

学位論文

分裂酵母の RNA 結合タンパク質 Spo5 による
減数分裂特異的な MPF 活性制御機構の解析

(An RNA-binding protein Spo5 regulates
the MPF activity during meiosis in fission yeast)

平成 23 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

新 真由美

Abstract

減数分裂では、一度の DNA 複製に続いて二度の核分裂が起こり、半数性の配偶子が産生される。第二分裂が開始するためには、第一分裂終了の際に減少する分裂期促進因子 (M-phase promoting factor : MPF) の活性が、完全には消失せずに維持されねばならない。分裂酵母ではこれまでに、第二分裂開始のための MPF 活性制御因子として、Mes1 (*meiosis second defective*) タンパク質の機能が詳しく解析されてきた。この時期に特異的な制御機構のより詳細な解明を目指し、新規 *mes* 変異体の単離を目的としたスクリーニングを行ったところ、複数の *spo5* 遺伝子変異体が単離された。Spo5 は、分裂酵母の減数分裂特異的に発現する RNA 結合タンパク質であり、これまでも第二分裂の進行への関与が示唆されていた。しかし、その詳細な機能については未だ不明な点が多い因子であった。その後の解析から、Spo5 が MPF 活性調節を介して、減数第二分裂の進行制御に関与している可能性が見出された。*spo5* 変異株では、MPF の活性調節サブユニットであるサイクリン Cdc13 の量が、第二分裂の際に低下していることが分かった。一部の細胞では、減数第一分裂の終了時に Cdc13 が細胞内から消失し、減数分裂を停止する様子が見られた。また、CDK 活性亢進型変異の導入によって、*spo5* 変異株の示す第二分裂の進行異常を部分的に抑圧できることが分かった。これらのことから、*spo5* 変異株に見られる減数分裂の停止は、CDK 活性の低下に起因すると考えられた。そこで、不可逆的な光変換蛍光タンパク質である Dendra を用いて解析を行ったところ、*spo5* 変異株では Cdc13 の合成速度が野生型よりも低い可能性が示唆された。また、ノザンプロッティングおよび定量 RT-PCR 解析から、*spo5* 変異株では、*cdc13* mRNA の減数分裂時の発現

パターンが、野生型に比べて変動に乏しいことが分かった。このことから、正常な減数分裂の進行には極めて厳密な *cdc13* mRNA の発現量の調節を要する可能性が考えられる。また、*spo5* 変異株では Cdc13 の他に、Cdr2 や Cig2 など複数の CDK 活性調節因子が、野生型に比べて減数分裂の早い段階での細胞内から消失する様子が観察された。従って、Spo5 は複数の遺伝子の発現制御を介して細胞内の各タンパク質の量を調節し、減数分裂に特異的な連続した分裂を補助する役割を担っている可能性が考えられる。

Abstract

Meiosis consists of two consecutive nuclear divisions without DNA replication between them. Cells have to prevent complete loss of the M-phase promoting factor (MPF) activity at the MI/MII transition to ensure MII entry. In fission yeast, *Mes1* is known to facilitate the maintenance of the MPF activity at this transition by blocking degradation of cyclin. However, much remains unclear about the regulation of MII progression. To obtain further insight into the regulatory mechanisms of MII progression, we performed a genetic screen for novel MII mutants. By screening 500,000 nitrosoguanidine-mutagenized colonies, we isolated 17 MII-deficient mutants (>50% cells arrested at the binucleate stage in meiosis), 15 of which were *spo5*. *Spo5* is an RNA-binding protein known to be involved in MII regulation, but its molecular function remains elusive. We analyzed the *spo5* mutants and found that the B-type cyclin *Cdc13* was degraded at an earlier stage of meiosis in them than in the wild-type. In addition, the MII defect of the *spo5* mutants was partially suppressed by the introduction of active MPF. Moreover, a mutation in *wee1*, a negative regulator of CDK, partially suppressed the MII defect of the *spo5* mutants. These results suggest that the MPF activity is lowered in the *spo5* mutants. A fluorescence signal assay using *Cdc13-Dendra*, a photoconvertible fluorescent protein, indicated that de novo synthesis of *Cdc13* was lower in *spo5* than in the wild-type. Therefore, it is presumable that *Spo5* is involved in regulation of the MPF activity through controlling the expression of *Cdc13*.

目次

Abstract	1
序論	6
結果	16
【第1章 新規 <i>mes</i> 変異体のスクリーニング】	16
1-1. <u>新規 <i>mes</i> 変異体のスクリーニング</u>	16
1-2. <u>変異遺伝子の同定</u>	17
【第2章 <i>spo5</i> 変異体の表現型の解析】	21
2-1. <u>Spo5 タンパク質の機能領域の解析</u>	21
2-2. <u><i>spo5</i> 変異体の示す第二分裂異常と MPF 活性との関与</u>	24
2-3. <u>CDK 活性亢進型変異による <i>spo5</i> 変異体の第二分裂進行異常の抑 <u>圧</u></u>	28
【第3章 Spo5 による Cdc13 タンパク質の発現調節機構の解析】	31
3-1. <u>核内に蓄積した Cdc13 は比較的安定である</u>	31
3-2. <u>光変換蛍光タンパク質 Dendra を用いた Cdc13 タンパク質の量の <u>比較</u></u>	32
3-3. <u>第二分裂開始の際には Cdc13 タンパク質が新規に合成される</u>	35
【第4章 <i>spo5</i> 変異体における <i>cdc13</i> mRNA の発現の解析】	37
4-1. <u>野生型株および <i>spo5</i> 変異体での <i>cdc13</i> mRNA の発現量の比較</u>	37
4-2. <u>野生型および <i>spo5</i> 変異体におけるレポーター遺伝子の発現比較</u>	39

【第 5 章 <i>spo5</i> 変異体における他の CDK 活性調節因子の局在変化】	42
考察	46
結論	49
材料と方法	51
参考文献	67
謝辞	78

序論

細胞分裂の進行は、親細胞の持つ遺伝情報を正確に子孫に伝えるために厳密に制御されている。遺伝情報を担う DNA は、S 期の中に複製されて倍加し、G2 期を挟んで M 期に有糸分裂が起こることで、2 つの娘細胞へと等量ずつ分配される。細胞には、一回の分裂の周期で二度の DNA 合成が起こることを防ぐ機構が備わっており、子孫に受け継がれる DNA の量は常に一定である(Blow, 1993; Blow and Dutta, 2005)。また、チェックポイントと呼ばれる機構が、DNA に損傷が存在しないか、複製が正常に進行しているか、染色体の分配が正しく行われているかを監視し、異常な細胞分裂が起こるのを防いでいる(Elledge, 1996; Sherr, 1996)。この DNA の倍加から分配へと続く一連の過程は不可逆的であり、進行の鍵を握る因子群のダイナミックな発現変動によって、一方向的な進行が保証されている(Reed, 2003)

真核生物は、体細胞分裂と減数分裂の 2 つの様式の細胞分裂を行う (図 1)。体細胞分裂は増殖のための分裂であり、S 期と M 期が一度ずつ交互に起こり、常に親細胞と同量の DNA を含む娘細胞が産生される (図 1 左)。一方、減数分裂は、有性生殖を行う真核生物に見られる細胞分裂様式である。減数分裂では、一度の DNA 複製の後に二度の連続した核分裂が続き、半数性の配偶子が産生される (図 1 右)。この S 期を挟まない連続した核分裂が、体細胞分裂との最も大きな相違点の一つである。2 つの半数性の配偶子が融合すると、親の細胞と同量の DNA を持った接合子となり、接合子は体細胞分裂を繰り返して増殖する。減数分裂の異常は、異数性の配偶子を産み出す原因となり、子孫の生存に甚大な影響を及ぼす。胎生致死や不妊、ダウン症などの先天性疾患は減数分裂の異常

に起因することが既に知られている。すなわち、正常な減数分裂は種の存続のために極めて重要な過程であり、その詳細な制御機構の解明は、上記のような先天性疾患の研究や、不妊治療への応用が期待される。

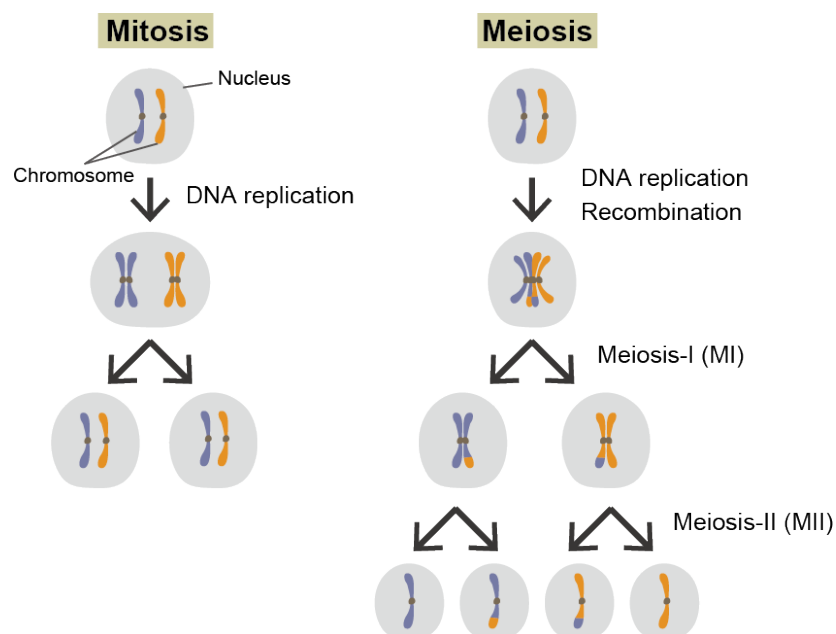


図 1. 細胞分裂の二種類の様式

体細胞分裂（左）では一度の DNA 複製と染色体分配が交互に繰り返すが、減数分裂（右）では一度の DNA 複製の後に二度の染色体分配が続き、DNA 量の半減した娘細胞を生じる。

本研究で用いた分裂酵母 (*Shizosaccharomyces pombe*) には、 h 型と h^+ 型の二種類の接合型がある。増殖に伴って接合型の変化しないヘテロタリック株 (h 株、 h^+ 株) と、増殖中に接合型の変換が起こるホモタリック株 (h^{90} 株) が存在し、ホモタリック株は単一コロニー内での接合が可能である。分裂酵母は通常、

栄養豊富な環境下では一倍体で安定に生育し、体細胞分裂を行って増殖する。環境中の栄養源、特に窒素源の枯渇に応答し、細胞周期を G1 期で停止する。性フェロモンの刺激に応じて異なる接合型の細胞同士が接合し、二倍体となって減数分裂を開始する。接合子は、減数分裂前 DNA 複製を経て、二回の連続した染色体分配を行う。その結果生じた四つの核が、それぞれ前孢子膜および孢子壁に覆われ、一倍体の孢子が形成される (図 2)。

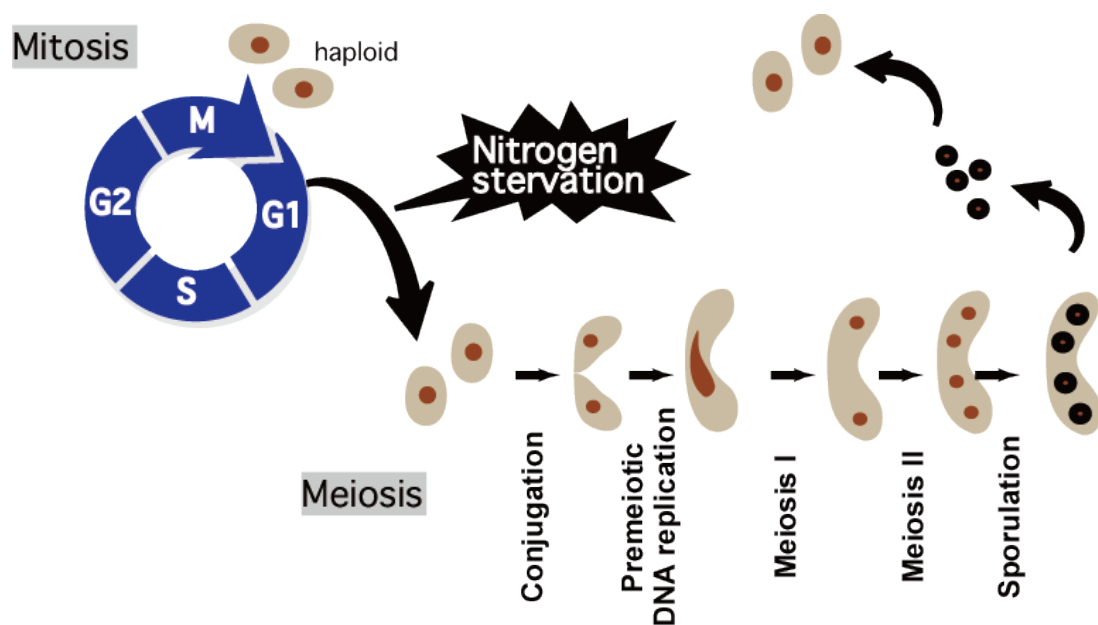


図 2. 分裂酵母の生活環

分裂酵母は通常一倍体で増殖するが、環境中の窒素源が枯渇すると細胞周期を G1 期で停止し、異なる接合型の細胞同士で接合して二倍体となる。減数分裂期前 DNA 形成を経て二回の DNA 分配を行い、四つの一倍体孢子を形成する。

細胞周期の進行には、サイクリン依存の Ser/Thr キナーゼである CDK

(Cyclin-dependent kinase) と、活性化サブユニットのサイクリンとの複合体がマスターレギュレーターとして働く。特に、分裂期の開始と進行を司る CDK1-サイクリン B の複合体は、分裂期促進因子 (M-phase promoting factor: MPF) と呼ばれる。分裂酵母の MPF は、CDK である Cdc2 キナーゼと、サイクリン B である Cdc13 の複合体である。分裂酵母は Cdc13 の他に、Cig1、Cig2、Puc1、Rem1 の 4 つのサイクリン B をもつが、Cdc13 以外のものはいずれも生存には必須でない。MPF は初め、カエルの卵母細胞の G2 期停止を解除し、M 期への移行を促進する卵成熟促進因子 (Maturation promoting factor: MPF) として発見・単離された(Lohka et al., 1988; Masui and Markert, 1971)。その後の研究から、MPF は減数分裂期のみならず、真核生物の分裂期の促進に普遍的に働くことが分かり、分裂期促進因子として再命名された。

MPF 活性はサイクリンとの結合だけでなく、Cdc2 の不活性化型リン酸化によっても調整される。分裂酵母の Cdc2 は、Wee1 キナーゼによる 15 番目のチロシンのリン酸化を受けて不活性化される。分裂期には、Cdc25 フォスファターゼによってこのリン酸化が外され、CDK 活性が上昇する(Russell and Nurse, 1986; Russell and Nurse 1987)。このリン酸化の有無による CDK の活性制御もまた、酵母から哺乳類まで保存された機構である。

Cdc13 の合成と、Cdc25 による Cdc2 の脱リン酸化を受けて MPF が活性化し、核内へと移行して分裂期が開始する。細胞内でスピンドルが形成されて染色体が細胞の中央に並び、両スピンドル極から染色体が並ぶ分裂面へと紡錘糸 (分裂酵母ではスピンドル微小管と呼ばれる構造) が伸長する。全ての染色体が両極からの紡錘糸に捕らえられ、細胞両端への二方向性 (bi-orientation) が確立すると、E3 ユビキチンリガーゼである後期促進複合体 (Anaphase-promoting

complex/Cyclosome: APC/C) が活性化する。APC/C の活性によってサイクリン B とセキュリンがユビキチン化されて、分解へと導かれることで、MPF 活性の低下と染色体分配が起こり、分裂期が終了する(Cerutti and Simanis, 2000; Tanaka, 2002; Zachariae and Nasmyth, 1999)。このように、分裂期の開始と終了はそれぞれ、MPF 活性の上昇と下降という正反対の事象によって制御されている。

減数分裂では、第一分裂を終了するために一旦 MPF 活性が低下しなければならない。しかし、このときに全ての MPF 活性が失われてしまうと、細胞は第二分裂を開始できずに減数分裂を停止し、配偶子の形成も起こらない。分裂酵母では、第一分裂を正常に完了することはできるものの、第二分裂の開始や進行に異常が起こり、2 核の状態が減数分裂を停止する変異体は *mes* (*meiosis second defective*) と呼ばれる。これまでに *mes* 変異体として分類されているものは、Bresch らの行ったスクリーニングにより単離された *mes1* 遺伝子の変異体のみである(Bresch et al., 1968)。 *mes1* 変異体はほぼ完全に第二分裂へ移行できず、大半の細胞が 2 核で停止し、胞子形成能も欠く(Shimoda et al., 1985)。Mes1 タンパク質は約 11 kDa と非常に小さく、減数分裂中の細胞が第一分裂から第二分裂へと移行する際の短期間に、特異的に発現する。Mes1 は、APC/C の標的タンパク質に共通の D-box (Destruction-box) および KEN-box と呼ばれる配列を持ち、APC/C の偽基質として Cdc13 と競合的に分解され、Cdc13 の分解を部分的に阻害する。その結果、第一分裂終了の際に CDK 活性が部分的に維持され、第二分裂の開始が可能となる (図 3) (Izawa et al., 2005; Kimata et al., 2008)。

さらに、減数分裂時の核分裂が 2 度しか起こらないよう制限する機構が存在することが、当研究室で行われた解析により明らかとなってきた(Aoi et al., 2013)。APC/C の活性化因子である Fzr1 (Fizzy-related 1) を欠く株では、減数 “第三分

裂”と思われる核分裂を行う細胞が高頻度に出現する。Fzr1 は、ショウジョウバエの Fizzy タンパク質の分裂酵母ホモログであり、減数第二分裂の時期にのみ特異的に合成される。Fizzy のホモログタンパク質は分裂酵母からマウス、ヒトまで広く保存されており、分裂期の終了を促進する。他の生物においても、APC/C の活性化因子が、減数分裂を第二分裂の後に確実に終了させる役割を果たしている可能性は高い。

