and Yamamoto, M. (2005). Fission yeast Mes1p ensures the onset of meiosis II by blocking degradation of cyclin Cdc13p. *Nature* 434, 529–533.
3. Ohe, M., Inoue, D., Kanemori, Y., and Sagata, N. (2007). Erp1/Emi2 is essential for the meiosis I to meiosis II transition in *Xenopus* oocytes. *Developmental Biology* 303, 157–164.
4. Cromer, L., Heyman, J., Touati, S., Harashima, H., Araou, E., Girard, C., Horlow, C., Wassmann, K., Schnittger, A., De Veylder, L., et al. (2012). OSD1 Promotes Meiotic Progression via APC/C Inhibition and Forms a Regulatory Network with TDM and CYCA1;2/TAM. *PLoS Genet* 8, e1002865.
5. Blanco, M. A., Pelloquin, L., and Moreno, S. (2001). Fission yeast mfr1 activates APC and coordinates meiotic nuclear division with sporulation. *Journal of Cell Science* 114, 2135–2143.