

# 学位論文

## 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

平成 24 年 12 月 博士（理学）申請

東京大学大学院 理学系研究科  
生物化学専攻

青井 勇樹



## Abstract

減数分裂は有性生殖を可能にする特殊な分裂様式である。減数分裂において、核分裂が連続して起きる回数は厳密に 2 回に限定されており、これにより 2 倍体の生殖細胞は 1 倍体の配偶子に分化する。この特徴的な細胞周期の制御は、サイクリンを分解する 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と考えられる。しかしながら、その詳細な仕組みは不明である。本研究は、2 回目の核分裂の後に減数分裂周期を正しく終了させる APC/C の調節機構の解明を目指した。

減数分裂の終了を制御する因子群を探索する分裂酵母の遺伝学的スクリーニングにより、*mes1* 変異を抑圧する変異の原因遺伝子として、*fzr1*<sup>+</sup>および *sms5*<sup>+</sup>遺伝子を同定した。*fzr1*<sup>+</sup>は APC/C の減数分裂特異的な活性化因子をコードする。*sms5*<sup>+</sup>は新規遺伝子であった。*sms5Δ*株あるいは *fzr1Δ*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。Sms5 タンパク質の構造と局在の解析から、Sms5 は転写因子であることが予想された。さらに、Sms5 は *fzr1*<sup>+</sup>遺伝子の適切な転写に必要であること、Sms5 は *fzr1*<sup>+</sup>遺伝子のプロモーター領域に特異的に結合することなどから、*fzr1*<sup>+</sup>は Sms5 の重要なターゲット遺伝子であることが示唆された。これらの結果と合致して、*sms5Δ*株では Fzr1 タンパク質の発現は低く、サイクリン Cdc13 は減数第二分裂の後も安定であった。

以上より次のモデルを提唱した。Sms5 を含む転写調節機構は APC/C-Fzr1 の活性を上昇させ、減数第二分裂においてサイクリンの分解を促進する。その結果、減数第二分裂の後に細胞がふたたび分裂期に入ることを防ぎ、機能的な配偶子の形成を保証する。

## Abstract

Meiosis is a special form of nuclear division that enables sexual reproduction. The number of nuclear divisions during meiosis is strictly limited to two, thereby generating haploid gametes from diploid germ line cells. Although the precise mechanism remains unknown, this seems to be achieved by adjusting the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) activity to degrade cyclin. The aim of this study is to elucidate how APC/C is regulated to terminate the division cycle accurately after the second meiotic division.

Through a genome-wide screen to search for factors that might regulate the termination of meiosis in fission yeast, *fzr1*<sup>+</sup> and *sms5*<sup>+</sup> were identified as the genes responsible for mutations that suppress the *mes1* mutant. *fzr1*<sup>+</sup> encodes a meiosis-specific APC/C activator. *sms5*<sup>+</sup> was an uncharacterized gene. *fzr1*Δ and *sms5*Δ cells exhibited a novel phenotype, represented by ectopic spindle assembly and abnormal chromosome segregation after the second division, which we call the third division. The amino acid sequence and localization of Sms5 suggested that Sms5 is a transcription factor. Sms5 was required for proper transcription of the *fzr1*<sup>+</sup> gene and bound to the *fzr1*<sup>+</sup> promoter, indicating that *fzr1*<sup>+</sup> is a critical target of Sms5. Consistently, in *sms5*Δ cells, Fzr1 protein levels decreased and cyclin Cdc13 was stable even after the second division.

Taken together, I propose that boosting APC/C–Fzr1 activity by transcription machinery including Sms5 promotes cyclin degradation in the second meiotic division, and hence ensures the termination of the M-phase cycle to generate functional gametes.

# 目次

|   |    |
|---|----|
| 序章 .....  | 1  |
| 結果と考察.....  | 10 |
| 1 章 <i>mes1</i> 変異を抑圧する <i>sms</i> 変異の原因遺伝子の同定と解析 .....                             | 10 |
| 1.1 <i>sms</i> 変異の染色体マッピング .....  | 11 |
| 1.2 ホールゲノムシーケンシングによる <i>sms</i> 変異の原因遺伝子の同定 .....                                   | 11 |
| 1.3 <i>sms5Δ</i> 株と <i>fzr1Δ</i> 株では減数分裂において多数の核が形成された .....                        | 15 |
| 1.4 <i>sms5Δ</i> 株と <i>fzr1Δ</i> 株では“減数第三分裂”が生じた.....                               | 16 |
| 1.5 <i>sms1-23</i> 変異の性格 .....  | 19 |
| 1.6 <i>mes1</i> のサプレッサーとしての <i>sms7</i> 変異 .....                                    | 21 |
| 1.7 考察 “減数第三分裂”を生じさせる要因について .....   | 23 |
| 2 章 Sms5 は減数分裂を終了させるために <i>fzr1</i> 遺伝子の転写を促進する.....                                | 28 |
| 2.1 Sms5 は N 末端に DNA 結合ドメインをもつ.....   | 28 |
| 2.2 Sms5-GFP はクロマチンに局在した .....  | 29 |
| 2.3 Sms5 の機能には N 末端側 117 残基が必要かつ十分である .....   | 33 |
| 2.4 考察 Sms5 は転写因子である.....   | 34 |
| 2.5 Sms5 のターゲット遺伝子を解析するための減数分裂の同調系の設定 .....   | 35 |
| 2.6 Sms5 は <i>fzr1</i> 遺伝子の転写に必要である.....  | 35 |
| 2.7 Sms5-5FLAG は <i>fzr1</i> 遺伝子のプロモーター領域に結合した .....                                | 37 |
| 2.8 <i>sms5Δ</i> による <i>mes1Δ</i> の抑圧は <i>fzr1</i> <sup>+</sup> の過剰発現により打ち消された..... | 38 |

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| 2.9         | <i>sms5</i> Δ株では Fzr1 の発現量が減少しサイクリン Cdc13 が安定化した .....                       | 40 |
| 2.10        | <i>sms5</i> Δ株と <i>fzr1</i> Δ株では安定化した Cdc13–YFP は減数第三分裂の分裂装置<br>に局在化した ..... | 43 |
| 2.11        | 考察 減数分裂を終了するための Sms5 および Fzr1 の役割について .....                                  | 45 |
| 結論 .....    |  | 52 |
| 材料と方法 ..... |  | 53 |
| 展望 .....    |  | 63 |
| 謝辞 .....    |  | 69 |
| 参考文献 .....  |  | 70 |

## 序章

### 有性生殖と減数分裂

新たな個体の産生は生命のもつ最も基本的な特徴のひとつであり、これを生殖という。生殖は、分裂などにより遺伝的に等価な個体を作り出す無性生殖と、配偶子の形成と融合を経て遺伝的に異なる個体を生み出す有性生殖、のふたつに分類される。ヒトを含む多くの真核生物は、後者の有性生殖を利用し、配偶子を形成する仕組みを発達させている。減数分裂は、配偶子の形成のための特殊な分裂様式である。減数分裂の異常は配偶子の異数性を引き起こし、先天性の欠陥や不妊につながる。有性生殖をおこなう生物にとって、減数分裂を正確に成し遂げることは極めて重要である。

減数分裂は、細胞増殖のための分裂様式である体細胞分裂と比較して、いくつか異なる点をもつ。まず、細胞周期の構成に違いがある。体細胞分裂周期では、DNA 複製と核分裂が交互におこなわれる (図 1)。倍数性を維持するため、DNA 複製と核分裂のうちどちらか一方が連続しておこなわれることはない。これに対して減数分裂周期では、生殖細胞 (倍数性:  $2n$ ) は、まず減数分裂前 DNA 複製期に DNA を倍加 ( $4n$ ) させる。つぎに減数第一分裂期と減数第二分裂期において核分裂を 2 回連続しておこなうことにより、倍数性を 2 回連続して半減させ、配偶子 ( $1n$ ) を形成する (図 1)。ふたつの配偶子 ( $1n$ ) は融合して倍数性  $2n$  の細胞となり、これにより倍数性は世代を越えて維持される。このように、2 回連続した分裂期は減数分裂周期に特有の現象であり、また同時に、有性生殖において倍数性を維持するのに不可欠な役割を果たしている。

細胞周期の違いのほか、減数分裂周期では体細胞分裂周期に比べて、染色体組み換えが非常に高い頻度で起きる。組み換えにより父親と母親由来の相同染色体間で乗り換え

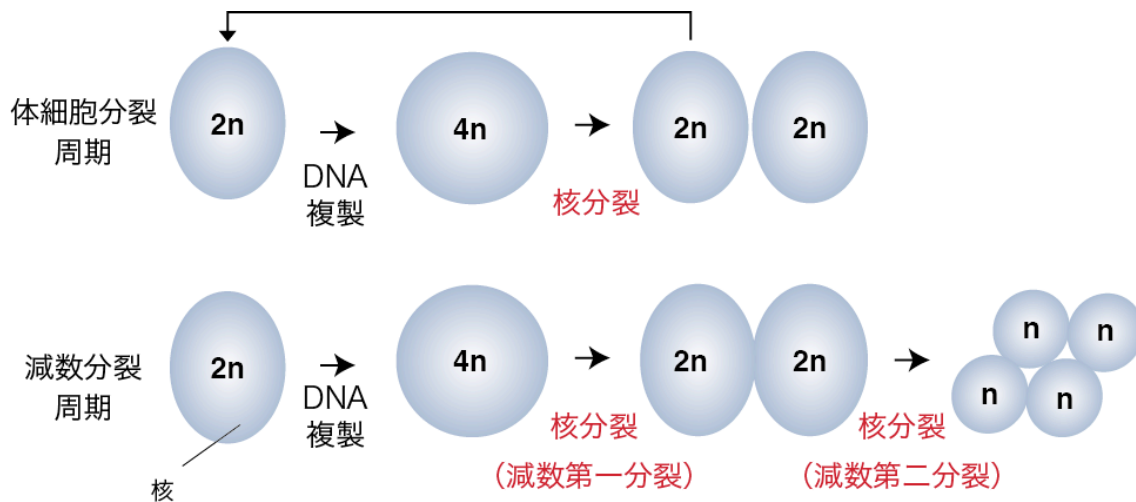


図1 体細胞分裂と減数分裂のちがい

体細胞分裂周期では、DNA複製と核分裂（体細胞分裂）が交互に起きるが、減数分裂周期では、DNA複製ののち核分裂が2回連続して起きる（減数分裂）。“ $n$ ”は1つの染色体セットを示す。

が起きると、両者の染色体が混在した多様な染色体をもつ配偶子が産生され、その結果、種内の遺伝的多様性がもたらされる。また、染色体の分配様式にも違いがみられる。体細胞分裂では姉妹染色分体が2つの細胞に均等に分配される（均等分裂）。これに対し、減数第一分裂では姉妹染色分体は分離しないまま相同染色体が分配され（還元分裂）、そののち減数第二分裂において姉妹染色分体が分配される（均等分裂）。

さて、減数分裂周期は上記のような特徴をあわせもつことにより、倍数性が半減した配偶子の形成を可能とする。そしてそのような特徴を生み出すためには、一般的な細胞周期の制御因子に加えて、減数分裂周期に特異的な因子が必要である。減数分裂周期では、どのように体細胞分裂周期の仕組みが改変されるのだろうか。以下では、細胞周期の違いに焦点を絞り、その違い生み出す分子機構について記述した。

## 細胞周期における APC/C の役割

はじめに、体細胞分裂周期における細胞周期制御の仕組みについて述べる。細胞周期は Cdk (cyclin-dependent kinase) の活性が振動することによって制御される。Cdk はサイクリンと結合することによって活性化され、結合相手のサイクリンが分解されることによって急速に不活性化される。様々なタイプのサイクリンが細胞周期において分解されるが、なかでも B 型サイクリン (本論文ではこれ以降 B 型サイクリンを単にサイクリンとよぶこととする) は多くの生物にとって必須の役割をもつ。サイクリンの蓄積によって導かれる高い Cdk 活性は、DNA の複製開始点が構築されるのを妨げ、細胞を分裂期へと移行させる。いっぽう分裂期におけるサイクリンの分解は Cdk を不活性化させ、これにより細胞は分裂期を終了させ、複製開始点の構築を開始できるようになる。

Cdk の活性制御は、主に APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome) によっておこなわれる。APC/C は真核生物に広く保存されたユビキチンリガーゼである。APC/C による Cdk 活性の制御は、サイクリンを特定の時期にユビキチン化し、26S プロテアソームによる分解へ誘導することによって達成される。サイクリンに加え、APC/C は染色体分配においてセキュリンのユビキチン化を担う。姉妹染色分体はコヒーシンによって束ねられ、このコヒーシンを切断する酵素であるセパレースの活性はセキュリンによって阻害されている。APC/C を介したセキュリンの分解は、セパレースをセキュリンの阻害から開放し、これによりコヒーシンが切断されて染色体は 2 つの細胞に分離される。このように、APC/C はセキュリンおよびサイクリンの分解を介して、染色体分配と分裂期の終了に必須の役割を果たしている。

APC/C は少なくとも 15 種類のサブユニットで構成されるが、その活性は 2 つの APC/C 活性化因子、Cdc20 と Cdh1 (Cdc20 homologue 1) に依存する[1]。活性化因子は主に 2

つの分解配列（D-box と KEN-box）を認識し、APC/C と基質の結合を助ける。G1 期から分裂期の初期にかけて APC/C は不活性化されており、この間にサイクリンを含む APC/C の基質が蓄積する。細胞が分裂期に入ると APC/C は活性化する。この活性化は、部分的には、Cdk に依存して Cdc20 と APC/C の結合が促進される[2-5]ことにより達成される。出芽酵母では、Cdk によるリン酸化によって Cdc20 と Cdh1 のどちらの活性化因子と結合するか決められており、分裂期では Cdc20 が、分裂期の終了時と間期では Cdh1 が、APC/C と結合すると考えられている[6]。

Cdc20 はセキュリンとサイクリンの分解に必須である[7-10]。分裂中期において、全ての染色体の分裂装置への接着が完了すると、Cdc20 は D-box を認識して APC/C を介したセキュリンとサイクリンの分解を誘導する。サイクリンの分解が進み Cdk 活性が低下した分裂後期では、APC/C はターゲットの範囲を広げてより多くの種類の基質（その多くは KEN-box を含む）をユビキチン化する。この基質特異性の変化は、ひとつには、APC/C と結合する活性化因子が Cdc20 から Cdh1 へ変更することによって成しとげられる[11, 12]。このとき、Cdk 活性が低下したことにより Cdh1 は脱リン酸化されて、APC/C を活性化できるようになると考えられている。しかしながら、分裂期における Cdh1 の役割については不明な点が多い。実際、Cdh1 を欠失しても哺乳類では分裂期の進行には軽微な欠陥しかみられず[13]、ハエ[14]、出芽酵母[15, 16]では分裂期に何の影響もみられない。Cdh1 による APC/C の活性化は、むしろ分裂期が終了したあとに重要となる。Cdh1 は細胞の分化、静止状態、酵母における接合といった、G1 期の細胞の運命を決定するときに必要な。上記の文脈は分裂酵母においても当てはまり、Cdc20 ホモログの Slp1 は染色体の分離に必要であり生育に必須である[17]。他方で、Cdh1 ホモログの Ste9 は生育に不要であるものの、Ste9 を欠失すると環境変化に応答した G1

期の停止ができず、接合不能となる[18]。

### **APC/C の阻害は減数第二分裂の開始に必要である**

さて前述のように、減数分裂周期では2回の核分裂（減数第一分裂と減数第二分裂）が連続して起きる。このような体細胞分裂周期の改変の仕組みは、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ことによって達成される。

分裂酵母において APC/C インヒビター Mes1 は、減数第二分裂の開始に必須である[19]。Mes1 は減数分裂に特異的に発現し、APC/C の活性化因子と結合して本来の基質であるサイクリン Cdc13 の分解を阻害する[20]。これにより、減数第二分裂を開始するのに十分な Cdk 活性が維持される（図 2）。Mes1 は自身の D-box および KEN-box によって活性化因子 Slp1 に認識され、APC/C を介した分解を受ける[21]。そのため、Mes1 は”自殺”することによって APC/C-Slp1 を阻害すると考えられている。分裂酵母は Cdh1 ホモログとして Ste9 の他に、減数分裂に特異的に発現する Fzr1, Fzr2, Fzr3 をもつ[22, 23]。APC/C-Ste9 と APC/C-Fzr2 は Mes1 の分解を誘導できるが、他方で APC/C-Fzr1 は Mes1 と強く結合するものの分解へ誘導することはできないようである[24]。

脊椎動物では、カエルおよびマウスの卵において Erp1/Emi2 による APC/C の阻害が減数第一分裂から減数第二分裂への移行に必要である[25, 26]。カエルの卵では、Erp1 を欠失させると減数第一分裂ののち DNA 複製が始まり単為発生が起きる[25]。同様の表現型は、Mos-MAPK 経路を阻害した場合[27, 28]や、クロモキネシン Xkid を枯渇させた場合[29]でもみられるが、APC/C との関与は不明である。どの場合にも共通してサイクリンの減少がみられるため、少なくともサイクリンのタンパク量を維持することが DNA 複製を抑制し減数第二分裂を開始させるのに必要であるといえる。また Cdk の阻

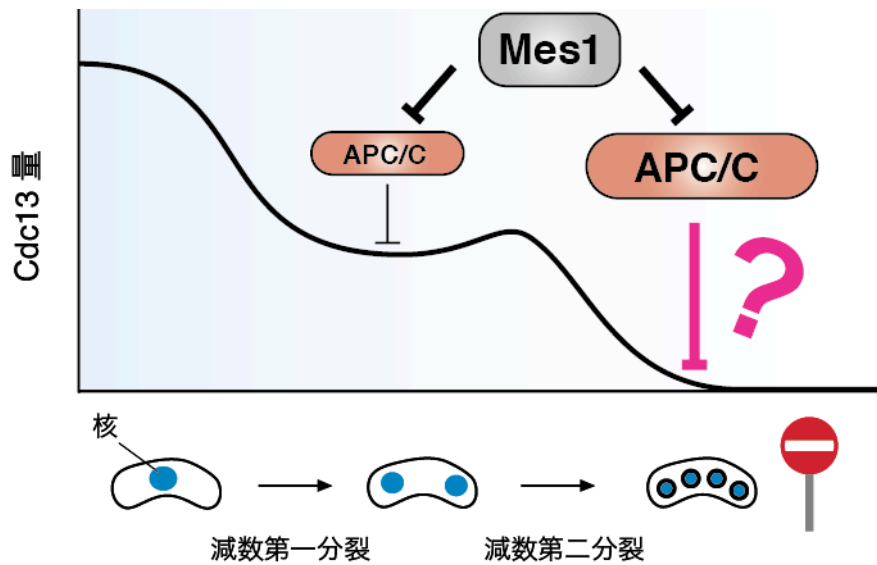


図2 減数第二分裂を開始するための APC/C の制御モデル

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 を阻害する。この時期サイクリン Cdc13 は APC/C を介して分解されるが、この分解は Mes1 によって部分的に妨げられるため、十分な量の Cdc13 が残される。残存した Cdc13 は Cdk 活性を維持するので、そこで分裂期は終了せず、減数第二分裂が開始する。つまり、Mes1 は APC/C を阻害することによって、結果的に減数第二分裂の開始を保証する。

このモデルにおいて、減数第二分裂を開始するという点は、「Mes1 による APC/C の阻害」という分子機構によって理解できる。しかしこの機構は、減数第二分裂を終了するという点では、むしろ矛盾を生んでいる。すなわち、減数第二分裂を終了するとき APC/C は Cdc13 の分解を誘導する必要があるが、「Mes1 による APC/C の阻害」はこの分解への誘導を妨げてしまう。したがって、減数第二分裂を終了させるためには、何らかの機構によって APC/C を「再活性化」する必要がある。従来のモデルではこの点について説明できない。

害キナーゼである Wee1 の活性は抑制され、このことも DNA 複製の抑制に寄与する[30]。

植物では、シロイヌナズナにおいて Osd1 による APC/C の阻害が減数第二分裂の開始に必要である[31]。Osd1 と Mes1 は D-box や KEN-box など複数のモチーフ配列を共有する。Osd1 は体細胞分裂にも必要であるが[32]、減数分裂との機能の違いや、Osd1 による APC/C の阻害の仕組みなど不明な点が多い。

以上のように、酵母では Mes1、脊椎動物では Erp1/Emi2、植物では Osd1 という APC/C

インヒビターが減数第二分裂の開始に重要な役割を果たす。「APC/C の阻害」を介した減数分裂周期の制御は、種を越えて保存されている。

### **本研究の目的：減数分裂の終了における APC/C の再活性化の仕組みを解明する**

減数第二分裂を開始するためには「APC/C の阻害」が必要であるが、他方で、減数第二分裂を終了するためには「APC/C の再活性化」が必要であると考えられる。APC/C の再活性化には少なくとも減数分裂特異的な活性化因子が関与することが、次の結果から示唆されている。分裂酵母における減数分裂に特異的な活性化因子 Fzr1 を欠失させた場合、減数第二分裂の終了後もサイクリン Cdc13 が安定化し、また胞子形成に異常がみられる[22-24]。Fzr1 の出芽酵母ホモログである Ama1 も、正常な胞子形成に必要である[33]。しかし、Fzr1 や Ama1 がどのように減数分裂の終了を導くのか、その具体的なメカニズムは不明である。

減数分裂では分裂期が連続して起きるが、倍数性がちょうど半減した配偶子を形成するためには、分裂期の連続する回数は2回に限定しなければならない。そして、その仕組みを理解するためには、減数第二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を明らかにする必要がある。

### ***sms* 変異株をもちいて APC/C の再活性化の仕組みを解析する**

そこで本研究は、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。はじめに、減数分裂の終了に関与する新規因子を同定しようと考え、当研究室の先行研究において単離されていた *sms* 変異株に着目した。*sms* 変異株は、*mes1* 変異のサプレッサーとして、勝田・今井によるスクリーニングによって取得された分裂

酵母変異株である (図 3B,C, 未発表データ)。 *sms* 変異株は 9 つの相補群に分類されていたが、どの相補群についても、原因遺伝子の同定には至っていなかった。 *sms* 変異株が単離された時点はまだ Mes1 の機能が不明であったこともあり、 *sms* 変異株の解析はほとんどおこなわれていなかった。

そこで、Mes1 は APC/C インヒビターであるという事実をもとに *sms* 変異株のスクリーニングを解釈しなおした (図 3A)。 *mes1* 変異株は減数第二分裂を開始できない。この表現型は、Mes1 が機能しないために APC/C が活性化してしまい、減数分裂が「早期に終了」した表現型であると考えてよい。 *sms* 変異株とは、この「早期の終了」の表現型が抑圧されて、減数第二分裂と孢子形成が可能となった変異株である。したがって、 *sms* 変異株のなかには「減数分裂の終了メカニズムに異常が生じた結果として *mes1* 変異を抑圧した」変異株が含まれるはずである。実際、減数分裂の終了に関与すると考えられる *fzr1* 遺伝子の破壊 (*fzr1Δ*) は、 *mes1Δ* を抑圧する[24]。この結果は、上記の *sms* 変異株の再解釈の内容を支持する。

このように、「*mes1* 変異を抑圧する = 減数分裂の終了に異常がある」という考え方にもとづけば、 *sms* 変異株のスクリーニングは、減数分裂の終了に関与する因子の変異株を検索する目的にも適したものであるといえる。以上が *sms* 変異株に着目した理由である。したがって本研究は、減数分裂の終了メカニズムを解明することを目的として、まず *sms* 変異の原因遺伝子を同定することから開始した。