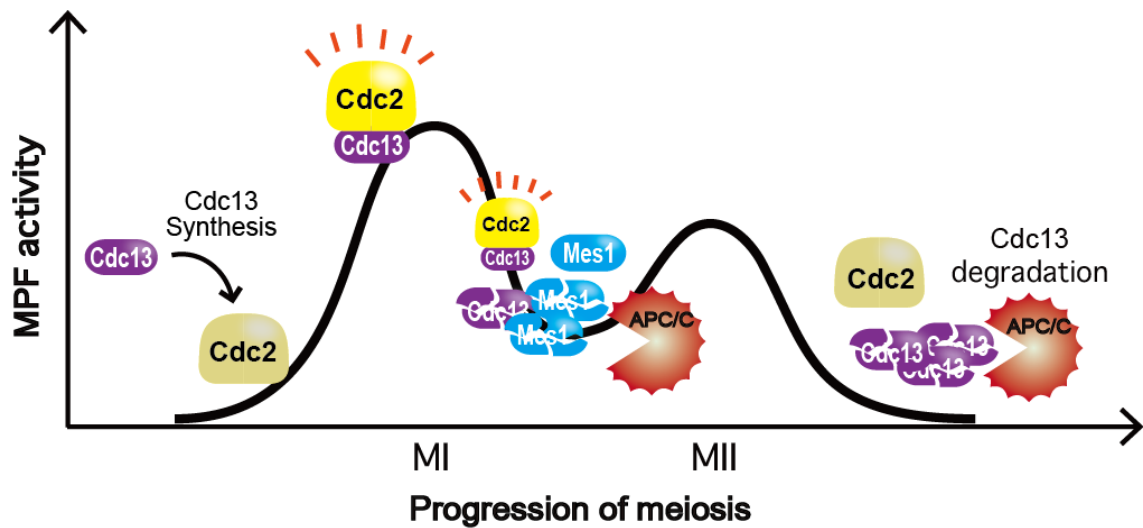


図 3. 分裂酵母の減数分裂期における CDK 活性制御機構

Cdc13 合成の増加に伴って MPF 活性が上昇し、減数第一分裂が開始する。APC/C による Cdc13 の分解が起こり MPF 活性が低下することによって分裂期が終了するが、第一分裂から第二分裂への移行の際には Mes1 タンパク質が発現して APC/C の活性を部分的に阻害し、MPF 活性が完全に失われるのを防ぐ。

高等生物の減数分裂では、アフリカツメガエル卵において、Emi2 タンパク質が、Mes1 と同様に APC/C の活性を部分的に阻害し、第二分裂への移行を保証することが知られている(Ohe et al., 2007; Ohe et al., 2010)。アフリカツメガエルやマウスなどの高等生物の卵母細胞は、減数第二分裂の中期に、分裂を一時停止 (Meta-II 停止) することが知られている。受精刺激を受けて細胞内の Ca^{2+} イオン濃度が急上昇すると、Meta-II 停止が解除され、卵母細胞は減数分裂を完了する。この卵母細胞の Meta-II 停止は、細胞分裂抑制因子 (Cytostatic factor: CSF) (Masui and Markert, 1971) によって維持される。Emi2 は CSF としての働きもよく知られており、第二分裂への移行の促進にも、Meta-II 停止を維持する際にも、

APC/C に直接結合してサイクリン B の分解を抑制する。Emi2 の機能には、Mes1 との共通点が見られるが、互いに配列上の相同性は認められない。また、Emi2 は、第二分裂への移行期および Meta-II 停止期には、p90rsk によってリン酸化されて安定化し、Mes1 とは異なり APC/C による分解は受けない(Inoue et al., 2007; Nishiyama et al., 2007; Wu et al., 2007)。しかし、Mes1 と Emi2 とで、APC/C の活性を阻害するという機能は同様であり、異生物種間で互いに異なるタンパク質が共通の機能を獲得している点は非常に興味深い。マウスの Emi2 オーソログタンパク質も、卵母細胞の CSF としてだけでなく、APC/C 活性の部分的な阻害により、減数第二分裂の開始を促す機能を持つことが知られている(Madgwick et al., 2006; Shoji et al., 2006)。また、アフリカツメガエルの卵母細胞では、第一分裂終了時に Wee1 の活性を人為的に上昇させると、細胞は第二分裂を開始せずに S 期へと移行してしまい、DNA 合成を経て再び分裂期を開始するという結果も報告されている(Iwabuchi et al., 2000)。これらのことから、この時期の CDK 活性維持は正常な減数分裂の進行に必須であることが伺える。すなわち、連続した核分裂を可能にするための制御は、全ての有性生殖生物にとって極めて重要な機構であると考えられる。

分裂酵母における第二分裂の開始と進行の制御に関しては、Mes1 の機能の他に知られていることは非常に少ない。減数第二分裂の制御に関する研究が進展しにくい理由として、機構が複雑であること以外に研究材料となるべき変異体の不足が考えられた。そこで、第二分裂の制御機構をより詳細に解明すべく、新規の第二分裂変異体の単離を目的としたスクリーニングを行ったところ、複数の *spo5* 変異体が単離された。*spo5* 変異体は減数分裂を 2 核の状態で停止する細胞が高頻度に観察されることから、過去にも *mes2-P* 変異体として単離された

ことがあるものの、詳細な解析は行われなかった(Hirata and Shimoda, 1992)。spo5 変異体は第二分裂の進行に異常を生じる。一部の細胞は 4 核の状態まで減数分裂を進行することができるものの、胞子を形成することは出来ない。この胞子形成不能の表現型から、現在は spo (*sporulation defective*) 変異体として分類されている。遺伝子産物である Spo5 タンパク質は、C 末端側に 2 つの RNA 認識配列 (RNA recognition motif: RRM) を持つ RNA 結合タンパク質である。Spo5 は、減数第一分裂の開始直後から第二分裂の終了の時期まで発現し、相同組換えや前胞子膜形成などの制御に関与する可能性が示唆されてきた(Kasama et al., 2006; Kishida and Shimoda, 1986)。しかし、2 つの RRM の役割や直接のターゲット因子など、具体的な機能については未だ多くの不明な点が残されている。先行研究から、Spo5 が減数分裂期の MPF 活性と何らかの関連がある可能性も示唆されていたが、詳細については不明であった。そこで、分裂酵母における新たな減数分裂期の MPF 活性制御機構の解明を目指し、スクリーニングにより得られた変異体や、新たに作製した spo5 変異体の解析を行った。その結果、Spo5 が cdc13 の発現制御に関与することが明らかとなってきた。

減数分裂期におけるサイクリン B の発現制御としては、出芽酵母から高等生物まで、mRNA の安定化と翻訳抑制による制御が起こることが広く知られている。例えば、アフリカツメガエルやマウスの卵形成においては、前述の Meta-II 停止だけでなく、減数第一分裂の前期にも分裂の一時停止が起こる。黄体ホルモンであるプロゲステロンの刺激を受けて卵核胞の崩壊 (Germinal vesicle breakdown: GVBD) が起こるまでの間、サイクリン B の mRNA は、翻訳を抑制された形で安定的に細胞質内に蓄積される。サイクリン B の mRNA は、3' UTR に細胞質ポリアデニル化エレメント (Cytoplasmic polyadenylation element: CPE)

と呼ばれる配列を持ち、これを CPE 結合タンパク質 (CPE-binding protein: CPEB) が認識する。CPEB は、Maskin と eIF4E を介して 5' cap とも結合してリング状の RNA-タンパク質複合体 (Ribonucleoprotein: RNP) を形成し、サイクリン B mRNA の安定化と翻訳の抑制を促す。また、出芽酵母において、RNA 結合タンパク質 Rim4 が、サイクリン B の一つである Clb3 の mRNA の 5' UTR に結合し、第一分裂の間の翻訳を抑制することが知られている (Berchowitz et al., 2013; Carlile and Amon, 2008)。このように、UTR 領域を介した RNP 形成とサイクリン mRNA の安定化は様々な生物種で見られ、翻訳が適切なタイミングで開始されるよう制御する機構に関わると考えられている。本論文で行った解析によって、分裂酵母においても、RNA 結合タンパク質である Spo5 を介したサイクリン B の発現制御が、減数分裂の進行の鍵を握っていることが明らかとなってきた。Spo5 は保存されたタンパク質でなく、上記の CPEB を介した制御との関連性は不明である。しかしながら、Spo5 が RNA 結合タンパク質として Cdc13 の発現制御にどのように関与するのかは、CDK 活性の制御機構の保存性という観点からも、非常に興味深い問題である。

結果

【第1章 新規 *mes* 変異体のスクリーニング】

1-1. 新規 *mes* 変異体のスクリーニング

新規の *mes* 変異体を単離するために、野生型のホモタリック株を薬剤により処理し、ランダムに変異を導入した。それらを孢子形成誘導培地上で培養し、孢子形成不能株の中から、2核で減数分裂を停止する細胞が高頻度に出現する株を単離するスクリーニングを行った。分裂酵母の形成する孢子壁はヨウ素蒸気により染色されるため、孢子形成不能な変異体はヨウ素染色により選別可能である。それらが接合不能な変異体であるのか、あるいは減数分裂の途中で停止し孢子を形成できないのかは実体顕微鏡下で選別可能であるが、後者の場合、減数分裂のどの段階で停止しているか判別するためには各細胞中の核を観察し、分裂の進行状況を知る必要がある。一般的に核観察には固定した細胞の染色体を DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) により染色する方法が用いられる。本研究では、スクリーニングの時間を短縮しながら規模の大きなスクリーニングを行うために、核膜タンパク質の1つである Cut11 に GFP を付加し、細胞の固定と DAPI 染色の手間を省いてより容易に顕微鏡下で減数分裂の進行をモニターすることが可能な株を作成し、スクリーニングに用いた (図 4A)。この *cut11-gfp* 株を変異原であるニトロソグアニジン (1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine) とともに振盪し、ランダムな突然変異を誘導した。孢子形成誘導培地にて培養して減数分裂を誘導し、生じたコロニーから孢子形成不能となったものをヨウ素染色により選別した。約 500,000 コロニーの中から、G1 期停止を経て接合するが、DNA 複製や染色体分配など、接合以降

のいずれかの段階に異常を生じて減数分裂の進行を停止し、孢子形成に至らない変異体を 426 株単離した。得られた株を顕微鏡下で観察し、50%以上の細胞が 2 核で停止する表現型を示す変異体を 17 株単離した (図 5、表 1)。

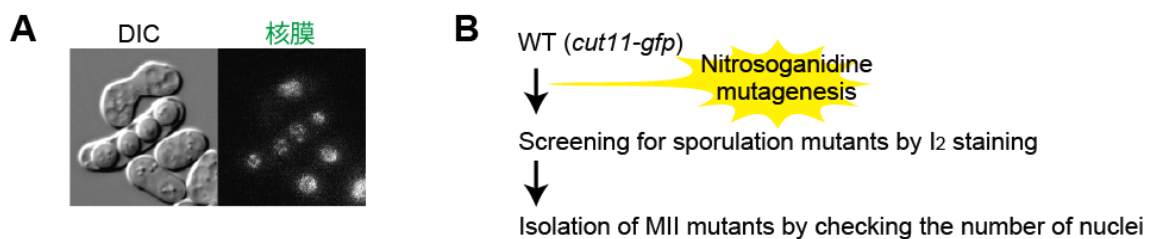


図 4. 新規 *mes* 変異体のスクリーニング

- (A) 減数分裂の進行を容易にモニターするため、核膜タンパク質 Cut11 に GFP を融合させた株を作製し、スクリーニングに用いた。
- (B) Cut11-GFP 株を変異原であるニトロソグアニジンとともに振盪し、ランダムな変異を誘発した。SSA プレート上でコロニーを形成させ、ヨウ素染色により孢子形成不能である株を選択した。それらを顕微鏡下で観察し、2 核で減数分裂を停止している細胞が多く観察される変異体を第二分裂変異体として単離した。

1-2. 変異遺伝子の同定

スクリーニングにより得られた株を互いに掛け合わせ、相補性検定を行ったところ、15 株からなる群 (A 群) と 2 株からなる群 (B 群) の 2 つに分類された。各群からそれぞれ 1 株ずつ選び、cDNA ライブラリおよびゲノム DNA ライブラリを導入して抑圧因子の単離を試みたところ、A 群株の抑圧因子として *spo5* が得られた。Spo5 は分裂酵母の減数分裂特異的に発現し、C 末端側領域に 2 つの RNA 結合モチーフ (RNA recognition motif: RRM) を持つ RNA 結合タンパク

質である (図 5)。 *spo5* 変異株を減数分裂へ誘導すると、第二分裂を進行できず 2 核の状態で停止する細胞が高頻度に観察されるが、一部の細胞は第二分裂に進行し孢子形成を行わず 4 核で停止することから、*spo* (*sporulation defective*) 変異体として分類されている (Bresch et al., 1968)。過去の報告から第二分裂の進行だけでなく相同組換えや孢子形成への関与が知られている (Kasama et al., 2006) が、詳細な機能については不明な部分が多く残されていた。A 群に分類された 15 株の *spo5* 遺伝子の塩基配列を調べたところ、全ての株が *spo5* 遺伝子の ORF 内またはスプライシング部位に変異を持つことが判明した。これら 15 の *spo5* 変異株を以降 m1~15 と表記し、各変異株の変異の詳細を図 5 および表 1 にまとめて示す。

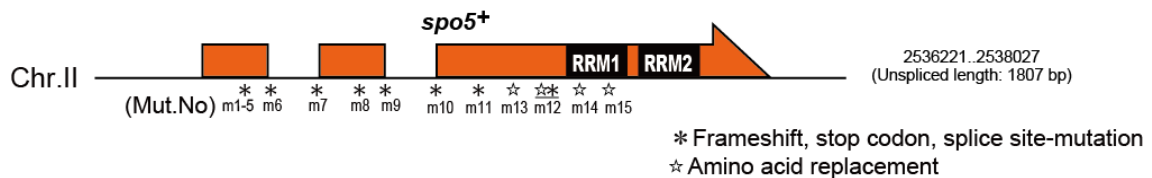


図 5. スクリーニングで単離された *spo5* 変異体

spo5 遺伝子は 3 つの分断されたエキソンによってコードされており、3 番目のエキソンには 2 つの RNA 結合モチーフがコードされている。

表 1. スクリーニングで単離された *spo5* 変異体の変異箇所

Mutant Number	Mutation sites and details
m1 ~ 5	Frameshift at S44
m6	Point mutation in the splicing donor site of the first intron
m7	Point mutation in the splicing acceptor site of the first intron
m8	Point mutation at Q116 (to termination)
m9	Point mutation in the splicing donor site of the second intron
m10	Point mutation in the splicing acceptor site of the second intron
m11	Point mutation at Q209 (to termination)
m12	Point mutation at G265 (to D) and frameshift at S287
m13	Point mutation at G235 (to termination)
m14	Point mutation at G302 (to D)
m15	Point mutation at G320 (to D)

得られた変異体の示す減数分裂の異常が、表 1 の変異に由来するものであるか否かを判断するため、変異を含む *spo5* 遺伝子の全長および周辺の配列を PCR により増幅し、形質転換により *spo5* 全長破壊株に導入した。得られた形質転換株は、それぞれの対応するスクリーニングから得た株と同様に第二分裂の進行異常を示し、これらの異常が *spo5* の変異に由来することが確認された。

一方、B 群株では、導入したゲノム DNA ライブラリから多コピーで変異を抑制するプラスミドは得られたものの、含まれる DNA 配列をクローニングすることが出来なかった。そこで、*mes1* や *spo5* 変異体ほど顕著ではないものの、第二分裂の進行異常を示すことが知られている *spo4* 遺伝子の変異体と掛け合わせて相補性検定を行ったところ、互いに相補せず、同一遺伝子の変異であることが

分かった。B 群の 2 株の *spo4* 遺伝子の塩基配列を決定したところ、ORF 内およびスプライシング部位に変異を持っていた。これら 2 株の B 群株についても、上記の *spo5* 変異体と同様に、*spo4* ORF を含む領域を *spo4* 全長破壊株に形質転換し、減数分裂異常が再現されることを確認した。

Spo5 と Spo4 はいずれも第二分裂の進行への関与が示唆されており、且つその詳細な機能の不明な因子であるが、以降は、より顕著な第二分裂異常を示す *spo5* 変異体に的を絞り解析を行った。

【第2章 *spo5* 変異体の表現型の解析】

2-1. *Spo5* タンパク質の機能領域の解析

spo5 遺伝子は3つのエクソンに分断されてコードされており、エクソン3のコードする領域に2つのRRMモチーフを含む(図5)。スクリーニングで得られた変異体のうち、1) エクソン1とエクソン2の間のスプライシング部位に変異を持ち、エクソン1にコードされる領域のみを発現する *spo5-m6*、2) エクソン2とエクソン3の間のスプライシング部位に変異を持ち、エクソン2にコードされる部分までを発現する *spo5-m10*、3) エクソン3でコードされる領域に含まれる265番目のグリシンがグルタミン酸に置換し、直後の287番目のセリンの位置でフレームシフトが起きており、N末端側のRRM(RRM1)の直前までを発現する *spo5-m12*、4) RRM1に一塩基置換が起きている *spo5-m14*、の核数と孢子形成率を計測した(図6A、B)。*spo5-m6*、*m10*、*m12* はいずれも70%程度の細胞が第二分裂へ進行できず2核の状態で停止し、孢子形成も不能であった。この表現型は *spo5* 全長破壊株(*spo5Δ*)とよく似ており、これら3変異体で発現する *Spo5* はほぼ機能を失っていると考えられた。これらの変異体に比べ、*spo5-m14* では4核まで進行する細胞の割合が若干増加し、また僅かに孢子を形成する細胞も見られた。過去の報告から、*Spo5* の機能にはC末端側領域よりもN末端側領域が重要であると考えられてきた(Kasama et al., 2006)が、上記の結果は、*Spo5* の機能にはRRMを含むC末端側の領域が不可欠であることを示唆した。

そこで、N末端側の領域を欠く部分欠損型の変異体を作製し、同様に表現型を観察した(図6A、B)。C末端側のRRM(RRM2)以降のみを発現する *spo5(385-567)* およびRRM1からC末端までを発現する *spo5(297-567)* の示す表現

