

学位論文

分裂酵母の減数分裂進行に必須な 長鎖ノンコーディング RNA である meiRNA の機能解析

Functional analysis of meiRNA,
which is a long non-coding RNA essential for
the progression of meiosis in fission yeast

平成 25 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

七野 悠一

Abstract

分裂酵母は、体細胞分裂から減数分裂へと移行する際、遺伝子発現パターンを大幅に切り換える。体細胞分裂期には、減数分裂抑制因子 Mmi1 が減数分裂特異的な転写産物上の DSR 配列を認識し、それらを選択的な分解へと導く。一方、減数分裂期に入ると、長鎖ノンコーディング RNA である meiRNA と減数分裂マスター制御因子 Mei2 が結合し、meiRNA をコードする遺伝子座に凝集して、核内構造体 Mei2 ドットを形成する。この Mei2 ドットが Mmi1 を一箇所に束ねて不活性化し、減数分裂特異的な遺伝子発現パターンへの移行を促進する。meiRNA は減数分裂の進行において欠かせない役割を担っているが、その機能に関しては、自らの遺伝子座に凝集する機構も含めて不明な点が多い。そこで本研究では、meiRNA の詳細な機能解析を行った。

meiRNA の 3' 側の領域には、DSR 配列を構成する 6 塩基モチーフが多数存在していた。meiRNA が Mmi1 の基質である可能性を検討したところ、meiRNA が 3' 側で Mmi1 と直接結合し、Mmi1 を介した RNA 分解を受けていることが明らかとなった。また、meiRNA が Mei2 に依存せず Mmi1 を自らの遺伝子座に誘引し、1 点に集合させる能力をもつことが示された。これらの結果から、meiRNA は Mmi1 の擬似餌として働き、Mmi1 の活性低下を誘導していると考えられる。

次に、meiRNA が自らの遺伝子座に凝集する機構について解析を行った。*mmi1* 破壊株や、Mmi1 と結合できない meiRNA 変異株では、meiRNA は凝集しなかった。更に、Mmi1 はタンパク質分子同士で結合することがわかった。この自己結合に必要な領域を欠損した *mmi1* 変異株では meiRNA の凝集は観察されなかった。以上から、meiRNA は Mmi1 の自己相互作用を介して自らの遺伝子座で凝集し、減数分裂進行を促していると考えられる。

Abstract

The gene expression profile changes dramatically between mitosis and meiosis in fission yeast. In mitotic cells, the meiosis-inhibitor Mmi1 recognizes the DSR sequence in meiosis-specific transcripts and eliminates them selectively. During meiosis, a long non-coding RNA species termed meiRNA and a master meiotic regulator Mei2 bind with each other and form a nuclear body called Mei2 dot in the genetic locus of meiRNA. The Mei2 dot converges Mmi1 into a single focus and inactivates it. Thus, the meiosis-specific gene expression profile is ensured. The meiRNA plays an essential role in the progression of meiosis, but its molecular function remains elusive. It is also ambiguous how meiRNA aggregates in its own genetic locus. To address these issues, I performed the functional analysis of meiRNA.

I realized that the 3' region of meiRNA carries numerous hexanucleotide motifs that constitute DSR. This led me to investigate the possibility that meiRNA is a target of Mmi1. I found that meiRNA directly bound to Mmi1 via its 3' region, and was degraded by the Mmi1-mediated elimination machinery. Furthermore, meiRNA promotes the accumulation of Mmi1 to the genetic locus of meiRNA even in the absence of Mei2. These results suggest that meiRNA functions as a decoy to lure Mmi1 and induces the decrease of its activity.

Next, I analyzed the mechanism that meiRNA was assembled on its own genetic locus. The meiRNA failed to aggregate in *mmi1*-depleted cells or meiRNA mutant cells that could not bind to Mmi1. I further found that Mmi1 molecules could interact among themselves. Mmi1 lacking the region required for the self-interaction could not assemble meiRNA. From these observations, I concluded that meiRNA is tethered in its own genetic locus through the self-interaction of Mmi1, and promotes the progression of meiosis.

目次

序論	…	1
分裂酵母の生活環		
核内構造体とノンコーディング RNA		
分裂酵母の減数分裂に必要な核内構造体 Mei2 ドット		
Mmi1 を介した減数分裂特異的な RNA 分解系		
meiRNA の相同染色体対合における機能		
本研究の目的		
材料と方法	…	13
結果	…	29
meiRNA には多数の DSR モチーフが存在する		
減数分裂の初期に働く転写因子 Ste11 は meiRNA の転写を活性化する		
meiRNA は Mmi1 を介した RNA 分解を受けている		
meiRNA は多数の DSR モチーフを含む 3' 側の領域を介して Mmi1 と結合する		
meiRNA は DSR モチーフを介して Mmi1 の擬似餌として働く		
生細胞内における meiRNA の可視化		
meiRNA のドット形成に Mei2 は不要である		
DSR モチーフを多数含む 3' 側の領域は meiRNA のドット形成に必要なである		
Mmi1 の自己相互作用が meiRNA のドット形成に必須である		
DSR をもつ mRNA はドットを形成する		

meiRNA は DSR モチーフを介して Mmi1 を *sme2* 遺伝子座に誘引する

meiRNA は散在する Mmi1 を 1 つに束ねる能力をもつ

meiRNA の過剰発現による Mmi1 の集合は Mei2 非依存的である

meiRNA は Mmi1 の活性を低下させる能力をもつ

考察と展望 … 56

meiRNA-S と meiRNA-L の生成機構

Mmi1 がもつ 2 つの機能

DSR をもつ RNA の分解箇所

meiRNA が自らの遺伝子座に係留される機構

DSR 依存的に RNA がドットを形成することの生理的な意義

meiRNA による相同染色体の対合

meiRNA が Mmi1 の活性を抑制する機構

謝辞 … 67

参考文献 … 68

序論

あらゆる生物は生殖によって新たな個体を産生し、自らの遺伝情報を伝達することで、生命の永続性を獲得している。生殖は、細胞分裂によって親個体と同じ遺伝子型の個体を産生する無性生殖と、配偶子形成とその融合によって両親とは異なる多様な遺伝子型の個体を産生する有性生殖の2種類に大きく分類される。配偶子形成の際に行われる特殊な分裂様式である減数分裂は、酵母からヒトまで幅広く保存された生命現象である。減数分裂では、DNA複製の後に連続して2回の核分裂が行われ、体細胞の半分のDNA量をもった配偶子が形成される。また、第一分裂の前期には相同染色体の対合が起こり、高頻度な染色体の組換えが生じるため、様々な遺伝子型の配偶子の形成が可能となる。この配偶子が融合することで、さらに多様性に富んだ遺伝子型の個体が産生され、環境の変化に適応できる個体が生まれる可能性が高まる。これらの点から、有性生殖・減数分裂には進化的に多くのメリットがあるといえるが、その分子機構には未知の部分が非常に多く残されている。

単細胞真核生物である分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は、減数分裂の分子機構を解析する上で有用なモデル生物である。分裂酵母は培地中の栄養源、特に窒素源を減少させることで、減数分裂を人為的に誘導することができるため、高等真核生物の生殖細胞に比べて扱いが容易である。また、倍加時間が約3時間と短く、全ゲノム配列が解読され、強力な遺伝学的、逆遺伝学的手法が整備されている。蛍光顕微鏡を用いた局在観察や、タンパク質やRNA量の測定、免疫沈降による因子間結合の評価などの生化学的・分子生物学的解析も容易に行うことができる。さらに、トランスクリプトームやプロテオームなどの網羅的な研究も進ん

であり、様々な生命現象の分子機構を解析する上で有用なツールが十分に用意されている。そこで本研究では、分裂酵母をモデル生物として利用し、減数分裂の分子機構を詳細に解明することを試みた。

分裂酵母の生活環

分裂酵母は、通常一倍体として安定に存在し、体細胞分裂を繰り返すことで増殖する。しかし、培地中の窒素源が枯渇すると体細胞分裂を G1 期で停止し、相異なる接合型の細胞同士で接合を行う。分裂酵母には h^+ 型および h^- 型の 2 種類の接合型があり、両者は *mat1* 遺伝子座に挿入されている遺伝子カセットの違いによって決定されている (Beach, 1983)。遺伝子カセットには *mat2-P* と *mat3-M* の 2 種類が存在し、*mat2-P* が *mat1* 遺伝子座へ挿入されている場合は h^+ 型に、*mat3-M* が挿入されている場合は h^- 型の細胞となる。*mat1* 遺伝子座に挿入されている遺伝子カセットが分裂の際に高頻度で切り換わり、単一のコロニー内に h^+ 型と h^- 型が混在する株をホモタリック株と呼び、 h^{90} 型と表記する。また、分裂しても遺伝子カセットが切り換わらず、親細胞と接合型が変わらない株をヘテロタリック株と呼ぶ。

窒素源飢餓を感知した分裂酵母は、接合の後、核融合を経て二倍体化し、減数分裂前 DNA 合成を行う。減数第一分裂の前期には、ホーステールと呼ばれる形状の核が細胞内を大きく往復する特徴的な運動によって、相同染色体の対合が促進される。次いで、2 回の連続した核分裂が行われ、一倍体の胞子が 4 つ形成される。胞子は、強固な胞子壁を持ち、貧栄養などの厳しい生育環境に耐えることができる。栄養状態が回復すると、胞子は発芽して通常の一倍体細胞に戻り、再び体細胞分裂によって増殖を繰り返す (図 1)。

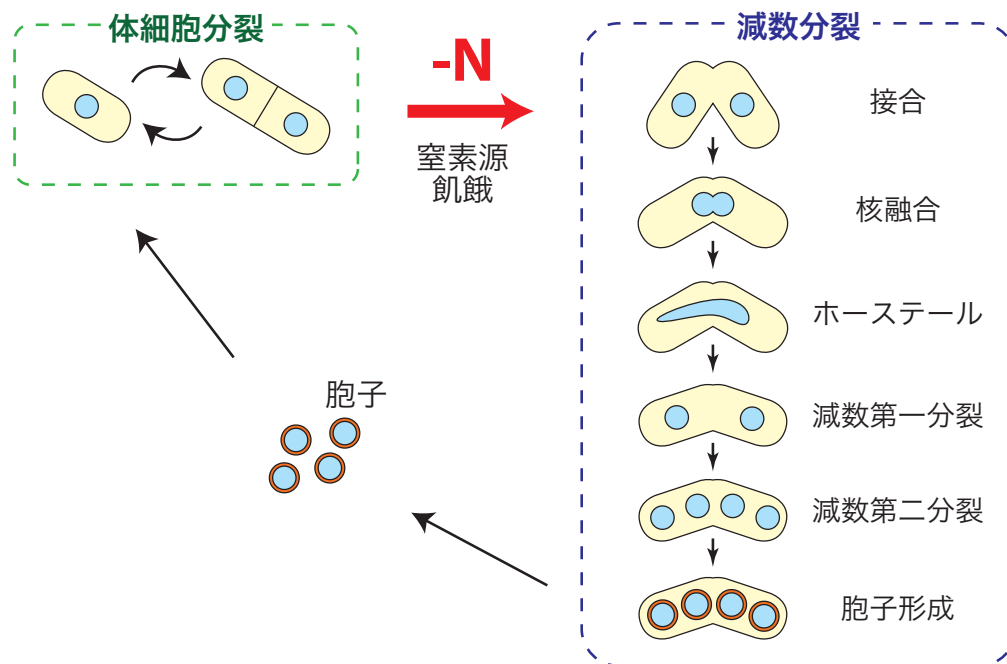


図 1 分裂酵母の生活環

分裂酵母は体細胞分裂により増殖するが、窒素源の枯渇を認識すると細胞周期を G1 期で停止し、接合、核融合を経て減数分裂に移行して孢子形成を行う。

核内構造体とノンコーディング RNA

減数分裂をはじめ、様々な生命現象は細胞内における生化学反応の連続として捉えることができる。一連の反応を正確かつ効率良く行うためには、反応に関わる様々な因子の位置を正確に制御する必要がある。特に、真核生物の核内においては、非常に限られた空間で実に多様な反応が行われているため、一連の反応に関与する因子が集められて核内構造体 (nuclear body) を形成する例が多数知られている (Spector, 2006)。スプライシングに関与する snRNP や snoRNP の生合成に関わるカハル体 (Matera and Shpargel, 2006)、あるいは mRNA の 3' 末端修飾の際に行われる切断反応に関わるクリベージ体などがその一例である (Schul et al, 1996)。核内構造体はタンパク質や RNA などの構成因子の相互作用によって形成されており、多くの細胞小器官 (オルガネラ) と違って非膜性である。

核内構造体の中には、長鎖ノンコーディング RNA (long non-coding RNA、

lncRNA) を含むものが存在する。lncRNA とは、長さが 200 塩基以上で、タンパク質をコードする能力を有しない RNA をいう (Rinn and Chang, 2012)。lncRNA の末端の修飾は様々であるが、mRNA のように 5' キャップ構造や 3' poly(A) 構造をもつものも存在する。lncRNA はタンパク質をコードする mRNA とは異なり、翻訳のために細胞質へ移行する必要が無く、核内に局在しつづけているものも多い (Derrien et al, 2012)。核内の様々な反応を制御する上で、タンパク質よりも、転写後そのまま核内に留まり続ける lncRNA を利用する方が、素早く経済的であると考えられている。lncRNA はこれまでに X 染色体の不活性化、胚性幹細胞の多能性、細胞周期制御など、生体内における様々な過程に関与していることが知られているが、どの場合も RNA 結合タンパク質と結合して RNA タンパク質複合体 (ribonucleoprotein、RNP) を形成し、遺伝子発現を制御する点は共通であると考えられている (Rinn and Chang, 2012)。