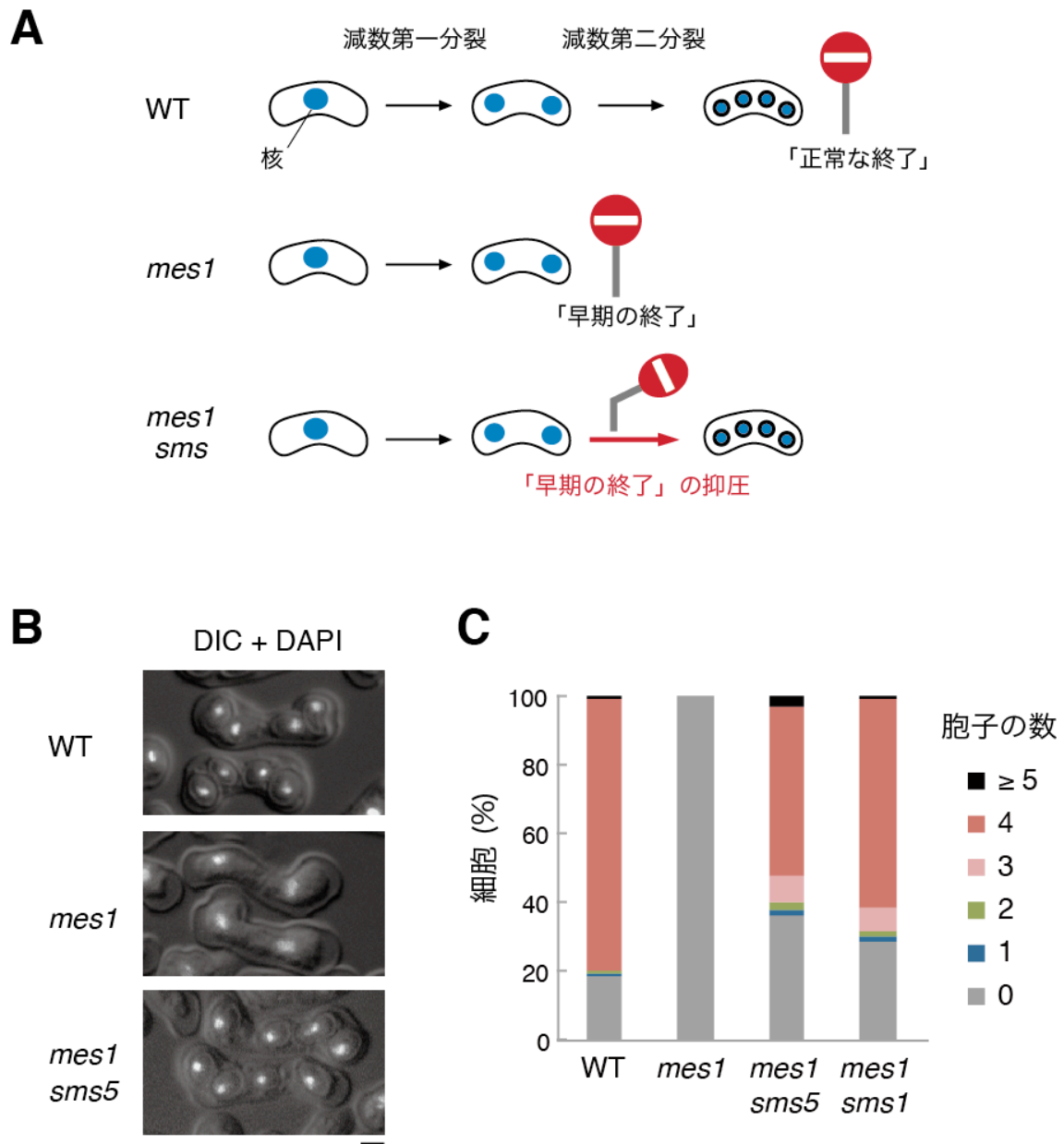


図3 減数分裂の終了という観点からとらえなおした *sms* 変異株のスクリーニング

(A) スクリーニングの戦略を示した模式図。*mes1* 変異株は減数第二分裂の前で分裂期を終了し（「早期終了」）、胞子を形成しない。*mes1* 変異株にランダムに変異を導入することによって、「早期終了」の表現型が抑圧され、減数第二分裂と胞子形成が可能となった変異株を単離した。(B) *sms* 変異による *mes1* 変異の抑圧。ここでは *sms5* を代表例として、野生株 (WT)、*mes1* 変異株、*mes1 sms5* 二重変異株を接合と減数分裂に誘導した。それらの細胞を DAPI 染色して、蛍光顕微鏡と DIC(微分干渉顕微鏡)による観察像を重ねあわせた像を示す。(C) 野生株 (WT)、*mes1* 変異株、*mes1 sms5* 二重変異株、*mes1 sms1* 二重変異株それぞれについて、接合体で形成された胞子の数の分布を計測した (各株について  $n > 200$  細胞)。

## 結果と考察

### 1 章 *mes1* 変異を抑圧する *sms* 変異の原因遺伝子の同定と解析

変異の原因遺伝子をクローニングする方法には、いくつかの種類が存在する。なかでも遺伝子ライブラリをもちいる方法は、分裂酵母における変異の原因遺伝子をクローニングする手法として確立されている。この方法では、プラスミド化した遺伝子ライブラリを変異株に導入し、変異を相補する遺伝子を単離することによって、原因遺伝子を同定する。たとえば、生育が温度感受性 (*ts*) を示す変異であるときは、増殖能を回復させる遺伝子を単離すればよい。実際、生育について温度感受性を示す *sms8* 変異株は、この方法により APC/C コアサブユニットをコードする *cut20*[34]を原因遺伝子として同定した。

さて、*sms* 変異は *mes1* 変異株のサプレッサー変異である。すなわち *mes1* 変異株において、減数第二分裂の開始と胞子形成能を回復させた変異である。したがって遺伝子ライブラリ中に存在する原因遺伝子が *sms* 変異を相補した場合、この抑圧変異株は *mes1* 変異株と同様の表現型（減数第二分裂および胞子形成が不能）に戻ると考えられる。このような *sms* 変異の相補遺伝子の探索は、過去に当研究室の勝田・今井によっておこなわれたが、この方法では原因遺伝子の同定には至らなかった。

ここ 5, 6 年の DNA シーケンサーの技術革新を背景として、今日では、細胞の全ゲノム DNA 配列を決定（ホールゲノムシーケンシング）して、変異箇所を探し当てるのが難しくない。ホールゲノムシーケンシングを使用した変異解析は、変異株の DNA 配列を野生株の配列と直接比較しておこなう。そのためこの方法は、遺伝子ライブラリで

は同定するのが難しい表現型を示す変異株にも適用できる。この点において、ホールゲノムシーケンシングによる変異解析は、遺伝子発現ライブラリの導入といった表現型の回復を指標とするクローニング法に比べて有利である。本研究では、*sms* 変異株のホールゲノムシーケンシングをおこない、3 種類の *sms* 変異の原因遺伝子を同定した。本章ではその過程を述べるとともに、*sms* 遺伝子の破壊株の表現型を観察することによって、*sms* 遺伝子と減数分裂の終了との関係について考察した。

### 1.1 *sms* 変異の染色体マッピング

本研究では、原因遺伝子の同定にあたって次の 2 段階の手順で解析を進めた。まず、染色体マッピングをおこない原因遺伝子が各々何番染色体上に位置するか調べた。次に、ホールゲノムシーケンシングによって変異の所在を塩基単位で決定した。

染色体マッピングは、*rec12Δ* をバックグラウンドとしたマーカー株との掛け合わせによる [34, 35] (詳細は「材料と方法」を参照)。これより、*sms6* を除く 8 つの *sms* 原因遺伝子を各染色体上にマッピングした (表 1)。*sms8* 遺伝子は 1 番染色体上にあるという結果を得た。これは *sms8* 遺伝子が 1 番染色体上の *cut20* と同一であるという結果と合致する。これより、マッピング系が正しく機能していることを確認した。

### 1.2 ホールゲノムシーケンシングによる *sms* 変異の原因遺伝子の同定

*sms* 変異株のホールゲノムシーケンシングをおこなうにあたり、

- (1) *mes1* 変異の抑圧と無関係な変異がゲノム上に存在するかもしれないこと
- (2) 配列解読エラーによって、目的の変異が検出できない可能性があること

の 2 点に注意した。(1) については、無関係な変異が数多く検出されてしまうと、原

表 1 *sms* 変異の染色体マッピング

| マッピング遺伝子    | 染色体番号 | 組換え体の出現率 <sup>a</sup> (%) | <i>n</i> | $\chi^2$ | <i>p</i> |
|-------------|-------|---------------------------|----------|----------|----------|
| <i>sms1</i> | I     | 33                        | 101      | 12.1     | 0.0005   |
|             | II    | 3                         | 101      | 89.4     | < 0.0001 |
|             | III   | 56                        | 101      | 1.67     | 0.1958   |
| <i>sms2</i> | I     | 3                         | 102      | 90.4     | < 0.0001 |
|             | II    | 56                        | 102      | 1.41     | 0.2348   |
|             | III   | 38                        | 102      | 5.65     | 0.0175   |
| <i>sms3</i> | I     | 1                         | 102      | 98.0     | < 0.0001 |
|             | II    | 54                        | 102      | 0.627    | 0.4283   |
|             | III   | 43                        | 102      | 1.92     | 0.1657   |
| <i>sms4</i> | I     | 0                         | 101      | 101      | < 0.0001 |
|             | II    | 40                        | 101      | 4.37     | 0.0367   |
|             | III   | 62                        | 101      | 6.19     | 0.0129   |
| <i>sms5</i> | I     | 46                        | 101      | 0.802    | 0.3705   |
|             | II    | 54                        | 101      | 0.802    | 0.3705   |
|             | III   | 0                         | 101      | 101      | < 0.0001 |
| <i>sms6</i> | I     | 65                        | 105      | 9.15     | 0.0025   |
|             | II    | 35                        | 105      | 9.15     | 0.0025   |
|             | III   | 62                        | 105      | 5.95     | 0.0147   |
| <i>sms7</i> | I     | 0                         | 102      | 102      | < 0.0001 |
|             | II    | 36                        | 102      | 7.69     | 0.0056   |
|             | III   | 49                        | 102      | 0.0392   | 0.8430   |
| <i>sms8</i> | I     | 0                         | 103      | 103      | < 0.0001 |
|             | II    | 59                        | 103      | 3.50     | 0.0612   |
|             | III   | 28                        | 103      | 19.7     | < 0.0001 |
| <i>sms9</i> | I     | 0                         | 103      | 103      | < 0.0001 |
|             | II    | 29                        | 103      | 18.0     | < 0.0001 |
|             | III   | 50                        | 103      | 0.00971  | 0.9215   |

すでに発表した結果[34]に、*sms2*, *sms3*, *sms6* のデータを新たに追加した表を示す。

<sup>a</sup> 掛け合わせの結果、マッピング相手株が保持している遺伝子マーカーと *sms* 変異が同時に出現した胞子のことを組換え体とした。組換え体がほとんど出現しない染色体（緑色）は、すなわち *sms* 変異の染色体を示す。*sms6* 変異株では、どの染色体においても組換え体が高頻度で出現したため、染色体は決定できなかった。詳しくは方法と材料を参照。

因遺伝子の同定が困難になる。そこで、*sms* 変異株を野生株と 5 回以上バッククロスさせた。これにより、*sms* 変異と連鎖しない変異の数を理論上約 3%にまで減らすことができる。いっぽう（2）に対処するためには、染色体マッピングの結果をもとにして、

各染色体に一つずつ変異をもつ *sms1 sms5 sms7* 三重変異株を作製した。3 つの *sms* 変異を含むゲノム DNA をもちいれば、変異を 1 つだけでもつ場合に比べて、変異の検出に失敗する確率を大幅に下げることができる。

このようにして作製された *sms1 sms5 sms7* 三重変異株から、ゲノム DNA サンプルを抽出し、Genome Analyzer IIx (illumina)をもちいた変異解析をタカラバイオ社に委託した。その結果、およそ 900 個の変異が検出された。この中からエキソン内で生じた変異を抽出し、さらにコードされるアミノ酸配列に影響を及ぼす変異に限定したところ、約 60 個の変異が候補に残った。これらの変異を一つずつ *mes1* 変異株に導入し、*mes1* 変異の抑圧が再現されるものを探索した。その結果、*sms5* と *sms7* の原因遺伝子を、それぞれ 3 番染色体上の SPCC584.02 と 1 番染色体上の SPAC3H8.07c に同定した。今後、これらの遺伝子名を、それぞれ変異名と同じく *sms5*, *sms7* と呼ぶ。*sms5* と *sms7* はどちらも新規遺伝子であった。なお、本論文と同時期に発表された *cuf2* 遺伝子は *sms5* と同一の遺伝子である[36]。

ホールゲノムシーケンシングにもちいた *sms5-1* 変異は、19 番目のアルギニン残基がグルタミンに置き換わるミスセンス変異であった。同様に *sms7-59* 変異体は、103 番目のトリプトファン残基がストップコドンに変化するナンセンス変異であった。これらの変異が機能欠失型かあるいは機能獲得型かを知る目的で、*mes1Δ*株において *sms5* または *sms7* 遺伝子を破壊した。*sms5Δ*と *sms7Δ*はどちらも *mes1Δ*を抑圧した。これより、*sms5-1* および *sms7-59* 変異体は機能欠失型であると推測された。

いっぽう、*sms1* の原因遺伝子はエキソン内の変異候補からは特定されなかったので、探索範囲を非コード領域へ広げた。すると、APC/C の活性化因子をコードする *fzr1/mfr1* 遺伝子の-106 (ORF の最初の A から 106bp 上流) の位置に、塩基 C が T に置換する変異

が存在した。確認のため、*fzr1* 遺伝子のコード領域およびその 1kb 上流と下流を含めた 3.3kb の DNA 断片を再度シーケンシングしたが、他に変異は発見されなかった。*fzr1Δ* は *mes1Δ* を抑圧するので[24, 37]、*fzr1* 遺伝子の上流配列の変異が *mes1* 変異を抑圧する可能性は高い。そこで次のような相補性検定をおこなった。まず、*sms1* 変異は野生型 *fzr1*<sup>+</sup> によって相補され、このとき *mes1Δ* の抑圧はみられなくなった (表 2)。いっぽう *sms1* 変異は *fzr1Δ* によっては相補されず、このとき *mes1Δ* は抑圧された (表 2)。これより、*sms1* の原因遺伝子は *fzr1* であることが確認された。以上の同定結果をまとめたものを表 3 に示す。

表 2 *sms1* 変異と *fzr1Δ* の相補性検定

A 株 (一倍体)      B 株 (一倍体)      A/B 株 (ヘテロ二倍体) の胞子形成能

|                    |                   |   |
|--------------------|-------------------|---|
| <i>mes1Δ fzr1Δ</i> | <i>mes1Δ</i>      | — |
| <i>mes1Δ sms1</i>  | <i>mes1Δ</i>      | — |
| <i>mes1Δ fzr1Δ</i> | <i>mes1Δ sms1</i> | + |

*fzr1Δ* と *sms1* 変異は、どちらも *mes1Δ* のサプレッサーとして劣性であった。*mes1Δ fzr1Δ* 株と *mes1Δ sms1* 株より作製したヘテロ二倍体では、*mes1Δ/mes1Δ* が抑圧されて胞子の形成がみられた。つまり、*fzr1Δ* と *sms1* は互いを相補できなかった。この結果は、*sms1* 変異の原因遺伝子は *fzr1* であることを示した。

表 3 *sms* 変異の原因遺伝子と変異箇所

| 変異株            | 原因遺伝子        | コードされるタンパク質               | 変異 <sup>a</sup> | アミノ酸の置換               |
|----------------|--------------|---------------------------|-----------------|-----------------------|
| <i>sms1-23</i> | <i>fzr1</i>  | APC/C activator Fzr1/Mfr1 | C(-106)T        | 該当なし                  |
| <i>sms5-1</i>  | SPCC584.02   | unknown                   | G106A           | R19Q                  |
| <i>sms7-59</i> | SPAC3H8.07c  | unknown                   | G402A           | W103stop <sup>b</sup> |
| <i>sms8-29</i> | <i>cut20</i> | APC/C subunit Cut20/Lid1  | T1976C          | S584P                 |

<sup>a</sup> 開始コドン ATG のアデニンを+1, その 1 つ上流の塩基を-1 として示した。

<sup>b</sup> *sms7-59* 変異株では、103 番目のトリプトファン残基をコードするコドン TGG が、終止コドン TAG に置換される。したがってこの変異株では、C 末端側の約 4 割を欠失したトランケート型変異体を発現すると予想される。

### 1.3 *sms5Δ*株と *fzr1Δ*株では減数分裂において多数の核が形成された

さて、序論で述べたように、*sms* 変異株は減数分裂の終了メカニズムに異常があると予想される。原因遺伝子として同定された *sms5*, *sms7* 遺伝子は機能が未知であったため、実際に減数分裂の終了に関与するか検討する必要がある。そこで、それぞれの遺伝子を単独で破壊した株を作製して、減数分裂での表現型を観察した。

細胞を SPA プレート上で減数分裂に誘導したところ、野生株では細胞内に 4 つの核が形成された。これに対して *sms5Δ*株では、13.4%の細胞で 4 つを超える異常な核が形成された(図 4)。他方で、*sms7Δ*株は野生株と大きな差は見られなかった(data not shown)。したがって、*sms5* 遺伝子は、すくなくとも減数分裂における正常な核分裂に必要であると推測できた。

すでに報告されているように[22]、*fzr1Δ*株では 28.1%の細胞で、*sms5Δ*株と同様の核数の異常が観察された(図 4)。この *fzr1Δ*株での核数の異常は、*fzr1Δ sms5Δ*二重破壊株

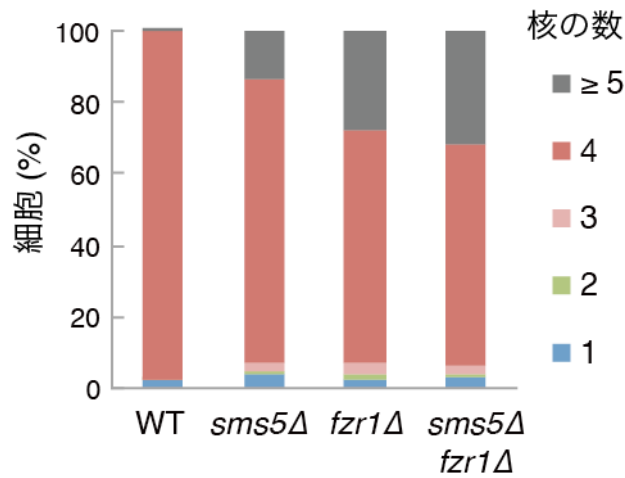


図4 *sms5Δ*株および *fzf1Δ*株では減数分裂により多数の核が形成された

野生株 (WT)、*sms5Δ*株、*fzf1Δ*株、*sms5Δ fzf1Δ* 二重破壊株の細胞を SPA 上で減数分裂へ誘導した。30°C 24h 培養したのち、各接合体に生じた核の数を計測した (n > 800 細胞)。*sms5Δ*株と *fzf1Δ*株では、5 つ以上の核を持つ細胞が出現した。*fzf1Δ*株の表現型は、*sms5Δ fzf1Δ* 二重破壊株の表現型と大きな差はみられなかった。

ではほとんど強まらなかった (32.0%、図 4)。これより、*sms5* 遺伝子は *fzf1* 遺伝子と同経路で機能することが示唆された。

#### 1.4 *sms5Δ*株と *fzf1Δ*株では“減数第三分裂”が生じた

興味深いことに、*fzf1Δ*株では減数第二分裂が終了したのちにふたたびスピンドル微小管が形成されることが、当研究室の新井・宮本の観察によって見いだされた。この観察結果は、*sms5Δ*株および *fzf1Δ*株でみられる核数の増加は、減数第二分裂ののちに核分裂が異所的に起きることにより生じることを示唆した。これを検討するため、3 色の蛍光タンパク質をもちいた生細胞 (ライブセル) イメージングをおこなった。GFP-Atb2 ( $\alpha$  チューブリン) によって微小管を緑色に、Htb1-CFP (ヒストン H2B) によってク

ロマチンを青色に、Sfi1-mCherry (SPB half-bridge 因子) によってスピンドル極体 (SPB : 中心体に相同な小器官) を赤色に可視化した細胞を観察にもちいた。

まず、この3色で標識された野生株において、減数第二分裂が進行するようすを観察した。減数第二分裂後期において、スピンドル微小管の伸長に伴って染色体が分離し、のちスピンドル微小管は消失した (図 5A)。これより、野生株では減数第二分裂が正常に進行することが確認された。*sms5Δ*株においても、減数第二分裂後期における染色体分離とその後のスピンドル微小管の消失は正常に起きた (10 分、図 5B)。しかし、スピンドル微小管の消失の後に、SPB から微小管が再度形成され始め (40 分)、この微小管の伸長とともに染色体が一部分離して (55 ~ 75 分)、最終的に5つ以上の染色体の塊を生じさせた。

*fzr1Δ*株においても、新井・宮本の観察結果に合致するように、減数第二分裂のスピンドル微小管が消失したあとに、微小管の再形成が観察された (75 分、図 5C)。このスピンドル微小管は染色体を分離し、*sms5Δ*株と同じく核を断片化させた (95 ~ 115 分)。*fzr1Δ*におけるスピンドル微小管の再形成 (95%) は、*sms5Δ*株 (11%) に比べ非常に高い頻度でみられた (図 5D)。

以上の結果より、*sms5Δ*株と*fzr1Δ*株では、核分裂の終了に異常があり、3回目の分裂装置の形成が起きること、またこの“減数第三分裂”によって核が過剰に分離することが示された。

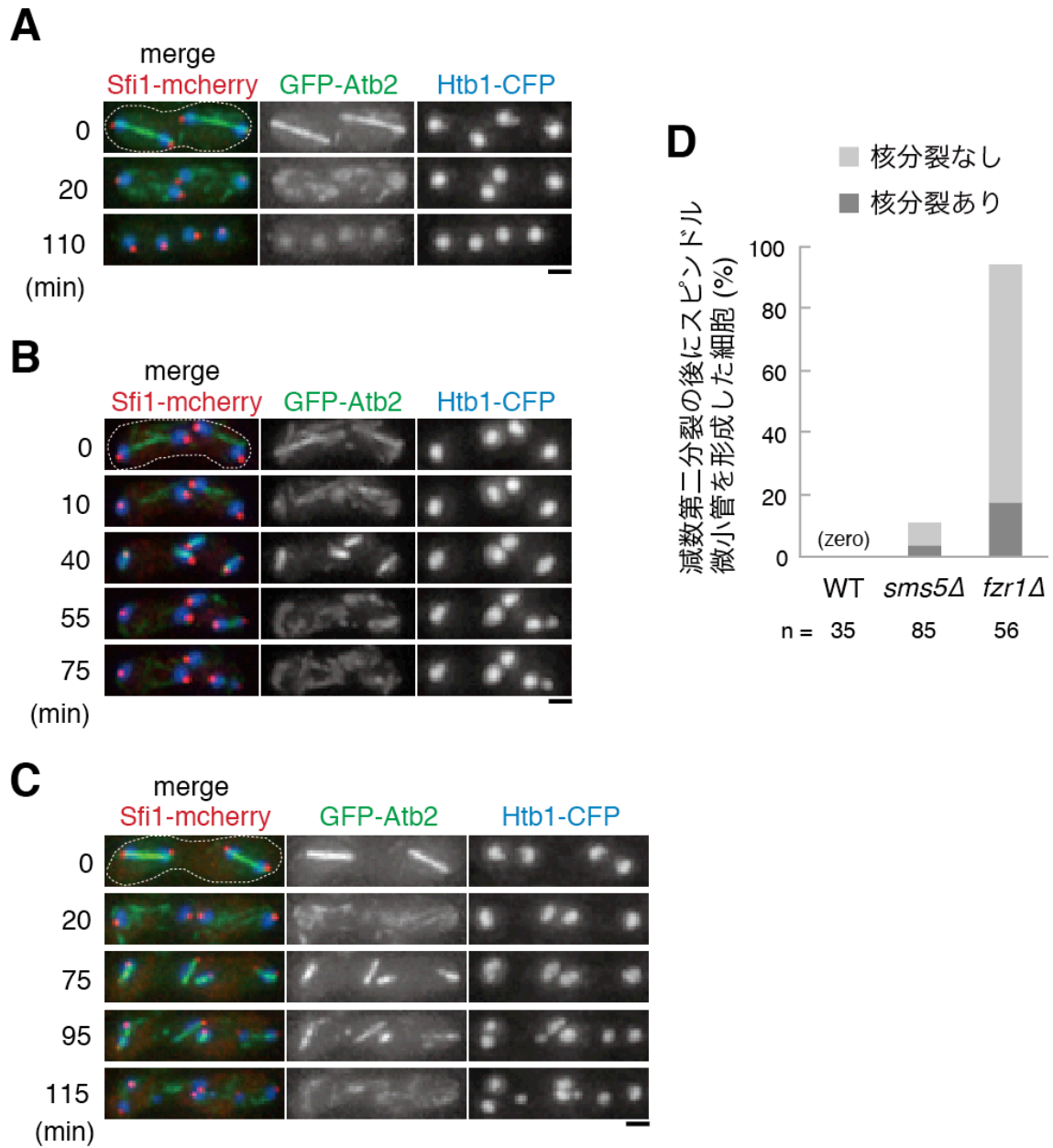


図5 *sms5Δ*株および *fzr1Δ*株では減数第二分裂の後に再び分裂期が起きた  
(A–C) *sms5Δ*株と *fzr1Δ*株では、減数第二分裂のあとに、スピンドル微小管の異常な再形成と付加的な核分裂が観察された。観察にもちいた細胞は、GFP-Atb2 (微小管; 緑)、Htb1-CFP (ヒストン H2B; 青)、Sfi1-mCherry (SPB; 赤) を発現する。それぞれの株についてライブ観察をおこない、減数第二分裂以降のようすをタイムラプス画像で追った。(A) 野生株、(B) *sms5Δ*株、(C) *fzr1Δ*株。スケールバーは 2μm。(D) 野生型 (WT)、*sms5Δ*株、*fzr1Δ*株において、減数第二分裂ののちスピンドル微小管を形成した細胞の割合を示す。それらの細胞の一部では核分裂がみられた。