型は *spo5Δ* のものとよく似ており、多くの細胞が第二分裂進行異常および孢子形成不能を示した。一方、エキソン 3 のコードする全領域を発現する *spo5(192-567)* では約 80% の細胞が第二分裂を行い、孢子形成率も野生型に比べて低いものの、40% 以上の細胞が孢子を形成することが分かった。従って、Spo5 の持つ第二分裂進行および孢子形成に関する機能には、エキソン 3 にコードされる C 末端側の領域が重要であることが分かった。ただし、*spo5(192-567)* の形成する孢子の生存率は野生型のものと遜色無かったものの、野生型の孢子よりも僅かに小さく（周辺長は約 20% 減少。図 6C、D）、正常な孢子形成のために N 末端側の領域も何らかの役割を果たしていると考えられる。Spo5 の N 末端側領域に位置する T29、T55、S59、T63 は発現後にリン酸化を受け、Spo5 タンパク質の分解に関わることが報告されている (Okuzaki et al., 2010)。また、これらをアラニンに置換した非リン酸化型 Spo5 は機能を失うとされており、これを確認するために上記 4 アミノ酸をアラニンに置換した非リン酸化型 Spo5 (Spo5-4A) およびアスパラギン酸に置換したリン酸化模倣型 Spo5 (Spo5-4D) を発現する株を作製した (図 6A、B)。減数分裂の進行および孢子形成率を計測したところ、*spo5-4A* は *spo5Δ* と同様に第二分裂の異常と孢子形成不能を示した。一方、*spo5-4D* は野生型と同程度の減数分裂の正常な進行と孢子形成が可能であった。*spo5(192-567)* が機能を保つことと考え併せると、リン酸化されていない Spo5 の N 末端側領域は、C 末端側領域の持つ第二分裂および孢子形成を促進する機能を阻害している可能性が考えられる。

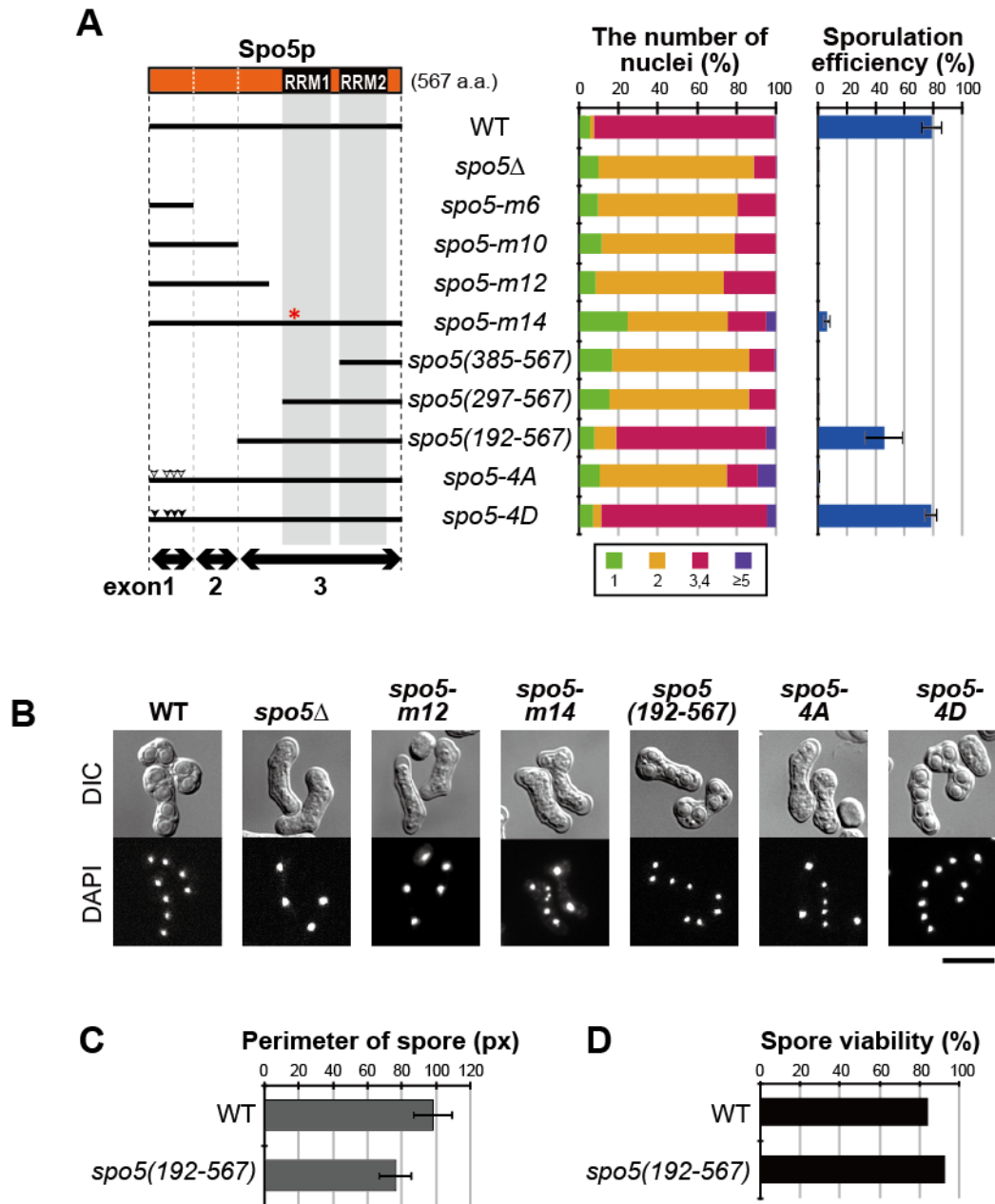


図 6. 各 *spo5* 変異体の減数分裂の進行と胞子形成率

- (A) (B) スクリーニングで単離された一部の *spo5* 変異体 (*spo5-m6*, *spo5-m10*, *spo5-m12*, *spo5-m14*)、N 末端側領域を欠くトランケート型変異体 (*spo5(385-567)*, *spo5(297-567)*, *spo5(192-567)*) および N 末端側領域のリン酸化部位の変異体 (*spo5-4A*, *spo5-4D*) の、核数の割合と胞子形成率を計測し、野生型および *spo5* 全長破壊株 (*spo5Δ*) と比較した。
- (C) *spo5(192-567)* 株の形成する胞子の周辺長を計測したところ、野生型に比べて僅かに短いことが分かった。周辺長の比較には ImageJ(NIH)を用いた。
- (D) *spo5(192-567)* および野生型株の形成した胞子をマイクロマニピュレーションによって分離し、YE 寒天培地で生育させて胞子生存率を測定したところ、両者はほぼ同程度の生存率を示した。スケールバー: 10 μ m。

2-2. *spo5* 変異体の示す第二分裂異常と MPF 活性との関与

分裂酵母の *pat1-114* 温度感受性株は、制限温度下では通常 of 体細胞分裂により増殖するが、環境温度を高温へシフトすると接合型や倍数性、細胞周期に関わらず減数分裂を開始する。この性質を利用し、細胞集団を同調的に減数分裂へと移行させることができ。この系を利用し、減数分裂期における野生型株と *spo5* 変異株との Cdc13 の発現量の推移を比較したウエスタンブロッティング解析から、大きな差は見られなかったという結果が過去に報告されている(Kasama et al., 2006)。当該論文中では、野生型と *spo5* 変異株で Cdc13 の発現の量やパターンに大差は無いものの、*spo5* 変異株では僅かな Cdc13 タンパク質が長時間に渡って細胞内に残留し続ける様子が見られている。この余剰の Cdc13 タンパク質が、*spo5* 変異細胞中で MPF 活性へ何らかの影響を与え、減数分裂に異常を生じると考えられてきた。当実験室で改めて作製した *spo5* 全長破壊株を用いて同様にウエスタンブロッティング解析を試みたところ、過去の報告(Kasama et al., 2006)と同様に、Cdc13 の発現量に大きな差は見られなかった (図 7)。半数性の *h-pat1-114* 株を同調的に減数分裂へと誘導し、1 時間ごとの核数の変化と Cdc13 発現量を野生型株と *spo5Δ* 株とで比較したが大きな差は見られなかった (図 7A)。野生型株で発現量がピークに達する 4 時間目から検出されなくなる 6 時間目までを 15 分ごとに検出したところ、*spo5Δ* 株では野生型株に比べて Cdc13 の減少の開始から消失までにやや時間が掛かっている様子が見られた (図 7B)。過去の報告(Kasama et al., 2006)中では二倍体の細胞を用いているが、半数体の細胞を用いた当実験でも一致する結果となった。なお、この系で *spo5Δ* 株の 3 核以上になった細胞 (第二分裂を遂行した細胞) の割合は図 6A に比べて高くなっているが (図 7A 上)、異なる培地・株を用いて減数分裂への誘導を試みたところ、*spo5Δ*

細胞が第二分裂へと進行する頻度は培養条件によって上下するようであった。以降に示す図中でも、培養の条件によって第二分裂の進行の割合に差が見られる。

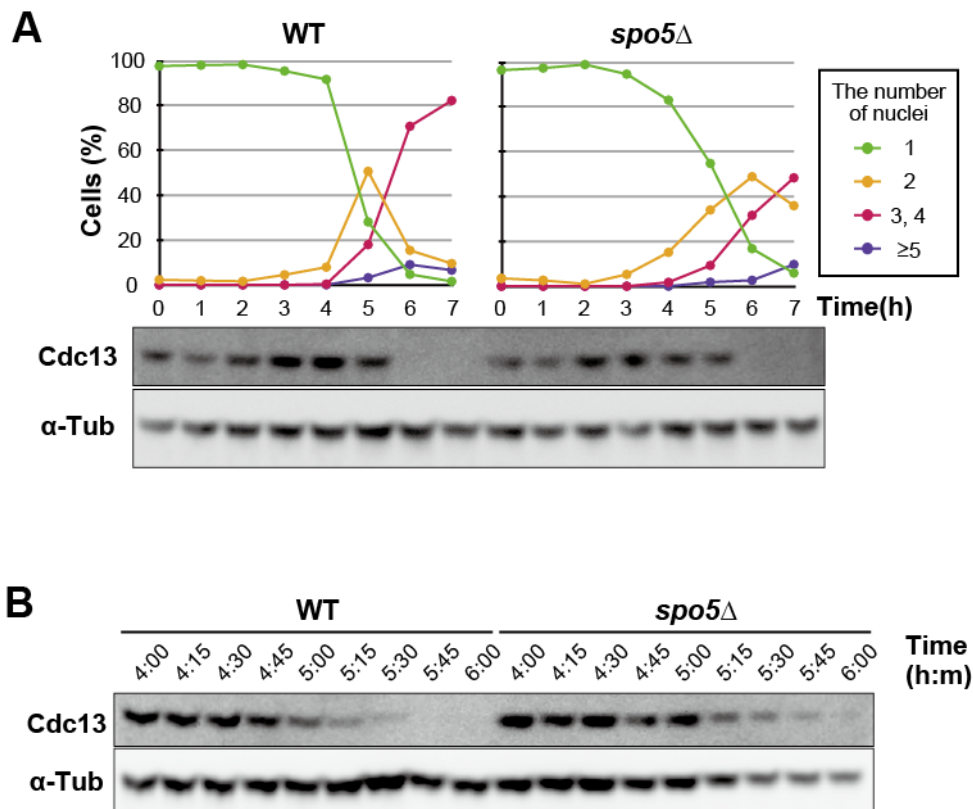


図 7. ウェスタンブロッティングによる減数分裂期の Cdc13 タンパク質の発現量の解析
 (A) *h-pat1-114* 型の WT 株、*spo5Δ* 株を同調的に減数分裂へ誘導し、1 時間ごとの減数分裂の進行と、Cdc13 発現量を比較した。培養温度を 25°C から 34°C へシフト後、1 時間ごとに細胞を回収し、DAPI により核を染色して計数し、減数分裂進行の指標とした (上)。回収した細胞からタンパク質を抽出し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE) にて分離後、ポリフッ化ビニリデン (polyvinylidene fluoride: PVDF) 膜へ転写し、抗 Cdc13 抗体および抗 α -Tubulin 抗体 (コントロール) により検出を行った。
 (B) (A) と同様の系を用いて、温度シフト後 4 時間目から 6 時間目までの細胞を 15 分ごとに回収し、Cdc13 タンパク質の発現量を検出した。

続いて、YFP (Yellow fluorescent protein) を融合した Cdc13 タンパク質を発現する株を作製し、ライブイメージングを用いて一細胞単位での Cdc13 タンパク質の挙動を観察した (図 8)。動物細胞の多くは M 期に核膜が崩壊するが、分裂酵母では M 期にも核膜崩壊が起こらず、合成された Cdc13 は核内に蓄積し、スピンドル極体 (Spindle polar body: SPB) やスピンドル微小管上に強く局在する (図 8A 左、0h:00m、0h:15m)。減数第一分裂から第二分裂へ移行する際には核内の Cdc13 は一旦減少するが (0h:36m)、再び核内に蓄積し、第二分裂が開始する (1h:03m、1h:15m) (Decottignies et al., 2001; Izawa et al., 2005; Yamamoto et al., 2008)。*spo5Δ*では、1) 野生型株のように Cdc13 の再蓄積が起こり第二分裂が進行する細胞 (図 8A 中、*spo5Δ* Cell-1)、2) 第一分裂後期に Cdc13 が減少した後、核内への再蓄積が起こらずに減数分裂を停止したと思われる細胞 (図 8A 右、*spo5Δ* Cell-2) の 2 種類が見られた。核内および細胞内の Cdc13-YFP シグナルを定量したところ、*spo5Δ*細胞のうち Cell-1 のように第二分裂の起こった細胞でも、第二分裂の時期の Cdc13 タンパク質量が野生型株に比べて低い傾向にあることが分かった (図 8B、D)。この結果から、*spo5* 変異体の示す第二分裂の異常は、Cdc13 の発現量低下に伴って MPF 活性が早期に低下することに起因する可能性が示唆された。一方、第一分裂の時期には *spo5Δ*細胞の方が野生型に比べて Cdc13-YFP シグナルが高かった (図 8C、D)。図 7A 上のグラフに示した核数の推移から、*spo5Δ*株では野生型よりも同調性がやや低いことが分かる。また、図 7B から、Cdc13 タンパク質の消失が部分的に遅延することも伺える。これらの結果を併せて考えると、一部の細胞では第一分裂が長時間続き、その間により多くの Cdc13 が細胞内に蓄積し、図 8C、D のような定量結果になった可能性が推察される。

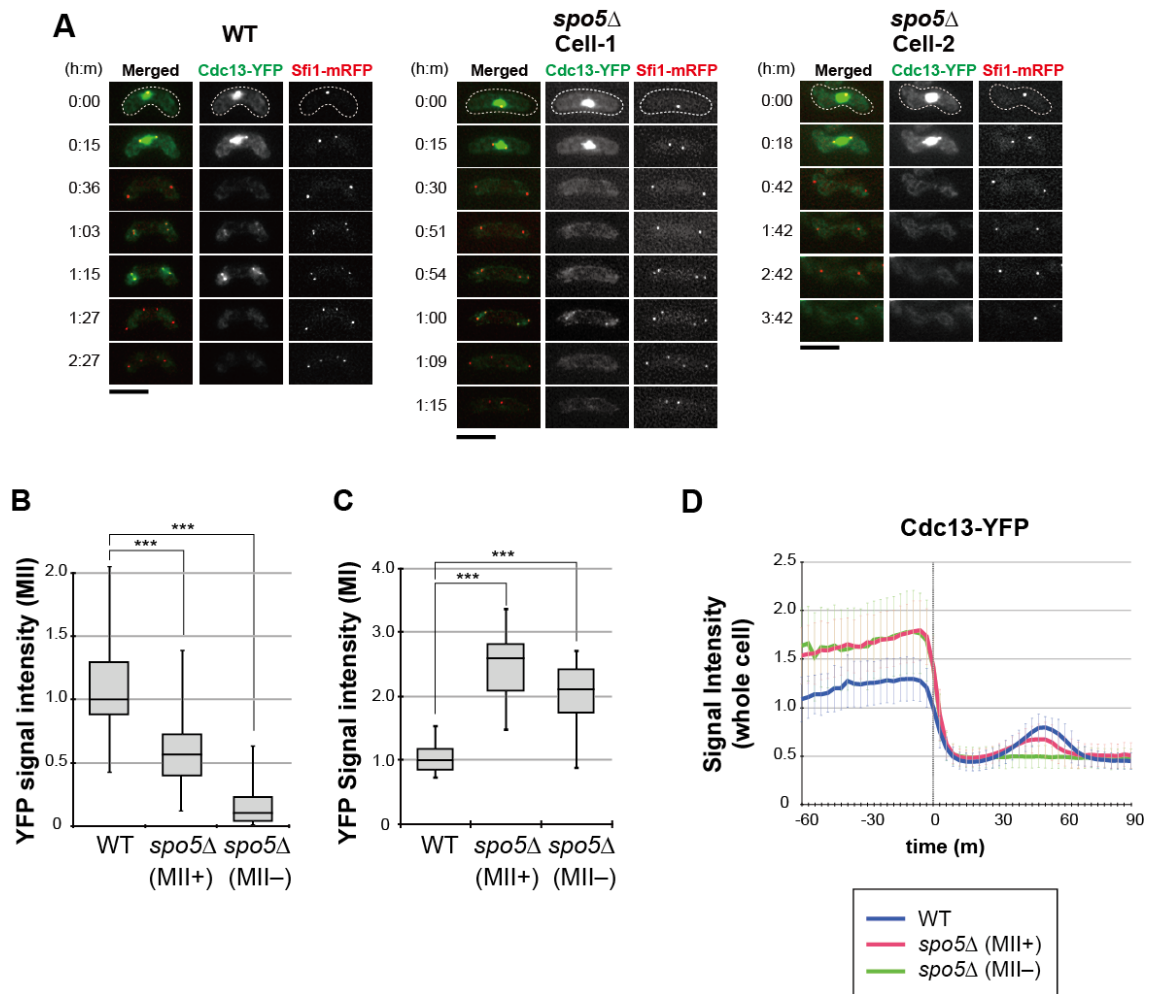


図 8. *spo5Δ*株では減数第二分裂の際の Cdc13 タンパク質量が低下していた

(A) Cdc13-YFP を発現する株を作製し、挙動を観察した。野生型株では、分裂期に合成された Cdc13 は核内に蓄積し蓄積し、後期に APC/C によって分解されて細胞内から消失する。核内の全体に存在するが、特にスピンドル微小管とスピンドル極体 (SPB) に強く局在する。減数分裂では第一分裂から第二分裂へ移行する際に一旦核内から Cdc13 が消失するが、暫く経過した (30 分~1 時間程度) 後に再度核内への蓄積が起こり、第二分裂が開始する。Sfi1 は SPB の構成因子であり、分裂進行の指標とするため RFP 融合型 Sfi1 を発現する株を用いた。*spo5Δ*細胞では、Cdc13 の再蓄積と第二分裂の進行の見られた細胞 (Cell-1) と、Cdc13 が第一分裂の終了と共に核内から消失した後、長時間経過後も核内への再蓄積が見られない細胞 (Cell-2) が高頻度に観察された。0:00 (h:m)は撮影開始時刻である。スケールバー: 10 μ m。