近年、一部の lncRNA が核内構造体の形成に必須な役割を果たしていることが報告された (Batista and Chang, 2013)。例えば、lncRNA の一種である *NEAT1* は、哺乳類細胞に存在するパラスペックルという核内構造体の形成に必須である。パラスペックルは、核内に十数個観察され、*NEAT1* RNA の他に、RNA 結合タンパク質の PSPC1 (PSP1)、NONO (p54nrb)、SFPQ (PSF) などをはじめとした様々な因子により構成されている (Fox et al, 2002; Naganuma et al, 2012; Prasanth et al, 2005)。パラスペックルの生理的な意義に関しては不明な点が多いが、パラスペックルが形成できないマウスも正常に生育するため、何らかのストレス下で機能する構造体であると考えられている (Nakagawa et al, 2011)。実際、以下のような例が知られている。ストレス応答に必要な *mCAT2* 遺伝子の mRNA には非常に長い 3' UTR (untranslated region) をもつものが存在し、その 3' UTR に含まれる局在化シグナルによってパラスペックルに係留され、核内に留まっている。ウィルス感

染などのストレスを受けると、3' UTR が切断されることによってパラスペックルを離れて核外放出され、mCAT2 タンパク質が翻訳される。(Prasanth et al, 2005)。

NEAT1 をノックアウトすると、パラスペックルタンパク質の量は変化しないが、パラスペックルは消失してしまう (Chen and Carmichael, 2009; Clemson et al, 2009; Sasaki et al, 2009; Sunwoo et al, 2009)。パラスペックルは *NEAT1* 遺伝子座の近傍に形成されることが知られている (Clemson et al, 2009)。また、*NEAT1* RNA を人工的に染色体上に繋ぎ止めると、その固定箇所に新たなパラスペックルが形成される。しかし、他のパラスペックルタンパク質を同様に固定化しても、パラスペックル形成は誘導されない (Mao et al, 2011)。*NEAT1* 遺伝子座に形成されたパラスペックルはその後、核質内に放出される。以上から、*NEAT1* RNA は自らの遺伝子座ないしその近傍に蓄積し、パラスペックルタンパク質を集合させるために必須の足場として働くと考えられる。このように、lncRNA は核内構造体の形成機構や機能を解明する上で、重要な鍵を握る因子であるといえる。

分裂酵母の減数分裂に必要な核内構造体 Mei2 ドット

分裂酵母の減数分裂の進行には、Mei2 ドットという核内構造体が非常に重要な役割を果たしていることが知られている。Mei2 ドットは、RNA 結合タンパク質である Mei2 と、lncRNA である meiRNA から構成されている (Watanabe and Yamamoto, 1994; Yamashita et al, 1998)。Mei2 は減数分裂の開始を支配するマスター制御因子であり、*mei2* 遺伝子を破壊すると、細胞は減数分裂前 DNA 合成を開始せずに停止する (Watanabe and Yamamoto, 1994)。逆に、体細胞分裂期において、人為的に活性化状態にした Mei2 を発現させると、通常は減数分裂を行えない一倍体であっても、接合を経ずに減数分裂を開始してしまう (Watanabe et al, 1997)。このため、体細胞分裂期には Mei2 の活性は強く抑制される必要があ

る。*mei2* 遺伝子の転写は体細胞分裂期には低く抑えられている (Watanabe et al, 1988)。窒素源の枯渇を細胞が認識すると、減数分裂の初期に働く転写因子である Ste11 の機能によって *mei2* 遺伝子の転写が活性化される (Sugimoto et al, 1991)。さらに、体細胞分裂期には、Mei2 タンパク質は Pat1 キナーゼによってリン酸化され、このリン酸化によって機能抑制およびユビキチン・プロテアソーム経路によるタンパク質分解の促進を受けている (Kitamura et al, 2001; Watanabe et al, 1997)。

Mei2 の RNA 結合モチーフに変異を導入して、低温では正常に機能するが、高温では機能を失う変異体 (温度感受性変異体) が作製されている。この変異体を半制限温度下に置くと、制限温度下で Mei2 を完全に失活させた場合や *mei2* 遺伝子を破壊した場合にみられる減数分裂前 DNA 合成前で停止する表現型とは異なり、減数分裂前 DNA 合成を行った後、減数第一分裂前で停止する。この温度感受性 *mei2* 変異株の半制限温度下における表現型を多コピーで抑圧する因子の探索から、*meiRNA* をコードする *sme2* 遺伝子が単離された (Watanabe and Yamamoto, 1994)。*meiRNA* は 3' 末に poly(A) 鎖をもつ lncRNA であり、*meiRNA-S* (約 0.5 kb) と *meiRNA-L* (約 1.0 ~ 1.3 kb) の 2 種類のアイソフォームが存在する (Watanabe and Yamamoto, 1994; Yamashita et al, 2012)。

窒素源の枯渇によって減数分裂が誘導されると、Mei2 と *meiRNA* の発現量が上昇する (Watanabe et al, 1988; Watanabe and Yamamoto, 1994)。*in vitro* および *in vivo* の実験から、Mei2 と *meiRNA* が直接結合することが示されている (Watanabe and Yamamoto, 1994)。Mei2 と *meiRNA* は、両者とも核内で凝集し、同じ箇所ドット状の局在を示す (Watanabe et al, 1997; Yamashita et al, 1998)。*meiRNA* を発現しない *sme2* 破壊株では Mei2 ドットが形成されず、減数第一分裂前で停止してしまうため、Mei2 ドットの形成は減数分裂の進行に必須だといえる (Watanabe and Yamamoto, 1994; Yamashita et al, 1998)。さらに、Mei2 ドット

トは、2番染色体上に存在する *sme2* 遺伝子座に形成されることが示されている (Shimada et al, 2003)。以上の知見から、転写された *meiRNA* が自らの遺伝子座に係留され、*Mei2* ドットを形成するための足場として働いていると考えられる。

Mei2 ドットは減数第一分裂において、以下のように働くことが示されている (図2)。減数分裂の進行には多くの減数分裂特異的な遺伝子の発現が必要である。一方、不適切な減数分裂の開始・進行は生育を阻害するため、体細胞分裂期ではこれらの遺伝子の発現を抑制する必要がある。このため、体細胞分裂期の細胞においては、減数分裂特異的な遺伝子は転写レベルで抑制されている (Mata et al, 2002)。それに加えて、体細胞分裂期の細胞には、RNA結合タンパク質 *Mmi1* を中心とした、減数分裂特異的な転写産物を選択的に除去する機構が存在し、減数分裂特異的な遺伝子の発現が強く抑制されている (Harigaya et al, 2006)。一方、減数分裂期では、減数分裂の進行を阻害する *Mmi1* の活性は抑制されなければならない。*Mei2* ドットは、減数分裂期における *Mmi1* の活性を抑制する働きをもつことが明らかとなった。体細胞分裂期の細胞において、*Mmi1* は核内に散在し、

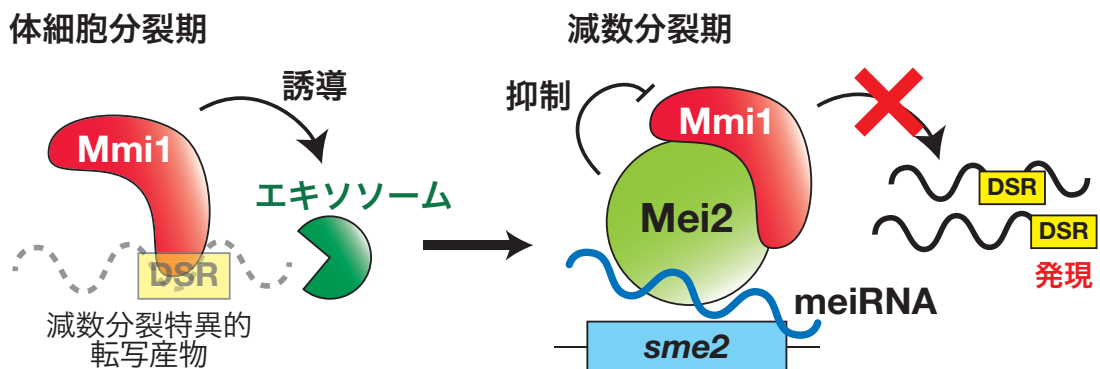


図2 *Mei2*-*meiRNA* による減数分裂の概略

体細胞分裂期には *Mmi1* が *DSR* をもつ減数分裂特異的な転写産物を認識し、*RNA* 分解を行うエキソソーム複合体へと誘導するため、減数分裂特異的な遺伝子の発現が強く抑えられる。一方、減数分裂期には *sme2* 遺伝子座に *meiRNA* と *Mei2* がドットを形成する。*Mei2* ドットは *Mmi1* を1つに束ね、その活性を抑制するため、減数分裂特異的な転写産物が分解されずに残り、減数分裂が進行する。

複数の点状の局在を示すが、減数分裂期の細胞では、Mmi1 は Mei2 ドット 1 点に集まっている。しかし、*mei2* あるいは *sme2* 破壊株では、減数分裂期の細胞でも Mmi1 が核内に散在したままであり、Mmi1 の活性も抑制されない。このことから、Mei2 ドットによって Mmi1 は 1 点に束ねられ、その活性が抑制されると考えられている (Harigaya et al, 2006)。減数分裂特異的な遺伝子の転写活性化に加え、Mmi1 が Mei2 ドットによって抑制されることで、減数分裂特異的な遺伝子の発現が上昇し、減数分裂の進行が可能になる。

Mmi1 を介した減数分裂特異的な RNA 分解系

Mmi1 は YTH ファミリーに属する RNA 結合タンパク質であり (Stoilov et al, 2002)、減数分裂特異的な転写産物に存在する DSR (determinant of selective removal) と呼ばれる目印配列に直接結合する (Harigaya et al, 2006; Yamashita et al, 2012)。DSR 配列は、6 塩基の UNAAAC というモチーフが一定領域内に複数、通例 6 個以上存在することで構成されている (Chen et al, 2011; Hiriart et al, 2012; Yamashita et al, 2012)。2 番目の塩基が U や C の場合は core motif と呼ばれ、DSR としての機能が強く、A や G の場合は augmenting motif と呼ばれ、DSR としての機能が弱い (Yamashita et al, 2012)。

Mmi1 は、DSR をもつ転写産物を認識し、それらを核内エキソソームによる RNA 分解系へと誘導している (図 2) (Harigaya et al, 2006; Yamanaka et al, 2010)。エキソソームは 3'→5' 方向のエキソヌクレアーゼ活性をもつ複合体であり、分裂酵母では核にのみ局在する Rrp6 と、核と細胞質両方に局在する Dis3 が主な機能サブユニットである (Allmang et al, 1999; Mitchell et al, 1997)。エキソソーム以外の Mmi1 を介した RNA 分解系に関与する因子の探索から、mRNA の poly(A) 付加を担う一般的な poly(A) ポリメラーゼ Pla1、poly(A) 付加の際に 3' 末端の

切断を行うクリベージ因子 CF1A のホモログ Rna15、poly(A) 結合タンパク質 PABPN1 のホモログ Pab2 が同定された (Yamanaka et al, 2010)。Pla1、Rna15、Pab2 の変異体では、体細胞分裂期において、DSR をもつ mRNA の発現上昇が観察される。また、これら全ての因子と Mmi1 との相互作用がみられている。さらに、poly(A) が付加されないように改変された DSR をもつ mRNA は、体細胞分裂期においても分解されないことが示されている。以上の知見から、Mmi1 は mRNA 上に存在する DSR を認識し、その mRNA の poly(A) 付加を行っている Pla1、Rna15 や、poly(A) 鎖と結合する Pab2 と相互作用しつつ、エキソソームを mRNA 上に誘導し、RNA 分解を促進していると考えられる (図 3)。

エキソソームのターゲットとしては、rRNA や snRNA、遺伝子間領域から転写される不安定な転写産物 CUT (cryptic unstable transcript) などが知られているが、これらの RNA がエキソソームによって分解されるためには、TRAMP と呼ばれる複合体による poly(A) 付加が必要である (LaCava et al, 2005; Wyers et al, 2005)。しかし、分裂酵母の TRAMP 複合体の poly(A) ポリメラーゼサブユニット Cid14 は、Mmi1 を介した RNA 分解に関与しないことが示されている (St-Andre et al, 2010; Yamanaka et al, 2010)。Cid14 ではなく、通常の mRNA の poly(A) 付加を行う

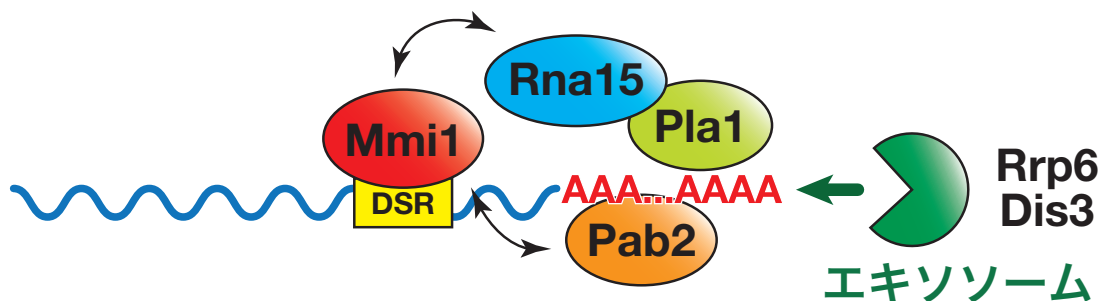


図 3 Mmi1 を介した RNA 分解系

Mmi1 は転写産物上の DSR 配列を認識し、転写産物の poly(A) 付加に関わる Pla1 や Rna15、poly(A) と結合する Pab2 などのタンパク質と相互作用することにより、DSR をもつ転写産物上へエキソソームを誘導し、分解を促進する。