### 1.5 *sms1-23* 変異の性格

ところで、オリジナルの変異である *sms1-23* と *sms5-1* は、遺伝子にどのような影響を及ぼす変異であろうか。*sms5-1* 変異については2章で詳しく述べるので、ここでは *sms1-23* 変異について記載する。*sms1-23* の原因変異は、*fzr1* ORF の 106bp 上流にある 1 塩基の置換として同定された。したがって *sms1-23* 変異は、*fzr1* 遺伝子のプロモーター領域内の変異である。また *fzr1Δ* と *sms1-23* はどちらも *mes1Δ* を抑圧することから、*sms1-23* 変異は機能低下型であると推測される。これらを考慮すると、*sms1-23* 変異株では *fzr1* の転写量が減少している可能性があるため、この点を検討することとした。

まず、*sms1-23* 変異を *mes1Δ* 株に導入したところ、たしかにこの *fzr1* プロモーター内の変異は *mes1Δ* を抑圧した (図 6A)。*sms1-23* 変異による抑圧された細胞の割合 (9.5%) は、*fzr1Δ* によって抑圧された細胞の割合 (23%) より低かった。これより、*sms1-23* 変異株では *fzr1* の転写は起きているものの、その転写量が減少していることが示唆された。

つぎに、*fzr1* mRNA を定量した。野生株と *sms1-23* 変異株を同調的に減数分裂に導入し (*pat1* 変異による同調的な減数分裂については2章を参照)、経時的に細胞を回収して RNA を調製し、RT-PCR によって定量した。*sms1-23* 変異株では野生株に比べて *fzr1* の転写量が 71% に低下していた (図 6B, C、3~4h)。これより、*sms1-23* 変異は *fzr1* 遺伝子の転写活性化を部分的に妨げる変異であることがわかった。またこのことは、*fzr1* 遺伝子の転写が部分的に抑制されることによって *mes1* 変異が抑圧されたことを示している。したがって、*fzr1* 遺伝子の転写制御は減数分裂の終了メカニズムにおいて重要な要素である可能性がある。

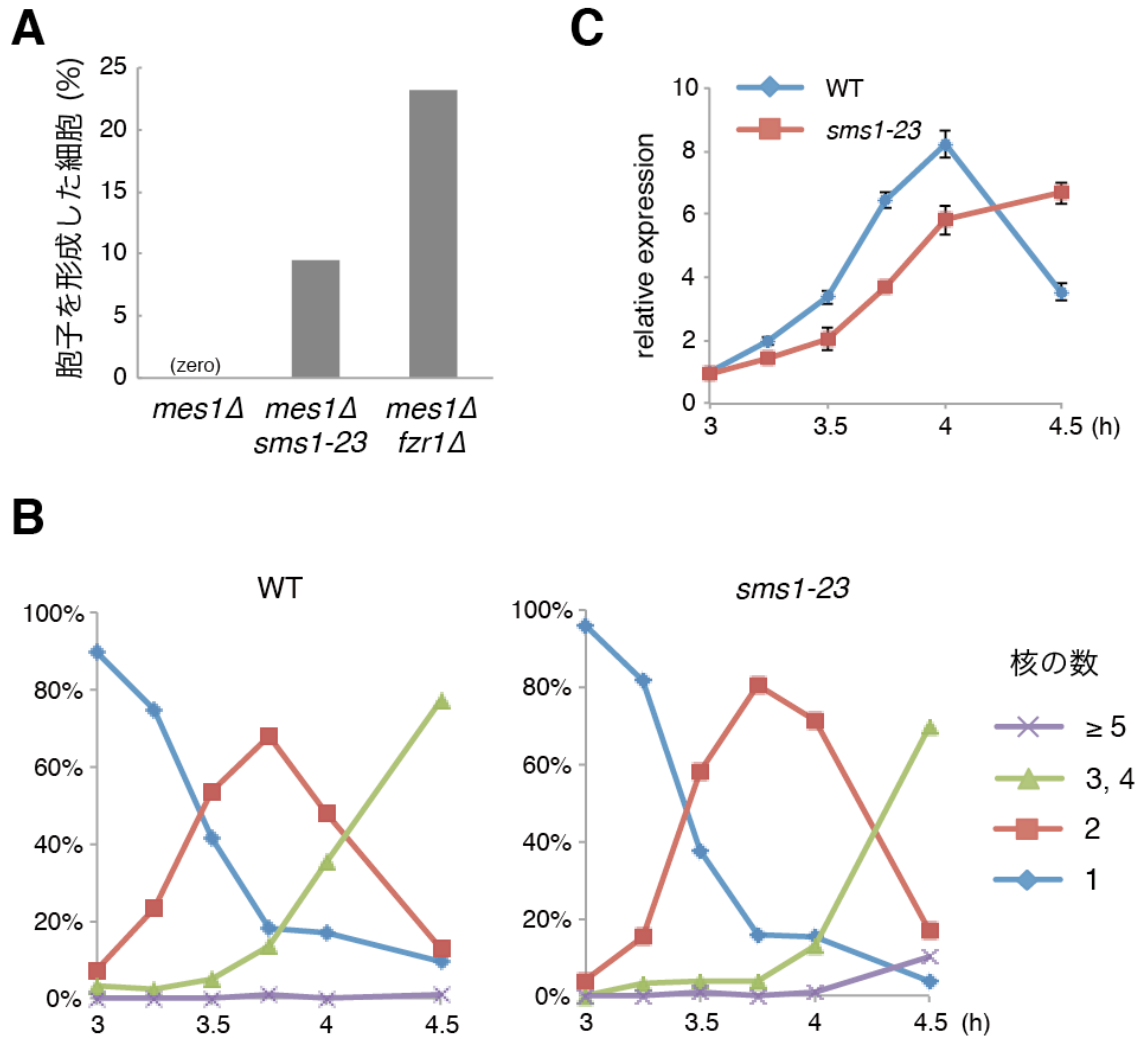


図6 *sms1-23* 変異の性格

(A) *sms1-23* 変異と *fzf1Δ* による *mes1Δ* の抑圧。 *mes1Δ* 株、 *mes1Δ sms1-23* 二重変異株、 *mes1Δ fzf1Δ* 二重破壊株を SPA 上で接合と減数分裂に誘導した。 25°C 24h 培養したのち、胞子を形成した接合子の割合を示す (n > 200 細胞)。 (B) 野生株 (WT) と *sms1-23* 変異株を同調的に培養したときの減数分裂の進行のようす。 *pat1-114* 変異をもちいて細胞を減数分裂に誘導し、各時点において細胞内の核の数を計測した。 (C) 野生株 (WT) と *sms1-23* 変異株において、各時点における *fzf1* mRNA 量を定量 RT-PCR によって測定した。それぞれの *fzf1* mRNA 量は *act1* mRNA 量でノーマライズした。エラーバーは標準偏差を示す (3 反応)。

## 1.6 *mes1* のサプレッサーとしての *sms7* 変異

前述したように、*sms7*Δ株は野生株と同様に減数分裂を経て4つの核を形成した。これより、*sms7* 遺伝子は減数分裂の終了に関与する因子ではなさそうである。*sms7* は新規遺伝子であるので、ここで *mes1* 変異のサプレッサーという観点から *sms7* 遺伝子の特徴付けをおこなった。アミノ酸配列のホモロジー検索の結果、Sms7 タンパク質は出芽酵母 Pac10（プレフォールディングのサブユニット 3）と相同性が高いことが見いだされた。プレフォールディングはチューブリンとアクチンのフォールディングを助けるシャペロンである[38, 39]。出芽酵母 *pac10*Δ株と同様に[39]、*sms7*Δ株は生育が低温感受性（*cs*）であり、微小管脱重合剤（TBZ）に感受性を示した（図 7）。これらの結果から、Sms7 はプレフォールディングのサブユニットとして、チューブリンとアクチンの合成過程に関与する可能性が高い。*sms7*Δ株では未フォールディングな状態のチューブリンが蓄積したために *mes1* 変異を抑圧したのかもしれない。*mes1* 変異はαまたはβチューブリンの過剰発現によって抑圧される（今井博士、私信）という結果は、上記の推測に合致する。

プレフォールディングは、チューブリンとアクチンの新生鎖に結合して、それらを CCT シャペロニンに輸送する[40]。CCT は、未フォールディングのタンパク質を包み込みフォールディングを促進するタンパク質複合体である。出芽酵母において CCT は、APC/C の活性化因子である Cdc20 および Cdh1 と結合し、それらのフォールディングを促進することによって APC/C を活性化する[41]。しかしプレフォールディングは、この Cdc20 のフォールディングの経路には必要ない[41]。したがってプレフォールディングのサブユニットと予想される Sms7 は、APC/C の活性化に直接は関与しないかもしれない。

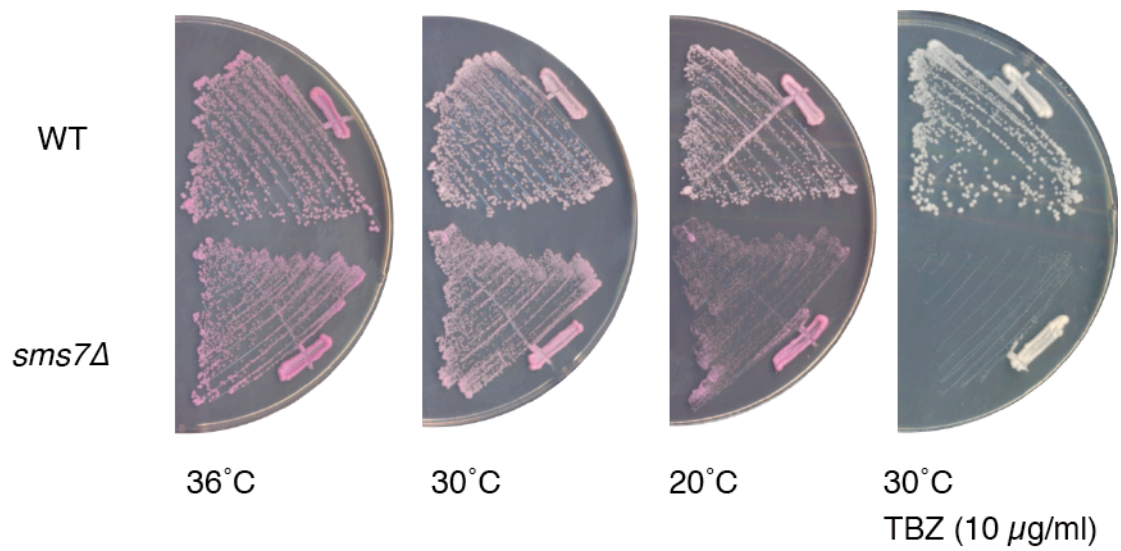


図7 *sms7Δ*株の表現型

*sms7Δ*株の低温感受性とTBZ感受性。野生株(WT)と*sms7Δ*株をYE上で20, 30, 36°Cの各温度のもとで培養した。TBZ感受性を調べるため、TBZ(終濃度10 μg/ml)を加えたYE上で30°Cのもとで培養した。

## 1.7 考察 “減数第三分裂”を生じさせる要因について

*mes1* 変異のサプレッサー変異の原因遺伝子として、*fzr1/sms1*, *sms5*, *sms7* 遺伝子を同定した。*fzr1Δ*株と *sms5Δ*株では、新規の表現型である“減数第三分裂”が観察された。“減数第三分裂”とはどのような現象なのか、また減数第三分裂を防ぐためにどのような機構が存在するのか。ここでは、“減数第三分裂”を誘起しうる、減数分裂特有の細胞周期的な背景について論じる。*fzr1* 遺伝子は APC/C の活性化因子をコードすることから、活性化因子の制御という観点からも考察を加えた。

### “減数第三分裂”はサイクリンの残存によって生じる

減数第三分裂が観察される細胞では、まず減数第二分裂のスピンドル微小管が一度消失し、そののち減数第三分裂のスピンドル微小管が形成する (図 5B,C)。Cdk はスピンドル微小管の形成を促進し、他方で Cdk の基質の脱リン酸化はスピンドル微小管の伸長とそののちの消失に必要である[42]。したがって、減数第二分裂のスピンドル微小管が消失する時点では Cdk 活性は一度低下するが、そののち Cdk 活性下がり切らず、おそらくは少し Cdk 活性が上昇して、減数第三分裂のスピンドル微小管が形成された、と考えることができる。少なくとも、減数第三分裂の形成は Cdk 活性の残存によるといえる。*fzr1Δ*株では減数分裂においてサイクリン Cdc13 が安定化する[22]。この結果は、*fzr1Δ*株において減数第三分裂が起きる要因は Cdc13 の安定化による Cdk 活性の残存であることを示唆する。詳しくは2章で述べるが、*sms5Δ*株でも同様に Cdc13 が残存する。

### 分裂期を連続させるポテンシャル

減数第三分裂が観察されたことは、他方では、減数分裂は分裂期を連続させるポテン

シャルをもつことを示している。無論、3 回目の分裂期は不完全である。多くのスピンドル微小管は単極性 (mono-polar) であり、Sfi1-mCherry (SPB) は多くの核で 1 点に観察され、またそれぞれの核の倍数性は双極に染色体を分離するのに不十分であった (図 5B,C)。しかし正常な分裂装置は形成されないにせよ、分裂期が 3 回連続して起きることは確かである。

分裂期を連続させるポテンシャルという表現はいささか曖昧であるが、このポテンシャルを生み出しているもっとも中心となる分子実態は、サイクリンの合成と APC/C によるサイクリンの分解を介した、Cdk 活性の振動だろう。そしてこのポテンシャルを Fzr1 と Mes1 が調節することによって、分裂期の連続回数は 2 回に限定されると私は考える (図 8)。すなわち、Fzr1 はポテンシャルを下げる (Cdk の振動を止める) ために

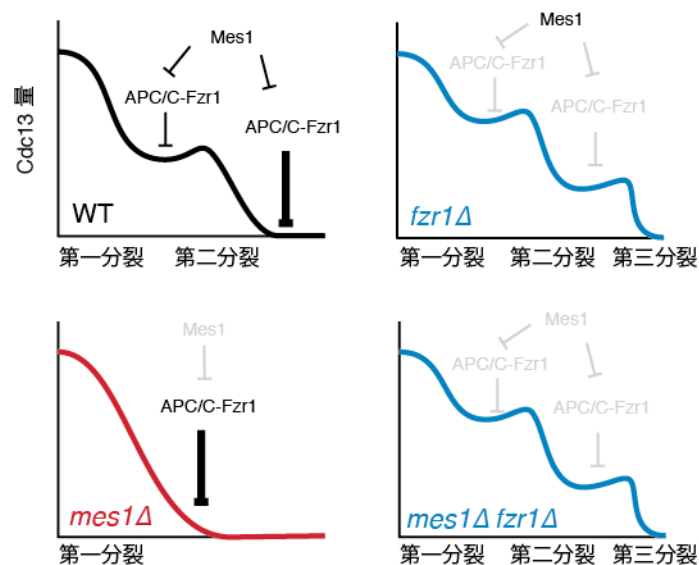


図 8 分裂期を連続させるポテンシャルの制御モデル

分裂期を連続させるポテンシャル (Cdc13 の振動) を Mes1, APC/C-Fzr1 制御するモデル。このモデルは、野生株(WT), *mes1Δ*, *fzf1Δ*, *mes1Δ fzf1Δ* 株でみられる分裂期の連続する回数の違いを、ポテンシャルの制御の観点から説明する。

APC/C を活性化し、Mes1 はポテンシャルを維持する（Cdk の振動を継続する）ために APC/C-Fzr1 を阻害する。実際、*fzr1Δ mes1Δ* 二重破壊株では、細胞は減数第一分裂のち減数第二分裂[24]と減数第三分裂（data not shown）が起きる。この結果は、Fzr1 と Mes1 はポテンシャルを構成する因子ではなく、ポテンシャルを外部から調節する因子であることを示唆している。また、Sms5 もこのポテンシャルの調節因子であるかもしれない。

*mes1*, *fzr1*, *sms5* 遺伝子はどれも増殖期の細胞には必要ない。しかし *mes1* 遺伝子は減数第二分裂の開始に必要であり、*sms5* と *fzr1* 遺伝子は減数第二分裂の終了に必要であるというように、それら 3 つの遺伝子は減数分裂の細胞に特異的に必要である。*sms5*, *fzr1*, *mes1* 遺伝子などで構成される、減数分裂にのみ機能する細胞周期の制御機構が存在するはずである。減数分裂では、そのような減数分裂に特有の機構が分裂期を連続させるポテンシャルを調節することによって、分裂期の連続する回数を「2 回」に限定するのだろう。

## 5 つの APC/C 活性化因子と減数分裂の終了の関係性について

さて、分裂酵母は 5 つの APC/C の活性化因子（Slp1, Ste9, Fzr1, Fzr2, Fzr3）をもつが、減数分裂におけるそれぞれの活性化因子の使い分けについては不明な点が多い。ここでは、それぞれの活性化因子の欠損は *mes1Δ* を抑圧するか、減数分裂の終了に異常を生じさせるか、という点について実験結果をまとめ、各活性化因子と減数分裂の終了の関係について議論したい。

序論で述べたように、APC/C の活性化因子には大きくわけて Cdc20 と Cdh1 のふたつのグループがある。分裂酵母 Slp1 は Cdc20 のホモログであり、分裂酵母のもつ APC/C

活性化因子のなかで唯一生育に必須である。*slp1* 変異(*ts*)は *mes1Δ*を抑圧するだろうか。このことに関して、次のように 2 つの相矛盾した結果が報告されている。すなわち、*slp1-362* 変異は *mes1Δ*を抑圧するが[20]、別の変異である *slp1-NF410* は *mes1Δ*を抑圧しない[24]。両者の変異の性格を直接比較した報告はないが、前者の実験は非制限温度下の 25°Cでおこなわれたのに対し、後者の実験は制限温度の 34°Cでおこなわれた。また、前者の *slp1-362* 変異はナンセンス変異であり、非制限温度下では野生型のリードスルー産物が生成される可能性が指摘されているが[20]、後者の *slp1-NF410* 変異はミスセンス変異体であり、細胞は制限温度下において分裂中期で停止する[24]。これらを考慮すると、*mes1Δ*の抑圧についての結果の相違は、Slp1 の機能低下の度合いによるものと予想できる。したがって *slp1* 変異は、軽度の欠陥を示す場合は *mes1Δ*を抑圧するが、重度の欠陥を示す場合は *mes1Δ*を抑圧しないといえる。Slp1 は染色体分離におけるセキュリンの分解に必要と考えられる[17, 43]。したがって重度の欠陥を示す場合は、染色体の分離に異常が生じたことが影響して、*mes1Δ*を抑圧しなくなった可能性がある。*slp1-362* および *slp1-NF410* の単独変異株は、どちらも減数第一分裂は起きるが減数第二分裂を開始することができない[20, 24]。この原因も、減数第一分裂において染色体分離に異常が生じたためかもしれない。Slp1 が減数第二分裂の終了に関与するか調べるためには、たとえば、セキュリンの分解を人工的に誘導できる実験系を構築するなどにより、*slp1* 変異が染色体分離以外の現象に異常を生じさせるか検討する必要がある。

いっぽう、Ste9, Fzr1, Fzr2, Fzr3 は Cdh1 ホモログである。このうち *fzr1*, *fzr2*, *fzr3* は減数分裂期に特異的に発現する遺伝子である[23]。前述のように *fzr1Δ*は *mes1Δ*を抑圧し、*fzr1Δ*株は多核の表現形を示す。これに対し、残りの 3 つの活性化因子をそれぞれ減数分裂において欠損させた場合は、*mes1Δ*は抑圧されず、また多核の表現形はみられない

(data not shown、宮本氏私信)。これらの結果は、*ste9, fzf1, fzf2, fzf3* の4つの遺伝子のうち、*fzf1* 遺伝子が減数分裂の終了にもっとも密接に関与することを示唆する。

さて、以上の議論を Mes1 による APC/C の阻害という観点からとらえなおしてみたい。Mes1 は APC/C の活性化因子に結合して、本来の基質であるサイクリン Cdc13 との結合を阻害する[20]。上述のように、*fzf1Δ* は *mes1Δ* を抑圧するのに対し、*ste9, fzf2, fzf3* の欠損は *mes1Δ* を抑圧しなかった。この結果は、Cdh1 ホモログのなかで Fzf1 が Mes1 の重要な阻害ターゲットであることを示唆する。

Fzf1 が Mes1 の重要なターゲットであるならば、減数第二分裂が終了する時点では、Fzf1 が Mes1 の阻害から開放されることが必要である。この点の重要性は Kimata らも指摘しているが[24]、これまでのところ、その詳細な仕組みは不明である。したがって、減数分裂の終了メカニズムを理解するうえでは、Fzf1 をいかに Mes1 から開放させるかという点を明らかにすることが、重要な課題のひとつである。

## 2 章 Sms5 は減数分裂を終了させるために *fzr1* 遺伝子の転写を促進する

1 章では、*mes1* 変異のサプレッサー変異の原因遺伝子として *sms5* と *fzr1* 遺伝子を設定し、*sms5*Δ株と *fzr1*Δ株の表現型について述べた。*sms5*Δ株および *fzr1*Δ株では、減数第二分裂のあとに分裂装置が再形成され、過剰な核分裂が生じた。この“減数第三分裂”が起きると、配偶子に染色体を正しく分配することができなくなり、その結果として生存可能な配偶子の形成を妨げる。したがって減数分裂を正常に終了するためには、“減数第三分裂”を阻止することが必要である。*sms5* および *fzr1* 遺伝子は“減数第三分裂”を防ぐためにどのような役割を果たすのだろうか。本章では、まず新規遺伝子 *sms5* の機能を推定し、つぎに *fzr1* 遺伝子との機能の関係を調べることによって、減数分裂の終了メカニズムにおける *sms5* および *fzr1* 遺伝子の役割について考察した。

### 2.1 Sms5 は N 末端に DNA 結合ドメインをもつ

*sms5* 遺伝子は、2 箇所のスプライシングを経て 177 残基のアミノ酸から成る約 20kDa のタンパク質をコードすると予想された（分裂酵母の総合データベース PomBase <http://www.pombase.org/> より）。Sms5 タンパク質のアミノ酸配列を分裂酵母ゲノムに対してホモロジー検索したところ、転写因子 Cuf1 と相同性を示した（図 9）。Cuf1 の N 末端 40 残基は、Zn(II)イオンを配位した DNA 結合ドメインを構成している。この“Zn ドメイン”は、酵母の銅イオンに応答する copper-fist 転写因子の間で高度に保存されている[44]（図 9）。Sms5 と Cuf1 それぞれの N 末端 60 残基は、相同性がとくに高い領域であった。この結果は、Sms5 が Cuf1 の DNA 結合ドメインに類似した構造をもつこと

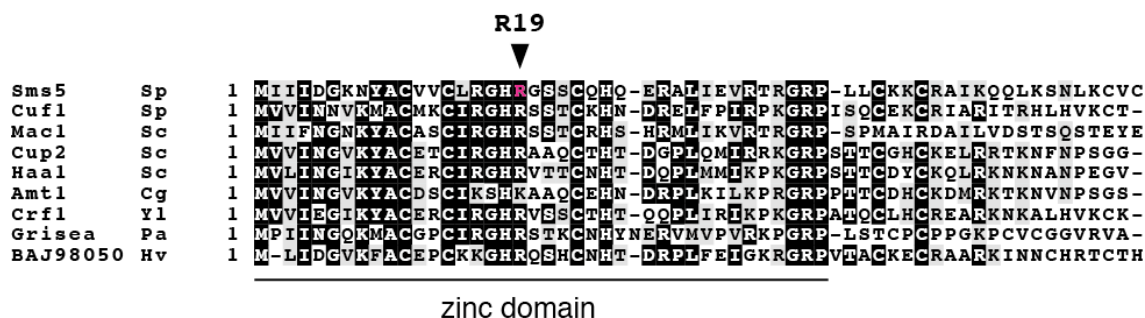


図9 Sms5 と copper-fist 転写因子ホモログの配列比較

Sms5 と copper-fist 転写因子ホモログのマルティプルアライメント。各タンパク質の N 末端 60 残基を Clustal X ソフトウェアをもちいてアライメントをおこなった。同一の残基を黒で、同種の残基を灰色で強調している。sms5-1 変異の生じた 19 番目のアルギニン残基を赤字で示す。N 末端 40 残基は Zn ドメインであり、Zn(II)イオンが配位して DNA と相互作用する構造をとる。[45]。Zn ドメインは酵母の間で保存されるが[44]、植物（オオムギ *Hordeum vulgare*）でも報告がある[46]。Sp, *Schizosaccharomyces pombe*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Cg, *Candida Glabrata*; Yl, *Yarrowia lipolytica*; Pa, *Podospora anserina*; Hv, *Hordeum vulgare*。