(B) ImageJ (NIH) を使い、第二分裂中の細胞の核内 Cdc13-YFP シグナル量を定量した。3 分毎に撮影した写真を用い、SPB 分離から anaphase-IIb の開始までの核内のシグナル量を定量し、数値を平均した。バックグラウンドとして細胞質のシグナル量を定量し、核の値から除いた。*spo5Δ*(MII-)については、WT における anaphase-Ib 開始から第二分裂の SPB 分離までの時間、および第二分裂における SPB 分離から anaphase-IIb 開始までの時間の平均値を定量時間として適用し、SPB の周辺のシグナルを定量した。WT の中間値を 1 とし、相対値をグラフ化した。WT: n = 27, *spo5Δ*(MII+): n = 33, *spo5Δ*(MII-): n = 20. *** $P < 0.001$ 。

(C) (B)と同様の方法で第一分裂の際の SPB 分離から anaphase-Ib 開始までの核内の Cdc13-YFP

- シグナルを定量した。WT: n = 29、*spo5Δ*(MII+): n = 34、*spo5Δ*(MII-): n = 20。
- (D) 細胞全体の Cdc13-YFP シグナルを定量した。細胞内の値の平均値から、細胞外の平均値をバックグラウンドとして除いた。*anaphase-Ib* の開始を t = 0、このときの WT の値を 1 とし、相対値をグラフ化した。WT: n = 20、*spo5Δ*(MII+): n = 20、*spo5Δ*(MII-): n = 17。エラーバー: mean ± SD。

2-3. CDK 活性亢進型変異による *spo5* 変異体の第二分裂進行異常の抑圧

上記の可能性を確かめるために、*spo5* 変異と CDK 活性亢進型変異の二重変異株を作製し、表現型の観察を行った(図 9)。Cdc2 は 15 番目のチロシン残基に Wee1 キナーゼによるリン酸化を受けて活性を抑制され、これを Cdc25 が脱リン酸化することで活性化が促進される(Nurse, 1990)。*wee1-50* は CDK 活性抑制因子である Wee1 の機能低下型変異体であるが、これを *spo5Δ* に導入した株では *spo5* 変異体の示す第二分裂進行異常が緩和された (図 9A)。*cdc2-1w* および *cdc2-3w* も同様に CDK 活性亢進型の変異である。*cdc2-1w* は活性化した CDK が Wee1 による抑制を受けづらくなった変異であり、その活性化には Cdc25 が必要である。それに対し、*cdc2-3w* は活性化に Cdc25 の活性を必要としなくなった活性化模倣型変異であるが、Wee1 による活性抑制は受けている(Russell and Nurse, 1987)。これらの変異の導入によっても *spo5* 変異体の第二分裂の進行異常が抑圧された (図 9A)。CDK の活性化に Cdc25 の活性を要する *cdc2-1w* でも抑圧が起こったことから、*spo5* 変異体では Cdc25 は正常に機能している可能性が高い。また、APC/C 活性化因子の変異体である *fzr1Δ* および *slp1-362* の導入も試みた。Fzr1/Mfr1 および Slp1 はいずれも Fizzy 関連タンパク質ファミリーに属し、Slp1 は体細胞分裂と減数分裂の両方で発現するのに対して Fzr1 は減数分裂期のみ

発現し、APC/C を活性化して Cdc13 の分解を促進する(Asakawa et al., 2001; Blanco et al., 2001; Matsumoto, 1997)。 *slp1-362* 株および *spo5Δ slp1-362* 株のいずれでも、おそらく APC/C の活性が低すぎるために、第一分裂の後期へ進行できず 1 核で停止する細胞が多く見られた。一方、*spo5Δ fzl1Δ* では *spo5* 変異体の第二分裂進行異常が抑圧された (図 9A)。さらに、Cdc13 および Cdc25 の過剰発現によっても *spo5* 変異体の第二分裂進行異常が部分的に抑圧された (図 9B)。すなわち、人為的に CDK 活性を上昇させることによって *spo5* 変異体の示す減数分裂の進行異常を抑圧することができた。ただし、これらの株では *spo5* 変異体の示す孢子形成不能は抑圧されず、Spo5 は、Cdc13 タンパク質量の調節を介した減数分裂の進行の制御と同時に、これとは異なる機構で孢子形成の制御にも関与すると考えられる。

Spo5 による Cdc13 の発現制御の機構の可能性として、1) タンパク質合成の促進、または 2) タンパク質の分解の阻害 (タンパク質の安定化) が考えられる。さらに、1) の機構として 1-1) *cdc13* mRNA の合成促進、1-2) *cdc13* mRNA の安定化、1-3) *cdc13* mRNA からの翻訳促進、の可能性が考えられる。Spo5 が細胞内の Cdc13 タンパク質量をどのレベルで制御しているのかを探るため、以降の実験を行った。

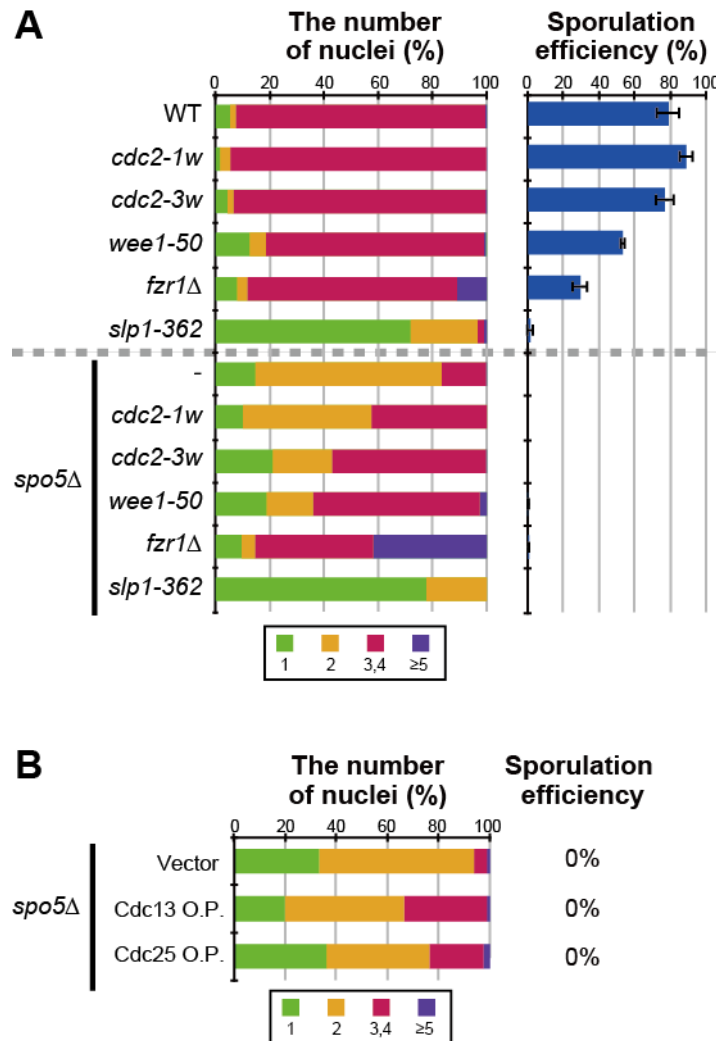


図 9. CDK 活性亢進型変異の導入により *spo5* 変異体の第二分裂進行異常が抑圧される。
 (A) *spo5* 変異と、CDK 活性化型変異あるいは APC/C 活性低下型の変異との二重変異体を作製し、核数および胞子形成率を計測した。APC/C の活性化因子の変異である *slp1-362* との二重変異体を除く全ての多重変異株で、3 核以上まで進行した細胞の割合が *spo5Δ* に比較して高頻度に出現し、これらの変異の導入により *spo5* 変異体の示す第二分裂の進行異常が抑圧されることが分かった。Slp1 は第一分裂の終了時にも MPF 活性の低下に必須であるため、*spo5Δ slp1-362* 二重変異体ではおそらく第一分裂を正常に進行できず 1 核で停止する細胞が高頻度に出現したと考えられる。
 (B) *spo5Δ* 株に Cdc13 および Cdc25 を過剰に発現するプラスミドを導入した場合にも、部分的な第二分裂の進行異常の抑圧が観察された。ただし全ての二重変異体および過剰発現株において *spo5Δ* の示す胞子形成不能の抑圧は見られなかった

【第3章 Spo5によるCdc13タンパク質の発現調節機構の解析】

3-1. 核内に蓄積したCdc13は比較的安定である

減数分裂期の *spo5* 細胞内における Cdc13 タンパク質の分解速度が野生型よりも上昇しているか否かを調べるため、翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドを添加した後の Cdc13 の挙動の観察を試みた (図 10)。体細胞分裂期の分裂酵母細胞を用いた予備実験を行ったところ、シクロヘキシミドを添加しても Cdc13-GFP は細胞内に長時間残留した (図 10B)。シクロヘキシミド添加後に細胞増殖速度の著しい低下が見られたこと (図 10A) や、コントロールとして用いたプロテアソームの核局在制御タンパク質の Cut8-CFP が速やかに細胞内から失われたこと (図 10B) から、添加したシクロヘキシミドの濃度は充分であったと考えられる。先行研究から、サイクリン B の分解は Cdk1 との結合に依存し、かつ Cdk1 と結合したサイクリン B が非常に安定であることが知られている (Kobayashi et al., 1994; van der Velden and Lohka, 1994)。すなわち、合成されたサイクリン B は遊離の状態では分解されず、かつ Cdk1 と結合状態にあるものも分裂期が進行し APC/C の活性が現れるまで細胞内に安定に存在すると考えられる。従って、予備実験の結果は、シクロヘキシミドを添加することにより細胞周期が停止し、APC/C の活性化が起こらず、蓄積していた Cdc13 が分解されずに細胞内に残留したことを反映していると考えられる。よってこの実験系は、減数第一分裂の終了までという比較的短い時間での Cdc13 の分解速度の比較を行うには適切でないと考えられた。

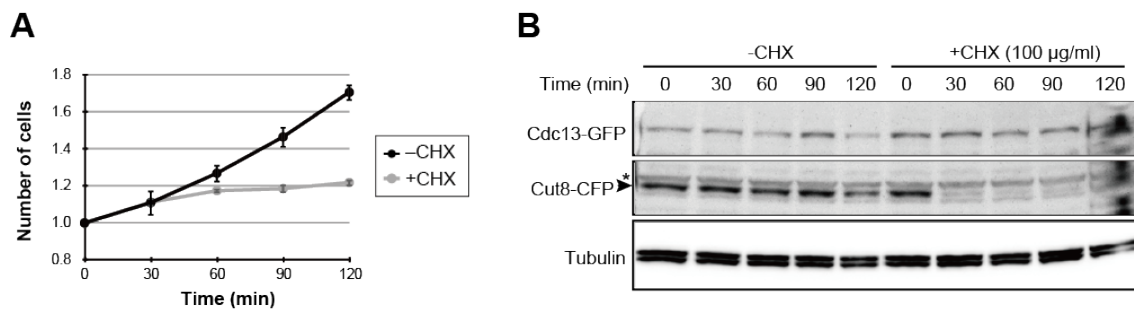


図 10. 核内に蓄積した Cdc13 タンパク質は比較的安定である。

- (A) YE 液体培地にて培養した野生型株に、シクロヘキシミド (CHX) を添加した場合と添加しない場合とでの細胞数の変化。シクロヘキシミドを添加しない場合には細胞数の増加が見られたのに対し、添加した場合には増加速度が著しく低下したことから、加えた量は充分であったと言える。細胞数は $t=0$ の値を 1 として算出した。
- (B) YE 液体培地で細胞を培養し、シクロヘキシミドを終濃度 100 µg/ml となるように添加した。コントロールとしてシクロヘキシミドを添加していない細胞とともに、それぞれ 30 分ごとに集菌し、タンパク質を抽出した。Cdc13-GFP および Cut8-CFP をウエスタンブロッティングにより検出したところ、Cut8-CFP はシクロヘキシミド添加後すぐに細胞から失われるのに対し、Cdc13-GFP はシクロヘキシミド添加の有無に関わらず細胞内に安定的に残留し続けた。*は非特異的なバンドである。

3-2. 光変換蛍光タンパク質 Dendra を用いた Cdc13 タンパク質の量の比較

次に、UV 照射によって不可逆的に蛍光が緑から赤へと変換する光活性化タンパク質 Dendra2(Chudakov et al., 2007)を用いて、Cdc13 の合成量および分解量の比較を試みた (図 11)。Cdc13-3Dendra2 (Cdc13-3DD) を発現する野生型株および *spo5Δ* 株、*mes1Δ* 株を作製し、UV 照射 (0 min) によって核内に蓄積した全ての Cdc13-3DD を、緑色蛍光を発する状態 (Cdc13-3DD(G)、-10 min) から赤色蛍光を発する状態 (Cdc13-3DD(R)) へと変換 (10 min) した後、細胞内のシグナル強度を測定し、1) Cdc13-3DD(G)の増加の度合いから Cdc13 タンパク質の新

規合成速度の比較と、2) Cdc13-3DD(R)の減少の度合いから Cdc13 タンパク質の分解速度の比較を試みた。なお、比較には Cdc13 の核内局在が安定的に観察可能な減数第一分裂の前期から中期までの細胞を用いた。Cdc13-3(R)の減少度は、*spo5Δ*株と野生型では小さく、互いにあまり差は見られなかった。これは核内に蓄積した Cdc13 が安定に保たれていることを反映しているものと思われる。これらに対し、*mes1Δ*株では、野生型および *spo5Δ*株に比べて Cdc13-DD(R)の減少が速く、第一分裂の早期から APC/C の活性が過剰となっている可能性を示唆している。

一方、Cdc13-DD(G)のシグナル定量から、*spo5Δ*株では野生型に比べて核へ再蓄積する速度が遅いことが分かった。これらのことから、*spo5Δ*株では Cdc13 の新規合成の速度が野生型よりも遅い可能性が示唆された。*mes1Δ*株での蓄積の遅延は、APC/C による分解の上昇を反映している可能性が考えられる。

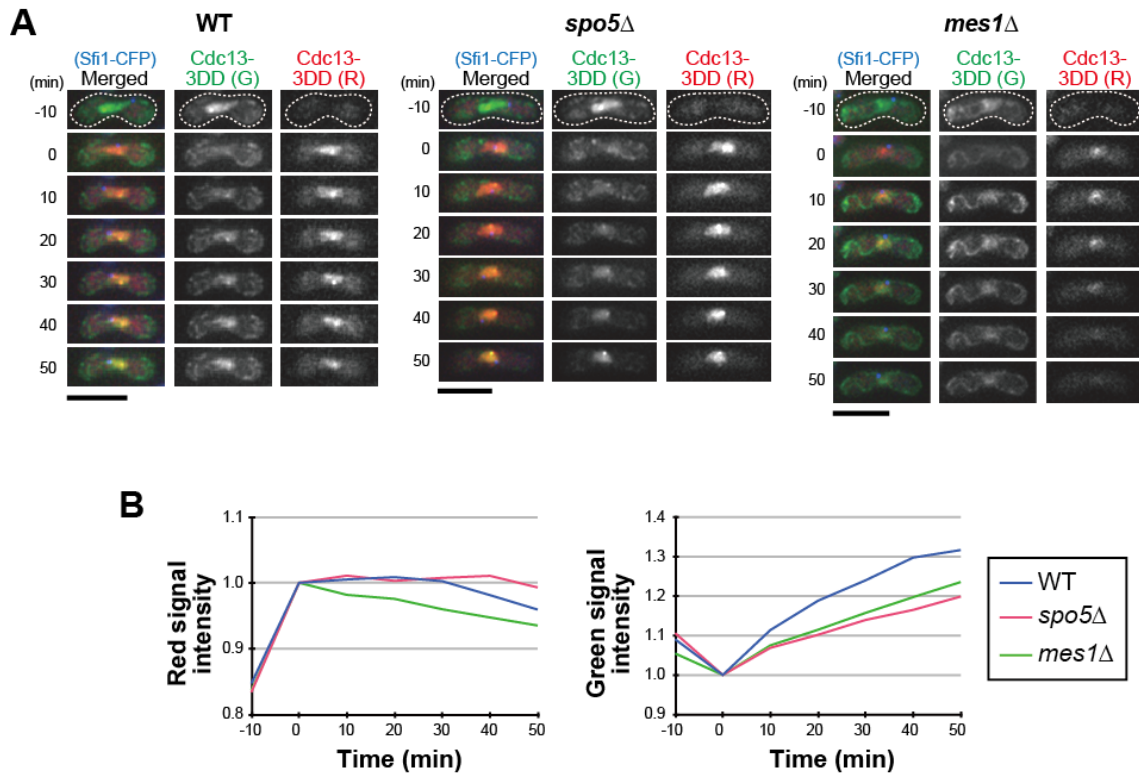


図 11. *spo5* 変異体では野生型に比べ Cdc13 の新規合成速度が低下している。

(A) 紫外光により蛍光が緑から赤に変換する Dendra タンパク質融合型の Cdc13 を発現する株を作製し、変換後の緑色蛍光の回復速度から Cdc13 の合成速度を、赤色蛍光の減少速度から Cdc13 の分解速度を比較した。減数第一分裂期の細胞に 10 分間 UV 照射を行い、蓄積した Cdc13-3Dendra(DD)を全て緑色の状態 (Cdc13-3DD(G)) から赤色の状態 (Cdc13-3DD(R)) へと変換し、その後の様子を 10 分ごとに測定して野生型、*spo5* Δ 細胞、*mes1* Δ 細胞とで比較した。

