

【序論】

細胞周期は、遺伝子発現の連鎖により進行する。よって細胞周期を通じた遺伝子転写ネットワークのメカニズムを解明することは重要であり、盛んに研究が行われてきた。しかし細胞周期のS期(DNA合成期)における細胞周期を制御する転写因子については、明らかになっていなかった。

近年、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、二つのトランスクリプトーム解析及び系統的なプロモーター配列の比較が行われ、転写因子の Hcm1 が S 期の細胞周期進行において、重要な働きをすることが明らかになった(Cho et al., 1998; Spellman et al., 1998; Pramila et al., 2006)。

Hcm1 は G1 期に発現し、S 期後期特異的な遺伝子発現を活性化して、細胞周期における染色体分離、紡錘極体形成、出芽に参与する(Pramila et al., 2006)。Hcm1 は、Hcm1 のターゲットのプロモーター領域の HCM element と呼ばれる配列に結合し転写を活性化する(Pramila et al., 2006)。さらに Hcm1 は、G1/S 期において核に局在することが明らかになっている (Rodriguez-Colman et al., 2010; Sekiya doctoral thesis., 2009 ;図 1)。Hcm1 の核局在は S 期の細胞周期進行において重要であると考えられるが、その核局在のメカニズムについては、明らかになっていない。

最近当研究室において、Hcm1 が細胞周期特異的な核局在シグナル(NLS)を有していることが明らかになった(未発表)。このことから、Hcm1 は核細胞質間輸送因子 karyopherin によって、G1/S 期に核へ輸送されている可能性が高いと考えた。そこで本研究では、Hcm1 の核局在を制御する因子として、karyopherin に注目し、非必須 karyopherin 欠損株及び必須 karyopherin の発現抑制条件下における G1/S 期の Hcm1 の局在を解析することで、Hcm1 の核-細胞質間輸送因子を同定することを目的とした。

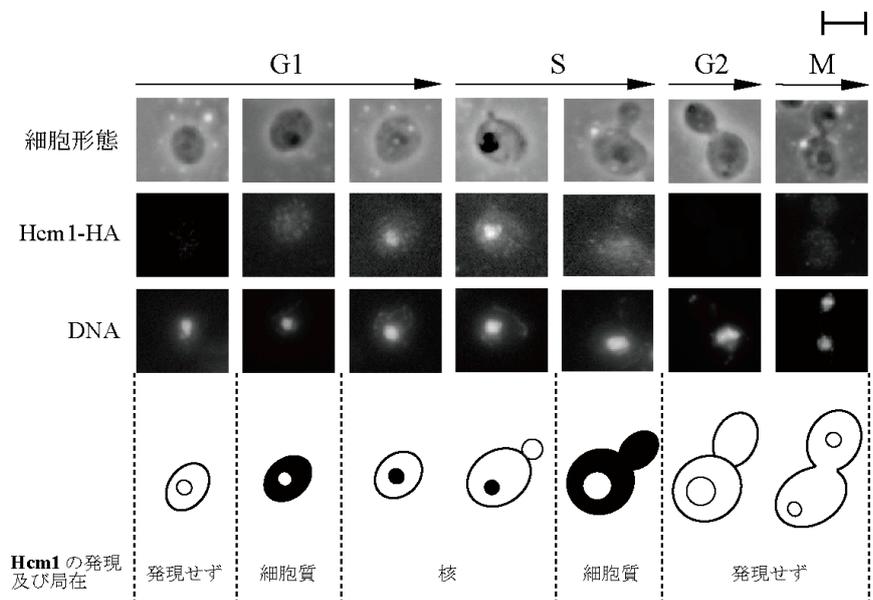


図 1. 細胞周期における Hcm1 の細胞内局在

Hcm1 は G1 期に発現し、G1/S 期において核に局在することが知られている。そして S 期後期には再び細胞質へ局在し、G2 期までに分解される。下図の黒塗り部は、Hcm1 の局在を示す。(スケールバー;5µm)

【結果と考察】

1. 非必須 karyopherin 欠損株における Hcm1 の核局在の解析

Hcm1 の核局在を制御する非必須 karyopherin を同定するために、非必須 karyopherin 遺伝子を欠損し、さらに Hcm1 に HA-tag を付加して可視化した変異株を作成した。出芽酵母において、生育に必須でない karyopherin は 9 種類知られており、そのうち 8 種類の非必須 karyopherin (Kap114, Nmd5, Kap123, Sxm1, Pdr6, Kap120, Kap142, Los1)について上記の変異株を作成した。上記の変異株を性接合因

子である α -factor で G1 期に同調し、リリース後経時的に細胞を回収し、間接蛍光抗体染色法で Hcm1 を、DAPI で核を染色し、顕微鏡で観察した。その結果、Kap142 の欠損株において、G1/S 期に Hcm1 が核局在を示す細胞の割合が低下している事が明らかになった(図 2)。Kap142 は、Hcm1 の上流と下流の転写因子の核外輸送に、さらに S 期の細胞周期(DNA 合成)に関与することが知られている(Queralt E et al., 2003; Taberner FJ et al., 2009)。これらの知見と今回の結果は、Kap142 が Hcm1 の核局在を制御していることを示唆している。