を示唆した。

## 2.2 Sms5-GFP はクロマチンに局在した

Sms5 が DNA 結合能をもつならば、Sms5 は核内に局在するはずである。これを確かめるため、Sms5 の C 末端に GFP を融合させた Sms5-GFP タンパク質を sms5 プロモーターの制御下で発現する株を作製した。この株を減数分裂に誘導し、Sms5-GFP の細胞内の挙動をライブ観察した（図 10A,B）。Sms5-GFP は減数第一分裂より前の細胞では発現しなかったが（図 10A、0 分）、減数第一分裂から核内で観察されはじめ（30 分）、徐々に GFP シグナルが強くなり、減数第二分裂でシグナルがピークを迎えた（120 分）。減数第二分裂のスピンデル微小管が伸長する際、Sms5-GFP は紡錘体の両極から引っ張られる核内構造体に局在した（図 10B、25 分）。この構造体は染色体であると考えられる。これらの観察結果より、Sms5 は減数第一分裂から減数第二分裂にかけて発現するクロマチン結合タンパク質であることが示唆された。

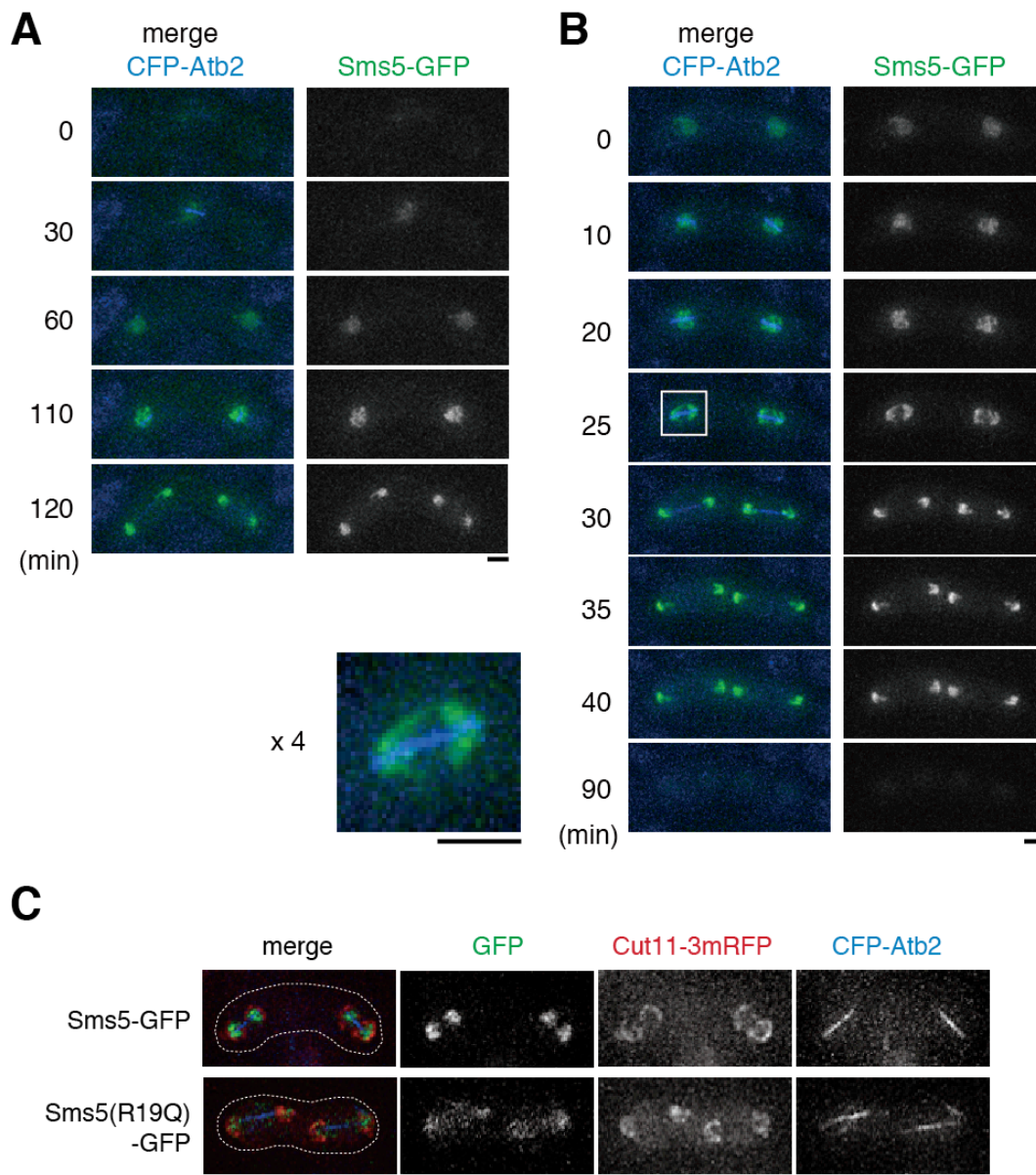


図 10 Sms5-GFP は減数分裂期のクロマチンに局在化した

(A-B) Sms5-GFP (緑) と CFP-Atb2 (微小管; 青) を発現する野生株の細胞を接合と減数分裂に誘導して、ライブ観察をおこなった。(A) Sms5-GFP は減数第一分裂から検出されはじめ、減数第二分裂でシグナルは最大となった。減数分裂を通して Sms5-GFP は核内に局在した。(B) 減数第二分裂における Sms5-GFP の局在。微小管が伸長するとき、Sms5-GFP は染色体様の構造体に局在化した。左下図は白枠で囲った核の拡大図 (4 倍)。減数第二分裂が終了したのち、Sms5-GFP のシグナルは消失した。スケールバーは 2 $\mu$ m。

(C) Sms5(R19Q)-GFP は細胞質に拡散した。Sms5-GFP または Sms5(R19Q)-GFP を発現する細胞を減数分裂に誘導した。減数第二分裂をおこなう細胞のライブセルイメージを示す。細胞は Cut11-3mRFP (核膜; 赤)、CFP-Atb2 (微小管; 青) を同時に発現する。Sms5-GFP は Cut11-3mRFP で囲まれた領域 (核内) に局在するのに対し、Sms5(R19Q)-GFP は細胞質に拡散した。スケールバーは 2 $\mu$ m。

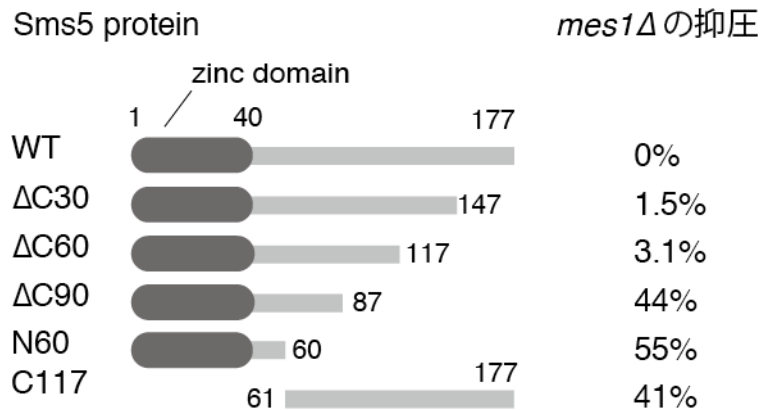


図 11 Sms5 の N 末端は減数分裂を終了させるために必要である

Sms5 の各トランケーション変異体の欠失部位を模式図で示す。野生型 Sms5 あるいは各トランケート型 Sms5 を *mes1Δ* 株で発現させて、*mes1Δ* を抑圧するか調べた。括弧内は孢子形成した細胞の割合を示す。*mes1Δ* を抑圧したトランケーション変異体は減数分裂を終了させる機能が失われたと判断した。

オリジナルの変異である Sms5 タンパク質の R19Q 変異 (1 章を参照) は Zn ドメイン内に存在する (図 9)。そこで Sms5(R19Q) 変異体が DNA 結合能に異常が生じている可能性を検討した。Sms5(R19Q) の C 末端に GFP を融合した Sms5(R19Q)-GFP を細胞に発現させ、その挙動を観察したところ、Sms5(R19Q)-GFP は減数第二分裂期に細胞質へ拡散した (図 10C)。これより、Sms5(R19Q) 変異体は DNA 結合能を失っていると推測できる。Sms5(R19Q)-GFP が核内にとどまらずに、細胞質へ拡散した理由として、以下のことが考えられる。分裂酵母の減数第二分裂の後期 (スピンドル微小管が伸長し染色体が分離する時期) においては、核内タンパク質のうち、クロマチン等の核内構造に強く結合するタンパク質はそのまま核内に残るが、その他の核内タンパク質は細胞質へ拡散する [47, 48]。つまり、Sms5-GFP はクロマチンに結合するため核内に残ったが、Sms5(R19Q)-GFP はクロマチンに結合できずに細胞質に拡散したと推測できる。

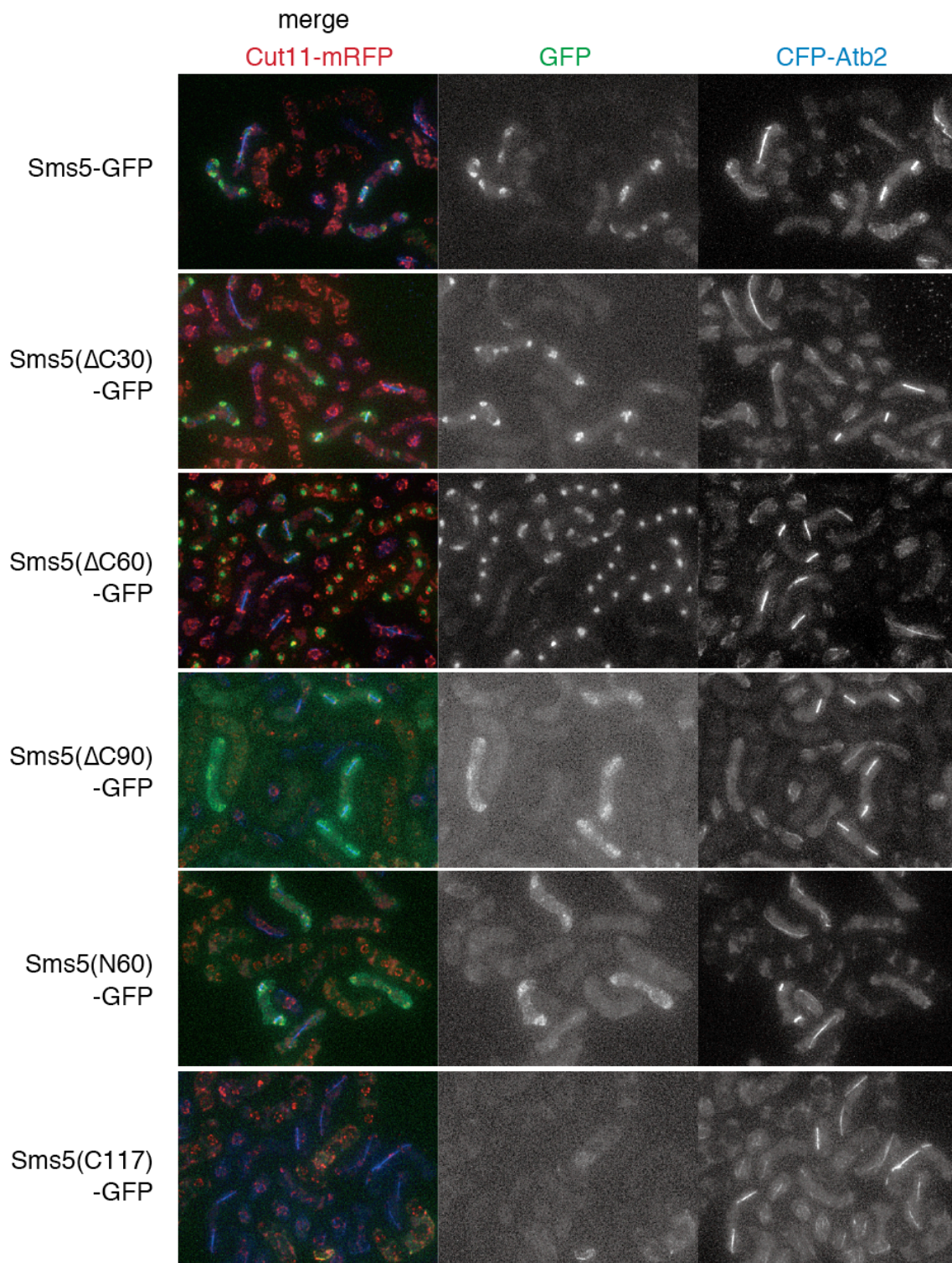


図 12 トランケーション型 Sms5-GFP の細胞内局在

図 11 で示したトランケーション型 Sms5-GFP を発現する細胞を減数分裂に誘導した。減数第二分裂をおこなう細胞のライブセルイメージを示す。細胞は Cut11-3mRFP (核膜; 赤)、CFP-Atb2 (微小管; 青) を同時に発現する。スケールバーは 5 $\mu$ m。

### 2.3 Sms5 の機能には N 末端側 117 残基が必要かつ十分である

Sms5 の機能に必要な領域を絞り込む目的で、5 種類のトランケーション変異体を発現する株を作製した (図 11)。sms5 遺伝子のトランケーションは、それぞれ C 末端に GFP が融合したタンパク質を発現するように設計し、ゲノム上の野生型 sms5 遺伝子と置き換えてある。それぞれの変異体が機能をもつかどうかは、次のように *mes1Δ* の抑圧という観点から評価した。N 末端 60 残基 (Zn ドメインを含む) を削った C117 変異は *mes1Δ* を抑圧し、機能をもたないことが分かり、したがって Zn ドメインが Sms5 の機能に必要であることが示唆された (図 11)。これに対して、C 末端 60 残基を削っても機能を失わなかったことから、この領域は機能に必要ないと推測できる (図 11)。トランケーションの結果から、Sms5 の機能に必要な十分な領域は、Zn ドメインをふくむ N 末端 117 残基に絞りこまれた。

トランケーション型 Sms5-GFP の局在の観察は、*mes1<sup>+</sup>* のバックグラウンドでおこなった。減数第一分裂や減数第二分裂をおこなう生細胞を蛍光顕微鏡で観察した (図 12)。図 11 の結果より機能をもつことが示唆された Sms5(ΔC30)-GFP と Sms5(ΔC60)-GFP は、核内に強く局在し、細胞質への拡散はみられなかった (図 12)。いっぽう、さらに C 末端側を削った変異体で、機能を失ったと推測された Sms5(ΔC90)-GFP および Sms5(ΔC90)-GFP は、細胞質へ拡散した (図 12)。これより、C 末端を 90 残基以上削った場合も、DNA 結合能が失われると推測できる。このことは Sms5(R19Q)-GFP が細胞質へ拡散したという結果 (図 10C) に合致する。また、N 末端側の Zn ドメインを削り DNA 結合能を失ったと予想される Sms5(C117)-GFP は、GFP シグナルが微弱であった (図 12)。この変異体は、DNA 結合能を失ったというよりは、タンパク質自体が不安定であったために、機能を失ったと考えられる。以上のトランケーション型 Sms5-GFP

の結果において、DNA 結合能と Sms5 の機能はもれなく対応していたことから、Sms5 の機能には DNA 結合能が必須であることが強く示唆された。

## 2.4 考察 Sms5 は転写因子である

Sms5 は N 末端に Zn ドメインをもつ。Zn ドメインは copper-fist 転写因子に保存された DNA 結合ドメインである。また Sms5 は、減数第一分裂から減数第二分裂にかけてクロマチンに局在すると考えられた。トランケーション変異体の解析の結果は、Zn ドメインは Sms5 の機能とクロマチン局在に必要であることを示した。これらより、Sms5 は減数分裂期に働く転写因子であると示唆される。

スクリーニングにより単離された *sms5-1* 変異株は、Zn ドメイン内に R19Q 変異をもつ。Sms5(R19Q)変異体は機能を失い、またクロマチンへの局在がみられなかった。この結果は、Zn ドメインが Sms5 の機能とクロマチン局在に必要であるという結果と合致する。19 番目のアルギニン残基は Zn ドメインの DNA 結合能に必要であると示唆される。R19Q 変異は Sms5 の構造にどのような影響を与えるのだろうか。Sms5 の 19 番目のアルギニン残基は、Zn ドメインをもつホモログ間で保存された塩基性残基の一つである (図 9)。この残基は、Zn ドメインで形作られた拳状の構造から外に向かって突き出した 3 つの塩基性残基 (16,18,19) のうちの 1 つである[45]。これらの塩基性残基は DNA 二重らせんのマイナーグループと相互作用する可能性が指摘されている[45]。塩基性のアルギニン残基 (R) が非電荷のグルタミン残基 (Q) に置き換わったことによって、R19Q 変異をもつ Zn ドメインはその DNA 結合能を失ったと推測できる。

さて、Sms5 が転写因子であるならば、Sms は下流の遺伝子の発現を制御することによって減数分裂の終了に貢献するのだろう。したがって Sms5 の機能をより詳細に解析

するためには、Sms5 のターゲット遺伝子を明らかにする必要がある。そこで本研究ではつぎに、Sms5 によって転写調節を受ける遺伝子の探索をおこなった。

## 2.5 Sms5 のターゲット遺伝子を解析するための減数分裂の同調系の設定

分裂酵母の減数分裂における遺伝子発現プロファイルは、減数分裂が進行するに従って大きく変動する[49]。したがって、減数分裂期の転写量を比較する場合は、減数分裂の進行を高い精度で同調させた細胞培養が必要となる。そこで本研究では、*pat1-114* 株をもちいた減数分裂の同調系[50, 51]を採用した（詳細は「材料と方法」を参照）。この株は減数分裂の開始を抑制する Pat1 キナーゼの *ts* 変異株である。Pat1 キナーゼを温度上昇により不活性化させることによって、同調的に減数分裂を導入することができる。

まず、*pat1-114* 変異を導入した野生株と *sms5Δ* 株において、減数分裂が進行するようすを調べた。細胞内の核の数を 15 分ごとに計測したところ、2 核および 4 核の細胞の比率は両者の株で明らかな差は見られなかった（図 13A）。つまり野生株と *sms5Δ* 株では、減数分裂は同じ速さで推移した。しかし *sms5Δ* 株では、減数第二分裂が終了した頃から過剰に断片化した核をもつ細胞が現れ始めた（図 13A）。すなわち、*sms5Δ* 株における過剰な核分裂という表現型が、*pat1-114* 変異を導入した状況でも観察された。5 つ以上の核は減数第二分裂のあとから生じ始めたが、この観察結果は、“減数第三分裂”によって過剰に核が分裂するという結果（図 5B）と合致する。

## 2.6 Sms5 は *fzr1* 遺伝子の転写に必要である

さて、減数分裂を同調させた野生型と *sms5Δ* 株から RNA を抽出し、RT-PCR によっ

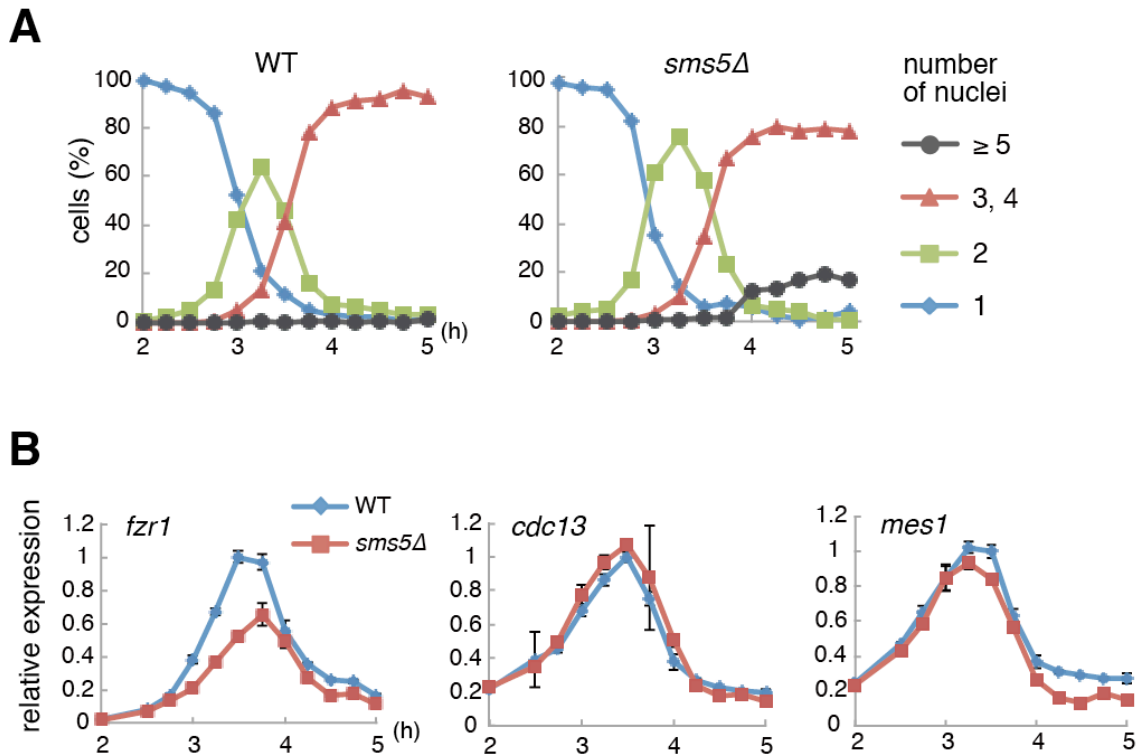


図 13 Sms5 は *fzr1* 遺伝子の転写に必要である

(A) 野生株 (WT) と *sms5Δ* 株を同調的に培養したときの減数分裂の進行の様子。 *pat1-114* 変異をもちいて細胞を減数分裂に誘導し、各時点において細胞内の核の数を計測した。(B) 野生株 (WT) と *sms5Δ* 株において、各時点における *fzr1*, *cdc13*, *mes1* mRNA 量を定量 RT-PCR によって測定した。エラーバーは標準偏差を示す (3 反応)。

て mRNA 量を解析した。まず、*sms5* と同経路で機能することが示唆された *fzr1* の mRNA 量を比較した。*sms5Δ* 株における *fzr1* mRNA は、野生型に比べ 54% に低下していた (図 13B)。この低下はとくに、減数第一分裂から減数第二分裂にかけて顕著にみられた。

他方で、*cdc13* と *mes1* mRNA 量を比較したところ、野生株と *sms5Δ* 株の間で大きな差は見られなかった (図 13B)。APC/C のコアサブユニットをコードする他の遺伝子群についても検討したが、やはり有意な差はみられなかった (data not shown)。これより、Sms5 は *fzr1* の転写活性化に作用することが示唆された。

## 2.7 Sms5-5FLAG は *fzr1* 遺伝子のプロモーター領域に結合した

つぎに、Sms5 が *fzr1* 遺伝子の転写を直接制御する可能性を検討した。Sms5 が *fzr1* 遺伝子のプロモーター領域に結合するか調べるために、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 解析をおこなった。Sms5 の C 末端に 5 つの Flag エピトープをタグ付けした Sms5-5FLAG を発現する株を、減数分裂に同調的に誘導した。減数第一分裂から減数第二分裂に移行する時期の細胞を回収し、解析にもちいた。Sms5-5FLAG は *fzr1* 遺伝子のプロモーター領域と効率的に共沈した (図 14)。しかし、*cdc13* と *mes1* 遺伝子のプロモーター領域では、そのような共沈はみられなかった (図 14)。これらの結果は、Sms5 が *fzr1* 遺伝子の転写を特異的に促進するという結果に合致した。

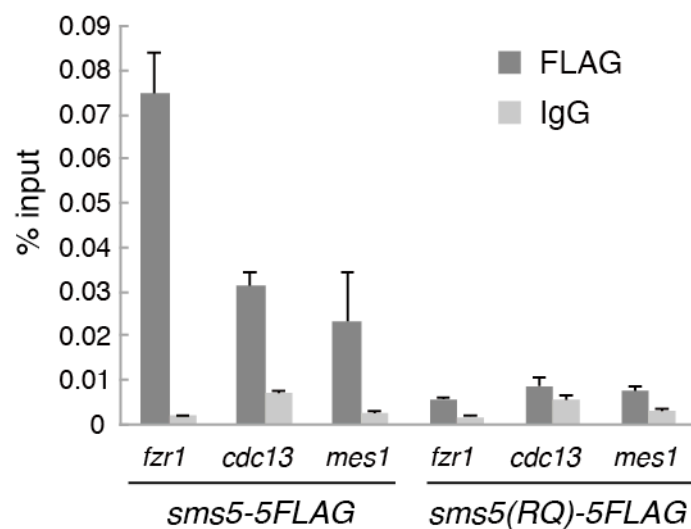


図 14 Sms5-5FLAG は *fzr1* 遺伝子のプロモーター領域に結合する  
クロマチン免疫沈降アッセイの結果を示す。減数第一分裂から減数第二分裂へ移行する時期の細胞から Sms5-5FLAG または Sms5(R19Q)-5FLAG を、抗 FLAG 抗体をもちいて免疫沈降した。それぞれのタンパク質と共沈した DNA 断片 (*fzr1*, *cdc13*, *mes1* 遺伝子のプロモーター) の量を定量 PCR によって計測した。エラーバーは標準偏差を示す (3 反応)。