(B) 細胞内のシグナル量を ImageJ (NIH) により定量した。蛍光の退色のコントロールとして、核内に Cdc13-DD の蓄積の見られない細胞の蛍光量を用いた。スケールバー：10 μ m。

3-3. 第二分裂開始の際には Cdc13 タンパク質が新規に合成される

Cdc13 は減数第一分裂終了時に核内から消失した後、再度核内に蓄積する。この再蓄積が、細胞質内に拡散した Cdc13 が再度核内に集合したものであるのか、新規に合成されたものであるか、あるいはその両方であるのかはこれまでに示されていなかった。そこで、第一分裂期の細胞の核に蓄積している Cdc13-DD(G) を全て Cdc13-DD(R) へと光変換し、第二分裂開始の際にどちらのタイプの Cdc13-DD が核内に蓄積するか観察した。第一分裂期の細胞を選択して Anaphase I の開始が確認されるまで細胞への連続的な UV 照射を行い (図 12、0h:00m、0h:10m)、第二分裂への進行を観察したところ、2 つの核に Cdc13-DD(G) が蓄積する様子が観察された。一方、Cdc13-DD(R) が再蓄積する様子は観察されなかった。この結果から、残留した Cdc13-DD(R) が退色してしまったか、あるいは確認不可能な程度に僅かに残留している可能性は残るものの、少なくとも第二分裂への進行に際して新規の Cdc13 タンパク質の合成が起こることが示された。

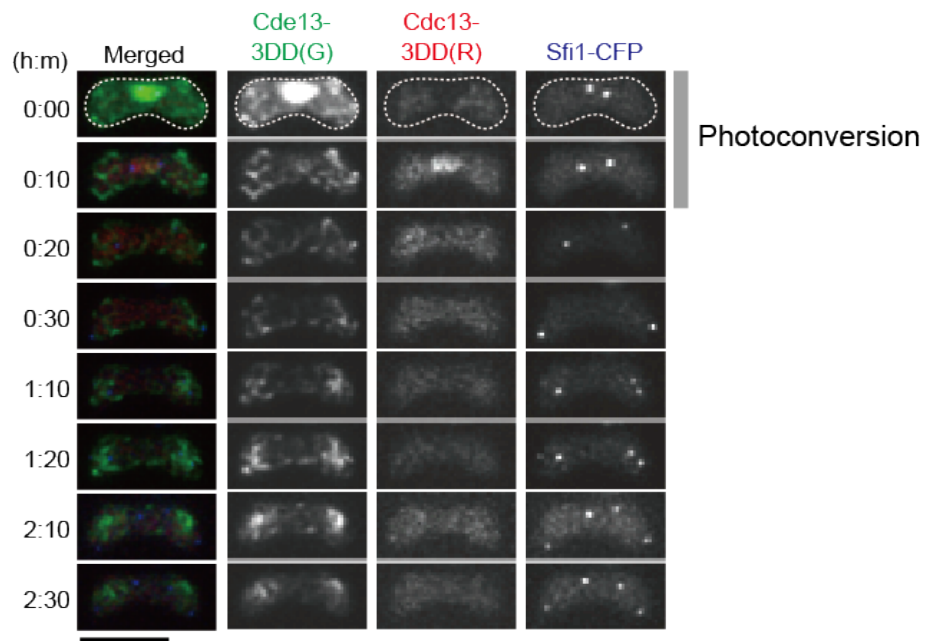


図 12. 減数第二分裂開始の際には新規の Cdc13 タンパク質合成が起こる。
 減数第一分裂を開始している野生型細胞に連続して UV を照射し、第一分裂期に合成される全ての Cdc13-3DD(G)を Cdc13-3DD(R)へと変換した。細胞が第一分裂を終了した時点で UV 照射を止め、その後 Cdc13-3DD(G)と Cdc13-3DD(R)のいずれが核内に蓄積するかを観察した。スケールバー：10 μm .

【第4章 *spo5* 変異体における *cdc13* mRNA の発現の解析】

4-1. 野生型株および *spo5* 変異体での *cdc13* mRNA の発現量の比較

Spo5 による Cdc13 の発現制御の可能性として、mRNA の発現制御あるいは翻訳の制御が考えられる。そのいずれであるかを区別するために、*pat1-114* 変異を用いて同調的に減数分裂に誘導した細胞集団から RNA を抽出し、ノザンブロットィングおよび定量 RT-PCR (Quantitative reverse transcription PCR: RT-qPCR) によって *cdc13* mRNA の発現量の比較を行った (図 13)。*spo5Δ* 株では野生型株に比べて減数分裂の進行に遅延が見られ、*cdc13* mRNA の発現量のピークが *spo5Δ* でやや低下していることが分かった (4–5 h)。しかし、ピーク以前およびピーク以降ではほぼ野生型と同程度か *spo5Δ* 株の方が発現量が僅かに上昇しており (0–3 h、6–7 h)、また野生型に比べて *spo5Δ* 株の方が *cdc13* mRNA の発現が長く残る様子が観察された (7 h)。この僅かな *cdc13* mRNA の残留は、*spo5* 変異体で Cdc13 タンパク質の完全な消失が野生型株に比べて遅延するという過去の報告と一致する (Kasama *et al.*, 2006)。*cdc13* mRNA の発現に急激な上昇と下降が見られる野生型に比べ、*spo5Δ* 株での *cdc13* mRNA の発現の変動は小さくなっている (図 13B)。このような *cdc13* mRNA の発現パターンを示す *spo5* 変異体において、Cdc13 タンパク質の早期減少が生じ、減数分裂の進行に異常が生じることから、減数分裂の正常な進行は、*cdc13* mRNA 発現量の厳密な制御の上に成り立っている可能性が示唆された。

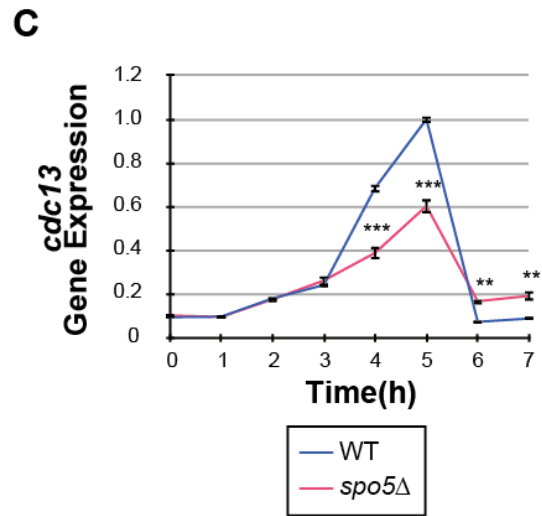
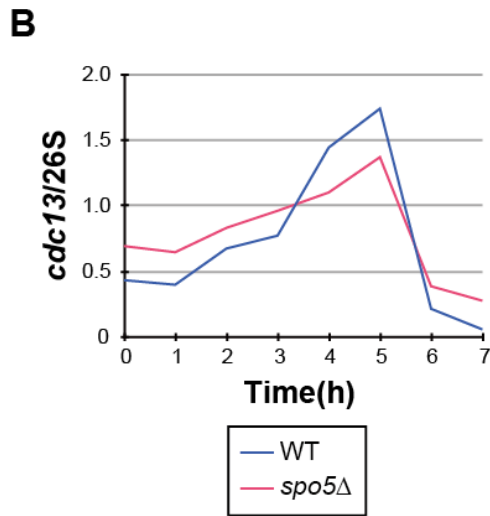
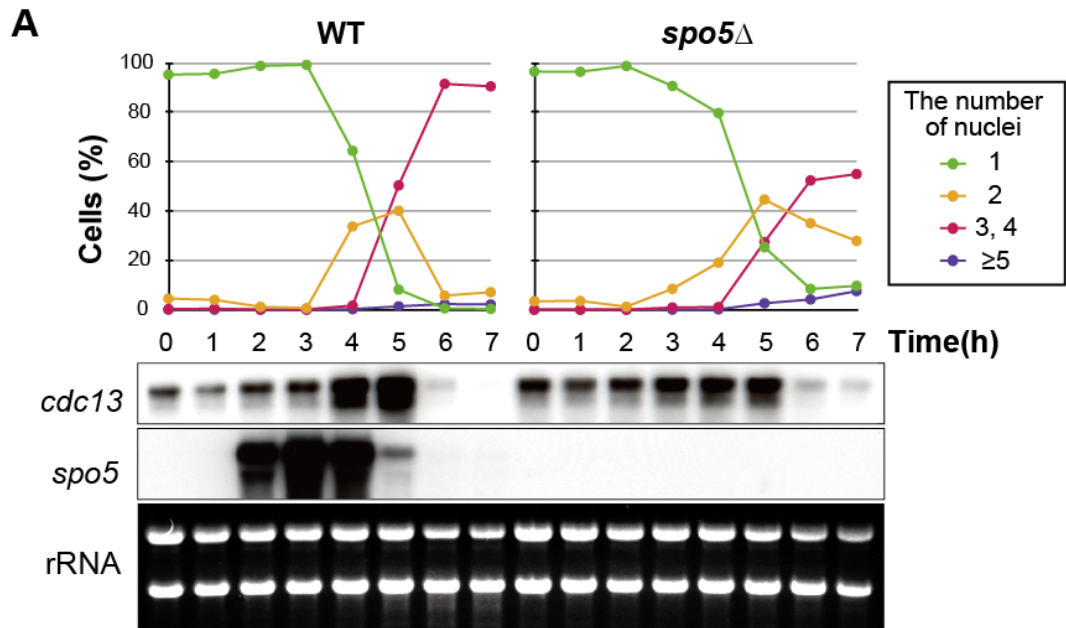


図 13. 減数分裂期における *cdc13* mRNA の発現の比較

- (A) 図 7 と同様の株および実験系を用い、*h-pat1-114* 型の WT 株、*spo5*Δ 株を同調的に減数分裂へ誘導し、1 時間ごとの *cdc13* mRNA の発現量を比較した。培養温度を 25°C から 34°C へシフト後、1 時間ごとに細胞を回収し、DAPI により核を染色して計数し、減数分裂進行の指標とした (上)。回収した細胞から抽出した RNA を電気泳動に展開し、メンブレンへ転写後、³²P により標識したプローブを用いて検出を行った。
- (B) (A) のノザンプロットングのバンドを ImageJ を用いて定量した。
- (C) (A) で抽出した RNA サンプルを用いて RT-qPCR を行い、*cdc13* mRNA の発現量を比較した。n = 4、内在性コントロールとして *act1* 遺伝子の発現量を用い、各値を標準化した。*** $P < 0.001$ 、** $P < 0.01$ 。

4-2. 野生型および *spo5* 変異体におけるレポーター遺伝子の発現比較

cdc13 遺伝子をプロモーター領域、ORF、ターミネーター領域に分けた場合に、図 13 で見られた野生型株と *spo5*Δ株における *cdc13* mRNA の発現様式の違いがより顕著に現れる可能性を考え、プラスミドを用いて発現量の違いを比較した。*nmt* プロモーター下流でタンパク質の過剰発現を誘導する pREP ベクターを用い、プロモーター領域、ORF 領域、ターミネーター領域をそれぞれ繋ぎ変え、減数分裂誘導後の発現量の推移を比較した (図 14)。プロモーターとしては、*nmt1* プロモーター内の TATA-box 領域を改変して発現量を低下させた *nmt81* プロモーター (P*nmt81*)、あるいは *cdc13* 遺伝子上流領域 1 kb (P*cdc13*) を用いた。ORF としては、*gfp* または *cdc13-gfp* を挿入し、ターミネーターとしては *nmt1* ターミネーター (T*nmt1*) あるいは *cdc13* 遺伝子下流領域 1 kb (T*cdc13*) を用いた (図 14A)。プラスミドから発現させた *cdc13-gfp* mRNA と内在性の *cdc13* mRNA を区別するために、内在 *cdc13* 遺伝子下流に GST (glutathione s-transferase) の配列を挿入した株を用い、ノザンブロットティングの検出用プローブにはそれぞれ *gfp* プローブおよび *gst* プローブを用いた。

コントロールプラスミドを導入した株では、*gfp* mRNA の発現量・発現パターンともに野生型株と *spo5*Δ株とではほぼ差は見られなかった (図 14B)。P*cdc13* 下流で *gfp* mRNA を発現させた場合、ターミネーター領域として T*nmt1* を用いたときには、野生型株では減数分裂の進行に伴って mRNA の発現量が僅かに低下していく様子が見られ、また *spo5*Δ株での発現量が全体的に野生型を上回った (図 14C)。しかし、ターミネーターとして T*cdc13* を用いた場合には、野生型

株では減数分裂の進行に伴った発現量の上昇が見られ、*spo5Δ*株での発現量を上回る様子が見られた (図 14D)。このように、減数分裂が進行するに従って野生型株での発現が *spo5Δ*株での発現を上回る状況は、図 13 で観察した内在性の *cdc13* mRNA の発現パターンと似ている。このことから、*spo5Δ*株で見られる *cdc13* mRNA 発現量のピークの低下は、*cdc13* のプロモーター領域とターミネーター領域の両者を併せ持つ場合に見られる影響であると考えられる。すなわち、Spo5 は *Pcdc13* および *Tcdc13* 依存に mRNA を安定化する可能性が示唆された。一方で、*cdc13* の ORF 領域のみを挿入したプラスミドを用いた場合には、野生型株よりも *spo5Δ*株での発現量が顕著に増加する様子が見られた (図 14E)。このことから、野生型株では ORF 依存で余剰の *cdc13* mRNA を排除する機構があるが、*spo5* 変異体ではそれが機能していない可能性が考えられる。同じ *Pnmt81* 下流での発現にも関わらず、*cdc13* ORF を含む場合に発現の開始が早まり、また発現量の増加も見られる (図 14B、E) ことも、*cdc13* mRNA は ORF 依存に発現量が上昇することを支持している。また、プロモーター領域のみ *cdc13* 遺伝子由来の *Pcdc13* である場合にも僅かに *spo5Δ*株での発現が野生型株を上回った (図 14C) ことから、正しいターミネーター領域を持たない場合、プロモーター領域依存にも Spo5 による *cdc13* mRNA の排除機構が働く可能性が考えられる。以上の結果から考えられる Spo5 の機能として、Spo5 は *cdc13* mRNA の発現調節に安定化と不安定化の両方向に関与しており、それにより減数分裂の進行に伴う *cdc13* mRNA および Cdc13 タンパク質の発現量を厳密に制御している可能性が挙げられる。

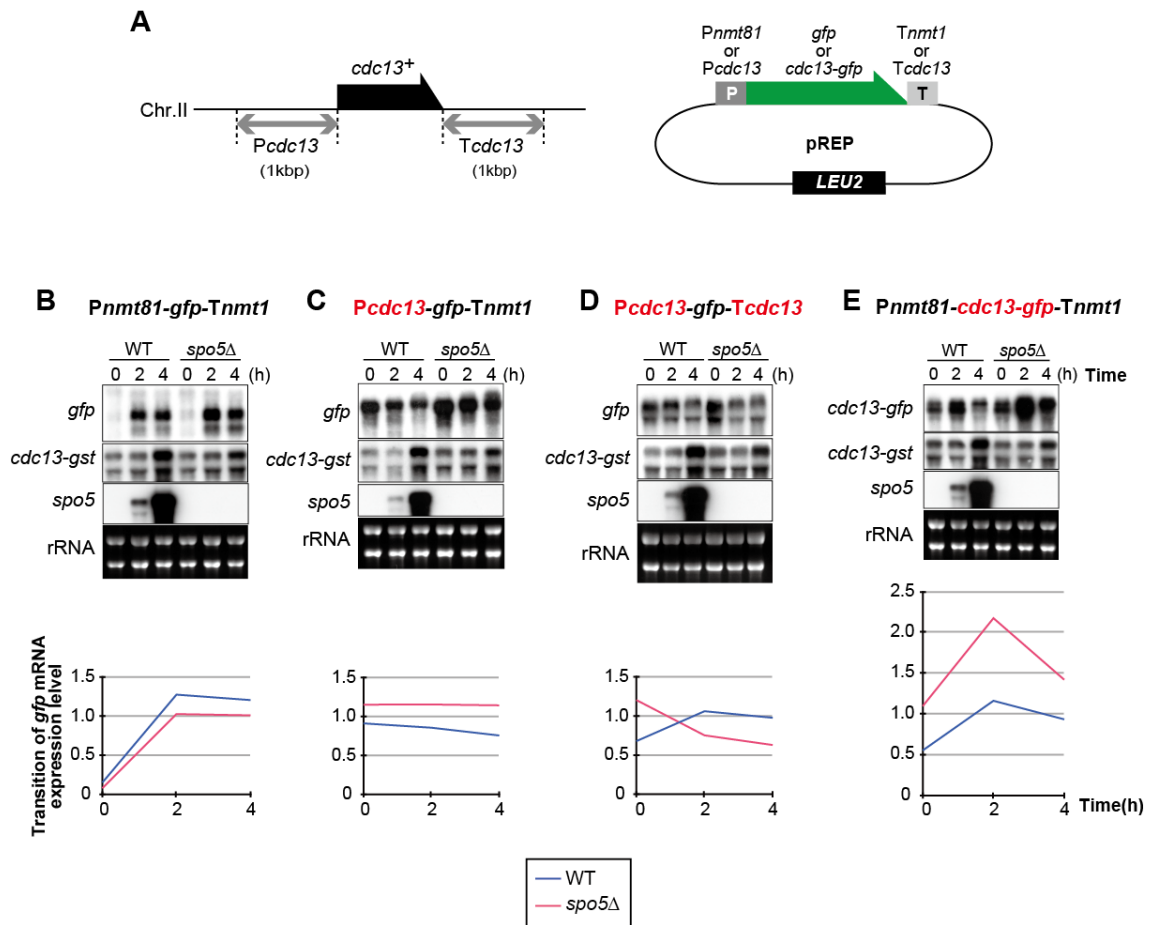


図 14. 野生型および *spo5* 変異体におけるレポーター遺伝子の発現

- (A) *nmt81* プロモーター下流で遺伝子の過剰発現を誘導する pREP ベクターを用い、プロモーター領域、ORF、ターミネーター領域を繋ぎ変えてレポーター遺伝子の発現比較に用いるプラスミドを作製した。
- (B-E) *h-pat1-114 cdc13-gst* 株に各プラスミドを形質転換し、同調的に減数分裂に誘導し、0 時間目、2 時間目、4 時間目の細胞から mRNA を抽出してノザンブロットングを行った。*gfp* プローブによりレポーター遺伝子の mRNA を、*gst* プローブにより内在性の *cdc13* mRNA を検出した (上)。ImageJ (NIH) を用いてバンドを定量し、26S rRNA の数値により標準化した (下)。