Pla1 が分解促進に用いられていることは、非常に興味深い。

また、Mmi1 と相互作用し、Mmi1 とともに減数分裂特異的な転写産物の選択的除去に働く因子として Red1 が単離されている (Sugiyama and Sugioka-Sugiyama, 2011; Yamashita et al, 2013)。Red1 は体細胞分裂期において Mmi1 と共局在し、核内に複数個の点として観察されるが、減数分裂期には、Mei2 ドットに集められ 1 点となる Mmi1 とは異なり、細胞内に散逸してしまう。Red1 と Mmi1 の間の相互作用には Iss10 という因子が必要であることが知られている (Yamashita et al, 2013)。Iss10 タンパク質は減数分裂期において不安定化される。その結果、減数分裂期には Mmi1 と Red1 の間の相互作用が弱まり、Red1 の散逸が起こると考えられている。しかし、選択的除去における Red1 の詳細な機能は明らかになっていない。

さらに、Mmi1 と Red1 は、減数分裂特異的な遺伝子の条件的なヘテロクロマチン化に関与していることが報告されている。*mei4* や *ssm4* などの一部の減数分裂特異的な遺伝子は、体細胞分裂期においてヘテロクロマチン化を受けており、このヘテロクロマチン化は減数分裂期になると解除される (Cam et al, 2005; Zofall et al, 2012)。これらの遺伝子が転写されると、その mRNA 上に存在する DSR が Mmi1 により認識される。これによって Mmi1 は減数分裂特異的な遺伝子座に局在化する (Hiriart et al, 2012; Tashiro et al, 2013; Zofall et al, 2012)。局在化した Mmi1 は、RNA 干渉の機構に依存したヘテロクロマチン化を行う RITS (RNA-induced transcriptional silencing) 複合体をこれらの遺伝子座に誘導し、ヘテロクロマチン化を促進する (Hiriart et al, 2012; Tashiro et al, 2013)。ただし、DSR をもつ mRNA の遺伝子座全てがヘテロクロマチン化されているわけではなく、例えば *rec8* や *spo5* の遺伝子は DSR をもつものの、これらの遺伝子座でヘテロクロマチン化は起こらない。この差異の原因となる因子の候補として Red1 が注

目されている (Hiriart et al, 2012; Tashiro et al, 2013; Zofall et al, 2012)。Red1 は *mei4* や *ssm4* など、ヘテロクロマチン化される遺伝子座に強く局在しているが、*rec8* や *spo5* の遺伝子座には局在していない。また、*red1* 破壊株では *mei4* や *ssm4* におけるヘテロクロマチン化が消失する。以上から、Red1 は減数分裂特異的な条件的ヘテロクロマチン化の制御において鍵となる因子であると考えられている。

meiRNA の相同染色体対合における機能

meiRNA は Mei2 ドットを形成する足場としての役割を持っているが、それ以外の meiRNA の新たな機能として、減数分裂における相同染色体の対合を促進することが報告されている (Ding et al, 2012)。分裂酵母では減数第一分裂前期に、高等生物の中心体に相当する SPB (spindle pole body) に染色体のテロメア領域が集合し、SPB を先頭として核が細胞内を大きく往復するホーステール運動が行われ、相同染色体の対合が促進される (Hiraoka and Dernburg, 2009)。しかし、meiRNA をコードする *sme2* 遺伝子座は、他の遺伝子座がまだ対合していないホーステール運動のごく初期に、強固に対合していることが明らかになった。*sme2* 遺伝子を染色体上の別の領域に移動すると、移動先の領域でも早期の対合がみられる。*sme2* 遺伝子座でみられる早期の対合には、meiRNA-L が転写され、*sme2* 遺伝子座上に係留されることが重要であることが示されている。これらのことから、染色体上に係留された meiRNA-L が、積極的に相同染色体を束ねるためのマーカーとして働くと考えられている。

本研究の目的

meiRNA は、Mei2 ドットの形成を介した減数分裂特異的な遺伝子の発現制御や、相同染色体の早期対合など、減数分裂を進行させるために非常に重要な役割

を果たしていることは明白である。しかし、meiRNA が凝集する機構や、実際に Mmi1 を抑制する機構など、meiRNA の機能には不明な点が多く残されている。そこで、本研究では meiRNA の機能解析を行い、meiRNA 凝集や Mmi1 抑制の分子機構を解明することを目指した。その結果、meiRNA の凝集には Mmi1 の機能が重要であること、そして meiRNA は Mmi1 を *sme2* 遺伝子座に集めることで活性低下を誘導する能力をもつことがわかった。これらの結果から、核内構造体の形成や減数分裂における遺伝子発現制御に対する理解がより深まると期待される。

材料と方法

分裂酵母株

本研究で用いた分裂酵母株とその遺伝子型を表 1 に示した。遺伝子名は“*mmi1*”のようにアルファベット 3 文字と数字 1 文字を用いて小文字のイタリック体で表記する。遺伝子アリルを表記する場合は、“*mmi1-ts3*”のように遺伝子名とアリル番号をハイフンで繋ぐ。

培地

<大腸菌>

プラスミドを調製する際の大腸菌の培養は TY (1% ポリペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% NaCl、pH 7.0) 培地で行った。必要に応じてアンピシリン (終濃度 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、またはカナマイシン (終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加した。プレートとして用いる場合は 1 L に対して 15 g の寒天を加えた。

組換えタンパク質を発現させる際の大腸菌の培養は 2×YT 培地 (1.6% バクトトリプトン、1% 酵母エキス、0.5% NaCl、2% グルコース、pH7.6) を用いた。

<分裂酵母>

完全栄養培地 YE、最少培地 SD および MM、孢子形成誘導培地 SSA および SPA の組成は標準的なものに従った (Egel and Egel-Mitani, 1974; Fantes, 1981; Gutz H, 1974; Moreno et al, 1991; Sherman et al, 1986)。プレートとして用いる場合は 1 L に対して 20 g の寒天を加えた。

kan^R、*hph^R*、*nat^R*、*bsd^R*、*ble^R* 遺伝子挿入株の選択時には、YE プレートにそれぞれ

れ G418 (終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、Roche)、ハイグロマイシン B (終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、和光純薬)、clonNAT (終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、Werner Bioagents)、ブラストサイジン S (終濃度 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、フナコシ)、Zeocin (終濃度 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、Life Technologies) を添加した (Benko and Zhao, 2011; Kimura et al, 1994; Sato et al, 2005)。また、ウラシル要求性株を選択する際には、SD プレートに 5-フルオロオロチン酸 (終濃度 1 mg/mL 、和光純薬) を加えた。

SD、MM、SSA 培地で栄養要求性株を培養する際には、必要に応じてアデニン、ウラシル、ロイシン、アルギニンをそれぞれ終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で加えた。

液体培地で分裂酵母の接合および減数分裂を誘導する際には、まず塩化アンモニウムを含む MM 培地 (MM+N) で培養を行い、対数増殖期の細胞を回収した後、水で 3 回洗い、塩化アンモニウムを含まない MM 培地 (MM-N) に移した。プレート上で接合、減数分裂を誘導する際には SSA または SPA 培地を用いた。SSA は少量の窒素源を含むため、細胞がある程度増殖した後に接合および減数分裂を行う。一方、SPA は窒素源を全く含まないため、即座に接合・減数分裂へと突入する。SSA は主に遺伝子組換え株の掛けあわせや孢子形成率測定の際に、SPA は主に減数分裂進行中の細胞を蛍光顕微鏡観察する際に用いた。

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 (Sambrook and Russell, 2001)。大腸菌株は DH5 α を使用し、形質転換は 18°C 法 (Inoue et al, 1990) により行った。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) を用いた。*sme2-DSRless* 遺伝子の作製には、人工遺伝子合成サービス (Operon) を使用した。塩基配列の決定は Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を使用した。サンプル

は同社の BigDye Terminator Cycle Sequencing, FS により調製した。

分裂酵母の遺伝学的手法

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 (Gutz H, 1974)。

形質転換は酢酸リチウム法を改変して行った (Okazaki et al, 1990)。対数増殖期の細胞を回収し、0.1 M 酢酸リチウム (pH7.5) に懸濁した。懸濁液を 100 μ L とり、形質転換のために調製した DNA とサケ精子 DNA を加え、室温で 5 分静置した後、300 μ L の 50% ポリエチレングリコール 4000 を加え、30°C で 1 時間転倒混和した。その後 42°C で 10 分間熱ショックを加え、遠心により上清を除去し、YE 液体培地を加えて 30°C で 30 分転倒混和した。遠心して細胞を回収し、滅菌水に懸濁して選択培地に広げた。

分裂酵母細胞の交配の際は主として *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、これら 2 つのアリルを同時に細胞内に有する株は、遺伝子内相補によりアデニン非要求性となる。これを利用して、*ade6-M210* 変異をもつ株と *ade6-M216* 変異をもつ株を交配し、アデニン非要求性の細胞を選択することで二倍体を獲得した。この二倍体を孢子形成させ、ランダムスポア処理、またはマイクロマニピュレータを用いて顕微鏡下で 1 つの孢子嚢に含まれている 4 つの孢子を分離する四分子分析法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。孢子形成している細胞を滅菌水に懸濁した後、消化酵素であるグルスラーゼ (Parkin Elmer) を加えて 30°C で 1 時間転倒混和し、孢子嚢を溶解させた。次に孢子以外の細胞を死滅させるため、エタノールを加えて室温で 10 分間静置した。孢子を遠心により回収し、適量の滅菌水に懸濁し、適当な選択培地に広げた。

分裂酵母ゲノム DNA の抽出

分裂酵母細胞を 200 μ L のゲノム抽出バッファー (10 mM Tris-HCl [pH8.0]、1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、100 mM NaCl、1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、2% TritonX-100)、0.5 g のガラスビーズ、200 μ L のフェノール・クロロホルムを加え、激しく攪拌し、細胞を破砕した。その後 200 μ L の TE (10 mM Tris-HCl [pH8.0]、1 mM EDTA [pH8.0]) を添加して遠心し、上清に 1 mL のエタノールを加え、DNA を沈殿させ回収した。

分裂酵母のベクター

pREP1 は、チアミンによって抑制される *nmt1* プロモーターをもつマルチコピープラスミドである (Maundrell, 1993)。*nmt1* プロモーターの下流にマルチクローニングサイトが存在し、出芽酵母の *LEU2* 遺伝子をマーカーとして持っている。チアミンを含まない MM、SSA、SPA 培地でこのベクターをもつ細胞を培養すると、*nmt1* プロモーターが脱抑制され、マルチクローニングサイトに挿入した遺伝子が過剰発現される。pREP41 および 81 は、pREP1 の *nmt1* プロモーター中の TATA ボックスに変異が導入されたプラスミドであり、pREP41 では約 1/6、pREP81 では約 1/80 に発現量が抑えられている (Basi et al, 1993)。pREP2 は、pREP1 の *LEU2* 遺伝子マーカーを分裂酵母の *ura4* 遺伝子に置き換えたプラスミドである。pREP42 および pREP82 は、pREP2 の *nmt1* プロモーターに pREP41 および pREP81 と同様の TATA ボックス変異を導入したものである。

分裂酵母の恒常的なプロモーター

細胞周期を通じて恒常的に発現するプロモーターとして、アルコールデヒドロゲナーゼをコードする *adh1* 遺伝子のプロモーターを用いた。*adh41* および *adh81* プ

ロモーターは、発現量が減少するように *adh1* プロモーターの TATA ボックス内に変異が導入されたものであり、*adh81* プロモーターは *adh41* プロモーターに比べてさらに発現量が低く抑えられている。

遺伝子破壊株、融合タンパク質発現株およびプロモーター置換株の作製

選択マーカー遺伝子カセットを用いた遺伝子破壊株、融合タンパク質発現株、およびプロモーター置換株の作製には、PCR に基づく標準的な遺伝子ターゲティング法を用いた (Bähler et al, 1998; Sato et al, 2005)。選択マーカー遺伝子の交換は佐藤らの方法に従った (Sato et al, 2005)。得られた形質転換体は、PCR によって目的の配列が導入されていることを確認した。二倍体細胞を形質転換した場合は、PCR による確認の後に四分子分析を行った。

遺伝子間領域 CO2 へのコンストラクト導入

1 番染色体の SPAC2E1P3.05c と SPAPB2C8.01 の間の遺伝子が存在しない領域を CO2 領域と名付け、そこへ様々なコンストラクトを遺伝子ターゲティングにより導入した。

meiRNA の可視化

生細胞内における meiRNA の局在を観察するため、MS2 コートタンパク質を用いた (Bertrand et al, 1998)。バクテリオファージの MS2 コートタンパク質は、ステム・ループ構造をとる MS2 配列を特異的に認識する。この性質を利用して、可視化したい RNA 内に MS2 配列を導入し、MS2 コートタンパク質と蛍光タンパク質の融合タンパク質を同時に発現させると、RNA の存在箇所での蛍光を観察することができる。

sme2 遺伝子の転写開始点から 424 bp の位置に存在する *EcoR* I サイトに、2 コピーの MS2 配列を導入した株を作製した。MS2 コートタンパク質と緑色蛍光タンパク質 GFP または黄色蛍光タンパク質 YFP との融合タンパク質の遺伝子は、CO2 領域に挿入するか、pREP81 ベクターから発現させた。全長の *meiRNA* 以外を観察する場合は、5' 側に 2 コピーの MS2 配列を付加した。

***sme2* 遺伝子座の可視化**

sme2 遺伝子座を可視化するため、LacI/*lacO* を用いた (Ding et al, 2004; Shimada et al, 2003; Yamamoto and Hiraoka, 2003)。大腸菌のラクトースオペロンのリプレッサータンパク質である LacI は、染色体上にあるオペレーター配列である *lacO* に特異的に結合する。32 コピーの *lacO* 配列を *sme2* 遺伝子座の約 2 kb 上流の領域 (*mrpl8* 遺伝子と *kes1* 遺伝子の間の遺伝子の存在しない領域) に挿入した。一方、4 つの赤色蛍光タンパク質 mCherry と核移行シグナル NLS をもつ LacI との融合タンパク質を、*adh41* プロモーターから発現させた。4mCherry-LacI-NLS 融合タンパク質の遺伝子は *arg1* 遺伝子内に挿入した。