同様の解析を、R19Q 変異を導入した Sms5(R19Q)-5FLAG についておこなった。R19Q 変異は Sms5 のクロマチンへの結合能を消失させると推測されていた (2 章)。ChIP 解析の結果、Sms5(R19Q)-5FLAG はたしかに、*fzr1* 遺伝子のプロモーターと共沈しなかった (図 14)。この結果は、Sms5 が *fzr1* 遺伝子のプロモーターに結合し、直接的に転写を活性化することを強く示唆した。

ここで検出に用いた *fzr1* プロモーター断片は、*fzr1* 遺伝子のおよそ 400 bp 上流に位置する。*sms1-23* 変異 (1 章, 表 3) は *fzr1* 遺伝子の 106 bp 上流である。したがって、Sms5 の結合サイトは *sms1* 変異の場所よりもおよそ 300 bp 上流であると推測する。またこのことは、*sms1* 変異による *fzr1* の転写量の低下は、Sms5 の機能低下とは独立の事象であることを示唆する。

## 2.8 *sms5Δ*による *mes1Δ*の抑圧は *fzr1*<sup>+</sup>の過剰発現により打ち消された

これまでの結果から、*fzr1* 遺伝子は転写因子 Sms5 のターゲット遺伝子であると推測された。*sms5Δ*は *mes1Δ*を抑圧するが、この抑圧は、*fzr1* mRNA が低下することによって起きた可能性がある。これを確かめるため、*sms5Δ mes1Δ* 二重破壊株に、*fzr1* を過剰発現させるプラスミドを導入した。*fzr1* の過剰発現は、*sms5Δ*による *mes1Δ*の抑圧能を打ち消し、2 核で停止する細胞を高い割合で生み出した (図 15)。これより、*fzr1* が Sms5 の重要なターゲット遺伝子の 1 つであることが示唆された。

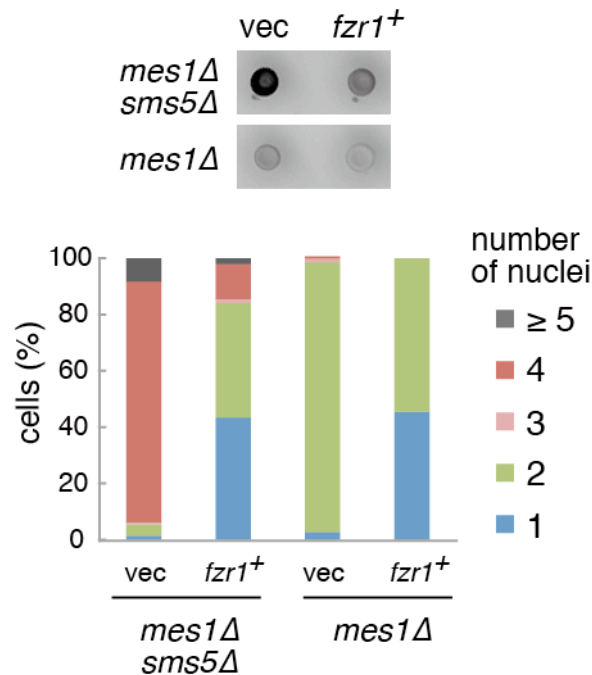


図 15 *fzf1<sup>+</sup>*の過剰発現は *sms5Δ*による *mes1Δ*の抑圧を打ち消す  
*fzf1<sup>+</sup>*を過剰発現する *mes1Δ*株あるいは *mes1Δ sms5Δ* 二重破壊株の細胞と、ベクターのみを持つコントロール細胞を SPA 上で接合と減数分裂に誘導し、25°C, 24h 培養した。(上段) コロニーをヨウ素蒸気で染めた。胞子形成した (*mes1Δ*を抑制した) 細胞を含むコロニーはヨウ素蒸気で黒色に染まる。(下段) 各接合体に形成された核の数を計測した (n > 200 細胞)。

*sms5Δ*株は多核の表現型を示す (図 4)。この減数分裂の終了における欠陥は、*fzf1* を過剰発現することによって回復するか検討した。*sms5Δ*株に *fzf1* 遺伝子を過剰発現させるプラスミドを導入したところ、多核の表現型は回復しなかった (data not shown)。その原因として *fzf1* 遺伝子の発現量や発現時期が多核を回復するのに不適切であったことが考えられるが、他方でこの結果は Sms5 の重要なターゲット遺伝子が *fzf1* の他にも存在する可能性を否定しない。

減数分裂の終了という観点から、*sms5*のターゲット遺伝子を網羅的に探索するため、以下のスクリーニングをおこなった。前述のように、*sms5Δ mes1Δ*二重破壊株の細胞に *fzf1* 遺伝子を過剰発現させることによって、*sms5Δ*による *mes1Δ*の抑圧が打ち消され胞

子形成が阻害される。このように *sms5Δ mes1Δ* 株における胞子形成の阻害を指標とすれば、Sms5 の重要なターゲット遺伝子が単離できる可能性がある。そこで *sms5Δ mes1Δ* 株の細胞にプラスミド化した遺伝子ライブラリを導入し、胞子形成能を阻害するものを探索した。形質転換した 1 万 3 千以上のコロニーを解析したが、これまでのところ *sms5* 遺伝子が単離されたほかは、*fzr1* を含め減数分裂の終了に関与する遺伝子の単離には至っていない。

## 2.9 *sms5Δ* 株では Fzr1 の発現量が減少しサイクリン Cdc13 が安定化した

さて、*sms5Δ* 株では *fzr1* mRNA の発現量が減少したため (図 13B)、つぎに Fzr1 タンパク質の発現量を解析した。野生株と *sms5Δ* 株の細胞をそれぞれ減数分裂へ同調的に誘導し、その細胞から抽出液を得た。細胞抽出液を SDS-PAGE によって分離し、ウェストンブロッティングによってそれぞれのタンパク質を定量的に解析した。

野生株では、Fzr1 の発現は減数第一分裂から減数第二分裂にかけて上昇した (図 16A, 3.5 ~ 4.25h)。これに対し *sms5Δ* 株では、Fzr1 の発現が開始するタイミングが遅れた (図 16B, 4.0h)。また、減数分裂をとおして Fzr1 の発現量は少なかった (図 16B)。これらの結果は、*sms5Δ* 株で *fzr1* mRNA 量が低下するという結果に合致する。

つづいて APC/C-Fzr1 の基質であるサイクリン Cdc13 の発現量を解析した。野生株において、Cdc13 は減数第一分裂から第二分裂にかけて減少し (図 16A, 3.0 ~ 4.0h)、減数第二分裂の終了とともに消失した (4.25h)。この消失のタイミングは、Fzr1 の発現量が増加する時期に一致した (4.25h)。これに対し *sms5Δ* 株では、減数第二分裂が終了したあとも、Cdc13 は安定化した (図 16B, 4.5 ~ 4.75h)。この Cdc13 が残存する時期は、5 つ以上の核をもつ細胞の割合が増加する時期に対応する。最終的には、*sms5Δ* 株でも

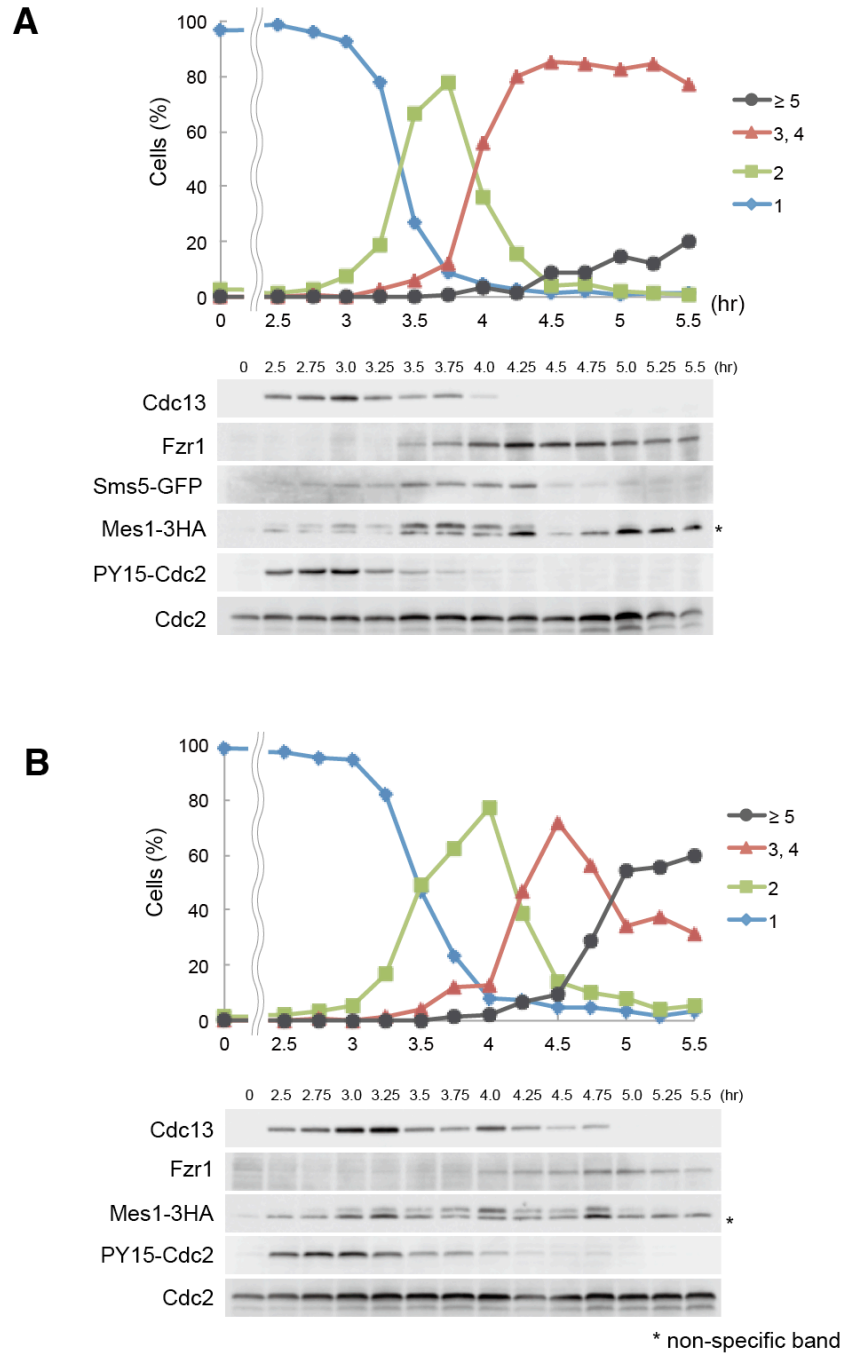


図 16 Sms5 は減数分裂の終了時点でのサイクリン Cdc13 のタイムリーな分解に必要である (A,B) 野生株に比べ *sms5Δ* 株では Cdc13 が安定化した。同調的な減数分裂をおこなう *sms5<sup>+</sup>-GFP* 株 (A) と *sms5Δ* 株 (B) の細胞から経時的に抽出液を調製した。(A,B 上段) *pat1-114* 変異をもちいて細胞を減数分裂に誘導し、各時点において細胞内の核の数を計測した。(A,B 下段) 図に示すタンパク質をウェスタンブロッティングによって検出した。\*は非特異的なバンドを示す。

Cdc13 は消失し、5 つ以上の核をもつ細胞の上昇も止まった (5.0h)。これらの結果は、Cdc13 の安定化が“減数第三分裂”を引き起こすという可能性を示唆した。Cdc2 キナーゼの活性は、Cdc13 のタンパク量に依存するが、他方で Cdc2 の 15 番目のチロシンのリン酸化 (PY15) によっても制御される[52]。この PY15 についても検討したが、野生株と *sms5Δ* 株の間で大きな変化はみられなかった (図 16A,B)。

Sms5 および Mes1 タンパク質を同時に解析するため、ここでもちいた株にはあらかじめ 2 種類のタグ付加をおこなった。すなわち、Sms5 の C 末端には GFP を、Mes1 の C 末端には 3 コピーの HA エピトープを付加し、それらをおのおの固有のプロモーターの制御下で発現させるようにした。Sms5-GFP の発現は、野生株において、減数第一分裂から第二分裂にかけてみられた (図 16A, 3.5 ~ 4.25h)。この結果は、Sms5-GFP の顕微鏡観察による結果 (図 10A) と合致する。また Sms5-GFP が発現する時期は、Fzr1 の発現が上昇する時期に一致した (図 16A, 3.5 ~ 4.25h)。この Sms5-GFP の発現パターンは、*fzr1* の転写を活性化するという結果に矛盾せず、むしろ合理的である。

Mes1-3HA の発現は、すでに報告されているように[20, 24]、野生株では、減数第一分裂から第二分裂にかけてみられた (図 16A, 3.5 ~ 4.25h)。これに対し *sms5Δ* 株では、Mes1-3HA は減数第二分裂が終了したあとも安定化した (図 16B, 4.5 ~ 4.75h)。最終的に Mes1-3HA は消失したが、この時期は Cdc13 が消失する時期に一致した (5.0h)。*sms5Δ* 株でみられた Fzr1 の発現量の低下は、Mes1-3HA の安定化に寄与するだろうか。野生型と *fzr1Δ* 株の間で、Mes1 が消失する時期に変化はみられない[24]。したがって、Fzr1 の低下が直接的に Mes1 の安定化をもたらす可能性は低い。Mes1 は APC/C の基質として分解され[21]、*ste9*, *fzr2*, *fzr3* の各遺伝子の欠損株では Mes1 の消失時期が遅れる[24]。したがって *sms5Δ* 株では、Ste9, Fzr2, Fzr3 を介した Mes1 の分解経路に異常がある可能

性が残されている。

## 2.10 *sms5Δ*株と *fzr1Δ*株では安定化した Cdc13–YFP は減数第三分裂の分裂装置に局在化した

ところで、*sms5Δ*株ではサイクリン Cdc13 が安定化したことが、このことは“減数第三分裂”という過剰な分裂装置の形成に関与するだろうか。これを確かめるため、Cdc13 の C 末端に YFP を融合した Cdc13–YFP を *cdc13* プロモーターから発現させて、その細胞内の挙動を観察した。この細胞では同時に、チューブリンを青で (CFP–Atb2)、核膜を赤で (Cut11–3mRFP)、可視化した。ここで、Cut11–3mRFP は分裂期に核膜のほかに SPB につよく局在化することに留意する。野生株では、Cdc13–YFP は減数第二分裂の中期に SPB につよく局在し、スピンドル微小管および核内にも局在化した (図 17)。減数第二分裂が終了したあと、Cdc13–YFP のシグナルは消失した (図 17)。いっぽう *sms5Δ* 株では、Cdc13–YFP は“減数第三分裂”のスピンドル微小管が観察させる時期に SPB に局在した (図 17)。このとき、Cut11–3mRFP も SPB に局在した (図 17)。同様の結果は、*fzr1Δ*株の観察からも得られた (図 17)。これらの結果から次のような示唆が得られる。すなわち、*sms5Δ*株において安定化した Cdc13 は、SPB に局在化して、分裂装置の再形成を促進し、“減数第三分裂”を引き起こす。

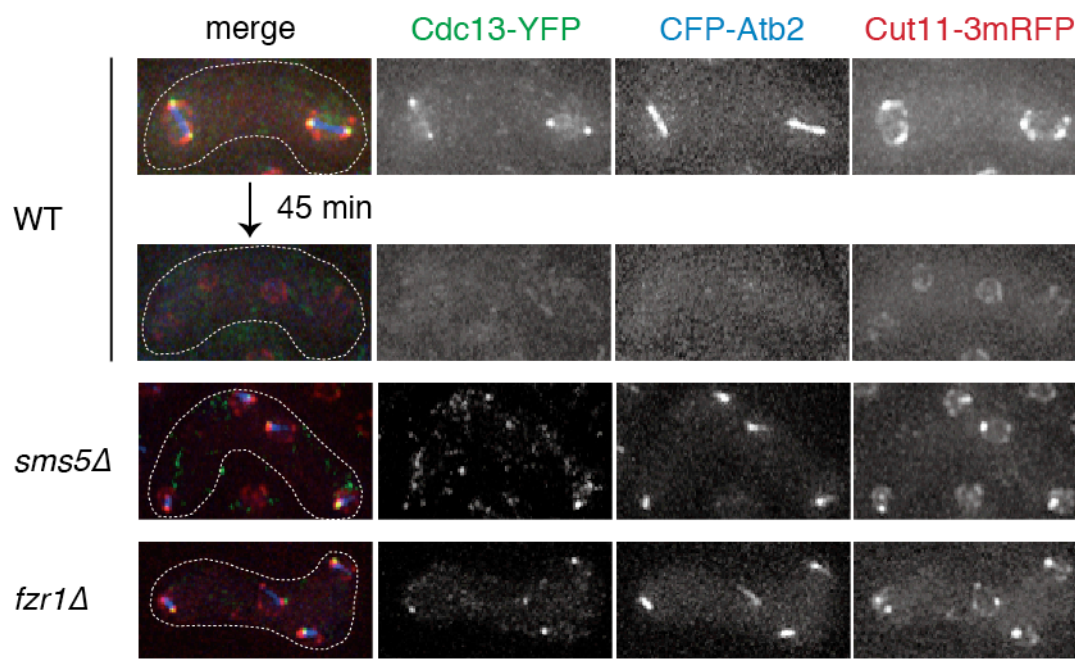


図 17 減数第三分裂における Cdc13-YFP の SPB 局在

減数第二分裂をおこなう野生株 (WT) と、減数第三分裂をおこなう *sms5Δ* 株および *fzf1Δ* 株のライブセルイメージを示す。細胞は Cdc13-YFP (サイクリン; 緑)、Cut11-3mRFP (核膜; 赤)、CFP-Atb2 (微小管; 青) を発現する。減数第三分裂をおこなう細胞では Cdc13-YFP は SPB に局在化した。Cut11-3mRFP は分裂期に、核膜に加えて SPB に局在することが知られている[53]。Cut11-3mRFP は、減数第三分裂のスピンデル微小管を形成する SPB に濃縮した。スケールバーは 2 $\mu$ m。

## 2.11 考察 減数分裂を終了するための Sms5 および Fzr1 の役割について

### 分裂期を「2回」に限定する仕組み

Sms5 は *fzr1* の転写の適切なタイミングでの活性化に必要であり (図 13)、また Sms5 は *fzr1* 遺伝子のプロモーターに結合した (図 14)。これらの結果は、Sms5 が *fzr1* 遺伝子の発現を直接的に活性化する転写因子であることを示唆した。*sms5Δ*株では、Fzr1 の発現量の低下にともない、Cdc13 の安定化がみられた (図 16)。この安定化した Cdc13 は SPB に局在化した (図 17)。これらの結果は、Cdc13 の安定化は減数第三分裂におけるスピンドル微小管の形成に寄与することを示唆した。以上をまとめると、Sms5 は *fzr1* 遺伝子の転写活性化を介して Cdc13 の分解を促進し、それにより減数分裂が終了する、と考えられる。

ここで明らかになった Sms5 の機能をもとに、本研究では減数分裂を終了させるための APC/C の制御モデルを提唱した (図 18)。このモデルは、序論で述べた APC/C の制御モデル (図 2) に、「APC/C の再活性化」を担う分子機構を加えたものである。このモデルは、減数分裂を「2 回目」の分裂期で終了させるためにどのようにサイクリン Cdc13 を分解するか、すなわちどのように Cdk を不活性化するか、その仕組みを説明する。このモデルの基盤となる考えは次の 3 つである。

- (1) APC/C-Fzr1 はサイクリン Cdc13 の分解を完了させる (減数分裂の終了)
- (2) Mes1 は APC/C-Fzr1 を阻害する (減数分裂の終了の阻害)
- (3) Sms5 による Fzr1 の発現上昇は Mes1 による阻害に打ち勝つ (減数分裂の終了の実行)

これらについて順を追って説明したい。(1) の主張は、*fzr1Δ*株でサイクリンが減数第

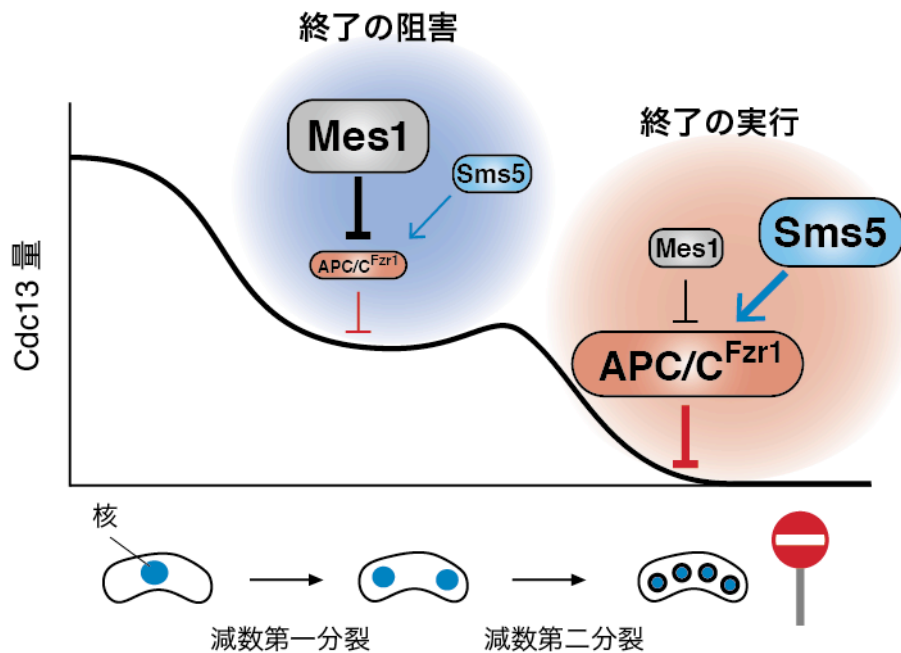


図 18 減数分裂を終了させるための APC/C の制御モデル  
詳細は本文を参照。

二分裂ののちも蓄積し続けること[22]、また APC/C–Fzr1 は Cdc13 の分解を促進すること[24]に基づく。*fzr1Δ*株では減数分裂が正常に終了せず、減数第三分裂が起きる(図 5)。したがって、APC/C–Fzr1 による Cdc13 の分解の完遂は、減数分裂を終了させる中核的な分子メカニズムである。

(2) の根拠となる結果は、Mes1 と Fzr1 の結合が Fzr1 と Cdc13 の結合を競合的に阻害すること[20]、また Mes1 が APC/C–Fzr1 を介した Cdc13 の分解を阻害すること[24]である。Mes1 は APC/C–Fzr1 を阻害することによって、減数第二分裂の開始を保証する。APC/C–Fzr1 を阻害することは、すなわち「減数分裂の終了」を「阻害」することである((1)の主張)。したがって Mes1 は、「減数分裂の終了」を「阻害」することによって減数第二分裂の開始を保証する。

(3) は本論文で述べた結果をもとに立てた仮説である。前述のように、Sms5 は *fzr1* 遺伝子の転写活性化を介して Cdc13 の分解を促進し、減数分裂を正しく終了させる。このことは、Fzr1 の発現量が減数分裂の終了を左右する重要な要素であることを示唆している。

Fzr1 の発現量の重要性は、APC/C-Fzr1 が Mes1 によって阻害されることを考えれば、より理解しやすい。減数第一分裂において APC/C-Fzr1 は Mes1 によって阻害される。これにつづく減数第二分裂では、Mes1 による阻害を打ち消して APC/C-Fzr1 を再活性化する必要がある。減数分裂の終了において Fzr1 の発現量が重要であるならば、APC/C-Fzr1 の再活性化は Fzr1 を豊富に (Mes1 の阻害効果を打ち消すほど大量に) 発現させることによって達成される、と考えるのが自然である。したがって本論文ではつぎの仮説を提唱する。すなわち「Sms5 による *fzr1* 遺伝子の転写活性化が Mes1 の阻害効果を打ち消すのに十分な Fzr1 の発現量をもたらし、これによって APC/C-Fzr1 を介した Cdc13 の分解が促進・完了して減数分裂が終了する」という仮説である。ここでは、Sms5 による Fzr1 の発現量の増加によって、「減数分裂の終了」は「阻害」される状態から「実行」する状態へと変化する (図 18)。この変化が、減数分裂における分裂期の連続回数を 2 回に限定すると私は考える。