【第 5 章 *spo5* 変異体における他の CDK 活性調節因子の局在変化】

CDK 活性は Cdc13 以外にも Cdc25 や Wee1 など、様々な因子によって厳密に制御されている。それらも Spo5 による発現調節を受けるか否かを知るため、幾つかの因子の GFP 融合タンパク質を発現する株を作製し、減数分裂期の野生型株および *spo5* 変異体での挙動を観察した (図 15~17)。Cig2 は分裂酵母の B 型サイクリンの一つで、G1/S 期移行および G2/M 期移行の際に発現し、S 期の進行制御に関与する (Buono and Russell, 1993; Mondesert et al., 1996)。減数分裂期には、減数分裂前 S 期だけでなく第二分裂でも強く発現する (Borgne et al., 2002)。野生型株では Cdc13 と同様に核内に局在し、第一分裂から第二分裂への移行の際には一旦核内から減少する様子が観察された (図 15A)。*spo5* 変異体でも、Cdc13 同様、第一分裂終了後に核内から消失し、再蓄積が起こらないことが観察された (図 15B)。Wee1 の抑制因子である Cdr2 は、ドットを形成して細胞の中央部分の表層に帯状に局在する (Kanoh and Russell, 1998; Moseley et al., 2009)。減数分裂期の細胞でも接合子の中央付近の細胞表層に帯状に局在し、減数分裂の進行に伴って細胞末端側まで局在が広がり、第二分裂終了後に局在が失われる様子が観察された (図 16A)。この Cdr2 も Cdc13 や Cig2 と同様に、*spo5* 変異体で野生型株よりも早期に局在が失われることが分かった (図 16B, C)。CDK の活性化因子である Cdc25 は、分裂期に核内に局在し、減数分裂では第一分裂から第二分裂への移行の際にも消失せず、第二分裂の終了と共に核内から消失する (図 17A)。Cig2 や Cdr2 とは異なり、*spo5* 変異体での Cdc25-GFP の挙動には野生型株との顕著な差は見受けられず、第一分裂終了後、第二分裂に進行しない細胞で Cdc25 が核内に長時間局在し続ける様子が観察された (図 17B)。これらのことから、Spo5 は Cdc13 以外にも Cig2 や Cdr2 など複数の因子の発現調

節を介して減数分裂期の CDK 活性の制御を行なっていると考えられる。ただし、*Cdc25* のように *spo5* 変異体でも野生型株と同様の発現様式を示すと思われる因子もあることから、*Spo5* による制御を受ける因子には何らかの特異性があると考えられる。

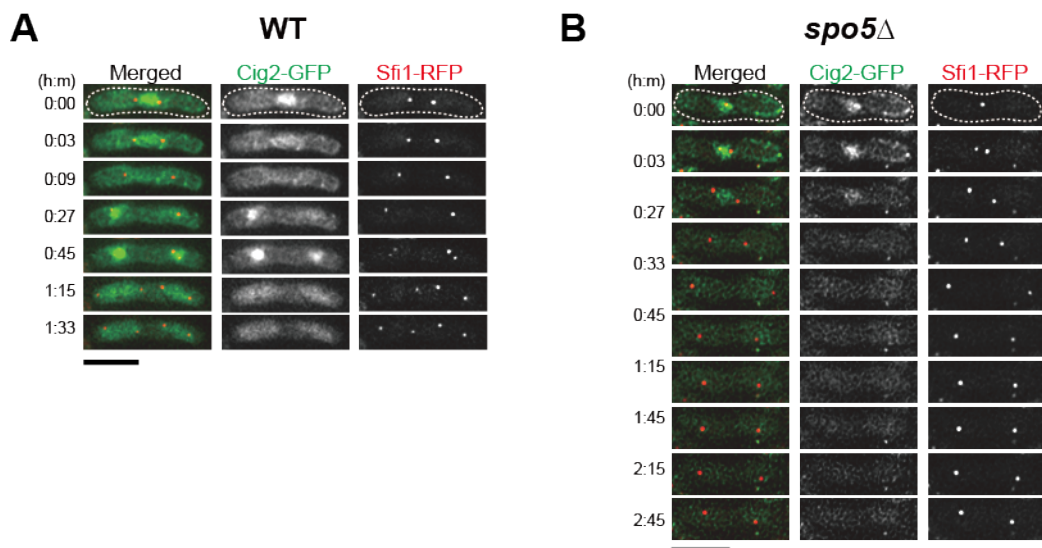


図 15. S 期サイクリン Cig2 もまた、*spo5* 変異体で野生型株よりも早期に消失した
 (A) 分裂酵母 B-type サイクリンの一つである Cig2 は、*Cdc13* と同様に分裂期には核内に蓄積する。減数分裂期には、第一分裂から第二分裂への移行の際に一旦核から消失し、核内への再蓄積が起こり第二分裂が開始する。
 (B) *spo5Δ* 株では、*Cdc13* と同様に、第一分裂終了後に核内から消失した Cig2 の再蓄積が起こらず、減数分裂を停止したと考えられる細胞が観察された。スケールバー：10 μm 。

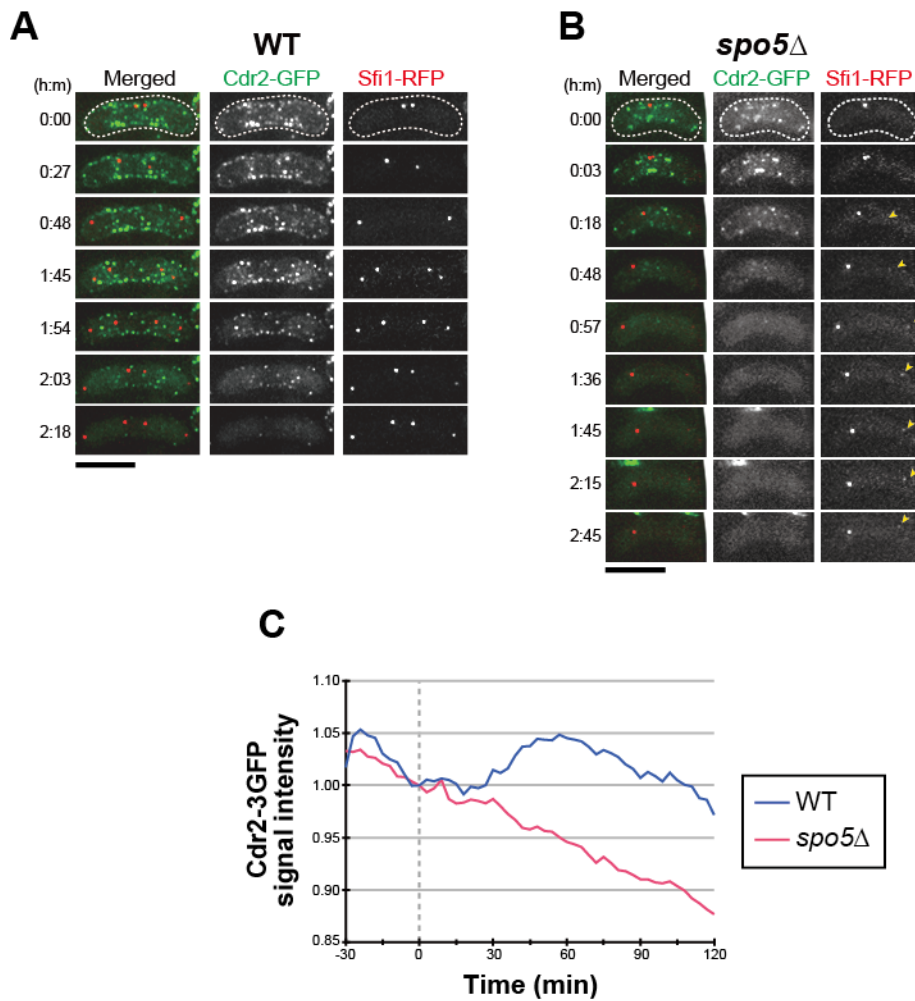


図 16. Wee1 抑制因子である Cdr2 も、*spo5* 変異体において野生型株よりも早期に細胞内から失われた

- (A) Wee1 抑制因子である Cdr2 は、細胞中央付近の表層にドットを形成して帯状に局在する。
 (B) (C) *spo5* Δ 株では、Cdc13 や Cig2 と同様に野生型株よりも早期に消失する様子が観察された。細胞内のシグナル強度は ImageJ (NIH) により測定し、体細胞分裂期の細胞を退色度合いのコントロールとして標準化した。Sfi1 のドットが 2 つに分離した時間を 0 分とし、この時のシグナル強度を 1 として推移を比較した。スケールバー：10 μ m.

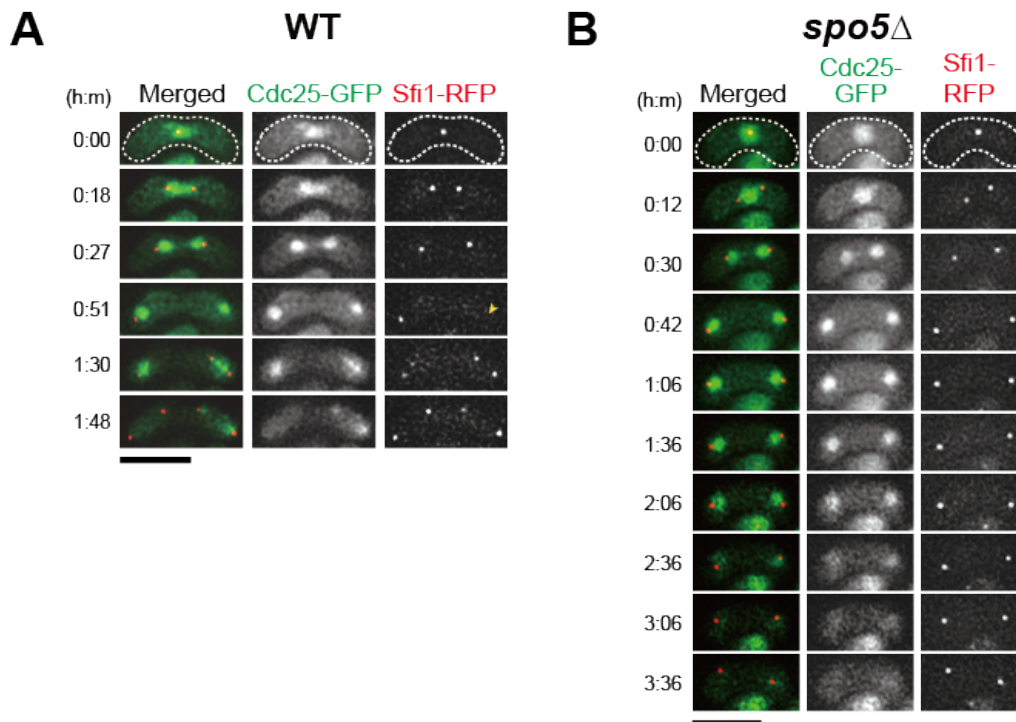


図 17. CDK 活性化因子である Cdc25 の局在には、野生型と *spo5* 変異体とで大きな差は観察されなかった

- (A) CDK 活性化因子である Cdc25 は、分裂期に核内に蓄積し、減数第一分裂から第二分裂への移行の際にも核内に留まる。
- (B) *spo5*Δ株では Cdc13 や Cig2, Cdr2 のように野生型よりも早期に消失する様子は観察されず、第一分裂終了後も速やかに核内から失われず核内に残留し続けるようであった。スケールバー：10 μm.

考察

減数第二分裂の開始や進行の制御に関わる因子としては、これまでに、Mes1 タンパク質の働きがよく調べられてきた。今回、Spo5 もまた、この時期の CDK 活性制御に関与することが明らかとなってきた。*spo5* 変異体では、第二分裂を開始できずに 2 核の状態が減数分裂を停止する細胞が多く見られた。Cdc13-YFP の局在観察から、*spo5* 変異体で第二分裂時の Cdc13 タンパク質量が低下していることが分かった。また、CDK 活性亢進型変異あるいは APC/C 不活性型変異の導入によって、*spo5* 変異体の第二分裂進行異常が部分的に抑圧された。これらのことから、*spo5* 変異体では、Cdc13 タンパク質が早期に減少してしまい、第二分裂を行うのに十分な CDK 活性を維持できないと考えられる。したがって、Spo5 は、細胞内の Cdc13 タンパク質の量の調節を介して、減数分裂の進行制御に関与している可能性が高い。また、*spo5* 変異体は孢子形成能も欠くが、これは人為的に CDK の活性を高い状態に誘導しても抑圧されなかった。このことから、Spo5 は Cdc13 のタンパク量の調節だけでなく、他の何らかの経路を介して孢子形成制御に関わっている可能性が考えられる。

部分欠損型変異体の解析から、Spo5 の C 末端側のエキソン 3 にコードされる領域 (*spo5(192-567)*) が、第二分裂の進行制御および孢子形成に重要であることが分かった。この領域には 2 つの RRM が含まれており、RRM 内の 1 アミノ酸残基置換変異によっても *spo5* 欠損株とほぼ同様の異常を生じた。したがって、RRM は Spo5 の機能にとって、非常に重要な役割を持つと考えられる。ただし、Spo5(192-567)から RRM1 直前までを欠失させた Spo5(297-567)が Spo5 としての機能を大きく欠くことから、2 つの RRM だけでは十分な機能を持ち得ないと考

えられる。*spo5(192-567)*株では *spo5* 欠損株に比べて第二分裂の進行および孢子形成に見られる異常が大きく減少したが、野生型よりはやや劣る。このことから、N 末端側のエクソン 1、2 にコードされる領域も Spo5 の完全な機能に必須であると考えられる。N 末端側領域にあるリン酸化部位に変異を加えることでその機能が失われることから、リン酸化されていない状態の N 末端側領域が、C 末端側のもつ機能に何らかの抑制的な影響を及ぼす可能性が考えられる。

Dendra を用いた解析から、*spo5* 変異体では野生型に比べて Cdc13 の合成速度が低下している可能性が示唆された。このことから *spo5* 変異体では mRNA の合成あるいは安定性、もしくは翻訳速度が低下していると考えられた。そこで、ノザンプロッティングおよび RT-qPCR 解析を行い、野生型株と *spo5* 破壊株とで *cdc13* mRNA の発現量を比較した。その結果、*spo5* 破壊株では、*cdc13* mRNA の発現パターンが、野生型に比べて変動に乏しいことが分かった。このことから、正常な減数分裂の進行には厳密な *cdc13* mRNA の発現量の調節を要する可能性が考えられた。また、野生型株と *spo5* 変異体でのレポーター遺伝子の発現量の比較から、Spo5 がターミネーター領域や ORF 領域を介して、減数分裂細胞内における *cdc13* mRNA の量を調整している可能性が示唆された。従って、Spo5 は、*cdc13* mRNA の発現量を細かく調節することによって CDK 活性の変動を強調し、減数分裂のスムーズな進行を補償する役割を担っている可能性が考えられる。また、*spo5* 変異体では、Cdc13 以外にも、Cdr2 や Cig2 など複数の CDK 活性調節因子が、野生型に比べて減数分裂の早い段階で細胞内から消失する様子が観察された。このことから、Spo5 は複数の遺伝子の発現制御を介して、遺伝子産物である各タンパク質の発現量を厳密に調節し、減数分裂特異的な連続した分裂を促している可能性が高い。

減数分裂期の M 期サイクリン (CyclinB) mRNA の制御については、高等生物の卵母細胞でよく知られている(de Moor and Richter, 1997; Mendez and Richter, 2001; Stebbins-Boaz et al., 1996)。哺乳類や両生類の卵母細胞では、減数分裂から初期発生の期間に必要な因子の mRNA が、減数分裂に入る前の細胞の成長段階に合成され、それぞれ適切な時期に翻訳が開始されるまで細胞内に安定的に蓄えられる(Curtis et al., 1995; Hake and Richter, 1997; Macdonald and Smibert, 1996)。Cyclin B の mRNA も上記のような制御を受ける mRNA の一つで、合成された後、卵母細胞が減数分裂を停止している間は翻訳されずに安定に保たれる。分裂酵母では、このような減数分裂の長期停止は起こらない。しかし、これまでの解析から、*spo5* 変異株では培地や細胞の状態によって *cdc13* mRNA の発現が変動しやすいことが分かった (data not shown)。このことから、分裂酵母細胞でも栄養源の枯渇というストレス環境下において mRNA の合成量、あるいは合成された mRNA を安定に保ち、減数分裂の進行に必要な量を維持する機構が存在すると思われる。したがって Spo5 は、減数分裂期に各種 mRNA の合成あるいは維持に関与し、厳しい環境下において確実に細胞が減数分裂および胞子形成を遂行し、確実な世代継承を補償するために重要な役割をもつことが予想される。

結論

減数第二分裂の制御機構をより詳細に解明するため、新規の第二分裂変異体のスクリーニングを行ったところ、複数の *spo5* 変異体が単離された。遺伝子産物である Spo5 は分裂酵母の減数分裂特異的に発現し、2 箇所の RRM を持つ RNA 結合タンパク質である。*spo5* 変異体は孢子形成不能と第二分裂の進行異常を示し、これまでも第二分裂との関連が示唆されていた因子であるが、詳細な機能については不明な点も多く残されていた。機能部位の解析から、Spo5 の第二分裂や孢子形成に関わる機能には、2 箇所の RRM を含む C 末端側領域が不可欠であることが分かった。N 末端側領域を欠く Spo5 は機能を大きく損なわなかったが、この欠損領域に存在するリン酸化部位をアラニンに置換した非リン酸化型 Spo5 が機能を失ったことから、リン酸化を受けていない状態の N 末端側領域が C 末端側領域の持つ機能を抑制している可能性が考えられる。