蛍光顕微鏡による観察

生細胞の蛍光顕微鏡観察は DeltaVision-SoftWoRx system (GE Healthcare) を用いて行った。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) に細胞をマウントし、ディッシュ内を適切な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 アルゴリズムを用いてスタックさせた。

体細胞分裂期の細胞を観察する際は、細胞を YE 液体培地で培養し、直接ガラスボトムディッシュにマウントした。減数分裂期の細胞を観察する際は、まず減

数分裂を誘導するため、 h^{90} 株の細胞を MM+N 培地で培養・回収し、滅菌水で 5 回洗い、5 μ L のロイシン溶液 (20 mg/ml) に懸濁して SPA 上にスポットした。30°C 5 ~ 7 時間培養した後、適切な量の分裂酵母細胞を掻き取って MM-N 培地に懸濁し、ガラスボトムディッシュにマウントした。

酵母 2 ハイブリッド法

Gal4 タンパク質の activation domain (AD) をもつ pGADT7 ベクターと DNA binding domain (BD) をもつ pGBKT7 ベクターに全長の *mmi1* 遺伝子をクローニングし、両者を出芽酵母 AH109 株 (*MATa*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* , *LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3*, *MEL1*, *GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2*, *URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ*) へ導入した。形質転換体を、ヒスチジンおよびアデニンを含まない SD プレートで培養し、その生育を観察した。

RNA 抽出とノザンプロッティング

細胞内の全 RNA を抽出するため、液体培養した細胞を回収し、300 μ L RNA 抽出バッファー (0.5 M NaCl, 0.2 M Tris-HCl [pH7.5], 0.01 M EDTA, 1% SDS)、0.5 g ガラスビーズ、300 μ L のフェノール・クロロホルムを加え、激しく攪拌し、細胞を破碎した。遠心後、水層に対して再びフェノール・クロロホルム抽出を再び行った後、エタノール沈殿により RNA を回収した。試料の RNA 濃度は OD₂₆₀ の測定により決定した (1 OD = 40 ng/ μ L)。

RNA を 50% ホルムアミド、10% ホルムアルデヒド、2 mg/mL 臭化エチジウムを含む MOPS バッファー (0.2 M MOPS, 0.5 M 無水酢酸ナトリウム、0.01 M EDTA [pH7.0]) 中に調製し、60°C で 5 分間加熱した。泳動はホルムアルデヒド変性ゲル (1.2% アガロース、3% ホルムアルデヒド in MOPS バッファー) を用い

て MOPS バッファーのもと、80 V で約 3 時間行った。電気泳動の後、ナイロンメンブレン GeneScreen Plus (Perkin Elmer) に浸透圧法によって転写した。転写されたメンブレンを 80°C に 2 時間おき、RNA をメンブレンに固定化した。

メンブレンをハイブリダイゼーションバッファー (10% デキストラン硫酸ナトリウム、10% ホルムアミド、1% SDS、1 M NaCl) 中におき、30 分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、サケ精子 DNA およびランダムプライミング法により ³²P ラベルした DNA プローブを加え、42°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。2×SSC バッファー (300 mM NaCl、30 mM クエン酸 3 ナトリウム) で 2 回、2×SSC バッファーに 1% SDS を加えたバッファーで 1 回、0.2×SSC バッファー (30 mM NaCl、3 mM クエン酸 3 ナトリウム) で 1 回メンブレンを洗浄し、オートラジオグラフをとった。

3'- rapid amplification of cDNA end 解析 (3'-RACE)

oligo dT ビーズにより poly(A) をもつ RNA のみを沈降させる Poly(A)Purist-MAG Kit (Ambion) を用いて、分裂酵母細胞から抽出した RNA から poly(A) をもつ RNA のみを単離した。単離した RNA をエタノール沈殿によって濃縮した後、Takara RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 を用いて 3'-RACE 解析を行った。oligo dT プライマーを用いて逆転写を行い、cDNA を合成した後、PCR を行って meiRNA-L の 3' 末端を含む断片を増幅した。増幅した断片を TOPO TA Cloning Kit (Life Technologies) を用いてクローニングし、Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer によって 3' 末端を決定した。

免疫沈降およびウェスタンブロッティング

対数増殖期の細胞の培養液に phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF、終濃

度 1 mM) を加えたのち、細胞を回収した。100 μ L の HB バッファー (25 mM MOPS[pH7.2]、5 mM EGTA[pH7.2]、15mM MgCl₂、150 mM KCl、50 mM β -glycerophosphate, 15 mM *p*-nitrophenylphosphate, 1 mM dithiothreitol (DTT)、1 mM PMSF、0.1 mM Na₃VO₄、0.2% NP-40、protease inhibitor cocktail [Complete Mini EDTA-free, Roche]) および 0.5 g のガラスビーズを加え、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、新しいチューブに重ねて遠心し、細胞抽出液を得た。

抽出液のうち 10 μ L を whole cell extract (WCE) として取り分けた。残りの抽出液に抗体を結合させた磁気ビーズを加え、4°C で 1 時間転倒混和し、免疫沈降した。tandem affinity purification (TAP) タグが付加された Mmi1 の場合はマウス IgG ビーズ (Cell Signaling Technology) を、GFP タグが付加された Mmi1 の場合は予め抗 GFP マウスモノクローナル抗体 (Roche) を結合させた Dynabeads protein G (Life Technologies) を用いて沈降した。免疫沈降後、磁気ビーズを HB バッファーで 3 回洗浄し、10 μ L の HB バッファーと 10 μ L の 2 \times SDS バッファー (62.5 mM Tris-HCl [pH6.8], 2% SDS, 25% Glycerol、5% 2-メルカプトエタノール、0.01% ブロモフェノールブルー) を加え、100°C 4 分間のボイルによりタンパク質を変性および可溶化した。WCE にも 10 μ L の 2 \times SDS バッファーを加え、同様にボイルした。

試料タンパク質を SDS-PAGE によって分離した。SDS-PAGE には 10% Mini-PROTEAN TGX ゲル (Bio-Rad) を用いた。Trans-Blot Turbo 転写システム (Bio-Rad) を用いて polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレンへタンパク質を転写し、5% スキムミルクを用いてブロッキングを行った。抗体反応は SNAP i.d. 2.0 (Merck Millipore) を用いた。HRP の化学発光は ECL-Prime (GE Healthcare) を用いて行い、ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) にて発光シグナルを検出した。

一次抗体は以下のものを使用した。抗 HA マウスモノクローナル抗体 12CA5 (1:5,000、Roche)、抗 GFP マウスモノクローナル抗体 (1:5,000、Roche)、抗 Mmi1 ラビットポリクローナル抗体 (1:5,000、本研究室にて作製)。二次抗体は、horseradish peroxidase が結合した抗マウスないし抗ラビット抗体を用いた (1:5,000、GE Healthcare)。

クロマチン免疫沈降

対数増殖期の細胞を固定するため、培養液にホルムアルデヒド (終濃度 1%) を加えて 30°C 10 分間培養した。その後、グリシン (150 mM) を加えて 30°C で 5 分間攪拌してクロスリンク反応を停止させ、細胞を Buffer1 (50 mM HEPES-KOH [pH7.5]、140 mM NaCl、1 mM EDTA [pH7.5]、1% Triton-X100、0.1% Sodium Deoxycholate) で 2 回洗った後、-80°C で保存した。細胞を 200 μ L の Buffer1 に懸濁してガラスビーズで激しく攪拌し、十分に破碎した。Sonifier 450 (Branson) を用いて氷水中で超音波破碎を行い、抽出液中の DNA の平均長が約 0.5 kb となるよう断片化した。遠心して上清をとり、これを細胞抽出液とした。抽出液のタンパク質濃度を Protein Assay Kit (Bio-Rad) を用いて測定し、各サンプル間のタンパク質濃度が揃うように希釈した。

5 μ L の抽出液を WCE として取り分け、200 μ L の抽出液と予め抗体と結合させた Dynabeads Protein G を混合し、4°C で一晩転倒混和により免疫沈降を行った。抗体は抗 Myc マウスモノクローナル抗体 (9E10、Santa Cruz)、およびコントロールとして抗 HA マウスモノクローナル抗体 (16E12、Covance) を用いた。その後、Dynabeads Protein G を Buffer1、Buffer1' (50 mM HEPES-KOH [pH7.5]、500 mM NaCl、1mM EDTA [pH7.5]、1% Triton-X100、0.1% Sodium Deoxycholate)、Buffer2 (10 mM Tris-HCl [pH8.0]、250 mM LiCl、

5% NP-40、0.1% Sodium Deoxycholate)、TE でそれぞれ 1 回ずつ洗った。脱クロスリンクするため、WCE と磁気ビーズに 100 μ L の 1% SDS を含む TE を加え、65°C で一晩転倒混和した。その後、1 μ g の RNaseA を加えて 37°C で 1 時間、次いで 20 μ g の proteinase K を加えて 37°C で 3 時間反応させ、RNA とタンパク質を分解した。フェノール・クロロホルム抽出を行った後、MinElute PCR purification kit (QIAGEN) を用いて DNA をカラム精製した。

精製された DNA 断片は、定量 PCR 法によって解析した。定量 PCR 反応は SYBR Premix EX Taq II (Tli RNaseH Plus) (タカラバイオ) を用いて Real Time PCR 7300 system (Applied Biosystems) 上で行った。定量結果は検量線による相対定量によって解析し、アクチンをコードする *act1* 遺伝子を標準化のために用いた。増幅に用いたプライマーは表 2 に示した。

Electro mobility shift assay (ゲルシフトアッセイ)

ジゴキシゲニン (DIG) ラベルされた RNA プローブは、DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Roche) を用いて、T7 RNA polymerase による *in vitro* 転写により合成した。また、未標識の RNA プローブは、DIG RNA Labeling Kit を用いて、DIG を加えずに合成した。

大腸菌を用いた GST タグ付き組み換えタンパク質は、以下のようにして精製した。pGEX-KG ベクターに *mmi1* および *mei2* 遺伝子をクローニングし、大腸菌 BL21 株へ導入した。形質転換した大腸菌を、2 \times YT 培地において 37°C で適当な濃度まで培養し、0.2 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG、Novabiochem) を添加して 30°C で 3 時間さらに培養して、組換えタンパク質の発現を誘導した。細胞を回収し、氷冷した PBS buffer で洗った後、5 mL の懸濁バッファー (3% NP-40、10 mM DTT、1 mM PMSF、Complete Mini in PBS

buffer) に懸濁して、Sonifier 450 (Branson) を用いて超音波破碎を行った。遠心により分離した上清に、Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) を加えて4°Cで1時間転倒混和した。その後、Poly-Prep Chromatography Column (Bio-Rad) に充填し、PBS buffer で2回洗った後、1 mL の L-Glutathione 溶液 (50 mM Tris-HCl [pH8.0]、10 mM L-Glutathione) を用いて溶出した。

大腸菌から精製した GST タグ付きの Mmi1 および Mei2 を、KNET バッファー (20 mM KCl、80 mM NaCl、2 mM EGTA、50 mM Tris-HCl[pH7.5]、0.05% NP-40、1 mM MgCl₂、2 mM DTT、10% グリセロール、RNase Inhibitor (Roche)) に溶解し、非特異的結合を防ぐために 50 μg の大腸菌 tRNA を加え、室温で20分間反応させた。その後 DIG ラベルされた RNA プローブを加え、再び室温で20分間転倒混和により反応させた後、電気泳動を行った。競合阻害の実験を行う際は、DIG ラベルされていない RNA をプローブも同時に加えた。

3.6% ポリアクリルアミドゲルを 0.5×TBE バッファー (45 mM Tris、45 mM ホウ酸、1 mM EDTA [pH8.0]) のもと、110 V で2時間泳動した。0.5×TBE バッファーを用いて RNA をナイロンメンブレン (GeneScreen) へ転写し、DIG Luminescent Detection Kit (Roche) を用いてシグナルの検出を行った。発光シグナルは ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) を用いて検出した。