この仮説では、Fzr1 の発現量の増加のほかに、Mes1 を不活性化する経路があることを否定はしない。Mes1 は APC/C を介して分解されるため[21, 24]、Mes1 の分解が進めば APC/C-Fzr1 を介した Cdc13 の分解は促進するだろう。実際、Mes1 は減数分裂の終了とともに分解されることから[20, 24] (図 16)、Mes1 の機能は発現量のレベルでタイムリーに不活性化されるようである。*ste9*, *fzr2*, *fzr3* の各遺伝子の欠損株では Mes1 の消失時期が遅れる[24]。しかしこれらの株では多核の表現型はほとんどみられない (data

not shown, 宮本氏私信)。したがって分解による Mes1 の不活性化は、少なくとも減数分裂の終了という観点からみれば、補助的な経路であるかもしれない。

## Sms5 の安定性を制御するシス因子

Sms5 のトランケーション変異体の解析において、Sms5-GFP は減数分裂の終了とともに細胞内から消失するのに対し (図 10,12)、Sms5(ΔC60)-GFP は減数分裂の終了後も核内で安定化していた (図 12)。この結果は、Sms5 を分解へ導く配列が Sms5 の C 末端に存在することを示唆する。Sms5(ΔC30)-GFP は野生型と同様に減数分裂の終了後に消失したため、そのような配列は Sms5 の 114 ~ 143 番目の配列内に存在するはずである (図 19)。興味深いことに、114 ~ 143 の配列内には APC/C の認識配列である D-box のコンセンサス配列が存在した (図 19)。また、そのすぐ C 末端側には、APC/C によって認識されるもうひとつの配列である KEN-box のコンセンサス配列も存在した (図 19)。

```

Sms5    1  MIIIDGKNYA  CVVCLRGHRG  SSCQHQERAL  IEVRTGRPL  LCKKCRAIKQ
        51  QLKSNLKVCV  HLQPFPLFAN  EYQELLNFTQ  KNPILASLFL  FSTDKDIMNS
       101  SLNPASQAYT  FDLGRTLPIS EDILGYRKPL SLTDASNRID ASQLNEKEND
           D-box like                                KEN-box like
       151  SFTINQEADI  FNFAKYLSHK  DDISGIP
                                           分解配列

Mes1    1  MVNTDNKENE  PPNMEKAHMD  SSNALYRVQR  PLQRRPLQEL  SIELVKPSQT
        51  ITVKKSKKST  NSSSYFAQLH  AASGQNPPPS  VHSSHKQPSK  ARSPNPLLSM
       101  R

```

図 19 Sms5 のアミノ酸配列に想定される APC/C の認識配列

(上段) Sms5 のアミノ酸配列内で想定される D-box コンセンサスを赤で、KEN-box コンセンサスをオレンジで示す。図 12 で明らかになった Sms5 の分解に必要な配列を黒枠で示す。(下段)

Mes1 のアミノ酸配列内における D-box (赤) と KEN-box (オレンジ) を示す[24]。

Sms5-GFP の消失時期が分裂期の終了時期であることを考慮すると、Sms5 は減数分裂の終了時点で APC/C を介した分解を受ける可能性がある。実際、ウェスタンブロッティングの結果において、Sms5-GFP はサイクリン Cdc13 と同時期に細胞内から消失した (図 16A)。この結果は Sms5 が APC/C の基質であることを支持する。

Sms5 はなぜ減数分裂の終了ののちに分解されるのだろうか。Sms5( $\Delta$ C60)-GFP は *mes1* $\Delta$  を抑圧しなかった (図 11)。この結果は、Sms5 の安定化が *fzr1* 遺伝子の転写を促進することと矛盾しない。というのも、Sms5 が安定化したとしても *fzr1* 遺伝子の転写を減少する方向には働かないはずであり、このとき *mes1* $\Delta$  は抑圧されないと推測できるからである。したがって、Sms5 が安定化したとしても、減数分裂の終了メカニズムに異常が生じるわけでは無さそうである。Sms5 のタイムリーな分解は、分裂期の制御とは異なる経路において必要なのかもしれない。

### Sms5 による転写制御の仕組みについて

*sms5* $\Delta$  による *mes1* $\Delta$  の抑圧は、*fzr1*<sup>+</sup> の過剰発現によって打ち消された。この結果は、*fzr1* 遺伝子は Sms5 の重要なターゲット遺伝子であることを示唆する。その一方で、*sms5* $\Delta$  株でみられる多核の表現形は *fzr1*<sup>+</sup> の過剰発現によって抑圧されなかった。この原因はつぎの 2 通りが考えられる。ひとつは、*fzr1* の転写量が不足した可能性である。過剰発現系において、*fzr1*<sup>+</sup> はオリジナルのプロモーターの制御下で発現させた。*fzr1* の正しい転写パターンを生み出すには Sms5 が必要であるため、オリジナルのプロモーターを用いたとしても、多核の表現形を抑圧するほどまでに過剰発現ができなかったのかも

しれない。もうひとつは、*fzr1*<sup>+</sup>の他にも重要なターゲット遺伝子が存在する可能性である。この可能性を検討するため、前述のように Sms5 のターゲット遺伝子を探索するスクリーニングをおこなったが、*sms5*<sup>+</sup>自身のほかには単離されなかった。この結果は、Sms5 の重要なターゲット遺伝子は複数存在し、*sms5*Δの欠陥を回復させるためにはそれらの遺伝子を同時に発現させる必要があることを示唆する。

Sms5/Cuf2 は転写抑制因子であるという報告がある[36]。*cuf2*Δ/*sms5*Δ株では *meu14* 遺伝子などの転写が抑制されない。Sms5 が *fzr1* 遺伝子の転写を促進し、他方で *meu14* 遺伝子などの転写を抑制する仕組みとはどのようなものが考えられるだろうか。Sms5 は *fzr1* 遺伝子のプロモーター領域に結合するため、Sms5 は *fzr1* の転写を直接制御することが示唆される。*cuf2*Δ/*sms5*Δ株で *meu14* 遺伝子などの転写の抑制がみられなかったのは、Fzr1 の発現量が下がり、サイクリン Cdc13 が安定化したことによる Cdk 活性の残存が原因である可能性がある。今後は、*meu14* 遺伝子のプロモーター領域への結合などを解析することにより、Sms5 の転写因子としての機能をより精細に調べる必要がある。

ところで、Sms5 による *fzr1* 遺伝子の転写活性化はどのような仕組みによっておこなわれるのだろうか。*sms5*Δ株では *fzr1* mRNA 量が 54%に減少した。この結果は、Sms5 は *fzr1* の転写量を約 2 倍に増幅させる機能をもつといえるのかもしれない。しかし、転写量を単に 2 倍に増幅するという解釈とは矛盾する結果がある。それはすなわち、*mes1*Δ/*mes1*Δは *sms5*Δ/*sms5*Δ (*fzr1* mRNA 量が半減) によって抑圧されるが、*fzr1*Δ/*fzr1*<sup>+</sup> (*fzr1* 遺伝子のコピー数が半減) によって抑圧されないという結果である (1 章)。Sms5 は *fzr1* の転写を単に 2 倍に増幅するというよりは、むしろ減数分裂を終了するのに十分な量だけ供給するような機能をもつ可能性がある。たとえば、Sms5 は Fzr1 の発現量を

なんらかの形で認識するフィードバック機構を構成するのかもしれない。そのような機能は、減数第二分裂において Mes1 による阻害を打ち消し、分裂期をかならず終了させるためには必要だと考えられる。

## 結論

本研究は、分裂酵母における減数分裂の終了に必要な細胞周期制御のメカニズムの一端を明らかにした。*sms5Δ*株および *fzr1Δ*株では、減数第二分裂の後に細胞がふたたび分裂期に入り、過剰な染色体分配がみられた。*Sms5* タンパク質は新規の転写因子であり、その重要なターゲット遺伝子は APC/C の減数分裂特異的な活性化因子をコードする *fzr1<sup>+</sup>*であると判明した。*sms5Δ*株において、Fzr1 タンパク質の発現量が減少すること、また APC/C の分解ターゲットであるサイクリン Cdc13 が減数第二分裂の後にも安定であることがわかった。これらの結果をもとに、以下のモデルを提唱した。*Sms5* を含む転写調節機構は、Fzr1 の発現量を増大させることによって Cdc13 の分解を促進する。その結果、減数第二分裂の後に細胞がふたたび分裂期に入ることを防ぎ、機能的な配偶子の形成を保証する。

## 材料と方法

### 1. 分裂酵母株

本研究でもちいた分裂酵母株とその遺伝子型を**方法-表 1** に示した。遺伝子名は“*mes1*”のようにアルファベット 3 文字と数字 1 文字をもちいて小文字のイタリック体で表記する。遺伝子アレルを表記する場合は、“*mes1-B44*”のように遺伝子名とアレル番号をハイフンでつなぐ。

### 2. 培地

#### <大腸菌>

大腸菌の培養は TY (1% polypepton, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7.0) 培地、または LB (1% Bacto Tryptone, 1% Yeast extract, 0.5% NaCl, pH7.6) 培地でおこなった。必要に応じて ampicillin を終濃度 40 µg/ml で添加した。

#### <分裂酵母>

完全栄養培地である YE、最小培地である SD と MM (EMM とも呼ぶ)、孢子形成培地である SSA と SPA はそれぞれ標準的な組成に従った[54, 55]。必要に応じて、アデニン (50 µg/ml)、ウラシル (50 µg/ml)、ロイシン (100 µg/ml)、ヒスチジン (50 µg/ml)、リジン (50 µg/ml)、アルギニン (100 µg/ml) を加えた。

YE は、上記 6 種類の栄養素のうちアルギニンを除く 5 種類を加えた YE5S を標準的にもちい、本論文では YE5S を単に YE と呼ぶこととした。ただし二倍体細胞を YE で培養する場合は、上記 6 種類の栄養素のうちアデニンとアルギニンを除く 4 種類を加えた YE4S をもちいた。*kan<sup>R</sup>*, *hph<sup>R</sup>*, *nat<sup>R</sup>*, *bsd<sup>R</sup>* 遺伝子挿入株の選択時には、YE プレートにそれぞれ G418 (Roche ; 100 µg/ml)、ハイグロマイシン B (和光純薬 ; 100 µg/ml)、clonNAT (Werner BioAgents ; 100 µg/ml)、ブラストサイジン S (フナコシ ; 30 µg/ml) を加えたものをもちいた[56, 57]。また、ウラシル要求性株を選択する際には、YE プレートに 5-フルオロオロチン酸 (和光純薬 ; 1 mg/ml) を加えた。

### 3. 組換え DNA 操作

一般的な組換え DNA 操作は標準的なプロトコールに従った[58]。大腸菌の形質転換は 18°C 法[59]により行った。大腸菌株は XL1-Blue または DH5  $\alpha$  を使用した。部位特異的に変異を導入する場合は PrimeSTAR Mutagenesis basal kit (タカラバイオ) をもちい

た。塩基配列の決定は ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) をもちいておこなった。

#### 4. 分裂酵母の遺伝学的手法とプラスミド DNA

分裂酵母の一般的な遺伝学的解析は標準的な方法に従った[60]。形質転換は酢酸リチウム法に従った[61]。細胞融合（プロトプラストフュージョン）によるヘテロタリック二倍体株の作製はすでに記述されているとおり[62]におこなった。

ホモタリック  $h^{90}$  株の細胞を接合、減数分裂、胞子形成への誘導するためには、YE で培養した細胞を滅菌水で 1 回洗い、等量のロイシン溶液 (20 mg/ml) に懸濁して SPA（どの栄養素も添加していない）上にスポットした。30°C 24h または 25°C 24h で培養したのち、接合体の胞子形成率や核の数の測定にもちいた。減数分裂をおこなう細胞のライブセルイメージングをおこなう場合は、SPA 上で 25°C 12h 培養した細胞をもちいた。

選択マーカー遺伝子カセットをもちいた遺伝子破壊株、融合タンパク質発現株の作製には PCR に基づく標準的な遺伝子ターゲティング法をもちいた[57, 63, 64]。*sms5-5FLAG* 株の作製には pFA6a-5FLAG-KanMX プラスミド[65]をもちいた。減数分裂における Fzr1 の過剰発現のため、pREP1 プラスミド[66]を次のように改変した。*fzr1* 遺伝子のプロモーター領域 (1kb) とコーディング領域を *mei4-DSR* (determinant of selective removal) 配列[67, 68]と融合させた DNA 断片を、pREP1 の *nmt1* プロモーターと交換した。

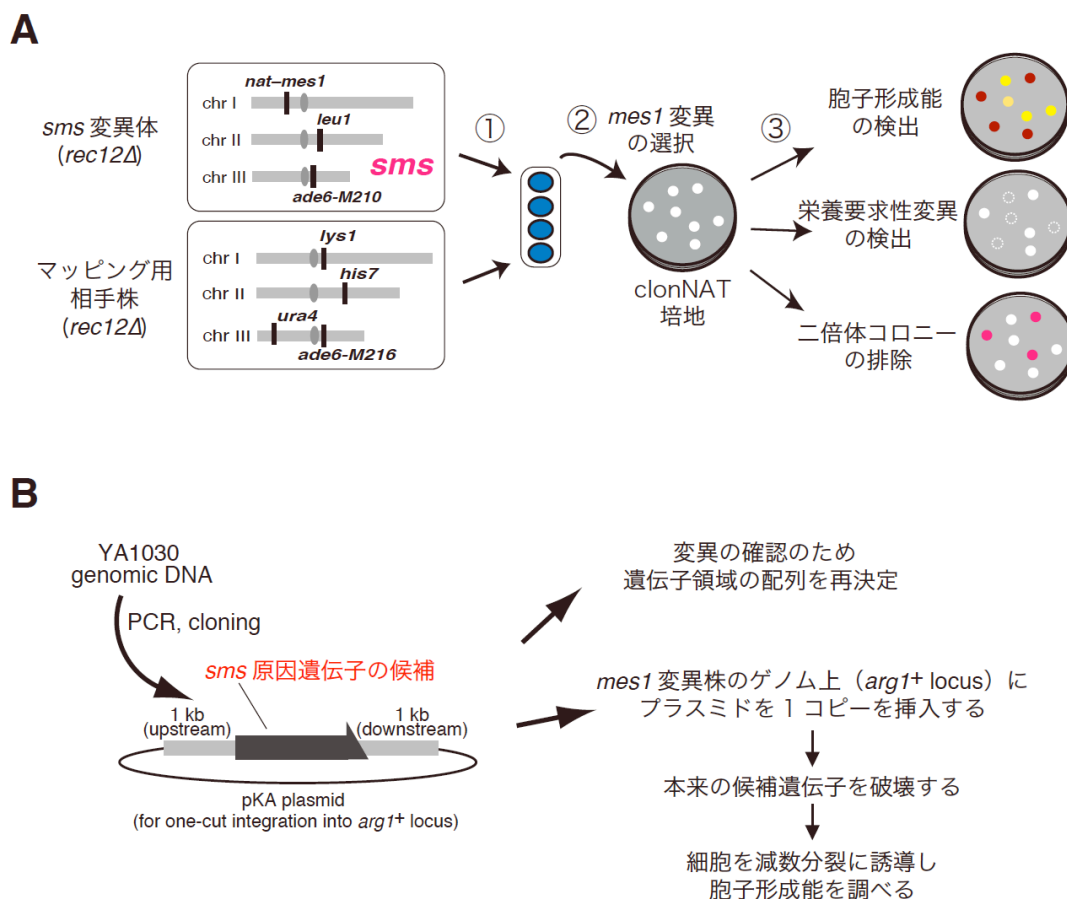
#### 5. 同調的な減数分裂の誘導

細胞を同調的に減数分裂へ誘導するため、*pat1-114+mat-Pc* 二倍体株をもちいた高温で誘導される減数分裂を利用した[51]。すでに記述されているように[50]、25°C YE4S で培養した対数増殖期の細胞を滅菌水で 5 回洗い、MM-N（窒素源を欠いた最少培地）に  $2 \times 10^6$  cells/ml となるよう移した。細胞を G1 期に停止させるため 25°C で 7h 培養したのち、Pat1 キナーゼを不活性化させるため温度を 34°C に上昇させて減数分裂を開始させた。そののちに図に示した各時点で培養液を分取した。各細胞あたりの核の数を計測するため、細胞をメタノールで固定して DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole ; 和光純薬)で染色した。

#### 6. 染色体マッピング

*sms* 変異の染色体マッピングは方法-図 A のようにおこなった。*sms* 変異株とマッピ

ング相手株 (YA199) を *rec12Δ* 株のバックグラウンドで掛けあわせて 1 倍体の胞子を形成させた (図中①)。*rec12Δ* 株では相同組み換え率が 0.1% に低下するため[35]、*sms* 変異の存在する染色体と相手株に由来する相同染色体の組み換えは事実上ほとんど起きない。つぎに、得られた 1 倍体の胞子を clonNat 薬剤培地にまいてコロニーを形成させた (図中②)。ここで clonNat 耐性遺伝子によってマークされた *mes1* 変異をもつ細胞のコロニーを選択した。最後に、各コロニーについて胞子形成能をもつか (= *sms* 変異をもつか)、どのマーカー遺伝子をもつか、1 倍体コロニーはどれか (まれに 2 倍体コロニーが混じるため) を判定した (図中③)。結果は表 1 (1 章) に示した。



#### 方法-図 *sms* 変異の原因遺伝子の同定法

(A) *sms* 変異の染色体マッピングの流れを示した模式図。(B) ホールゲノムシーケンシングの結果より得られた変異の候補から *sms* 変異の原因遺伝子进行特定する流れを示した模式図。pKA プラスミドは *arg1<sup>+</sup>* 遺伝子の 1 kb 断片と G418 耐性遺伝子を含む。このプラスミドを *arg1<sup>+</sup>* 断片の中央部で切断して線形化し内在性の *arg1<sup>+</sup>* 遺伝子座に挿入した。

## 7. ホールゲノムシーケンシングによる変異解析

*sms1-23 sms5-1 sms7-59* 三重変異株 (YA1030) のゲノム DNA を調製するため、細胞を 1L の YE でほとんど飽和するまで培養して集菌した。細胞を等量の SZB (\*1) に懸濁して 37°C 1h 反応させた。DNase を失活させるため SZB と同量の SDS-TE (\*2) を加えて混合し 65°C 10min 反応させた。さらに同量の 5M 酢酸カリウムを加えて混合し氷上に 1h 置いた。遠心して上清をとり、フェノールクロロホルム抽出を 3 回おこないイソプロパノール沈殿をおこなった。RNase A (10 µg/ml) 処理をおこなったのちふたたびフェノールクロロホルム抽出を 1 回おこない、イソプロパノール沈殿によって DNA を精製した。

(1\*) SZB : 600 µg/ml Zymolyase 20T (ナカライ) , 1M sorbitol, 0.1M Na Citrate [pH7.0], 60mM EDTA [pH8.0], 0.8% 2-mercaptoethanol

(2\*) SDS-TE : 2% SDS, 100mM Tris-HCl [pH8], 10mM EDTA [pH8]

精製したゲノム DNA の濃度を測定するため、アガロースゲル電気泳動と EtBr をもちいた蛍光定量をおこなった (この段階では多糖などの夾雑物が除去できなかったなどの理由から吸光度による測定値は蛍光定量の値より 10 倍以上高かった)。夾雑物を除去するため Genomic-tip (QIAGEN) をもちいて精製し、最終的に得られた 20µg (~100 ng/µl) のゲノム DNA を配列解析にもちいた。

ホールゲノムシーケンシングについては、Genome Analyzer IIx システム (illumina) をもちいて 75塩基両末端解析 (サンプルあたり 2000 万リード相当) をおこなった。得られた配列データを分裂酵母の参照ゲノム配列 (アクセッション番号: CU329670-2 および X54421) に対して BWA を用いてマッピングした。また、edena を用いてアセンブルして得られたコンティグ配列を、参照ゲノム配列に対して MUMmer を用いてマッピングした。リストアップされた約 900箇所の変異から原因変異の候補を約 60箇所に絞ったのち (1章を参照)、**方法-図B**のように各変異を *mes1* 変異株に導入した。*mes1* 変異を抑圧する変異として *sms1*, *sms5*, *sms7* の原因変異を特定した。なお、シーケンシングからマッピング解析まではタカラバイオに委託した。

## 8. 配列比較

マルチプルアライメントは Clustal X 2.0 [69, 70] をもちいておこなった。得られたアライメントデータは BOXSHADE ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)) で白黒の画像として出力した。

## 9. 顕微鏡

ライブセルイメージングは DeltaVision-SoftWoRx system (GE Healthcare)をもちいておこなった[64]。レクチンであらかじめコートしたガラスボトムディッシュ（松浪硝子）に減数分裂をおこなう細胞をマウントし、ディッシュ内を MM-N 液体培地で満たした。Z 軸に沿った一連の断面図として得られた観察像は、SoftWoRX の”quick projection”アルゴリズムをもちいてスタックさせた。

固定細胞の観察（図 3B など）は、まず細胞をメタノールで固定したのち DAPI（1  $\mu\text{g/ml}$  in 10%グリセロール）で染色した。DIC（微分干渉顕微鏡）と DAPI の観察像は、Axioplan 2 蛍光顕微鏡（Zeiss）を Slidebook software (Leeds Precision) で操作することによって得た。

## 10. 定量 RT-PCR

同調的な減数分裂に誘導した細胞の培養液を分取し集菌した。トータル RNA はホット酸性フェノール法によって調製し[71]、Turbo DNA-free (Ambion)で DNase 処理をおこなった。逆転写は High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)をもちいておこなった。定量 PCR 反応は Power SYBR Green (Applied Biosystems)をもちいて Real Time PCR 7300 system (Applied Biosystems)上でおこなった。定量結果は検量線による相対定量によって解析した。本研究でもちいたプライマーは方法-表 2 に示した。

## 11. ウェスタンブロッティング

同調的な減数分裂に誘導した細胞の培養液を分取して PMSF (1mM)を加えて攪拌したのち、細胞を STOP buffer (1\*) で 1 回洗った。細胞を等量の HB buffer (2\*) に懸濁してボイル（100°C 5min）し、その後の操作中にプロテアーゼによる分解などを受けないようにした。細胞懸濁液は必要に応じてここで-80°C に保存した。

(1\*) STOP buffer : 50mM NaF, 10mM EDTA[pH8.0], 1mM NaN<sub>3</sub>, 150mM

(2\*) HB buffer : 25mM MOPS[pH7.2], 5mM EGTA[pH7.2], 15mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM  $\beta$ -glycerophosphate, 15mM *p*-nitrophenylphosphate, 1mM DTT, 1mM PMSF, 0.1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.2% NP-40, 150mM KCl

ガラスビーズで激しく攪拌することにより細胞を破碎した。マイクロチューブの底に注射針で穴を開け、新しいマイクロチューブに重ねて遠心し、細胞抽出液を得た。抽出液と 2xSDS バッファー（62.5mM Tris-HCl [pH6.8], 2% SDS, 25% Glycerol）を 1:1 で混合してボイル（100°C 5min）し、タンパク質を変性および可溶化させた。タンパ

ク質濃度は DC protein assay (Bio-Rad) をもちいて測定した。測定後の抽出液に 2-メルカプトエタノール (5%) とブロモフェノールブルー (0.01%) を加えて再びボイルしたのち、タンパク質 50  $\mu$ g 分を SDS-PAGE により分離した。

SDS-PAGE には 4 ~ 15% Criterion TGX プレキャストゲル (Bio-Rad) をもちいた。PVDF メンブレンへの転写はトランスブロット Turbo 転写システム (Bio-Rad) にておこなった。メンブレンと抗体を反応させたのち、HRP の化学発光は ECL-Prime (GE Healthcare) をもちいておこない、ImageQuant LAS 4000 システム (GE Healthcare) にて発光シグナルを検出した。

一次抗体は次のものをもちいた。抗 Fzr1 ラビットポリクローナル抗体 HY81 (1:2,000、山野博士より供与)[24]、抗 Cdc13 マウスモノクローナル抗体 6F11/2 (1:2,000、abcam)、抗 HA マウスモノクローナル抗体 12CA5 (1:1,000、Roche)、抗 Cdk1/Cdc2 PSTAIR ラビットポリクローナル抗体 (1:2,000、Millipore)、抗 phospho-Cdc2 (Tyr15) ラビットポリクローナル抗体 (1:1,000、Cell Signaling)、抗 GFP マウスモノクローナル抗体 (1:1,000、Roche)。

## 12. クロマチン免疫沈降

減数第一分裂から減数第二分裂への移行期の細胞を得るため、*pat1-114* 変異による同調的な減数分裂において、34°C に温度上昇させてから 3.5h が経過した培養液を 200ml 用意した。細胞抽出液の調製と免疫沈降はすでに記述されている方法[72, 73]を以下のように改変しておこなった。