先行研究から、Spo5 と MPF 活性との関連が示唆されていたため、ライブセルイメージングを用いて減数分裂期の Cdc13 タンパク質の挙動を観察したところ、*spo5* 変異体では Cdc13 タンパク質が第一分裂終了とともに細胞内から消失し、減数分裂が停止することが分かった。さらに、CDK 活性亢進型変異の導入によって *spo5* 変異体の第二分裂進行異常が部分的に抑圧された。これらのことから、*spo5* 変異体では、Cdc13 タンパク質の早期消失によって MPF 活性の低下が起こり、第二分裂の進行に異常を生じると考えられた。従って、Spo5 タンパク質は Cdc13 タンパク質の量の調節を介して、減数分裂期の MPF 活性を制御している可能性が示唆された。

UV 光照射により蛍光の色が変化する光変換タンパク質 Dendra を用いた解析

から、*spo5* 変異体において Cdc13 タンパク質の新規合成速度が低下している可能性が示唆された。そこで、ノザンブロットティングを用い、減数分裂の進行に伴う *cdc13* mRNA の発現量の変化を、野生型株と *spo5* 変異体とで比較した。野生型株では細胞が減数第一分裂から第二分裂へと移行するのと同時期に *cdc13* mRNA の発現が急上昇し、その直後に急降下する様子が見られた。*spo5* 変異体でも野生型株よりやや遅れて *cdc13* mRNA の発現がピークに達するものの、野生型株に見られるような減数分裂の進行に伴った発現量の変動に乏しく、また、ピーク時の発現量は野生型株に比べて低かった。これらの結果から、減数分裂の正常な進行は、分裂進行に伴う *cdc13* mRNA 量の厳密な制御のもとに保証されるものであることが推察される。さらに、レポータープラスミドを用いた mRNA 発現量の比較実験から、Spo5 はプロモーター領域およびターミネーター領域依存に *cdc13* mRNA を安定化する一方で、正しいターミネーター領域を持たない場合には、*cdc13* プロモーター領域あるいは ORF に依存して余剰な *cdc13* mRNA を排除する役割も兼ね備えている可能性が推測された。従って、Spo5 は、*cdc13* mRNA の安定化と不安定化の両方向に関与し、それによって減数分裂の進行に伴う *cdc13* mRNA および Cdc13 タンパク質の発現量を厳密に制御している可能性が考えられる。また、*spo5* 変異体では、Cdc13 以外にも Cig2 や Cdr2 など複数の CDK 活性制御因子が、野生型に比べて減数分裂の早い段階で細胞内から消失することが分かった。このことから、Spo5 は、複数の因子の発現調節を介して減数分裂期の CDK 活性を厳密に制御し、減数分裂特異的な連続した分裂を遂行するために重要な役割を果たしていると考えられる。

材料と方法

【1】菌株

(1) 大腸菌株

XL1-Blue: *endA1 gyrA96 hsdR17(rk-mk+) lac recA1 relA1 supE44 thi-1*

F'[proAB lacIqZ::M15 Tn10(tetr)]

(2) 分裂酵母株

表 2 に示す。

【2】培地

(1) 大腸菌培養

大腸菌の培養にはLB培地またはTY培地を用いた。それぞれの組成を以下に示す。これらの培地には、必要に応じて終濃度40 mg/mL のampicillinを、また、寒天培地（プレート）として使用する際には1 L当たり15 g の寒天を添加した。

〈LB: 1% Bacto Tryptone、 0.5% Yeast extract、 1% NaCl、 pH 7.6〉

〈TY: 1% Polypepton、 0.5% Yeast extract、 0.5% NaCl、 pH ~7.0〉

(2) 酵母培養

分裂酵母の通常の培養には、完全栄養培地としてYEを、最少培地としてSDまたはMMを用いた。窒素源枯渇の実験の際にはYE培地で前培養し、NH₄Clを含まないグルコース濃度2%のMM-N培地へ移した。分裂酵母の接合および孢子形成の誘導にはSSA培地またはSPA培地を用いた。SSAには窒素源が少量含まれてお

り、細胞は増殖（コロニー形成）後に接合および孢子形成を行う。一方、SPAは窒素源を全く含まず、細胞は直ちに接合および孢子形成を行う。各培地の組成（1 L当たり）を以下に示す。プレートを作製する際には20 gの寒天を添加した。

・ YE（完全培地）：

kanR、*hphR*、*natR*、*bsdR*遺伝子挿入株の選択時には、YEプレートにそれぞれG418 (Geneticin、終濃度0.1 mg/mL)、Hygromycin B (終濃度0.1 mg/mL)、ClonNat (終濃度0.1 mg/mL)、Blasticidin S (終濃度0.01 mg/mL) を添加して用いた。

〈0.5% Yeast extract、 3% glucose、 0.005% adenine〉

・ SD（合成選択培地）：

アミノ酸類が含まれておらず、菌株の栄養要求性のチェックや、形質転換体選択の際に使用した。栄養要求性株の培養には、必要に応じて栄養素 (*1)を添加して用いた。分裂酵母で過剰発現に用いられる*nmt* プロモーター（後述）は、このSD培地では抑制される。

〈0.67% Yeast nitrogen base w/o a.a.、 1% glucose〉

・ MM+N（最少選択培地）：

Edinburgh minimal medium (EMM) と呼ばれる。この培地はチアミンを含有しないため*nmt*プロモーターが脱抑制され、下流につないだ遺伝子の転写が増大する。栄養要求性株の培養には、必要に応じて栄養素 (*1)を添加して用いた。

〈14.7 mM KH phthalate、 15.5 mM Na₂HPO、 93.5 mM NH₄Cl、 2%

glucose、x50 Salts stock (*2)、 x10、000 Minerals stock (*3)、 x1,000 Vitamins stock (*4)、 47.6 mM クエン酸)

• MM-N (窒素源飢餓培地) :

MM培地から塩化アンモニウムを取り除いた培地で、接合や孢子形成の誘導や、増殖期の細胞をG1期停止させる際に使用した。

• SSA (合成孢子形成培地) :

〈x20 SSA (*5)、 1% glucose、 0.68 mM CaCl₂、 4.2 mM NaOH (pH ~5.9)、
x1,000 Vitamins stock (*4)、 x10,000 Minerals stock (*3)〉

• SPA (孢子形成培地) :

〈1% glucose、 0.1% KH₂PO₄、 x1,000 Vitamins stock (*4)、 3% agar〉

*1. 培地に添加した栄養素 :

〈50 µg/mL Adenine、 50 µg/mL Uracil、 50 µg/mL L-Leucine、 50 µg/mL
L-Lysine、 50 µg/mL L-Arginine、 50 µg/mL L-Histidine〉

*2. x50 Salts stock :

〈260 mM MgCl₂·6H₂O、 5.00 mM CaCl₂·2H₂O、 670 mM KCl、 14.1 mM
Na₂SO₄〉

*3. x10,000 Minerals stock :

〈80.9 mM H₃BO₃、 23.7 mM MnSO₄·4H₂O、 13.9 mM ZnSO₄·7H₂O、

7.40 mM FeCl₃·6H₂O、2.7 mM (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O、6.02 mM KI、
1.60 mM CuSO₄·5H₂O)

*4. x1,000 Vitamins stock :

〈4.20 mM パントテン酸、81.2 mM ニコチン酸、55.5 mM イノシトール、
40.8 μM ビオチン〉

*5. x20 SSA :

〈75.1 mM L-アスパラギン酸、294 mM KH₂PO₄、28.2 mM Na₂HPO₄、
40.6 mM MgSO₄·7H₂O、303 mM (NH₄)₂SO₄、〉

【 3 】 分裂酵母の一般的な取扱いと遺伝学的解析

分裂酵母の一般的な遺伝学的解析はGutzらの方法に従った(Gutz et al., 1974)。分裂酵母の胞子はアミロース様の多糖類を蓄積するので、ヨウ素蒸気処理により胞子を含むコロニーは茶褐色に染色される。この性質を利用して胞子形成能を検定した。

分裂酵母の形質転換は岡崎らにより改良された酢酸リチウム法(Okazaki et al., 1990)を改変して行った。YE、またはSD培地で培養した細胞(対数増殖期または飽和状態の細胞)を遠心集菌した後、0.1 M 酢酸リチウム(pH 5.0)に懸濁した。懸濁液を0.1 mLずつマイクロチューブに分注し、DNA (0.1~1 mg)、サケ精子DNA および240 μLの50% (w/v) ポリエチレングリコール (#4000)水溶液を添加して30°Cで振盪した。少なくとも30分以上振盪した後、42°Cで5分間熱ショック

を与えた。熱ショック後上清を遠心除去し、細胞を滅菌水に懸濁して選択培地に広げた。

交配の際には主として*ade6* 変異をマーカーとして利用した。アデニン要求性変異である*ade6-M210*変異と*ade6-M216*変異は同一遺伝子座の変異であるが、互いに相補し、この二つのアリルを同時に細胞内に有する株はアデニン非要求性となる（遺伝子内相補）。そのため、*ade6-M210*変異株と*ade6-M216*変異株を交配させ、アデニン非要求性の細胞を選択することで、容易に二倍体を得ることができる。この二倍体をSPAプレート上で培養して胞子を形成させ、四分子分析またはランダム・スポア処理により、子孫細胞を得た。

ランダム・スポア処理は以下のようにして行った。胞子形成しているプレート上の細胞を掻き取り、滅菌水に懸濁した後、カタツムリから抽出した消化酵素グルスラーゼ（NEN）により胞子嚢を溶解し、遊離の胞子とした。滅菌水で胞子を洗浄した後、適当量の滅菌水に懸濁し、適当な培地に胞子を撒いた。

四分子分析法は、二つの親株を交配させてそこからできる四つの胞子（一つの子嚢に包まれている）を一つずつ顕微鏡下でガラス針を用いて分離し、それらの表現型を観察するものである。この方法では、多数の胞子をまとめて観察するランダム・スポア分析よりも詳細な解析が可能である。

【5】大腸菌プラスミドと組換えDNA 操作

DNA の制限酵素による切断、結合、平滑末端化、アガロースゲル電気泳動等の操作は標準的なプロトコルに従った(Sambrook et al., 1989)。プラスミドベクターとしてpUC119 (Stratagene)およびTOPO TAベクター (invitrogen)を用い、宿主

株としてXL1-Blueを使用した。大腸菌の形質転換には18°C法(Inoue et al., 1990)を用いた。

【6】 分裂酵母株の作製

遺伝子破壊株、融合タンパク質発現株の作製には、Bählerらによって確立された方法を用いた(Bähler et al., 1998)。3GFPのようにタンデムに複数の蛍光タンパク質を持つ融合タンパク質発現株の作製には改変されたプラスミドをPCRのテンプレートとして使用した(Sato et al., 2009)。

【7】 ランダム突然変異の誘導

cut11-gfp 株を (MA2) を栄養培地 (YE) で $\sim 1 \times 10^7$ cells/mL になるまで 30°C で培養した。集菌した細胞をトリス-マレイン酸緩衝液 (TM 緩衝液; 50 mM Tris、10 mM 無水マレイン酸、0.41 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、NaOH にて pH 6.0 に調製) で洗浄後、 1.4×10^8 cells/mL となるよう TM 緩衝液に懸濁した。2本のマイクロチューブに分注し、変異原であるニトロソグアニジン (1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine) を加え (終濃度 330 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、30°C にて 30分または 60分振盪した。ニトロソグアニジンを除去し、YE に懸濁して 30°C で 4時間振盪後、-80°C にて保存した。これを適宜取り出し約 200 colonies/plate となるよう希釈して YE プレートに撒き、出現したコロニーを SSA 寒天培地へレプリカして減数分裂へ誘導した。

【8】 DNA ライブラリの導入による抑圧因子の単離

形質転換により cDNA ライブラリまたはゲノム DNA ライブラリを導入した変異体を SSA 培地に撒き、コロニーを形成させた。ヨウ素染色により孢子形成可能となったコロニーを選択し、単離して【9】の手法によりプラスミド抽出を行った。抽出したプラスミドを再度元の変異体に形質転換し、抑圧に再現性が見られることが確認されたものについて、常用プライマーを用いて【10】の手法により挿入断片の塩基配列を決定した。

【9】 分裂酵母からの DNA の調製

分裂酵母のゲノム DNA およびプラスミド DNA の回収には以下の方法を用いた。1.5 ~5 mL の適当な培地で培養した細胞を遠心集菌し、細胞を 0.2 mL の breaking buffer (2% Triton X-100、1% SDS、100 mM NaCl、10 mM Tris-HCl [pH8.0]、1 mM EDTA)、0.3 g のガラスビーズ ($\phi = 0.5$ mm)、および 0.2 mL のフェノール・クロロホルムを加え、5 分間激しく攪拌して細胞を破碎した。攪拌後、0.2 mL の TE 溶液を添加して室温で 5 分間遠心し、上清を回収した。1 mL のエタノールを加えて DNA を沈降させ、風乾後、滅菌水に溶解して DNA 溶液とした。

【10】 塩基配列の決定

ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いた。サンプルは同社の BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit により調製した。

【11】 部位特異的変異導入

クローニングした遺伝子に対して、部位特異的に変異を導入するために、PrimeSTAR Mutagenesis basal kit (TaKaRa)を用いた。変異を導入したプライマーを購入し、付属のプロトコルに従って調製した。

【12】 プラスミドを用いた分裂酵母内でのタンパク質の過剰発現

タンパク質の過剰発現には *nmt1* プロモーター下流に任意の遺伝子を連結することのできる pREP1 ベクター(Maundrell, 1993)と、*nmt1* プロモーターの TATA box を改変し発現の誘導量を低下させた *nmt41*、*nmt81*(Basi et al., 1993)を pREP ベクターに組み込んだ pREP41、pREP81 を用いた。*nmt* プロモーターはチアミンによって発現が抑制される(Maundrell, 1990)ため、過剰発現によって生育が妨げられる恐れのある場合には、チアミンを含む SD 培地または MM 培地にチアミンを添加したものを培養に用い、必要に応じてチアミンを含まない MM 培地へと移した。

【13】 蛍光顕微鏡による観察

(1) DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) 染色

培養液1 mLを遠心し細胞を回収し、70%エタノール100 μ Lに懸濁し4°Cで一晩固定した。遠心して上清除去後、適当量の脱イオン水に懸濁し、スライドガラス

ス上で細胞懸濁液1 μL とDAPI溶液 (1 mg/mL) 1 μL を混合してサンプルとし、顕微鏡で観察した。

(2) 生細胞の経時観察

DeltaVision-SoftWoRxシステム (Applied Precision)を用いて、生細胞の経時観察を行った。減数分裂期の細胞を観察するために、ホモタリック株 (h^{90})を孢子形成培地上にスポットし、30°Cにて6~8時間インキュベートして減数分裂へ誘導した。細胞をレクチンコートしたガラスボトムディッシュ上に吸着させ、MM-N液体培地を加えることで観察用のサンプルを作製した。それぞれのタイムポイントにおいてZ軸に沿って、13セクションずつ撮影した。その後、バックグラウンドノイズの低減のためにSoftWoRxによりデコンボリューション処理を行い、quick projectionにてZ軸に沿って撮影した13枚の画像を統合し解析を行った。

【14】 *pat1-114*変異による減数分裂の同調

Pat1は減数分裂への進行を負に制御する因子である。*pat1-114*変異株は高温感受性を示し、32°Cないし34°Cに上げるとPat1が不活性化して同調的に減数分裂過程へと進行する。図11では村上浩士博士から頂いた1倍体の $h^- pat1-114 mat-Pc$ 株を改変して使用した。細胞を25°C、YE培地で 5×10^6 cells/mLとなるまで培養し、遠心して集菌して滅菌水で5回洗浄した。MM-N培地に 2×10^6 cells/mL濃度になるように再懸濁し、25°Cで6時間培養してG₁期停止を誘導した後、34°Cに温度を上げ減数分裂を同調的に誘導した。

図12のpREP由来のプラスミドを持つ株を用いた同調的な減数分裂の誘導では、

前培養にYE培地ではなくSD-Leucine培地を用いた。その後、*nmt81*プロモーターによる発現誘導のために、細胞をチアミンを含まない培地へ移し、*nmt*プロモーターの活性が最大となる16時間目(Maundrell, 1990)と、減数第一分裂から第二分裂への移行の時期であり、*cdc13* mRNAの発現が充分に見られる4時間目(図11A)が重なるように培養条件を調整した。具体的には、25°CのSD-Leucine培地で前培養した細胞を、MM+N培地へ移して25°C、6時間培養して 5×10^6 cells/mLとした。遠心して集菌し滅菌水で5回洗浄した後、MM-N培地に 2×10^6 cells/mLとなるように再懸濁し、25°C、6時間培養した後34°Cに温度を上げて減数分裂を誘導した。

【15】 分裂酵母からのタンパク質調製とウェスタンブロット

30°CのYE液体培地中でインキュベートした細胞を回収し、0.5 mlの100mM PMSFを懸濁して遠心し、上清を取り除いた。1 mL Cdc2 stop buffer (50 mM NaF、10 mM EDTA、1 mM NaN_3 、0.9% NaCl) および10 μL の 100 mM PMSFに懸濁し、凍結保存チューブに移した後、再度遠心して上清を除去した。100 mL HB buffer (25 mM MOPS、5 mM EGTA、15mM MgCl_2 、50 mM β -glycerophosphate、15 mM p-nitrophenylphosphate、1 mM DTT、0.1 mM Sodium vanadate、0.2%NP40、1 mM PMSF、使用時にRoche社のプロテアーゼインヒビターカクテル[Complete Mini EDTA-free] 1錠を1 mL HB bufferに対して加えた) および1 μL の100 mM PMSFに懸濁し、6分間加熱処理した後、液体窒素を用いて急速凍結した。約0.3 gのガラスビーズ($\phi = 0.5$ mm)を加えて激しく攪拌することにより細胞を破碎処理し、凍結保存チューブの底面に小胞を開けてマイクロチューブ上に載せて遠心するこ