表 1 本研究で用いた分裂酵母株

株名	遺伝子型
JS1	<i>h⁹⁰ lacO×32-kan^R-ura4⁺-sme2-MS2-2 CO2::Padh41-MS2-YFP-nat^R arg1::Padh41-4mCherry-lacI-NLS-hph^R LEU2-CFP-mmil ade6-M216 leu1 ura4-D18</i>
JS2	<i>h⁹⁰ bsd^R-sme2-MS2-2 CO2::Padh41-MS2-YFP-nat^R LEU2-CFP-mmil mei2-mCherry-hph^R ade6-M216 leu1 ura4-D18</i>
JS3	<i>h⁹⁰ sme2-5'-MS2-2-Tnmt CO2::Padh41-MS2-YFP-nat^R LEU2-CFP-mmil mei2-mCherry-hph^R ade6-M216 leu1 ura4-D18</i>
JS4	<i>h⁹⁰ MS2-2-sme2-3' CO2::Padh41-MS2-YFP-nat^R LEU2-CFP-mmil mei2-mCherry-hph^R ade6-M216 leu1 ura4-D18</i>
JS5	<i>h⁹⁰ bsd^R-sme2-DSRless-MS2-2 ade6-M216 leu1 ura4-D18</i>
JS6	<i>h⁹⁰ bsd^R-sme2-DSRless-MS2-2 CO2::Padh41-MS2-YFP-nat^R LEU2-CFP-mmil mei2-mCherry-hph^R ade6-M216 leu1 ura4-D18</i>
JS7	<i>h⁹⁰ mmil::kan^R mei4::ura4⁺ sme2-MS2-2-bsd^R CO2::Padh41-MS2-GFP-nat^R ade6-M216 leu1 ura4-D18</i>
JS8	<i>h⁹⁰ lacO×32-kan^R-ura4⁺-sme2-MS2-2 LEU2-CFP-mmil arg1::Padh41-4mCherry-lacI-NLS-hph^R red1-YFP-nat^R ade6-M216 leu1 ura4-D18</i>
JS9	<i>h⁹⁰ lacO×32-kan^R-ura4⁺-LEU2-sme2-m nat^R-CFP-mmil red1-mCherry-hph^R his7⁺<<GFP-lacI ade6-M210 leu1 ura4-D18</i>
JS10	<i>h⁹⁰ lacO×32-kan^R-ura4⁺-sme2-DSRless-MS2-2 LEU2-CFP-mmil arg1::Padh41-4mCherry-lacI-NLS-hph^R red1-YFP-nat^R ade6-M216 leu1 ura4-D18</i>
JS11	<i>h⁹⁰ mmil::ble^R mei4::LEU2 lacO×32-kan^R-ura4⁺-sme2-MS2-2 arg1::Padh41-4mCherry-lacI-NLS-hph^R red1-GFP-nat^R ade6-M216 leu1 ura4-D18</i>
JS12	<i>h⁹⁰ red1-13myc-nat^R ade6-M216 leu1</i>
JS13	<i>h⁹⁰ lacO×32-kan^R-ura4⁺-LEU2-sme2-m red1-13myc-nat^R ade6-M216 leu1 ura4-D18</i>
JS14	<i>h⁹⁰ bsd^R-sme2-DSRless-MS2-2 red1-13myc-nat^R ade6-M216 leu1</i>
JS15	<i>h⁹⁰ mmil::kan^R mei4::ura4⁺ red1-13myc-nat^R ade6-M216 leu1 ura4-D18</i>

- JS16 *h⁹⁰ lacO×32-kan^R-ura4⁺-bsd^R-Pnmt1-sme2-MS2-2
arg1::Padh41-4mCherry-lacI-NLS-hph^R CO2::Padh81-MS2-GFP-nat^R
ade6-M216 leu1 ura4-D18*
- JS17 *h⁹⁰ sme2-MS2-2-bsd^R nat^R-CFP-mmil1 ade6-M216 leu1 ura4-D18*
- JS18 *h⁹⁰ kan^R-Pnmt1-sme2-MS2-2 nat^R-CFP-mmil1 ade6-M216 leu1
ura4-D18*
- JS19 *h⁹⁰ kan^R-Pnmt1-sme2-5'-MS2-2-Tnmt nat^R-CFP-mmil1 ade6-M216 leu1
ura4-D18*
- JS20 *h⁹⁰ kan^R-Pnmt1-MS2-2-sme2-3' nat^R-CFP-mmil1 ade6-M216 leu1
ura4-D18*
- JS21 *h⁹⁰ mei2::ura4⁺ nat^R-CFP-mmil1 ade6-M216 leu1 ura4-D18*
- JS22 *h⁹⁰ mei2::ura4⁺ kan^R-Pnmt1-sme2-MS2-2 nat^R-CFP-mmil1 ade6-M216
leu1 ura4-D18*
- JS23 *h⁹⁰ mei2::ura4⁺ kan^R-Pnmt1-sme2-5'-MS2-2-Tnmt nat^R-CFP-mmil1
ade6-M216 leu1 ura4-D18*
- JS24 *h⁹⁰ mei2::ura4⁺ kan^R-Pnmt1-MS2-2-sme2-3' nat^R-CFP-mmil1
ade6-M216 leu1 ura4-D18*
- JS25 *h⁹⁰ mmil1-ts6-kan^R rrp6-32-hph^R ade6-M216 leu1*
- JS26 *h/h⁺ sme2::ura4⁺/sme2::ura4⁺ CO2::Padh1-MS2-2-sme2-5'-Tnmt-nat^R/
CO2::Padh1-MS2-2-sme2-5'-Tnmt-nat^R ade6-M216/ade6-M210
leu1/leu1 ura4-D18/ura4-D18*
- JS27 *h/h⁺ sme2::ura4⁺/sme2::ura4⁺ CO2::Padh1-MS2-2-sme2-3'-Tnmt-nat^R/
CO2::Padh1-MS2-2-sme2-3'-Tnmt-nat^R ade6-M216/ade6-M210
leu1/leu1 ura4-D18/ura4-D18*
- JS28 *h/h⁺ sme2::ura4⁺/sme2::ura4⁺ CO2::Padh1-MS2-2-sme2-FL-Tnmt-nat^R/
CO2::Padh1-MS2-2-sme2-FL-Tnmt-nat^R ade6-M216/ade6-M210
leu1/leu1 ura4-D18/ura4-D18*
- JS29 *h⁹⁰ sme2-MS2-2-bsd^R mei2-mCherry-hph^R htb1-CFP-nat^R ade6-M216
leu1 ura4-D18*
- JS30 *h⁹⁰ sme2-MS2-2-bsd^R mei2::ura4⁺ htb1-CFP-nat^R ade6-M216 leu1
ura4-D18*
- JS31 *h⁹⁰ CO2::Pnmt1-MS2-2-ura4-Tnmt-nat^R ade6-M216 leu1 ura4-D18*
- JS32 *h⁹⁰ CO2::Pnmt1-MS2-2-ssm4-Tnmt-nat^R ade6-M216 leu1 ura4-D18*
- JS33 *h⁹⁰ sme2-MS2-2 ade6-M216 leu1 ura4-D18*

JS34 *h⁹⁰ kan^R-Pnmt1-sme2-MS2-2 ade6-M216 leu1 ura4-D18*
 JS35 *h⁹⁰ mmi1-ts6-kan^R bsd^R-Pnmt1-sme2-MS2-2 ade6-M216 leu1*
 JT432 *h⁹⁰ rrp6-32-GFP-kan^R ade6-M216 leu1*
 JT449 *h⁹⁰ dis3-4-kan^R ade6-M216 leu1*
 JT452 *h⁹⁰ pla1-37-GFP-kan^R ade6-M216 leu1*
 JT453 *h⁹⁰ rna15-10-GFP-kan^R ade6-M216 leu1*
 JT685 *h⁻ TAP-mmi1 ade6-M216 leu1*
 JT816 *h⁹⁰ cid14::nat^R ade6-M216 leu1*
 JT926 *h⁹⁰ sme2(1-1065)::ura4⁺ ade6-M216 leu1 ura4-D18*
 JV579 *h⁹⁰ mmi1-ts3-kan^R ade6-M216 leu1*
 JV582 *h⁹⁰ mmi1-ts6-kan^R ade6-M216 leu1*
 JV832 *h⁹⁰ red1::ura4⁺ ade6-M216 leu1 ura4-D18*
 JV833 *h⁹⁰ pab2::ura4⁺ ade6-M216 leu1 ura4-D18*
 JV969 *h⁹⁰ iss10::kan^R ade6-M216 leu1*
 JY362 *h/h⁺ ade6-M216/ade6-M210 leu1/leu1*
 JY450 *h⁹⁰ ade6-M216 leu1*
 JY878 *h⁹⁰ ade6-M216 leu1 ura4-D18*
 JZ403 *h/h⁺ ste11::ura4⁺/ste11::ura4⁺ ade6-M216/ade6-M210 leu1/leu1
ura4-D18/ura4-D18*
 JZ462 *h/h⁺ sme2::ura4⁺/sme2::ura4⁺ ade6-M216/ade6-M210 leu1/leu1
ura4-D18/ura4-D18*

表 2 定量 PCR で用いたプライマーの配列

プライマー名	配列
act1-F	TGAGGAGCACCCCTTGCTTGT
act1-R	TCTTCTCACGGTTGGATTGG
mei4-F	AATGCGAAACTGAAGCATTG
mei4-R	TAGGATCGCCAAACCGATTA
sme2-5'-F	AAGACGGAATATGCATGCAAGA
sme2-5'-R	AACAAACCACAACACAAAGAAAGAGA
sme2-3'-F	GAAAATAAACAATAACCACAGCAAGCT
sme2-3'-R	ACAGCACAACCGAAGACCAAT

結果

meiRNA には多数の DSR モチーフが存在する

meiRNA は発見された当初は、発現量の多い meiRNA-S が主要な転写産物であり、meiRNA-L は meiRNA-S のリードスルー産物であると考えられていた (Watanabe and Yamamoto, 1994)。しかし、DSR モチーフの同定を受けて、meiRNA-L の配列を詳細に解析したところ、meiRNA-S より下流の領域に Mmi1 が認識する 6 塩基の DSR モチーフが多数含まれていることが分かった (図 4A)。meiRNA の転写開始点から下流約 1.5 kb までには、DSR core motif である UUAAAC が 11 個、UCAAAC が 2 個、DSR augmenting motif である UAAAAC が 5 個、UGAAAC が 7 個の計 25 個の DSR モチーフが含まれていた。一方、meiRNA-S に相当する、転写開始点から 508 bp までには、UUAAAC が 2 個と UGAAAC が 1 個しか存在していなかった。Mmi1 のターゲットであることが既に知られている *mei4* や *ssm4* の mRNA には、それぞれ 8 個および 7 個の DSR モチーフが含まれている (Yamashita et al, 2012)。meiRNA-L には、これらの mRNA よりもはるかに多くの DSR モチーフが存在しているため、meiRNA-L は Mmi1 のターゲットの 1 つであり、何らかの機能を果たしている可能性が強く疑われた。

そこでまず、減数分裂期の細胞における meiRNA の発現を詳細に検討した。一倍体細胞を窒素源飢餓条件において接合・減数分裂を誘導し、ノザンブロットティングにより meiRNA を検出したところ、減数分裂の進行とともに meiRNA-S の発現量の上昇が観察されたが、meiRNA-L は検出されなかった (図 4B)。一方、二倍体細胞を用いて同様の実験を行ったところ、減数分裂の進行とともに

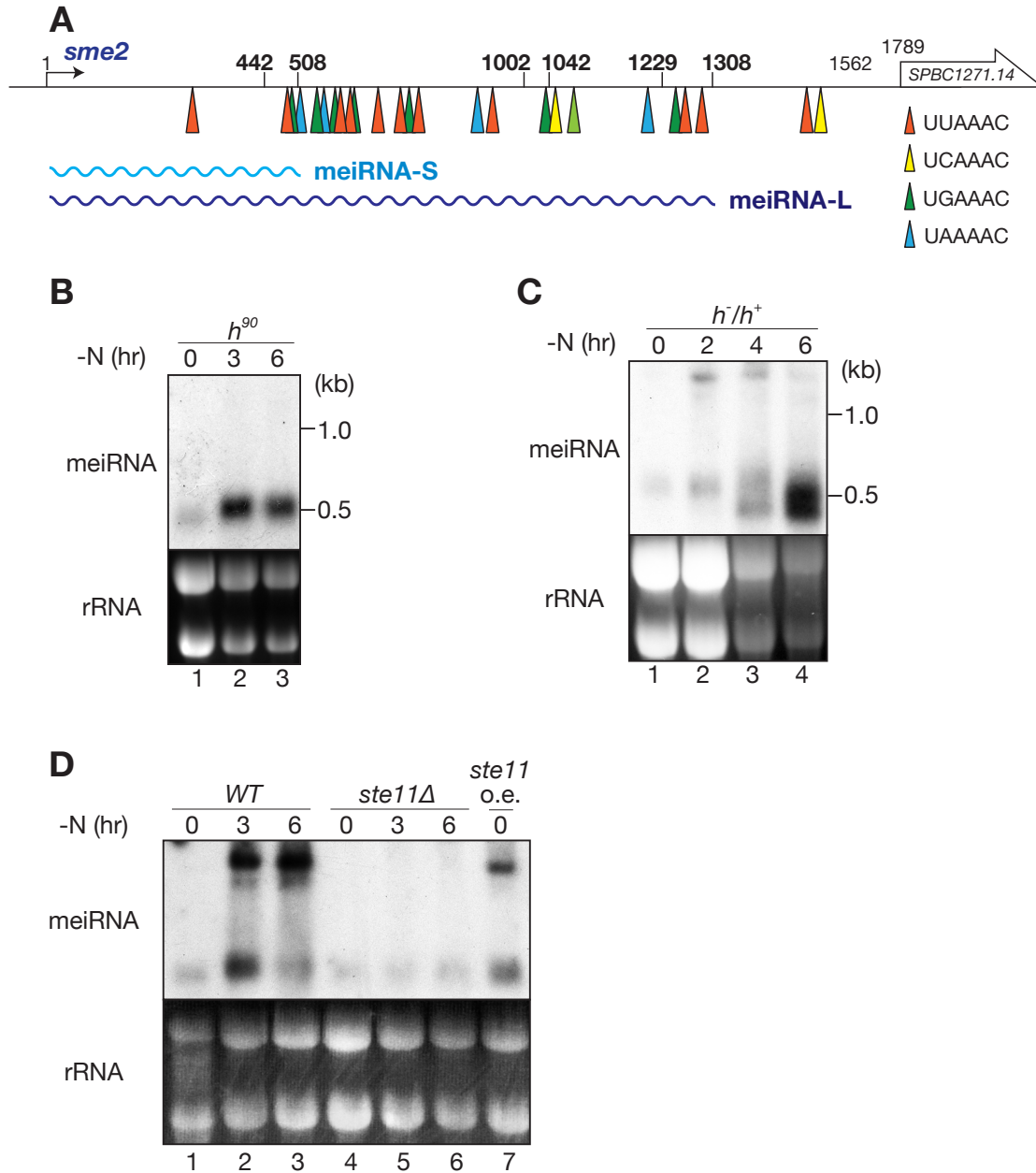


図4 DSRモチーフを多数含む長い meiRNA が存在する

(A) *sme2* 遺伝子上の DSR モチーフの位置。矢頭は UUA AAC (橙)、UCA AAC (黄)、UGA AAC (緑)、UAA AAC (青) の位置を表す。太字の数字は 3'-RACE 法によって決定された meiRNA の 3' 末端を、波線は長短 2 種類の meiRNA を示す。(B) 一倍体細胞における meiRNA の発現。一倍体の野生株 (JY450) を MM+N 培地で 30°C 一晩培養し (0 時間)、MM-N 培地に移して 30°C で 3 時間および 6 時間培養した。回収した細胞から RNA を抽出し、ノザンブロットティングにより解析した。臭化エチジウムで染色した rRNA は RNA 量のコントロールとして用いた。(C) 二倍体細胞における meiRNA の発現。二倍体の野生株 (JY362) を MM+N 培地で 30°C 一晩培養し (0 時間)、MM-N 培地に移して 30°C で 2 時間、4 時間、6 時間培養した。(D) meiRNA の発現における Ste11 の影響。二倍体の野生株 (JY362) および *ste11* 破壊株 (JZ403) を MM+N 培地で 30°C 一晩培養し (0 時間)、MM-N 培地に移して 30°C で 3 時間および 6 時間培養した。また、JY362 株に *ste11* 遺伝子をクローニングした過剰発現ベクター pREP41 を導入し、MM+N 培地で 30°C 一晩培養した。