細胞の固定は、培養液にホルムアルデヒド (和光純薬; 1%) を加えて 34°C 10min 培養したのち、氷上で 10min 冷却した。グリシン (和光純薬; 150mM) を加えて氷上に 5min 置きクロスリンク反応を停止させたのち、細胞を PBS で 2 回洗った。細胞は等量の Buffer1 (\*1) に懸濁してガラスビーズで激しく攪拌 (約 9 割の細胞が破碎されるまで) した。Sonifier 450 (Branson) をもちいて氷水中で超音波破碎 (Speed, 4; 15sec x 6 times) をおこない抽出液中の DNA を断片化した (平均長 0.5~1kb)。遠心して上清とりこれを細胞抽出液とした。タンパク質濃度は Protein Assay Kit (Bio-Rad) をもちいて測定し、タンパク質約 2mg 分の細胞抽出液を免疫沈降にもちいた。

免疫沈降には抗 Flag マウスモノクローナル抗体 M2 (Sigma-Aldrich) とコントロール IgG 抗体 (抗 myc マウスモノクローナル抗体 9E10, santa cruz) をもちいた。Dynabeads Protein G (invitrogen) で 1 回洗った細胞抽出液を抗体と 4°C で 1.5h 反応させ、そののち Dynabeads Protein G を加えて 4°C 1.5h 反応させた。抗体と結合した Dynabeads Protein G を Buffer1, Buffer1' (\*2), Buffer2 (\*3) でそれぞれ 1 回ずつ洗い、TE で 2 回洗った。TER

(10 µg/ml RNase A in TE)を加えて 37°C で 30min RNase 処理した(これ以降は細胞抽出液も同時に処理した)。SDS (ナカライ ; 0.25%) と Proteinase K (和光純薬 ; 250 µg/ml) を加えて 37°C で一晩反応させた。脱クロスリンク反応のため 65°C に 6h 反応させた。フェノール・クロロホルム抽出によってタンパク質を除去し、MinElute PCR purification kit (QIAGEN)をもちいて DNA をカラム精製した。

細胞抽出液あるいは免疫沈降物から精製された DNA 断片は、10.定量 RT-PCR の項で述べたのと同様に定量 PCR 法をもちいて解析した。増幅にもちいたプライマーは方法-表 2 に示した。

- (\*1) Buffer1 : 50mM HEPES-KOH [pH7.2], 140mM NaCl, 1mM EDTA [pH7.5], 1% Triton-X100, 0.1% Sodium Deoxycholate
- (\*2) Buffer1' : 50mM HEPES-KOH [pH7.2], 500mM NaCl, 1mM EDTA [pH7.5], 1% Triton-X100, 0.1% Sodium Deoxycholate
- (\*3) Buffer2 : 10mM Tris-HCl [pH8.0], 250mM LiCl, 0.5% NP-40, 0.5% Sodium Deoxycholate

方法-表 1 本研究にもちいた分裂酵母株

| 番号     | 遺伝子型  | 図     |
|--------|---|-------|
| JY476  | <i>h<sup>90</sup> leu1 ade6-M210</i>  | 3B, C |
| JZ51   | <i>h<sup>90</sup> mes1-B44 leu1 ade6-M210</i>   | 3B, C |
| YA304  | <i>h<sup>90</sup> sms5-1 nat-mes1-B44 leu1 ade6-M210</i>  | 3B, C |
| YA139  | <i>h<sup>90</sup> sms1-23 nat-mes1-B44 leu1 ade6-M210</i>   | 3C    |
| JY450  | <i>h<sup>90</sup> leu1 ade6-M216</i>  | 4,7   |
| YA1293 | <i>h<sup>90</sup> sms5::ura4<sup>+</sup> leu1 ura4 ade6-M216</i>  | 4     |
| KA162  | <i>h<sup>90</sup> fzf1::ura4<sup>+</sup> leu1 ura4 ade6-M210</i>  | 4     |
| YA1310 | <i>h<sup>90</sup> sms5::ura4<sup>+</sup> fzf1::bsd leu1 ura4 ade6-M216</i>  | 4     |
| YA1984 | <i>h<sup>90</sup> Z2-GFP-atb2-kan sfi1-mCherry-hph htb1-CFP-nat leu1 ade6-M216</i>  | 5A,D  |
| YA1991 | <i>h<sup>90</sup> sms5::ura4<sup>+</sup> Z2-GFP-atb2-kan sfi1-mCherry-hph htb1-CFP-nat leu1 ura4 ade6-M216</i>  | 5B,D  |
| YA1987 | <i>h<sup>90</sup> fzf1::ura4<sup>+</sup> Z2-GFP-atb2-kan sfi1-mCherry-hph htb1-CFP-nat leu1 ura4 ade6-M210 or M216</i>  | 5C,D  |
| YA2019 | <i>h<sup>90</sup> mes1::bsd fzf1::ura4<sup>+</sup> co2::Pfzf1-fzf1-Tfzf1-hph leu1 ura4 ade6-M216</i>  | 6A    |
| YA2027 | <i>h<sup>90</sup> mes1::bsd fzf1::ura4<sup>+</sup> co2::Pfzf1(sms1)-fzf1-Tfzf1-hph leu1 ura4 ade6-M216</i>  | 6A    |
| YA1528 | <i>h<sup>90</sup> mes1::bsd fzf1::ura4<sup>+</sup> leu1 ura4 ade6-M216</i>  | 6A    |
| YA2056 | <i>h<sup>-</sup>/h<sup>-</sup> fzf1::bsd/fzf1::bsd pat1-114/pat1-114 leu1/leu1 ade6-M210/ade6-M216 lys1-131::mat-Pc-lys1<sup>+</sup>/lys1<sup>+</sup> co2::Pfzf1-fzf1-Tfzf1-hph/co2::Pfzf1-fzf1-Tfzf1-hph</i>             | 6B,C  |
| YA2058 | <i>h<sup>-</sup>/h<sup>-</sup> fzf1::bsd/fzf1::bsd pat1-114/pat1-114 leu1/leu1 ade6-M210/ade6-M216 lys1-131::mat-Pc-lys1<sup>+</sup>/lys1<sup>+</sup> co2::Pfzf1(sms1)-fzf1-Tfzf1-hph/co2::Pfzf1(sms1)-fzf1-Tfzf1-hph</i> | 6B,C  |
| YA1373 | <i>h<sup>90</sup> sms7::ura4<sup>+</sup> leu1 ura4 ade6-M216</i>  | 7     |
| YA1325 | <i>h<sup>90</sup> sms5-GFP-kan Z2-CFP-atb2-nat leu1 ura4 ade6-M216</i>  | 10A,B |
| YA1423 | <i>h<sup>90</sup> sms5-GFP-kan Z2-CFP-atb2-nat cut11-3mRFP-hph leu1 ura4 ade6-M216</i>  | 10C   |
| YA1434 | <i>h<sup>90</sup> sms5(R19Q)-GFP-kan Z2-CFP-atb2-nat cut11-3mRFP-hph leu1 ura4 ade6-M216</i>  | 10C   |
| YA1381 | <i>h<sup>90</sup> sms5-GFP-kan mes1::bsd leu1 ura4 ade6-M216</i>  | 11    |
| YA1432 | <i>h<sup>90</sup> sms5(ΔC30)-GFP-kan mes1::bsd leu1 ura4 ade6-M216</i>  | 11    |
| YA1466 | <i>h<sup>90</sup> sms5(ΔC60)-GFP-kan mes1::bsd leu1 ura4 ade6-M216</i>  | 11    |
| YA1430 | <i>h<sup>90</sup> sms5(ΔC90)-GFP-kan mes1::bsd leu1 ura4 ade6-M216</i>  | 11    |
| YA1468 | <i>h<sup>90</sup> sms5(C117)-GFP-kan mes1::bsd leu1 ura4 ade6-M216</i>  | 11    |
| YA1428 | <i>h<sup>90</sup> sms5(N60)-GFP-kan mes1::bsd leu1 ura4 ade6-M216</i>   | 11    |
| YA2086 | <i>h<sup>90</sup> sms5-GFP-kan Z2-CFP-atb2-nat cut11-3mRFP-hph leu1 ura4 ade6-M216</i>  | 12    |
| YA2079 | <i>h<sup>90</sup> sms5(ΔC30)-GFP-kan Z2-CFP-atb2-nat cut11-3mRFP-hph leu1 ura4 ade6-M216</i>  | 12    |
| YA2088 | <i>h<sup>90</sup> sms5(ΔC60)-GFP-kan Z2-CFP-atb2-nat cut11-3mRFP-hph leu1 ura4 ade6-M216</i>  | 12    |

|        |   |       |
|--------|---|-------|
| YA2087 | <i>h<sup>90</sup> sms5(ΔC90)–GFP–kan Z2–CFP–atb2–nat cut11–3mRFP–hph leu1 ura4 ade6-M216</i>  | 12    |
| YA2080 | <i>h<sup>90</sup> sms5(C117)–GFP–kan Z2–CFP–atb2–nat cut11–3mRFP–hph leu1 ura4 ade6-M216</i>  | 12    |
| YA2081 | <i>h<sup>90</sup> sms5(N60)–GFP–kan Z2–CFP–atb2–nat cut11–3mRFP–hph leu1 ura4 ade6-M216</i>   | 12    |
| MO91   | <i>h<sup>–</sup>/h<sup>–</sup> pat1-114/pat1-114 lys1-131::mat-Pc–lys1<sup>+</sup>/lys1<sup>+</sup> leu1/leu1 ade6-M210/ade6-M216</i>   | 13A,B |
| YA1676 | <i>h<sup>–</sup>/h<sup>–</sup> sms5::kan/sms5::kan pat1-114/pat1-114 lys1-131::mat-Pc–lys1<sup>+</sup>/lys1<sup>+</sup> leu1/leu1 ade6-M210/ade6-M216</i>   | 13A,B |
| YA2003 | <i>h<sup>–</sup>/h<sup>–</sup> sms5–5FLAG–kan/sms5<sup>+</sup> pat1-114/pat1-114 lys1-131::mat-Pc–lys1<sup>+</sup>/lys1<sup>+</sup> leu1/leu1 ade6-M210/ade6-M216</i>                             | 14    |
| YA2007 | <i>h<sup>–</sup>/h<sup>–</sup> sms5(R19Q)–5FLAG–kan/sms5<sup>+</sup> pat1-114/pat1-114 lys1-131::mat-Pc–lys1<sup>+</sup>/lys1<sup>+</sup> leu1/leu1 ade6-M210/ade6-M216</i>                       | 14    |
| YA126  | <i>h<sup>90</sup> mes1::ura4<sup>+</sup> leu1 ura4 ade6-M216</i>  | 15    |
| YA1303 | <i>h<sup>90</sup> sms5::ura4<sup>+</sup> mes1::bsd leu1 ura4 ade6-M216</i>  | 15    |
| YA2103 | <i>h<sup>–</sup>/h<sup>–</sup> sms5–GFP–kan/sms5<sup>+</sup> mes1–3HA–nat/mes1<sup>+</sup> pat1-114/pat1-114 lys1-131::mat-Pc–lys1<sup>+</sup>/lys1<sup>+</sup> leu1/leu1 ade6-M210/ade6-M216</i> | 16A   |
| YA2105 | <i>h<sup>–</sup>/h<sup>–</sup> sms5::kan/sms5::kan mes1–3HA–nat/mes1<sup>+</sup> pat1-114/pat1-114 lys1-131::mat-Pc–lys1<sup>+</sup>/lys1<sup>+</sup> leu1/leu1 ade6-M210/ade6-M216</i>           | 16B   |
| YA1705 | <i>h<sup>90</sup> cdc13–YFP–Tcdc13–kan Z2–CFP–atb2–nat cut11–3mRFP–hph leu1 ura4 ade6-M216</i>  | 17    |
| YA1709 | <i>h<sup>90</sup> sms5::ura4<sup>+</sup> cdc13–YFP–Tcdc13–kan Z2–CFP–atb2–nat cut11–3mRFP–hph leu1 ura4 ade6-M216</i>   | 17    |
| YA1707 | <i>h<sup>90</sup> fzr1::ura4<sup>+</sup> cdc13–YFP–Tcdc13–kan Z2–CFP–atb2–nat cut11–3mRFP–hph leu1 ura4 ade6-M216</i>   | 17    |
| YA199  | <i>h<sup>90</sup> lys1 his7 ura4::hph ade6-M216 rec12::kan</i>  | 表 1   |
| YA166  | <i>h<sup>90</sup> sms1-23 nat–mes1-B44 leu1 ade6-M210 rec12::kan</i>  | 表 1   |
| YA952  | <i>h<sup>90</sup> sms2-28 nat–mes1-B44 leu1 ade6-M210 rec12::kan</i>  | 表 1   |
| YA955  | <i>h<sup>90</sup> sms3-7 nat–mes1-B44 ade6-M210 rec12::kan</i>  | 表 1   |
| YA321  | <i>h<sup>90</sup> sms4-8 nat–mes1-B44 leu1 ade6-M210 rec12::kan</i>   | 表 1   |
| YA323  | <i>h<sup>90</sup> sms5-1 nat–mes1-B44 leu1 ade6-M210 rec12::kan</i>   | 表 1   |
| YA956  | <i>h<sup>90</sup> sms6-19 nat–mes1-B44 leu1 ade6-M210 rec12::kan</i>  | 表 1   |
| YA514  | <i>h<sup>90</sup> sms7-59 nat–mes1-B44 leu1 ade6-M210 rec12::kan</i>  | 表 1   |
| YA328  | <i>h<sup>90</sup> sms8-29 nat–mes1-B44 leu1 ade6-M210 rec12::kan</i>  | 表 1   |
| YA329  | <i>h<sup>90</sup> sms9-44 nat–mes1-B44 leu1 rec12::kan</i>  | 表 1   |
| YA1446 | <i>h<sup>90</sup>/h<sup>90</sup> mes1::nat/mes1::kan fzr1::ura4<sup>+</sup>/fzr1<sup>+</sup> leu1/leu1 ura4/ura4<sup>+</sup> ade6-M210/ade6-M216</i>  | 表 2   |
| YA1444 | <i>h<sup>90</sup>/h<sup>90</sup> mes1::nat/mes1::kan sms1-23/sms1<sup>+</sup> leu1/leu1 ade6-M210/ade6-M216</i>   | 表 2   |
| YA1442 | <i>h<sup>90</sup>/h<sup>90</sup> mes1::nat/mes1::nat sms1-23/sms1<sup>+</sup> fzr1::ura4<sup>+</sup>/fzr1<sup>+</sup> leu1/leu1 ura4/ura4<sup>+</sup> ade6-M210/ade6-M216</i>                     | 表 2   |
| YA1030 | <i>h<sup>90</sup> sms1-23 sms5-1 sms7-59 nat–mes1-B44 leu1 ade6-M216 arg1::mes1–kan rec12::bsd</i>  | 表 3   |

方法-表 2 本研究で定量 PCR 反応にもちいたプライマー

| 名称                 | 配列 (5' to 3')                  | 図      |
|--------------------|--------------------------------|--------|
| For RT-PCR assays: |                                |        |
| fzr1_f             | GGCACTATTCAAAGGCAATTCAT        | 6C,13B |
| fzr1_r             | TCCAACATTTTCTTCTCAATTTTCC      | 6C,13B |
| cdc13_f            | ACAGTGTGCTGCCGCTATGT           | 13B    |
| cdc13_r            | CCACGGTCCACGTCCAA              | 13B    |
| mes1_f             | CGGTCAAAAAGTCTAAGAAGTCGACTA    | 13B    |
| mes1_r             | CGGATGCGGCATGCA                | 13B    |
| act1_f             | TGAGGAGCACCCCTTGCTTGT          | 6C,13B |
| act1_r             | TCTTCTCACGGTTGGATTTGG          | 6C,13B |
| For ChIP assays:   |                                |        |
| fzr1_f             | ATTTTAGGAGTTCTCTTACCATAACATCAC | 14     |
| fzr1_r             | TGCACTCATCAAAACAAACTGTTG       | 14     |
| cdc13_f            | GCCCAGCATAATTTTCATAGACAATAA    | 14     |
| cdc13_r            | CGGAGATATGGAACCACAATTTAA       | 14     |
| mes1_f             | TGTTGTATATTCGTCGTCCTTATCAATT   | 14     |
| mes1_r             | CGGAAAATGATTGAAAAGCTTCA        | 14     |

## 展望

減数分裂が2回の連続した核分裂で構成されることは、生命現象の基本的な特徴のひとつである。それゆえ「いかにして核分裂の回数は2回に限定されるか」という問いは非常に興味深い。本論文では、APC/Cの阻害とそれに続く再活性化、というモデルによって、その問いに部分的ではあるが答えることができた。体細胞分裂周期において、核分裂を1回に限定するため APC/C はサイクリンの分解を誘導する。サイクリンの分解とは、不可逆的な反応である。このことから考えて、核分裂を2回に限定するためには APC/C の働きを修正する必要がある、という論理は非常にシンプルに理解できる。

### Fzr1 の供給システムの予測と検証について

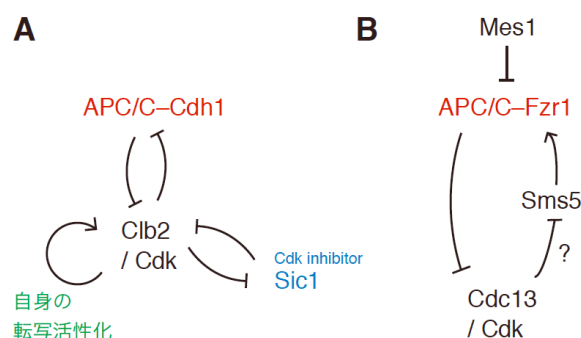
減数分裂の終了における APC/C の再活性化は、Sms5 を介して Fzr1 が十分に発現することによって達成される。したがって、「Fzr1 の発現量」は減数分裂を正確に終了するための重要な要素である。Sms5 は *fzr1* 遺伝子のプロモーターに結合して転写を直接制御すると示唆される (2 章)。しかしながら、どのようにして十分な量の Fzr1 を供給するか不明である。Fzr1 の不足は減数第三分裂を生じさせる危険性があるため、Fzr1 の供給量をかならず満足させるようなシステムが存在するはずである。またそのようなシステムの詳細を明らかにしてはじめて、核分裂の回数を2回に限定する仕組みを構造的に理解することが可能となる。これまでに、Fzr1 の供給システムの存在を示唆する結果が得られている (2 章)。以下に、Fzr1 の供給システムのモデルを提唱し、そのモデルの検証に必要となる実験を提案した。

Fzr1 の供給システムを予測するための土台として考えるのは、出芽酵母の「体細胞分

裂の終了」におけるフィードバック機構である[74] (展望-図 A)。分裂後期に Cdk の不活性化が始まると (これは APC/C–Cdc20 を介したサイクリン Clb2 の分解による)、フィードバック機構は Cdk をさらに不活性化させるように働き、核分裂が 1 回で終了することを保証する。このフィードバック機構は次の 3 つのフィードバックループによって構成される。

- (1) APC/C–Cdh1 と Cdk によるダブルネガティブフィードバックループは、Cdk に依存したリン酸化による Cdh1 の不活性化と、APC/C–Cdh1 を介したサイクリン Clb2 の分解によって成り立つ[75-77]。
- (2) Cdk および Cdk インヒビター Sic1 で構成されるダブルネガティブフィードバックループは、Cdk の不活性化が、Sic1 の発現と安定性を増加させる仕組みである[78, 79]。
- (3) サイクリン Clb2 は、自身の合成をポジティブに制御している[80, 81]。

これらのフィードバックは全て Cdk の不活性化がさらなる Cdk の不活性化を導くという構造をもつ。この機構により、体細胞分裂は不可逆的に終了する[74]。



#### 展望-図 フィードバックループによる Cdk の不活性化モデル

(A)出芽酵母における体細胞分裂の終了をもたらすフィードバックシステム (文献[74]より改変)。  
 (B)分裂酵母の減数分裂を終了させるための予想されるフィードバックモデル。

Fzr1 供給システムを、上記のフィードバック機構のアナロジーとしてとらえてみる。すると展望-図 B のようなフィードバックループが考えられるだろう。ここで、Cdk は Sms5 を不活性化すると仮定した。こう仮定することにより、Cdk が APC/C-Fzr1 を抑制する経路に、Sms5 による Fzr1 の発現増加の仕組みを組み込むことができる。

したがって、Fzr1 の供給システムは次のような仕組みによって成立すると予想する。すなわち、Cdk の不活性化が進むと、Sms5 による転写制御を介して Fzr1 の供給量が増加し、これにより APC/C-Fzr1 を介したサイクリン Cdc13 の分解が促進され、Cdk のさらなる不活性化を導くという仕組みである。実際、Sms5 によって *fzr1* の転写が活性化される時期は減数第一分裂から減数第二分裂にかけてであり (2 章)、この時期は Cdk 活性が下降する時期である[20]。この事実は、Cdk の不活性化が Sms5 を介した *fzr1* の転写をさらに促進するという予測に合致する。

このようなフィードバックループの存在を証明するため、Cdk が Sms5 をリン酸化するか検討する。同時に、Cdc2 (Cdk)の変異株において *fzr1* の転写パターンが変化するか調べることも重要だ。また、出芽酵母 Cdh1[75-77]や分裂酵母 Ste9[82, 83]のように、Fzr1 が Cdk に依存したリン酸化によって不活性化される可能性も検討する。ウェスタンブロットの結果では、減数分裂周期をとおして Fzr1 および Sms5 のバンドシフトは観察されなかった (2 章)。したがって、Cdk によるリン酸化の有無を調べるためには、*in vitro* キナーゼアッセイや、マスマスペクトロメトリーによる解析が必要である。

出芽酵母における体細胞分裂の終了では、少なくとも 3 つのフィードバックループが共役して Cdk を不活性化させる[74] (展望-図 A)。したがって、分裂酵母における減数分裂の終了においても、Fzr1 の供給システムを含めた複数のフィードバックループが機能する可能性がある。たとえば、出芽酵母 Sic1 の分裂酵母における機能ホモログ[84]

である Rum1 の関与である。Rum1 は環境の変化（栄養源の枯渇）に応答して細胞を G1 期に停止させるのに必要である[85]。体細胞分裂周期では、Rum1 は Cdk に依存したリン酸化によって細胞周期に依存した分解を受ける[86-88]。また、Rum1 は環境の変化に応答した mRNA の安定性の制御も受ける[89]。*rum1* mRNA を異所的に安定化させた場合、減数分裂周期に様々な異常が生じ、5 つ以上の胞子を形成する細胞も出現する[89]。したがって、Rum1 は減数分裂の終了メカニズムに関与するかもしれない。他方で、*rum1* mRNA 量は減数分裂周期をとおしてほとんど変化しないという報告もある[49]。今後はまず、Rum1 が減数分裂の終了に必要であるか調べたうえで、Cdk による Rum1 のリン酸化や mRNA の安定性の関与を検討する。

*cdc13* の転写制御は、減数分裂の終了における Cdk の不活性化に関与するだろうか。*cdc13* の転写は減数第一分裂から減数第二分裂にかけて増加する[49]（2 章）。この時期は Cdk が下降する時期に対応するため、Cdk の不活性化が *CLB2* の転写を抑える、という出芽酵母でみられるフィードバック（展望-図 A）は存在しないようである。*cdc13* の転写制御は、体細胞分裂周期では出芽酵母にくらべ弱体化しており[90]、*cdc13* の転写制御の仕組みはもとより出芽酵母 *CLB2* のものと異なる可能性がある。減数分裂における *cdc13* の転写は、減数第二分裂の終了とともに急激に抑制される（2 章）。この急激な転写抑制は、Cdc13 の合成速度を著しく低下させ、Cdk の不活性化につながると予想できる。どのように *cdc13* の転写は抑制されるのだろうか。*cdc13* の転写抑制パターンは *fzr1* や *mes1* などでもみられた（2 章）ため、これは *cdc13*, *fzr1*, *mes1* を含む“middle gene”のグループ[49]に共通した特徴だろう。ほとんどの middle gene の発現には、減数分裂に特異的な転写因子 Mei4 が必要である[49]。したがって、減数分裂の終了とともに Mei4 の機能が抑制される可能性がある。少なくとも、Sms5 は *cdc13* の転写制御に関与しな

いようだ (2 章)。以上のように、減数分裂の終了では Cdc13 が自身の転写をポジティブに制御する可能性は低く、減数分裂に特異的な転写制御がおこなわれるようである。

これらのほかにも、Mes1 は何らかのフィードバックに関与するかなど疑問は尽きない。上記のように既存の因子を解析することが重要である一方で、減数分裂に特異的に発現する新規因子の同定と解析は欠かせない。そのためには、*mes1* 変異のサプレッサー変異 *sms2*, *sms3*, *sms4*, *sms6*, *sms9* の 5 種類の原因遺伝子を同定することが有効であることは間違いない。今後は、既存の因子や *sms* 原因遺伝子の同定と解析をととして、減数分裂の終了メカニズムの解明をさらに進めていきたい。