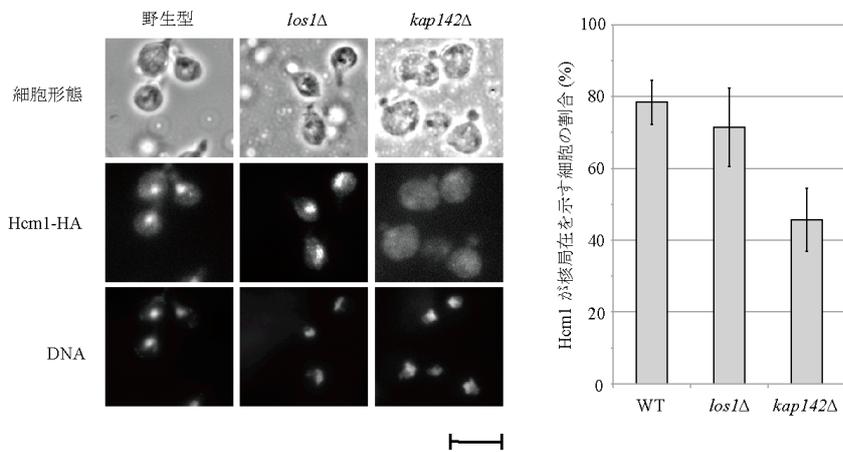


図 2. *KAP142* 欠損株は G1/S 期において、Hcm1 が核局在を示す細胞の割合が低下する。HA-tag を付加して Hcm1 を可視化した非必須 karyopherin 欠損株(*los1Δ*、*kap142Δ*)を、G1 期に同調し、リリース後 25 分の細胞を間接蛍光抗体法を用いて観察した。(スケールバー; 5μm)

が知られている(Queralt E et al., 2003; Taberner FJ et al., 2009)。これらの知見と今回の結果は、Kap142 が Hcm1 の核局在を制御していることを示唆している。

2. 必須 karyopherin 発現抑制条件下における Hcm1 の核局在の解析

Kap142 欠損株においても、45%程の細胞が Hcm1 の核局在を示していることから、Kap142 は Hcm1 の核局在に部分的に機能していると考えた。そこで次に必須 karyopherin が、Hcm1 の核局在に機能している可能性について検証した。Hcm1 の核局在を制御する必須 karyopherin を同定するために、Tet/OFF システムを導入した条件致死変異株における Hcm1 の核局在を観察した。この変異株では、必須遺伝子の上流に抗生物質 doxycycline によって発現抑制がかかるプロモーターを配置させてあるため、doxycycline を培地に添加することで、その必須遺伝子の発現を抑制することができる。出芽酵母において、生育に必要な karyopherin は 6 種類知られており、そのうち 4 種類の karyopherin (Kap95, Pse1, Cse1, Crm1)について、Hcm1 を可視化した変異株を作成し、観察した。その結果、発現抑制条件下の *CSE1* 条件致死変異株において、G1/S 期の Hcm1 の核局在が顕著に失われていることが明らかになった(図 3)。Cse1 は S 期の細胞周期(DNA 複製)や染色体分離など、Hcm1 と同様な細胞周期に関与していることが知られている (Z Xiao et al., 1993)。これらの知見と今回の結果は、Cse1 が Hcm1 の核局在に関与していることを示唆している。

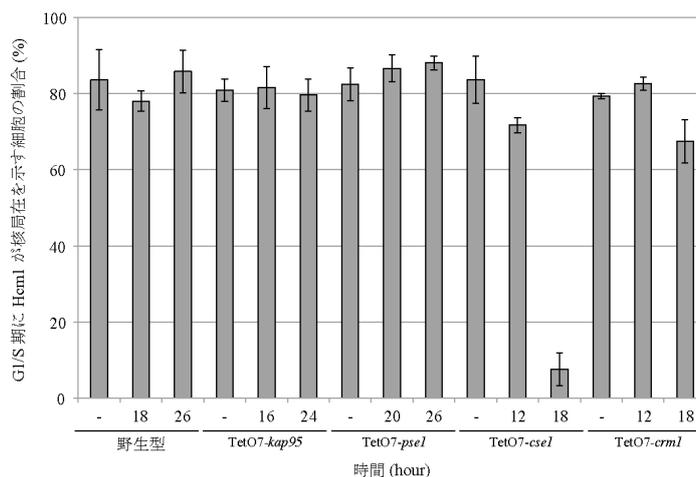


図 3. *CSE1* 発現抑制条件下では、G1/S 期において Hcm1 が核局在を示す細胞の割合が減少する。Hcm1 を可視化し、Tet/OFF システムを導入した条件致死変異株を、指し示した時間 doxycycline で処理した。そして、必須 karyopherin の発現抑制条件下における、Hcm1 の核局在を観察した。

【まとめ】

本研究において、出芽酵母で同定されている 15 種類の karyopherin のなかで、12 種類の karyopherin において、Hcm1 の G1/S 期の核局在への関与を検証した。その結果、2 つの酵母 karyopherin (Kap142, Cse1)が Hcm1 の核局在に必須であることが明らかになった。この発見は、karyopherin を介した S 期細胞周期の制御機構の解明に繋がると考えている。