に、meiRNA-S の発現上昇に加えて meiRNA-L が増加する様子が観察された (図 4C)。一倍体細胞は減数分裂へ移行する前に接合および核融合を行う必要があり、二倍体細胞に比べて細胞集団内の減数分裂の進行度合にばらつきが生じる。一倍体の細胞集団では同調性が悪く、meiRNA-L の発現量が相対的に低いために検出できなかったと考えられる。

meiRNA-L の発現が最も強い図 4C のレーン 3 の RNA を用いて、3'-RACE (3'-rapid amplification of cDNA end) 解析を行い、meiRNA-L の 3' 末端を決定した。その結果、meiRNA-L の 3' 末端は、転写開始点から約 1.0 ~ 1.3 kb の位置に複数あることが分かった (図 4A)。検出された meiRNA-L の 3' 末端は、図 4A のように 1002 bp 付近、1042 bp 付近、1229 bp 付近、1308 bp 付近の 4 グループに分類することができた。最も多く検出された 3' 末端は 1002 bp 付近のものであり、その他のグループのものは検出される頻度が低かった。この結果から、meiRNA-L には、分子種によって 16 個から 23 個の DSR モチーフが含まれていると考えられた。

減数分裂の初期に働く転写因子 *Ste11* は meiRNA の転写を活性化する

図 4C の結果から、meiRNA は減数分裂期特異的な転写活性化を受けていると考えられる。そこで、meiRNA の転写に必要な因子の同定を試みたところ、減数分裂の初期に働く転写因子 *Ste11* が候補として得られた。*ste11* 破壊株では、窒素源を枯渇させて減数分裂を誘導しても、meiRNA の転写量は増加しなかった (図 4D、レーン 4-6)。また、体細胞分裂期の細胞において *ste11* 遺伝子を過剰発現すると、meiRNA-S および meiRNA-L の発現量が共に増加した (図 4D、レーン 7)。以上から、*sme2* 遺伝子の転写は *Ste11* によって制御されていると考えられる。

meiRNA は Mmi1 を介した RNA 分解を受けている

meiRNA が実際に Mmi1 のターゲットであるかどうかを検討するため、*mmi1* 変異株における meiRNA の発現をノザンブロットティングにより解析した。野生株では、体細胞分裂期において meiRNA の発現は観察されなかった（図 5A、レーン 1-3）(Watanabe and Yamamoto, 1994)。しかし、温度感受性 *mmi1* 変異株 (*mmi1-ts*) を制限温度下で培養し、Mmi1 の機能を喪失させたところ、meiRNA-S に相当する約 0.5 kb のバンドと、meiRNA-L に相当する約 1.0 ~ 1.3 kb のバンドが観察された（図 5A、レーン 4-9）。2 種類の *mmi1-ts* 変異体のどちらにおいても、meiRNA-L の発現は meiRNA-S の発現より強かった。この結果から、体細胞分裂期において meiRNA は Mmi1 を介した RNA 分解を受けていると結論された。

次に、Mmi1 を介した RNA 分解系で働くことが知られている他の因子について、meiRNA の発現への影響を調べた (Chen et al, 2011; Harigaya et al, 2006; St-Andre et al, 2010; Yamanaka et al, 2010; Yamashita et al, 2013)。エキソソーム複合体の構成因子をコードする *rrp6* および *dis3* の変異体では、meiRNA-S が顕著に増加していた（図 5B、レーン 5-6、13-14）。また、*mmi1* と *rrp6* の二重変異株では、meiRNA-S の顕著な発現と meiRNA-L の発現が共にみられた（レーン 11-12）。一方、poly(A) ポリメラーゼをコードする *plal* の変異体では、meiRNA-S が若干増加するに留まり（レーン 7-8）、mRNA の poly(A) 付加の際に RNA 切断を行う因子をコードする *rna15* の変異体では、meiRNA の発現の増加はほとんどみられなかった（レーン 9-10）。

また、既に報告されている通り、poly(A) 結合タンパク質をコードする *pab2* の破壊株では、meiRNA-S が顕著に増加していた（図 5C、レーン 4）(St-Andre et al, 2010)。Mmi1 と協働して RNA 分解に寄与する因子 Red1 の遺伝子を破壊

した株では、meiRNA-Sの発現量が増加しており、0.5 kb 前後に2本のバンドが観察された（レーン2）。しかし、Red1とMmi1の結合を仲介する因子をコードする *iss10* の破壊株では、meiRNAの発現上昇はみられなかった（レーン3）。ま

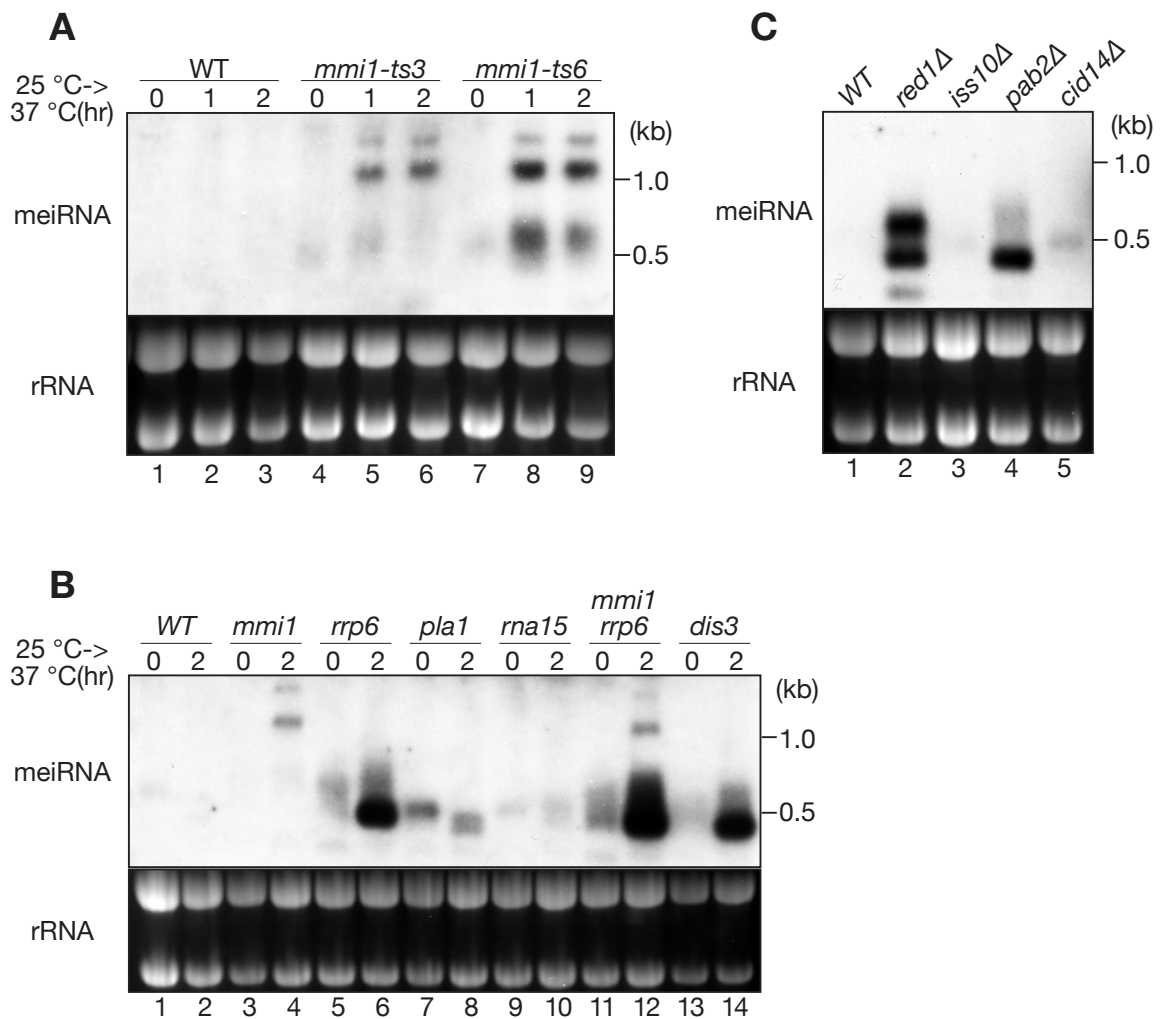


図5 meiRNAはMmi1を介したRNA分解を受ける

(A) *mmi1* 変異体における meiRNA の発現。野生株 (JY450)、*mmi1-ts3* 株 (JV579)、*mmi1-ts6* 株 (JV582) を YE 培地で 25°C 一晚培養し (0 時間)、37°C に移して 1 時間および 2 時間培養した。回収した細胞から RNA を抽出し、ノザンブロットングにより解析した。臭化エチジウムで染色した rRNA は RNA 量のコントロールとして用いた。(B) Mmi1 を介した RNA 分解系に関わる各因子の変異体における meiRNA の発現。野生株 (JY450)、*mmi1-ts6* 株 (JV582)、*rrp6-32* 株 (JT432)、*pla1-37* 株 (JT452)、*rna15-10* 株 (JT453)、*mmi1-ts3 rrp6-32* 株 (JS25)、*dis3-4* 株 (JT449) を YE 培地で 25°C 一晚培養し (0 時間)、37°C に移して 2 時間培養した。(C) Mmi1 を介した RNA 分解系に関わる各因子の変異体における meiRNA の発現。野生株 (JY450)、*red1* 破壊株 (JV832)、*iss10* 破壊株 (JV969)、*pab2* 破壊株 (JV833)、*cid14* 破壊株 (JT816) を YE 培地で 30°C 一晚培養した。

た、エキソソームによる異常な RNA の分解に関与する poly(A) ポリメラーゼ複合体 TRAMP の構成因子である Cid14 は、Mmi1 を介した RNA 分解に寄与しないことが知られているが (St-Andre et al, 2010; Yamanaka et al, 2010)、やはり *cid14* 破壊株では meiRNA の顕著な増加は見られなかった (レーン 5)。これらの因子がどのように meiRNA の分解に関わっているかは「考察と展望」の章で議論する。

meiRNA は多数の DSR モチーフを含む 3' 側の領域を介して Mmi1 と結合する

細胞内における meiRNA と Mmi1 が相互作用は、既に RNA 免疫沈降法により示されている (Yamashita et al, 2012)。そこで、meiRNA と Mmi1 の結合の詳細を、*in vitro* の結合実験である EMSA (electro mobility shift assay) によって検討した。プローブとして、*in vitro* 転写により合成した全長 (FL、1-1562)、5' 側 (5'、1-508)、および 3' 側 (3'、509-1562) の meiRNA を用いた (図 6A)。全長は最も長い meiRNA-L、5' 側プローブは meiRNA-S と一致するように設計し、全長から 5' 側を差し引いた meiRNA-L のみに含まれる部分を 3' 側プローブとした。大腸菌から精製した GST と GST-Mmi1 を用いて EMSA を行ったところ、3' (図 6B、レーン 6-8) および FL (レーン 9-11) については、GST-Mmi1 を加えた場合に濃度依存的にプローブの移動度が低下した。一方、5' プローブの移動度は変化しなかった (レーン 3-5)。GST 単体ではいずれのプローブの場合も移動度の変化はみられなかった。よって、Mmi1 は meiRNA-L の 3' 側に直接結合し、5' 側とは結合しないことが分かった。

Mei2 と meiRNA の結合は、meiRNA-S に相当するプローブを用いた EMSA により既に示されている (Watanabe and Yamamoto, 1994)。今回、meiRNA の 5'、3'、FL プローブを用いて Mei2 と meiRNA の結合を再検討した。GST および GST-Mei2 を用いて EMSA を行ったところ、以前の報告の通り、GST-Mei2 は 5'

(図 6C、レーン 3-5) の移動度を低下させ、また FL (レーン 9-11) プローブの移動度も低下させた。しかし、3' プローブの移動度に変化はなかった (レーン 6-8)。以上から、Mmi1 は meiRNA の DSR モチーフを多数含む 3' 側の領域に、Mei2 は 5' 側の領域にそれぞれ結合することが明らかとなった。