### 減数第三分裂を阻止する仕組みの保存性について

興味深いことに、減数第三分裂という現象は、マウス、牛、ホヤ、植物において観察されている[91-94]。マウスとホヤでは、減数分裂の進行に重要な働きをする Mos-MAPK 経路の適切な制御が減数第三分裂を阻止するのに不可欠である。マウスでは *mos* のノックアウトにより[95, 96]、ホヤでは Mos の過剰発現により[93]、それぞれの卵成熟において減数第三分裂が生じる。しかし、マウスやホヤでは、Mos-MAPK 経路が減数第三分裂を阻止する作用機序は不明である。カエルでは、Mos-MAPK 経路は減数第二分裂において APC/C インヒビター Erp1/Emi2 を安定化させる[97, 98]。したがってマウスやホヤでは、Mos-MAPK 経路は Emi2 の制御を介して減数第三分裂を阻止する可能性がある。

分裂酵母で見いだされた *Sms5-Fzr1* の転写制御系は他の生物に保存されているのだろうか。マウスやカエルの卵成熟においては、転写が抑制され、減数分裂の進行は卵内に蓄えられた mRNA やタンパク質に依存する。このような生物では、転写制御よりもむしろ転写後／翻訳後調節が重要な役割を果たしていると考えられる。たとえば、前述

したカエルの Mos-MAPK 経路による Erp1/Emi2 の制御である。無論、転写後調節によって APC/C の活性化因子の発現が制御される可能性は否定しない。いっぽう酵母や植物は、Mos-MAPK 経路を持たないようである。シロイヌナズナでは、分裂酵母 Mes1 のホモログである Osd1 は減数第二分裂の開始に必須である。したがって酵母や植物では、APC/C インヒビター Mes1/Osd1 を転写後／翻訳後制御するよりも、むしろ Sms5-Fzr1 のような転写制御系を発達させることによって、減数分裂を終了させるための APC/C の活性化機構を獲得したのかもしれない。

このように、有性生殖を利用する真核生物において、減数分裂における APC/C の制御の仕方は種によって異なる部分もあるようだ。様々なモデル生物をもちいて減数第三分裂を阻止する仕組みを解き明かすことは、生物の進化の過程で APC/C の制御の方法がどのように取捨選択されてきたかという生物学的に重要な知見をもたらす。さらにヒトの卵成熟、精子形成における減数分裂終了の仕組みへの理解を発展させることによって、それらの知見は将来的には不妊治療のような医学的観点からみても重要な研究に結びつくものと考えている。

## 謝辞

*sms* 変異株を単離・分類された勝田雄治氏と今井義幸博士ならびに、*fzr1Δ*株において“減数第三分裂”のスピンデル微小管の形成を発見・解析された新井邦生博士と宮本昌弥氏に感謝いたします。本研究を開始する十数年前に単離された *sms* 変異株、そして私の在籍中に発見された減数第三分裂、この2つの独立した研究との出会いがなければ、本研究は成立し得なかったと思います。

染色体マッピングのための酵母株を提供してくださった A.Anders 博士と K.E.Sawin 博士、*pat1-114+mat-Pc* 株を提供してくださった村上浩士博士、5FLAG タグ付加のためのプラスミド DNA を提供してくださった野口英史博士のご厚意に感謝いたします。抗 Fzr1 抗体を提供してくださり、また多くの有益な助言を与えてくださった、山野博之博士に感謝いたします。

本研究室の佐藤政充博士、山下朗博士、大坪瑤子博士をはじめとして、多くの有益な助言を与えてくださり、楽しい研究環境を作ってくださった、本研究室の皆様の有形無形の恩恵に感謝いたします。また、研究場所をかずさ DNA 研究所に移してから東大の指導教員として本研究を支えてくださった飯野雄一先生に感謝いたします。

そしてなによりも、本研究を全面的に支えてくださり、国内外を問わず研究発表の場を与えてくださり、またいろいろな場面で適切な助言と指導を与えてくださった、山本正幸先生に感謝いたします。

最後に、長い大学院生活を支えてくれた家族と、研究に対する活力を与えてくれた若い友人たちに感謝いたします。

## 参考文献

1. Pines, J. (2011). Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 427–438.
2. Rudner, A. D., and Murray, A. W. (2000). Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex. *J Cell Biol* 149, 1377–1390.
3. Kraft, C., Herzog, F., Gieffers, C., Mechtler, K., Hagting, A., Pines, J., and Peters, J.-M. (2003). Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation. *EMBO J* 22, 6598–6609.
4. Shteinberg, M., Protopopov, Y., Listovsky, T., Brandeis, M., and Herskho, A. (1999). Phosphorylation of the cyclosome is required for its stimulation by Fizzy/cdc20. *Biochem Biophys Res Commun* 260, 193–198.
5. Rudner, A. D., Hardwick, K. G., and Murray, A. W. (2000). Cdc28 activates exit from mitosis in budding yeast. *J Cell Biol* 149, 1361–1376.
6. Cross, F. R. (2003). Two redundant oscillatory mechanisms in the yeast cell cycle. *Dev Cell* 4, 741–752.
7. Manchado, E., Guillaumot, M., de Cárcer, G., Eguren, M., Trickey, M., García-Higuera, I., Moreno, S., Yamano, H., Cañamero, M., and Malumbres, M. (2010). Targeting mitotic exit leads to tumor regression in vivo: Modulation by Cdk1, Mastl, and the PP2A/B55 $\alpha,\delta$  phosphatase. *Cancer Cell* 18, 641–654.
8. Li, M., York, J. P., and Zhang, P. (2007). Loss of Cdc20 causes a securin-dependent metaphase arrest in two-cell mouse embryos. *Mol Cell Biol* 27, 3481–3488.
9. Huang, H.-C., Shi, J., Orth, J. D., and Mitchison, T. J. (2009). Evidence that mitotic exit is a better cancer therapeutic target than spindle assembly. *Cancer Cell* 16, 347–358.
10. Wolthuis, R., Clay-Farrace, L., van Zon, W., Yekezare, M., Koop, L., Ogink, J., Medema, R., and Pines, J. (2008). Cdc20 and Cks Direct the Spindle Checkpoint-Independent Destruction of Cyclin A. *Mol Cell* 30, 290–302.

11. Kraft, C., Vodermaier, H. C., Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, F., and Peters, J.-M. (2005). The WD40 propeller domain of Cdh1 functions as a destruction box receptor for APC/C substrates. *Mol Cell* *18*, 543–553.
12. Hagting, A., Elzen, den, N., Vodermaier, H. C., Waizenegger, I. C., Peters, J.-M., and Pines, J. (2002). Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1. *J Cell Biol* *157*, 1125–1137.
13. Floyd, S., Pines, J., and Lindon, C. (2008). APC/C Cdh1 targets aurora kinase to control reorganization of the mitotic spindle at anaphase. *Curr Biol* *18*, 1649–1658.
14. Sigrist, S. J., and Lehner, C. F. (1997). *Drosophila* fizzy-related down-regulates mitotic cyclins and is required for cell proliferation arrest and entry into endocycles. *Cell* *90*, 671–681.
15. Schwab, M., Lutum, A. S., and Seufert, W. (1997). Yeast Hct1 is a regulator of Clb2 cyclin proteolysis. *Cell* *90*, 683–693.
16. Visintin, R., Prinz, S., and Amon, A. (1997). CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. *Science* *278*, 460–463.
17. Matsumoto, T. (1997). A fission yeast homolog of CDC20/p55CDC/Fizzy is required for recovery from DNA damage and genetically interacts with p34cdc2. *Mol Cell Biol* *17*, 742–750.
18. Kitamura, K., Maekawa, H., and Shimoda, C. (1998). Fission yeast Ste9, a homolog of Hct1/Cdh1 and Fizzy-related, is a novel negative regulator of cell cycle progression during G1-phase. *Mol Biol Cell* *9*, 1065–1080.
19. Shimoda, C., Hirata, A., Kishida, M., Hashida, T., and Tanaka, K. (1985). Characterization of meiosis-deficient mutants by electron microscopy and mapping of four essential genes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* *200*, 252–257.
20. 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.

21. Kimata, Y., Trickey, M., Izawa, D., Gannon, J., Yamamoto, M., and Yamano, H. (2008). A Mutual Inhibition between APC/C and Its Substrate Mes1 Required for Meiotic Progression in Fission Yeast. *Dev Cell* 14, 446–454.
22. Blanco, M. A., Pelloquin, L., and Moreno, S. (2001). Fission yeast mfr1 activates APC and coordinates meiotic nuclear division with sporulation. *J Cell Sci* 114, 2135–2143.
23. Asakawa, H., Kitamura, K., and Shimoda, C. (2001). A novel Cdc20-related WD-repeat protein, Fzr1, is required for spore formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Genet Genomics* 265, 424–435.
24. Kimata, Y., Kitamura, K., Fenner, N., and Yamano, H. (2011). Mes1 controls the meiosis I to meiosis II transition by distinctly regulating the anaphase-promoting complex/cyclosome coactivators Fzr1/Mfr1 and Slp1 in fission yeast. *Mol Biol Cell* 22, 1486–1494.
25. 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. *Dev Biol* 303, 157–164.
26. Madgwick, S., Hansen, D. V., Levasseur, M., Jackson, P. K., and Jones, K. T. (2006). Mouse Emi2 is required to enter meiosis II by reestablishing cyclin B1 during interkinesis. *J Cell Biol* 174, 791–801.
27. Furuno, N., Nishizawa, M., Okazaki, K., Tanaka, H., Iwashita, J., Nakajo, N., Ogawa, Y., and Sagata, N. (1994). Suppression of DNA replication via Mos function during meiotic divisions in *Xenopus* oocytes. *EMBO J* 13, 2399–2410.
28. Gross, S. D., Schwab, M. S., Taieb, F. E., Lewellyn, A. L., Qian, Y. W., and Maller, J. L. (2000). The critical role of the MAP kinase pathway in meiosis II in *Xenopus* oocytes is mediated by p90(Rsk). *Curr Biol* 10, 430–438.
29. Perez, L. H., Antonio, C., Flament, S., Vernos, I., and Nebreda, A. R. (2002). Xkid chromokinesin is required for the meiosis I to meiosis II transition in *Xenopus laevis* oocytes. *Nat Cell Biol* 4, 737–742.

30. Iwabuchi, M., Ohsumi, K., Yamamoto, T. M., Sawada, W., and Kishimoto, T. (2000). Residual Cdc2 activity remaining at meiosis I exit is essential for meiotic M-M transition in *Xenopus* oocyte extracts. *EMBO J* 19, 4513–4523.
31. 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.
32. Iwata, E., Ikeda, S., Matsunaga, S., Kurata, M., Yoshioka, Y., Criqui, M.-C., Genschik, P., and Ito, M. (2011). GIGAS CELL1, a novel negative regulator of the anaphase-promoting complex/cyclosome, is required for proper mitotic progression and cell fate determination in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23, 4382–4393.
33. Cooper, K. F., Mallory, M. J., Egeland, D. B., Jarnik, M., and Strich, R. (2000). Ama1p is a meiosis-specific regulator of the anaphase promoting complex/cyclosome in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14548–14553.
34. Aoi, Y. (2010). 修士論文 (東京大学大学院理学系研究科).
35. Anders, A., Watt, S., Bähler, J., and Sawin, K. E. (2008). Improved tools for efficient mapping of fission yeast genes: identification of microtubule nucleation modifier mod22-1 as an allele of chromatin-remodelling factor gene swr1. *Yeast* 25, 913–925.
36. Ioannoni, R., Beaudoin, J., López-Maury, L., Codlin, S., Bähler, J., and Labbé, S. (2012). Cuf2 Is a Novel Meiosis-Specific Regulatory Factor of Meiosis Maturation. *PLoS One* 7, e36338.
37. Yamamoto, A., Kitamura, K., Hihara, D., Hirose, Y., Katsuyama, S., and Hiraoka, Y. (2008). Spindle checkpoint activation at meiosis I advances anaphase II onset via meiosis-specific APC/C regulation. *J Cell Biol* 182, 277–288.
38. Vainberg, I. E., Lewis, S. A., Rommelaere, H., Ampe, C., Vandekerckhove, J., Klein, H. L., and Cowan, N. J. (1998). Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin. *Cell* 93, 863–873.

39. Geissler, S., Siegers, K., and Schiebel, E. (1998). A novel protein complex promoting formation of functional alpha- and gamma-tubulin. *EMBO J* 17, 952–966.
40. Hansen, W. J., Cowan, N. J., and Welch, W. J. (1999). Prefoldin-nascent chain complexes in the folding of cytoskeletal proteins. *J Cell Biol* 145, 265–277.
41. Camasses, A., Bogdanova, A., Shevchenko, A., and Zachariae, W. (2003). The CCT chaperonin promotes activation of the anaphase-promoting complex through the generation of functional Cdc20. *Mol Cell* 12, 87–100.
42. Sullivan, M., and Morgan, D. O. (2007). Finishing mitosis, one step at a time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 894–903.
43. Funabiki, H., Yamano, H., Kumada, K., Nagao, K., Hunt, T., and Yanagida, M. (1996). Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast. *Nature* 381, 438–441.
44. Farrell, R. A., Thorvaldsen, J. L., and Winge, D. R. (1996). Identification of the Zn(II) site in the copper-responsive yeast transcription factor, AMT1: a conserved Zn module. *Biochemistry* 35, 1571–1580.
45. Turner, R. B., Smith, D. L., Zawrotny, M. E., Summers, M. F., Posewitz, M. C., and Winge, D. R. (1998). Solution structure of a zinc domain conserved in yeast copper-regulated transcription factors. *Nat Struct Biol* 5, 551–555.
46. Matsumoto, T., Tanaka, T., Sakai, H., Amano, N., Kanamori, H., Kurita, K., Kikuta, A., Kamiya, K., Yamamoto, M., Ikawa, H., et al. (2011). Comprehensive sequence analysis of 24,783 barley full-length cDNAs derived from 12 clone libraries. *Plant Physiol* 156, 20–28.
47. Asakawa, H., Kojidani, T., Mori, C., Osakada, H., Sato, M., Ding, D.-Q., Hiraoka, Y., and Haraguchi, T. (2010). Virtual breakdown of the nuclear envelope in fission yeast meiosis. *Curr Biol* 20, 1919–1925.
48. Arai, K., Sato, M., Tanaka, K., and Yamamoto, M. (2010). Nuclear Compartmentalization Is Abolished during Fission Yeast Meiosis. *Curr Biol* 20, 1913–1918.
49. Mata, J., Lyne, R., Burns, G., and Bähler, J. (2002). The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nat Genet* 32, 143–147.

50. Kakui, Y., Sato, M., Tanaka, K., and Yamamoto, M. (2011). A novel fission yeast *mei4* mutant that allows efficient synchronization of telomere dispersal and the first meiotic division. *Yeast* 28, 467–479.
51. Funaya, C., Samarasinghe, S., Pruggnaller, S., Ohta, M., Connolly, Y., Müller, J., Murakami, H., Grallert, A., Yamamoto, M., Smith, D., et al. (2012). Transient structure associated with the spindle pole body directs meiotic microtubule reorganization in *S. pombe*. *Curr Biol* 22, 562–574.
52. Gould, K. L., and Nurse, P. (1989). Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2+* protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* 342, 39–45.
53. West, R. R., Vaisberg, E. V., Ding, R., Nurse, P., and McIntosh, J. R. (1998). *cut11(+)*: A gene required for cell cycle-dependent spindle pole body anchoring in the nuclear envelope and bipolar spindle formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 9, 2839–2855.
54. Moreno, S., and Klar, A. (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol*
55. Sherman, F., Fink, G. R., and Hicks, J. B. (1986). *Methods in yeast genetics* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory).
56. Kimura, M., Kamakura, T., Tao, Q. Z., Kaneko, I., and Yamaguchi, I. (1994). Cloning of the blasticidin S deaminase gene (BSD) from *Aspergillus terreus* and its use as a selectable marker for *Schizosaccharomyces pombe* and *Pyricularia oryzae*. *Mol Gen Genet* 242, 121–129.
57. Sato, M., Dhut, S., and Toda, T. (2005). New drug-resistant cassettes for gene disruption and epitope tagging in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 22, 583–591.
58. Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning* third edition. (CSHL Press).
59. Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23–28.
60. Gutz, H., Heslot, H., Leupold, U., and Loprieno, N. (1974). *Handbook of Genetics* R. C. King, ed. (New York: Plenum).

61. Okazaki, K., Okazaki, N., Kume, K., Jinno, S., Tanaka, K., and Okayama, H. (1990). High-frequency transformation method and library transducing vectors for cloning mammalian cDNAs by trans-complementation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* 18, 6485–6489.
62. Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., McLeod, M., and Warbrick, E. (1993). Experiments with fission yeast: A laboratory course manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
63. Bahler, J., Wu, J. Q., Longtine, M. S., Shah, N. G., McKenzie, A., Steever, A. B., Wach, A., Philippsen, P., and Pringle, J. R. (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 14, 943–951.
64. Sato, M., Toya, M., and Toda, T. (2009). Visualization of fluorescence-tagged proteins in fission yeast: the analysis of mitotic spindle dynamics using GFP-tubulin under the native promoter. *Methods Mol Biol* 545, 185–203.
65. Noguchi, C., Garabedian, M. V., Malik, M., and Noguchi, E. (2008). A vector system for genomic FLAG epitope-tagging in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biotechnol J* 3, 1280–1285.
66. Maundrell, K. (1993). Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* 123, 127–130.
67. Harigaya, Y., Tanaka, H., Yamanaka, S., Tanaka, K., Watanabe, Y., Tsutsumi, C., Chikashige, Y., Hiraoka, Y., Yamashita, A., and Yamamoto, M. (2006). Selective elimination of messenger RNA prevents an incidence of untimely meiosis. *Nature* 442, 45–50.
68. Yamashita, A., Shichino, Y., Tanaka, H., Hiriart, E., Touat-Todeschini, L., Vavasseur, A., Ding, D. Q., Hiraoka, Y., Verdel, A., and Yamamoto, M. (2012). Hexanucleotide motifs mediate recruitment of the RNA elimination machinery to silent meiotic genes. *Open Biol* 2, 120014–120014.
69. Thompson, J. (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25, 4876–4882.

70. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–2948.
71. Collart, M. A., and Oliviero, S. (2001). Preparation of Yeast RNA. *Curr Protoc Mol Biol Chapter 13*, Unit13.12.
72. Takahashi, K. (2000). Application of the Chromatin Immunoprecipitation Method to Identify in Vivo Protein-DNA Associations in Fission Yeast. *Sci STKE* 2000, p11.
73. Yokobayashi, S., Yamamoto, M., and Watanabe, Y. (2003). Cohesins Determine the Attachment Manner of Kinetochores to Spindle Microtubules at Meiosis I in Fission Yeast. *Mol Cell Biol* 23, 3965–3973.
74. López-Avilés, S., Kapuy, O., Novak, B., and Uhlmann, F. (2009). Irreversibility of mitotic exit is the consequence of systems-level feedback. *Nature* 459, 592–595.
75. Zachariae, W., Schwab, M., Nasmyth, K., and Seufert, W. (1998). Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science* 282, 1721–1724.
76. Jaspersen, S. L., Charles, J. F., and Morgan, D. O. (1999). Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Curr Biol* 9, 227–236.
77. Yeong, F. M., Lim, H. H., Padmashree, C. G., and Surana, U. (2000). Exit from mitosis in budding yeast: biphasic inactivation of the Cdc28-Clb2 mitotic kinase and the role of Cdc20. *Mol Cell* 5, 501–511.
78. Visintin, R., Craig, K., Hwang, E. S., Prinz, S., Tyers, M., and Amon, A. (1998). The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol Cell* 2, 709–718.
79. Novak, B., Tyson, J. J., Gyorffy, B., and Csikász-Nagy, A. (2007). Irreversible cell-cycle transitions are due to systems-level feedback. *Nat Cell Biol* 9, 724–728.

80. Reynolds, D., Shi, B. J., McLean, C., Katsis, F., Kemp, B., and Dalton, S. (2003). Recruitment of Thr 319-phosphorylated Ndd1p to the FHA domain of Fkh2p requires Clb kinase activity: a mechanism for CLB cluster gene activation. *Genes Dev* *17*, 1789–1802.
81. Pic-Taylor, A., Darieva, Z., Morgan, B. A., and Sharrocks, A. D. (2004). Regulation of Cell Cycle-Specific Gene Expression through Cyclin-Dependent Kinase-Mediated Phosphorylation of the Forkhead Transcription Factor Fkh2p. *Mol Cell Biol* *24*, 10036–10046.
82. Blanco, M. A., Sánchez-Díaz, A., de Prada, J. M., and Moreno, S. (2000). APC(ste9/srw1) promotes degradation of mitotic cyclins in G(1) and is inhibited by cdc2 phosphorylation. *EMBO J* *19*, 3945–3955.
83. Yamaguchi, S., Okayama, H., and Nurse, P. (2000). Fission yeast Fizzy-related protein srw1p is a G(1)-specific promoter of mitotic cyclin B degradation. *EMBO J* *19*, 3968–3977.
84. Sánchez-Díaz, A., González, I., Arellano, M., and Moreno, S. (1998). The Cdk inhibitors p25rum1 and p40SIC1 are functional homologues that play similar roles in the regulation of the cell cycle in fission and budding yeast. *J Cell Sci* *111 ( Pt 6)*, 843–851.
85. Moreno, S., and Nurse, P. (1994). Regulation of progression through the G1 phase of the cell cycle by the rum1+ gene. *Nature* *367*, 236–242.
86. Benito, J., Martín-Castellanos, C., and Moreno, S. (1998). Regulation of the G1 phase of the cell cycle by periodic stabilization and degradation of the p25rum1 CDK inhibitor. *EMBO J* *17*, 482–497.
87. Kominami, K., and Toda, T. (1997). Fission yeast WD-repeat protein pop1 regulates genome ploidy through ubiquitin-proteasome-mediated degradation of the CDK inhibitor Rum1 and the S-phase initiator Cdc18. *Genes Dev* *11*, 1548–1560.
88. Kominami, K., Ochotorena, I., and Toda, T. (1998). Two F-box/WD-repeat proteins Pop1 and Pop2 form hetero- and homo-complexes together with cullin-1 in the fission yeast SCF (Skp1-Cullin-1-F-box) ubiquitin ligase. *Genes Cells* *3*, 721–735.
89. Daga, R. R., Bolaños, P., and Moreno, S. (2003). Regulated mRNA Stability of the Cdk Inhibitor Rum1 Links Nutrient Status to Cell Cycle Progression. *Curr Biol* *13*, 2015–2024.

90. Rustici, G., Mata, J., Kivinen, K., Lió, P., Penkett, C. J., Burns, G., Hayles, J., Brazma, A., Nurse, P., and Bähler, J. (2004). Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle. *Nat Genet* 36, 809–817.
91. Kubiak, J. Z. (1989). Mouse oocytes gradually develop the capacity for activation during the metaphase II arrest. *Dev Biol* 136, 537–545.
92. Ross, K. J., Fransz, P., Armstrong, S. J., Vizir, I., Mulligan, B., Franklin, F. C., and Jones, G. H. (1997). Cytological characterization of four meiotic mutants of *Arabidopsis* isolated from T-DNA-transformed lines. *Chromosome Res* 5, 551–559.
93. Dumollard, R., Levasseur, M., Hebras, C., Huitorel, P., Carroll, M., Chambon, J. P., and McDougall, A. (2011). Mos limits the number of meiotic divisions in urochordate eggs. *Development* 138, 885–895.
94. Li, G.-P., Liu, Y., Bunch, T. D., White, K. L., and Aston, K. I. (2005). Asymmetric division of spindle microtubules and microfilaments during bovine meiosis from metaphase I to metaphase III. *Mol Reprod Dev* 71, 220–226.
95. Verlhac, M. H., Kubiak, J. Z., Weber, M., Géraud, G., Colledge, W. H., Evans, M. J., and Maro, B. (1996). Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Development* 122, 815–822.
96. Araki, K., Naito, K., Haraguchi, S., Suzuki, R., Yokoyama, M., Inoue, M., Aizawa, S., Toyoda, Y., and Sato, E. (1996). Meiotic abnormalities of c-mos knockout mouse oocytes: activation after first meiosis or entrance into third meiotic metaphase. *Biol Reprod* 55, 1315–1324.
97. Nishiyama, T., Ohsumi, K., and Kishimoto, T. (2007). Phosphorylation of Erp1 by p90rsk is required for cytosolic factor arrest in *Xenopus laevis* eggs. *Nature* 446, 1096–1099.
98. Inoue, D., Ohe, M., Kanemori, Y., Nobui, T., and Sagata, N. (2007). A direct link of the Mos–MAPK pathway to Erp1/Emi2 in meiotic arrest of *Xenopus laevis* eggs. *Nature* 446, 1100–1104.