とにより、ビーズを除去し。上清を別のマイクロチューブに移し、5分間加熱処理した後、50 mLのx6 SDS-PAGE loading buffer (350 mM Tris-HCl [pH 6.8, including 0.28% SDS], 30% Glycerol, 10% SDS, 600 mM DTT, 0.012% Bromophenol blue) を加え懸濁した。SDS-PAGE (4-12% gradient Criterion XT Precast Gel, BIO-RAD) により分離し、泳動分離したタンパク質をiBlot システム (invitrogen) によってニトロセルロース膜へと転写した。一次抗体として、抗Cdc13マウスモノクローナル抗体 (1:1000, Abcam) 抗GFPウサギポリクローナル抗体 (1:1,000, MBL)、抗 α -チューブリンマウスモノクローナル抗体 (B-5-1-2, 1:2,500, SIGMA) を用いた。二次抗体にはhorseradish peroxidase を結合させた抗マウスIgG 抗体および抗ウサギIgG抗体(1:10,000, Amersham Pharmacia)を用いた。タンパク質の検出には、ECL plus (Amersham Pharmacia)を用い、peroxidase反応により発光したルミノールをImageAnalyzer (LAS-1000 plus Fuji Film) により検出した。

【16】 RNAの調製とノザンブロット

集菌した細胞からホット酸性フェノール法(Collart and Oliviero, 2001)によりRNAを抽出した。720 μ LのTBS (10 mM Tris-HCl [pH7.5], 10 mM EGTA [pH8.0], 0.5 % SDS)に懸濁し、等量のacidic phenol-chloroform (Phenol : Chloroform : Isoamyl Alcohol 25 : 24 : 1 Mixed [pH5.2], nacalai tesque)を加えて振り混ぜ、65°Cで10分おきに激しく攪拌しながら1時間インキュベートした。4°Cで遠心した後、水層をマイクロチューブに移し、酸性フェノール・クロロホルムを400 μ L加えて4°Cで遠心した。さらに水層を別のマイクロチューブに移し、400 μ Lのクロロホルムを加え、4°Cで遠心した。エタノール沈澱後、滅菌水に溶解し、試料のRNA濃度

をOD₂₆₀ (1 OD = 40 mg/mL) の測定により決定した。RNAをホルムアルデヒドにより変性させたのち、1.2 %アガロースゲルで電気泳動し、ナイロンメンブレン (GeneScreen) にトランスファーした。ランダムプライムラベリング法により³²Pでラベルしたプローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。

【17】 RT-qPCR

Turbo DNA-free (Ambion) により DNase 処理したトータル RNA を鋳型に、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて逆転写反応を行った。qPCR 反応は Power SYBR® Green (Applied Biosystems) を用い、Real Time PCR 7300 system (Applied Biosystems) 上で行った。内在性コントロールには *act1* 遺伝子の発現量を用いた。定量結果は検量線による相対定量を用いて解析した。解析に用いたプライマーは Primer Express® Software v3.0 (Applied biosystems) を用いて配列を決定した。本研究で使用したプライマーを以下に記す。

- *cdc13_RT_F*: 5'-ACAGTGTGCTGCCGCTATGT-3'
- *cdc13_RT_R*: 5'-CCACGGTCCACGTCCAA-3'
- *act1_RT_F*: 5'-TGAGGAGCACCCCTTGCTTGT-3'
- *act1_RT_R*: 5'-TCTTCTCACGGTTGGATTTGG-3'

【18】 シグナルとバンドの定量

蛍光強度およびウエスタンブロットティング、ノザンブロットティングのバンド

強度の定量には ImageJ ソフトウェア (NIH)を用いた。

表 2. 本研究で用いた分裂酵母株

Strain	Genotype	Source
MA2	<i>h⁹⁰ cut11-GFP-kanR ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	This study
JY878	<i>h⁹⁰ ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>	This study
JY879	<i>h⁹⁰ ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	Laboratory Stock
MA276	<i>h⁹⁰ spo5::bsdR ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>	Laboratory Stock
MA70	<i>h⁹⁰ spo5::ura4⁺::spo5-m6 ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>	This study
MA65	<i>h⁹⁰ spo5::ura4⁺::spo5-m10 ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>	This study
MA79	<i>h⁹⁰ spo5::ura4⁺::spo5-m12 ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>	This study
MA67	<i>h⁹⁰ spo5::ura4⁺::spo5-m14 ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>	This study
MA91	<i>h⁹⁰ spo5::ura4⁺::spo5(385-567) ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>	This study
MA90	<i>h⁹⁰ spo5::ura4⁺::spo5(297-567) ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>	This study
MA89	<i>h⁹⁰ spo5::ura4⁺::spo5(192-567) ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>	This study
MA527	<i>h⁹⁰ spo5::ura4⁺::spo5-4A(T29A, T55A, S59A, T63A) ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>	This study
MA602	<i>h⁹⁰ spo5::ura4⁺::spo5-4D(T29D, T55D, S59D, T63D) ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>	This study
MA674	<i>h⁹⁰ cdc13-YFP-kanR sfi1-mRFP-hygR ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>	This study
MA675	<i>h⁹⁰ spo5::bsd^r cdc13-YFP-kanR sfi1-mRFP-hygR ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>	This study

MA328	<i>h⁹⁰ cdc2-1w ade6-M216 leu1-32</i>	This study
JW106	<i>h⁹⁰ cdc2-3w ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>	Laboratory Stock
JX421	<i>h⁹⁰ wee1-50 ade6-M216 leu1-32</i>	Laboratory Stock
JV939	<i>h⁹⁰ fzr1/mfr1::ura4⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>	Laboratory Stock
AE142	<i>h⁺ slp1-362 leu1-32</i>	T. Matsumoto
JX755	<i>h⁹⁰ slp1-362 ade6-M216 leu1-32</i>	Laboratory Stock
MA315	<i>h⁹⁰ spo5::kanR cdc2-1w ade6-M216 leu1-32</i>	Laboratory Stock
MA102	<i>h⁹⁰ spo5::kanR cdc2-3w ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>	This study
MA374	<i>h⁹⁰ spo5::kanR wee1-50 ade6-M216 leu1-32</i>	This study
MA112	<i>h⁹⁰ spo5::kanR fzr1/mfr1::ura4⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>	This study
MA114	<i>h⁹⁰ spo5::kanR slp1-362 ade6-M216 leu1-32</i>	This study
MA189	<i>h⁹⁰ cdc13-GFP-kanR sfi1-mRFP-hygR cut8-ECFP-natR ade6-M216 leu1 ura4</i>	This study
MA287	<i>h⁹⁰ cdc13-3dendra2-hygR sfi1-CFP-natR ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>	This study
MA295	<i>h⁹⁰ spo5::bsdR cdc13-3dendra2-hygR sfi1-CFP-natR ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>	This study
MA296	<i>h⁹⁰ mes1::bsdR cdc13-3dendra2-hygR sfi1-CFP-natR ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>	This study
JY882	<i>h⁻ pat1-114 leu1 ura4 ade6-M210</i>	Laboratory Stock
MA482	<i>h⁻ pat1-114 spo5::natR leu1 ura4 ade6-M210</i>	This study

MA476	<i>h⁹⁰ cig2-2GFP-kanR cdc13-CFP-natR sfi1-mRFP-hygR leu1 ura4 ade6-M216</i>	This study
MA473	<i>h⁹⁰ spo5::bsdR cig2-2GFP-kanR cdc13-CFP-natR sfi1-mRFP-hygR leu1 ura4 ade6-M216</i>	This study
MA456	<i>h⁹⁰ cdr2-3GFP-kanR cdc13-CFP-natR sfi1-mRFP-hygR leu1 ura4 ade6-M216</i>	This study
MA459	<i>h⁹⁰ spo5::bsdR cdr2-3GFP-kanR cdc13-CFP-natR sfi1-mRFP-hygR leu1 ura4 ade6-M216</i>	This study
MA415	<i>h⁹⁰ cdc25-3GFP-kanR cdc13-CFP-natR sfi1-mRFP-hygR leu1 ura4 ade6-M216</i>	This study
MA414	<i>h⁹⁰ spo5::bsdR cdc25-3GFP-kanR cdc13-CFP-natR sfi1-mRFP-hygR leu1 ura4 ade6-M216</i>	This study

参考文献

Aoi, Y., Arai, K., Miyamoto, M., Katsuta, Y., Yamashita, A., Sato, M., and Yamamoto, M. (2013). Cuf2 boosts the transcription of APC/C activator Fzr1 to terminate the meiotic division cycle. *EMBO reports* *14*, 553-560.

Asakawa, H., Kitamura, K., and Shimoda, C. (2001). A novel Cdc20-related WD-repeat protein, Fzr1, is required for spore formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular genetics and genomics : MGG* *265*, 424-435.

Bahler, J., Wu, J.Q., Longtine, M.S., Shah, N.G., McKenzie, A., 3rd, 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.

Basi, G., Schmid, E., and Maundrell, K. (1993). TATA box mutations in the *Schizosaccharomyces pombe* nmt1 promoter affect transcription efficiency but not the transcription start point or thiamine repressibility. *Gene* *123*, 131-136.

Berchowitz, L.E., Gajadhar, A.S., van Werven, F.J., De Rosa, A.A., Samoylova, M.L., Brar, G.A., Xu, Y., Xiao, C., Futcher, B., Weissman, J.S., *et*

al. (2013). A developmentally regulated translational control pathway establishes the meiotic chromosome segregation pattern. *Genes & development* *27*, 2147-2163.

Blanco, M.A., Pelloquin, L., and Moreno, S. (2001). Fission yeast *mfr1* activates APC and coordinates meiotic nuclear division with sporulation. *Journal of cell science* *114*, 2135-2143.

Blow, J.J. (1993). Preventing re-replication of DNA in a single cell cycle: evidence for a replication licensing factor. *The Journal of cell biology* *122*, 993-1002.

Blow, J.J., and Dutta, A. (2005). Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nature reviews Molecular cell biology* *6*, 476-486.

Borgne, A., Murakami, H., Ayte, J., and Nurse, P. (2002). The G1/S cyclin Cig2p during meiosis in fission yeast. *Molecular biology of the cell* *13*, 2080-2090.

Bresch, C., Muller, G., and Egel, R. (1968). Genes involved in meiosis and sporulation of a yeast. *Molecular & general genetics : MGG* *102*, 301-306.

Bueno, A., and Russell, P. (1993). Two fission yeast B-type cyclins, *cig2* and

Cdc13, have different functions in mitosis. *Molecular and cellular biology* 13, 2286-2297.

Carlile, T.M., and Amon, A. (2008). Meiosis I is established through division-specific translational control of a cyclin. *Cell* 133, 280-291.

Cerutti, L., and Simanis, V. (2000). Controlling the end of the cell cycle. *Current opinion in genetics & development* 10, 65-69.

Chudakov, D.M., Lukyanov, S., and Lukyanov, K.A. (2007). Tracking intracellular protein movements using photoswitchable fluorescent proteins PS-CFP2 and Dendra2. *Nature protocols* 2, 2024-2032.

Collart, M.A., and Oliviero, S. (2001). Preparation of yeast RNA. *Current protocols in molecular biology* / edited by Frederick M Ausubel [et al] *Chapter 13*, Unit13 12.

Curtis, D., Lehmann, R., and Zamore, P.D. (1995). Translational regulation in development. *Cell* 81, 171-178.

de Moor, C.H., and Richter, J.D. (1997). The Mos pathway regulates cytoplasmic polyadenylation in *Xenopus* oocytes. *Molecular and cellular biology* 17, 6419-6426.

Decottignies, A., Zarzov, P., and Nurse, P. (2001). In vivo localisation of fission yeast cyclin-dependent kinase *cdc2p* and cyclin B *cdc13p* during mitosis and meiosis. *Journal of cell science* *114*, 2627-2640.

Elledge, S.J. (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* *274*, 1664-1672.

Gutz, H., Heslot, H., and Leupold, U. (1974). *Schizosaccharomyces pombe*, Vol 1 (New York: Plenum Publishing Corp.).

Hake, L.E., and Richter, J.D. (1997). Translational regulation of maternal mRNA. *Biochimica et biophysica acta* *1332*, M31-38.

Hirata, A., and Shimoda, C. (1992). Electron microscopic examination of sporulation-deficient mutants of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Archives of microbiology* *158*, 249-255.

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.

Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency

transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.

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. *The EMBO journal* 19, 4513-4523.

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.

Kanoh, J., and Russell, P. (1998). The protein kinase Cdr2, related to Nim1/Cdr1 mitotic inducer, regulates the onset of mitosis in fission yeast. *Molecular biology of the cell* 9, 3321-3334.

Kasama, T., Shigehisa, A., Hirata, A., Saito, T.T., Tougan, T., Okuzaki, D., and Nojima, H. (2006). Spo5/Mug12, a putative meiosis-specific RNA-binding protein, is essential for meiotic progression and forms Mei2 dot-like nuclear foci. *Eukaryotic cell* 5, 1301-1313.

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. *Developmental cell* 14,

446-454.

Kishida, M., and Shimoda, C. (1986). Genetic mapping of eleven spo genes essential for ascospore formation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Current genetics* *10*, 443-447.

Kobayashi, H., Stewart, E., Poon, R.Y.C., and Hunt, T. (1994). Cyclin A and cyclin B dissociate from p34cdc2 with half-times of 4 and 15 h, respectively, regardless of the phase of the cell cycle. *The Journal of biological chemistry* *269*, 29153-29160.

Lohka, M.J., Hayes, M.K., and Maller, J.L. (1988). Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *85*, 3009-3013.

Macdonald, P.M., and Smibert, C.A. (1996). Translational regulation of maternal mRNAs. *Current opinion in genetics & development* *6*, 403-407.

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. *The Journal of cell biology* *174*, 791-801.

Masui, Y., and Markert, C.L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *The Journal of experimental zoology* *177*, 129-145.

Matsumoto, T. (1997). A fission yeast homolog of CDC20/p55CDC/Fizzy is required for recovery from DNA damage and genetically interacts with p34cdc2. *Molecular and cellular biology* *17*, 742-750.

Maundrell, K. (1990). nmt1 of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine. *The Journal of biological chemistry* *265*, 10857-10864.

Maundrell, K. (1993). Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* *123*, 127-130.

Mendez, R., and Richter, J.D. (2001). Translational control by CPEB: a means to the end. *Nature reviews Molecular cell biology* *2*, 521-529.

Mondesert, O., McGowan, C.H., and Russell, P. (1996). Cig2, a B-type cyclin, promotes the onset of S in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and cellular biology* *16*, 1527-1533.

Moseley, J.B., Mayeux, A., Paoletti, A., and Nurse, P. (2009). A spatial

gradient coordinates cell size and mitotic entry in fission yeast. *Nature* *459*, 857-860.

Nishiyama, T., Ohsumi, K., and Kishimoto, T. (2007). Phosphorylation of Erp1 by p90rsk is required for cytostatic factor arrest in *Xenopus laevis* eggs. *Nature* *446*, 1096-1099.

Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* *344*, 503-508.

Ohe, M., Inoue, D., Kanemori, Y., and Sagata, N. (2007). Erp1/Emi2 is essential for the meiosis I to meiosis II transition in *Xenopus* oocytes. *Developmental biology* *303*, 157-164.

Ohe, M., Kawamura, Y., Ueno, H., Inoue, D., Kanemori, Y., Senoo, C., Isoda, M., Nakajo, N., and Sagata, N. (2010). Emi2 inhibition of the anaphase-promoting complex/cyclosome absolutely requires Emi2 binding via the C-terminal RL tail. *Molecular biology of the cell* *21*, 905-913.

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 research* *18*, 6485-6489.

Okuzaki, D., Kasama, T., Hirata, A., Ohtaka, A., Kakegawa, R., and Nojima, H. (2010). Spo5 phosphorylation is essential for its own timely degradation and for successful meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell cycle* 9, 3751-3760.

Reed, S.I. (2003). Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. *Nature reviews Molecular cell biology* 4, 855-864.

Russell, P., and Nurse, P. (1986). *cdc25+* functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* 45, 145-153.

Russell, P., and Nurse, P. (1987). The mitotic inducer *nim1+* functions in a regulatory network of protein kinase homologs controlling the initiation of mitosis. *Cell* 49, 569-576.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning*. In a laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

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 in molecular biology* 545, 185-203.

Sherr, C.J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672-1677.

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*. *Molecular & general genetics* : MGG 200, 252-257.

Shoji, S., Yoshida, N., Amanai, M., Ohgishi, M., Fukui, T., Fujimoto, S., Nakano, Y., Kajikawa, E., and Perry, A.C. (2006). Mammalian Emi2 mediates cytostatic arrest and transduces the signal for meiotic exit via Cdc20. *The EMBO journal* 25, 834-845.

Stebbins-Boaz, B., Hake, L.E., and Richter, J.D. (1996). CPEB controls the cytoplasmic polyadenylation of cyclin, Cdk2 and *c-mos* mRNAs and is necessary for oocyte maturation in *Xenopus*. *The EMBO journal* 15, 2582-2592.

Tanaka, T.U. (2002). Bi-orienting chromosomes on the mitotic spindle. *Current opinion in cell biology* 14, 365-371.

van der Velden, H.M., and Lohka, M.J. (1994). Cell cycle-regulated degradation of *Xenopus* cyclin B2 requires binding to p34cdc2. *Molecular*

biology of the cell *5*, 713-724.

Wu, J.Q., Hansen, D.V., Guo, Y., Wang, M.Z., Tang, W., Freel, C.D., Tung, J.J., Jackson, P.K., and Kornbluth, S. (2007). Control of Emi2 activity and stability through Mos-mediated recruitment of PP2A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 16564-16569.

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. *The Journal of cell biology* *182*, 277-288.

Zachariae, W., and Nasmyth, K. (1999). Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes & development* *13*, 2039-2058.

謝辞

本研究にて使用した *h-pat1-114 mat-Pc* 株は村上浩士博士より頂きました。また、ニトロソグアニジンを用いたランダムスクリーニングの手法については浅川和秀博士よりご助言頂きました。この場を借りて深く御礼申し上げます。

佐藤政充博士、山下朗博士には大変熱心なご指導とご助言を頂きました。山本研究室の皆様には実験手法や材料を提供して頂き、有益な議論の場とご助言を頂きました。心より感謝致します。また、飯野雄一先生には、かずさ DNA 研究所へ移ってからの東京大学での指導教員として本研究を支えて頂きました。皆様に心より御礼申し上げます。

そして、本研究を全面的に支えて下さり、熱心なご指導と、国内外での研究発表の機会を多数与えて頂きました山本正幸先生に篤く御礼申し上げます。

最後に、長い大学院生活を支えてくれた家族に感謝の意を表明致します。