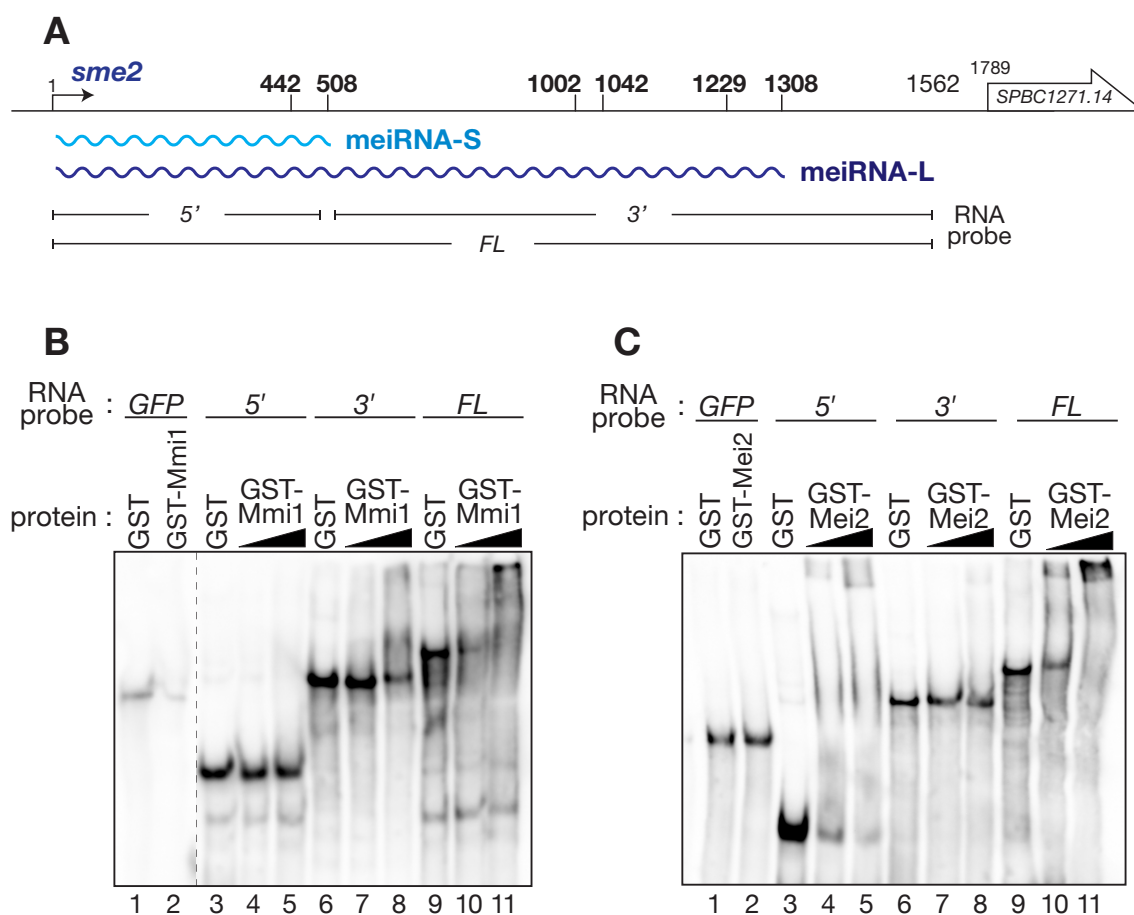


図 6 meiRNA の 3' 側領域は Mmi1 と結合し、5' 側領域は Mei2 と結合する

(A) EMSA に用いた RNA プローブの概略。meiRNA-S に相当する 1-508 塩基の部分をも 5'、meiRNA-L に相当する 1-1562 塩基の部分をも FL、FL から 5' を除いた 509-1562 塩基の部分をも 3' とした。(B) EMSA による Mmi1 と meiRNA の結合。大腸菌から精製した GST (200 ng) および GST-Mmi1 (100 ng ないし 200 ng) を、*in vitro* 転写により合成した DIG ラベルした meiRNA プローブと混合し、結合の可否を解析した。GFP プローブはコントロールとして用いた。(C) EMSA による Mei2 と meiRNA との結合。大腸菌から精製した GST (200 ng) および GST-Mei2 (100 ng ないし 200 ng) を DIG ラベルした meiRNA プローブと混合し、結合の可否を解析した。

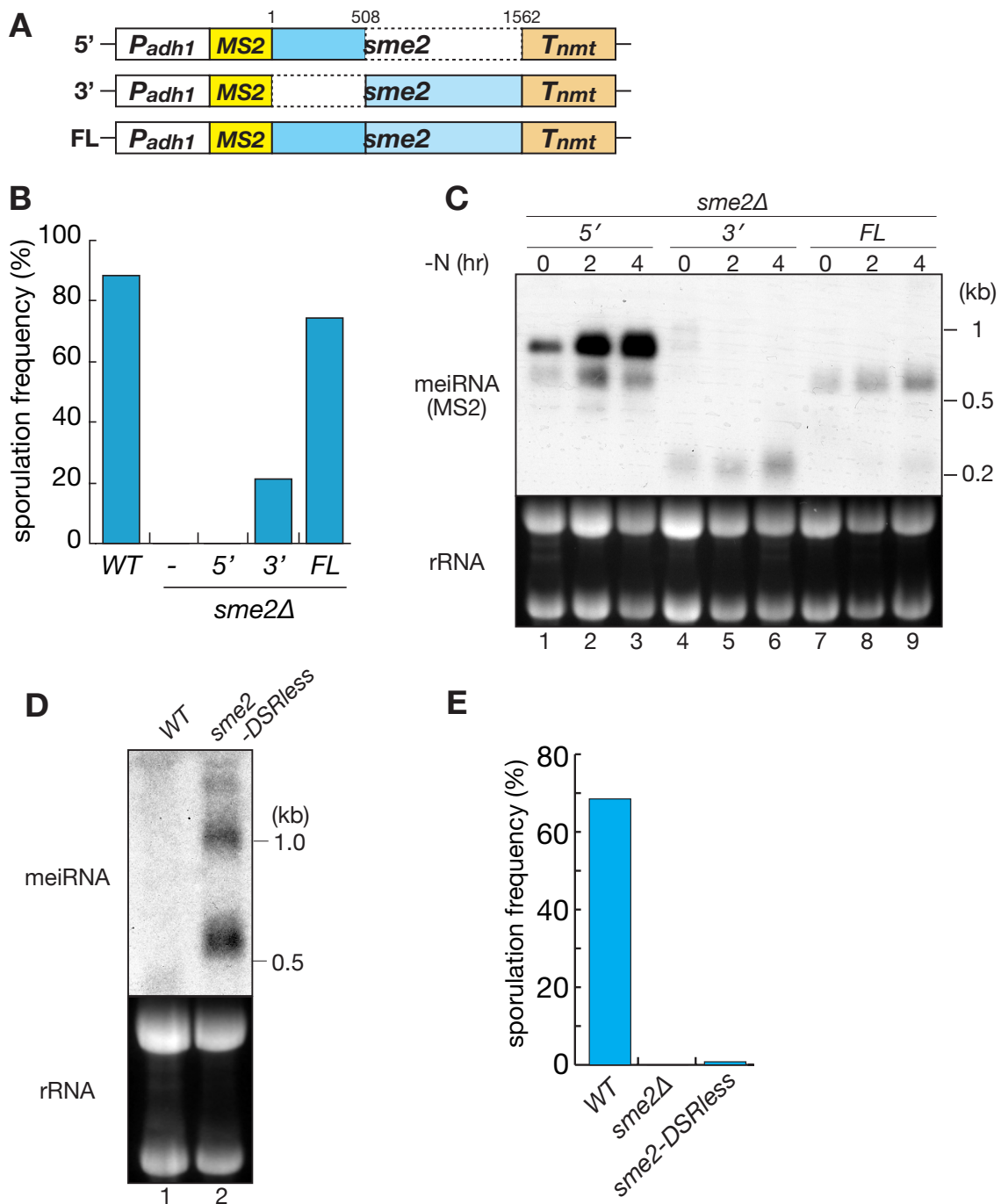


図7 meiRNA 上の DSR モチーフはその機能に必須である

(A) 遺伝子間領域である *CO2* 領域に導入した変異型 *sme2* 遺伝子の概略。恒常的なプロモーターである *adh1* プロモーターの下流に *sme2-5'* (1-508)、*sme2-3'* (509-1562)、*sme2-FL* (1-1562) をクローニングした。ノザンプロットングで検出する際のタグとして、MS2 配列を各変異型 *sme2* 遺伝子の 5' 側に挿入した。(B) 変異型 *sme2* 遺伝子株の胞子形成率。*sme2* 破壊株の *CO2* 領域に図 7A で示したコンストラクトを導入した。野生株 (JY362)、*sme2* 破壊株 (JZ462)、*sme2-5'* 株 (JS26)、*sme2-3'* 株 (JS27)、*sme2-FL* 株 (JS28) を SSA 培地上で 30°C 3 日間培養し、胞子形成率を測定した ($n > 100$)。 (C) ノザンプロットングによる変異型 *sme2* 遺伝子の発現。*sme2-5'* 株 (JS26)、*sme2-3'* 株 (JS27)、*sme2-FL* 株 (JS28) を (次頁へ)

meiRNA は DSR モチーフを介して Mmi1 の擬似餌として働く

次に、meiRNA の機能領域の探索を行った。*sme2* 遺伝子の 5' 側 (1-508)、3' 側 (509-1562)、および全長 (1-1562) を恒常的なプロモーターである *adh1* プロモーターから転写させるコンストラクトを作製し、*sme2* 破壊株に導入して孢子形成率を測定した (図 7A)。*sme2* 破壊株に全長を導入した場合は、野生株と同程度の孢子形成率を示した (図 7B)。5' 側を導入しても孢子形成率の回復はみられず、3' 側を導入した細胞では孢子形成率の回復がみられた。よって、3' 側の領域が meiRNA の減数分裂を進行させる能力に重要であることが分かった。

これらの株における meiRNA の発現をノザンブロットティングにより確認した。5' 側のみを発現させた場合は、meiRNA の強い発現が観察されたが、3' 側または全長を発現させた場合は meiRNA の発現レベルは低く、Mmi1 を介した RNA 分解を受けていると考えられた (図 7C)。*sme2* 破壊株に *mei4* や *ssm4* などの DSR を過剰発現すると、孢子形成不能の表現型を抑圧できることが知られているが、これは多量の DSR によって Mmi1 が競合的に阻害され、DSR をもつ mRNA の分解が低下するためであると考えられている (Harigaya et al, 2006; Yamashita et al, 2012)。このことを踏まえると、meiRNA の 3' 側の領域が DSR として働き、Mmi1 が抑制されることで、減数分裂が進行するという可能性が示唆される。

meiRNA の DSR モチーフが機能的に重要であることを示すため、*sme2* 遺伝子内の DSR モチーフに変異を導入した株の作製を行った。6 塩基の DSR モチーフ

MM+N 培地で 30°C 一晚培養した後、MM-N 培地に移し、30°C で 2 時間および 4 時間培養した。回収した細胞から RNA を抽出し、MS2 配列に対するノザンブロットティングを行った。臭化エチジウムで染色した rRNA は RNA 量のコントロールとして用いた。(D) *sme2*-DSRless 株における meiRNA の発現。*sme2*-DSRless 株では *sme2* 遺伝子上の最も 5' 側に存在するものを除いた全ての DSR モチーフに一塩基置換 (UNAAAC → UNAAGC) が導入され、DSR としての機能が失われている。野生株 (JY878)、*sme2*-DSRless 株 (JS5) を YE 培地で 30°C 一晚培養した。(E) *sme2*-DSRless 株の孢子形成率。野生株 (JY878)、*sme2* 破壊株 (JT926)、*sme2*-DSRless 株 (JS5) を SSA 培地上で 30°C 3 日間培養し、孢子形成率を測定した ($n > 100$)。

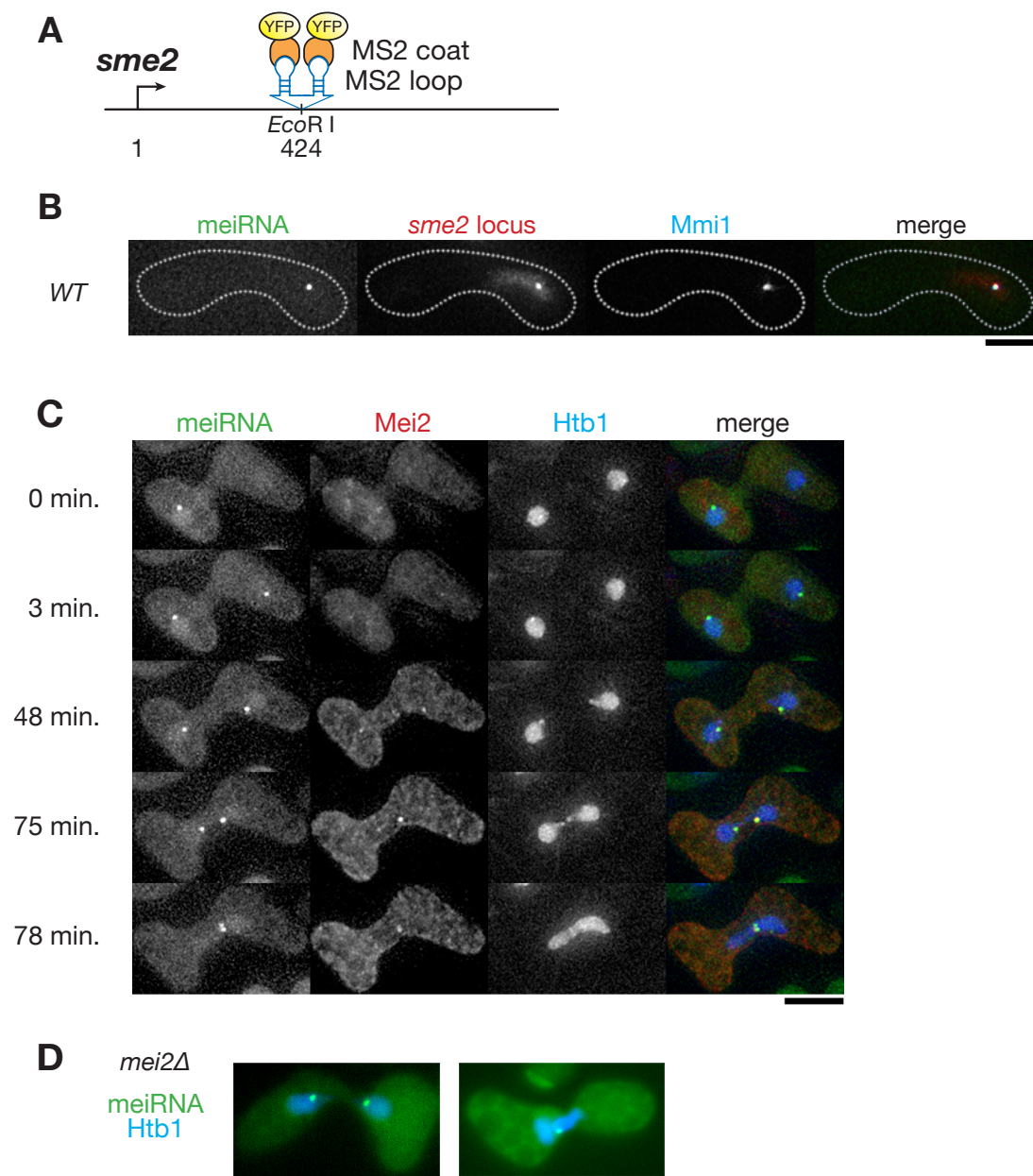


図8 meiRNA のドット形成は Mei2 非依存的である

(A) meiRNA を可視化する系の概略。 *sme2* 遺伝子の転写開始点から 424 bp の位置に存在する *EcoR* I サイトに 2 コピーの MS2 配列を挿入した。この細胞に、MS2 コートタンパク質と YFP の融合タンパク質を同時に発現させた。(B) MS2 の系により可視化された meiRNA の局在。野生株 (JS1) を SPA 培地上で 5 時間培養し、観察を行った。MS2 タグが付加された meiRNA と Mmi1 は自身のプロモーターから、MS2-YFP と 4mCherry-LacI-NLS は *adh41* プロモーターから発現されている。*sme2* 遺伝子座を標識するため、32 コピーの *lacO* 配列を *sme2* 遺伝子の約 2 kb 上流に挿入した。Merge : meiRNA (MS2-YFP、緑)、*sme2* 遺伝子座 (4mCherry-LacI-NLS、赤)、CFP-Mmi1 (青)。スケールバー : 5 μ m。(C) 減数分裂進行中の細胞における meiRNA と Mei2 の局在。減数分裂進行中の野生株 (JS29) を経時的に観察した。MS2 タグが付加された meiRNA と Mei2-mCherry は自身のプロモーターから、MS2-GFP は pREP81 ベクターから発現させた。核を観察するために、ヒストン (次頁へ)

TNAAAC に一塩基置換を導入し、TNAAGC とすると、DSR としての機能が失われる (Yamashita et al, 2012)。この変異を *sme2* 遺伝子の最も 5' 側の 1 つを除く 24 個の DSR モチーフに導入した *sme2-DSRless* 株を作製した。ノザンブロットティングにより meiRNA の発現量を確認したところ、体細胞分裂期の細胞において、meiRNA-S および meiRNA-L が蓄積することが分かった (図 7D)。この *sme2-DSRless* 株の孢子形成率を測定したところ、野生株に比べて著しく低下していた (図 7E)。よって、DSR モチーフは meiRNA の減数分裂を進行させる能力に重要であることが確かめられた。

以上の結果から、meiRNA が Mmi1 の擬似餌として働き、Mmi1 の活性を抑制しているというモデルが考えられる。

生細胞内における meiRNA の可視化

meiRNA を生細胞内で可視化するため、バクテリオファージの MS2 コートタンパク質を利用した (Bertrand et al, 1998)。MS2 コートタンパク質は、ステムループを形成する MS2 配列に特異的に結合する。そこで、meiRNA の転写開始点から 424 bp 下流に、MS2 配列を 2 つタンデムに挿入した株を作製した (図 8A)。この株の孢子形成率は野生株と同程度であり、MS2 配列の挿入によって meiRNA の機能が阻害されないことが確認された。*sme2* 遺伝子内に MS2 配列を挿入した株に、MS2 コートタンパク質と黄色蛍光タンパク質 (YFP) の融合タンパク質を発現させたところ、減数分裂前期の核内において、単一のドットが観察された (図 8B)。このドットは、LacI-*lacO* を用いて標識した染色体上の *sme2* 遺伝子座のシグナル

H2B タンパク質である Htb1 に CFP を融合させて用いた。撮影開始 0 分として示した。Merge: meiRNA (MS2-GFP、緑)、Mei2-mCherry (赤)、Htb1-CFP (青)。スケールバー: 5 μm 。
(D) *mei2* 破壊株における meiRNA の局在。減数分裂進行中の *mei2* 破壊株 (JS30) の細胞を観察した。Merge: meiRNA (MS2-GFP、緑)、Htb1-CFP (青)。スケールバー: 5 μm 。

と一致していた (図 8B) (Shimada et al, 2003)。また、減数分裂前期の細胞では、Mmi1 は *sme2* 遺伝子座に局在する Meï2 ドットに捕捉されているが、MS2 コートのシグナルが、Meï2 および Mmi1 と一致する様子も観察された (図 8B、C)。よって、MS2 の系によって可視化された meïRNA のドットは、本来の meïRNA の局在を反映していると考えられた。

meïRNA のドット形成に Meï2 は不要である

MS2 の系を用いて、meïRNA と Meï2 のドット形成の経時的な観察を行った。減数分裂進行中の細胞において、まず meïRNA がドット状に局在し (図 8C、3 min)、続いて Meï2 が meïRNA と共局在するようにドット形成することが分かった (図 8C、48 min)。次に、meïRNA のドット形成に対する Meï2 の寄与を検討するため、*meï2* 破壊株における meïRNA の局在を観察した。その結果、Meï2 を欠く細胞でも、meïRNA ドットが形成されることが分かった (図 8D)。以上から、meïRNA が自らの遺伝子座に凝集し、それを足場として Meï2 が凝集することで、Meï2 ドットが形成されると考えられる。

DSR モチーフを多数含む meïRNA の 3' 側の領域はドット形成に必要である

meïRNA がドット形成するために必要な領域を探るため、meïRNA の 5' 側および 3' 側のみを発現させ、その局在を観察した。meïRNA の 5' 側のみを発現する変異体 *sme2*-5' 株においては、3' 側を排除するため、*nmt1* 遺伝子のターミネーター領域を *sme2* 遺伝子の転写開始点から 508 bp 下流に挿入した (図 9A)。一方、3' 側のみを発現する変異体 *sme2*-3' 株においては、meïRNA-S に相当する領域 (1-508 塩基) を染色体上から除去した。RNA の可視化のための MS2 配列は図 9A に示すように挿入した。

sme2-5' 株では、減数分裂期の細胞内において、meiRNA のドットは観察されなかった (図 9B)。この株では Mei2 はドットを形成せず、Mmi1 は核内に散在しており、*sme2* 破壊株とよく似た表現型が観察された (Harigaya et al, 2006; Yamashita et al, 1998)。一方、*sme2-3'* 株では meiRNA のドットが観察された (図 9B)。この株では、Mmi1 は meiRNA のドット上に集められて 1 点となっていたが、Mei2 ドットは観察されなかった。同様の結果は、1-574 塩基を欠損した

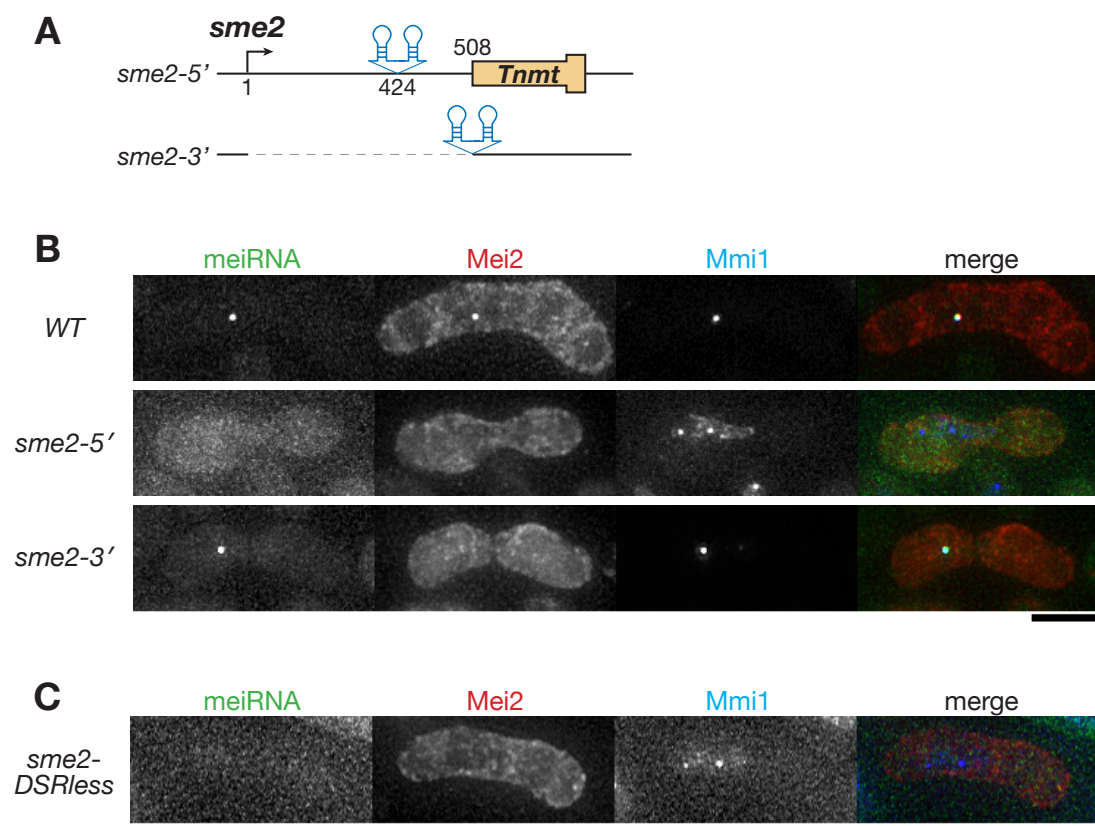


図 9 meiRNA 上の DSR モチーフがドット形成に必要なである

(A) 変異型 *sme2* 遺伝子の概略。 *sme2-5'* 株では、 *nmt1* 遺伝子のターミネーター (*Tnmt*) が *sme2* の転写開始点から 508 bp 下流に挿入されている。 *sme2-3'* 株では、 *sme2(1-508)* が除去されている。 MS2 配列は図の通りに挿入した。(B) 各 *sme2* 変異株における meiRNA の局在。野生株 (JS2)、 *sme2-5'* 株 (JS3)、 *sme2-3'* 株 (JS4) を SPA 培地上において 30°C で 5 時間培養し、観察を行った。 Merge : meiRNA (MS2-YFP、緑)、 Mei2-mCherry (赤)、 CFP-Mmi1 (青)。スケールバー : 5 μ m。(C) *sme2-DSRless* 株における meiRNA の局在。 *sme2-DSRless* 株 (JS6) を SPA 培地上で 30°C 5 時間培養し、観察を行った。 Merge : meiRNA (MS2-YFP、緑)、 *sme2* 遺伝子座 (4mCherry-LacI-NLS、赤)、 CFP-Mmi1 (青)。スケールバー : 5 μ m。

sme2 変異体の観察でも得られている (Ding et al, 2012; Ding et al, 2013)。以上から、Mmi1 と結合する 3' 側の領域は、meiRNA が自身の遺伝子座にドットを形成するために必要であり、Mei2 と結合する 5' 側の領域は、Mei2 ドットの形成に必須であることが分かった。

meiRNA の 3' 側がドット形成に必要であることから、meiRNA のドット形成における DSR モチーフの重要性が示唆された。そこで、*sme2-DSRless* 株を調べたところ、meiRNA のドットは観察されなかった (図 9C)。この株でも *sme2-5'* 株と同様に、Mei2 ドットは形成されず、Mmi1 が核内に散在していた。従って、3' 側に多数存在する DSR モチーフに依存して meiRNA がドット状に局在し、ドット化した meiRNA の 5' 側領域によって Mei2 のドットが形成されるという機構が明らかとなった。

Mmi1 の自己相互作用が meiRNA のドット形成に必須である

meiRNA のドット形成に DSR モチーフが重要であったことから、meiRNA の局在に対する Mmi1 の寄与を検討した。*mmi1* 破壊株では著しい生育の悪化がみられるが、減数分裂の進行に重要な転写因子をコードする *mei4* 遺伝子を同時に破壊することで生育が回復する (Harigaya et al, 2006)。そこで、これ以降、*mmi1* 遺伝子を破壊してその影響を検討する場合、*mmi1* と *mei4* の二重破壊株を利用して解析を行った。検討の結果、*mmi1* 破壊株では meiRNA のドット形成は観察されず、Mmi1 が meiRNA の局在化に必須な役割を果たしていることが明らかになった (図 10A)。

Mmi1 は体細胞分裂期の核内では凝集していくつかの点として観察される (Harigaya et al, 2006)。この凝集が Mmi1 の自己相互作用により生じる可能性を考え、Mmi1 分子同士の結合を検討した。TAP (tandem affinity purification)

タグの付いた Mmi1 と HA (heamagglutinin) タグの付いた Mmi1 を同時に発現する株を作製し、TAP タグに対する抗体で免疫沈降を行った。全長 Mmi1 を発現させた場合は、TAP タグが付加された Mmi1 と HA タグが付加された Mmi1 の共沈降が観察され、Mmi1 が自己相互作用していることが明らかとなった (図 10B、レーン 3)。一方、N 末端側の 61-120 残基を欠損した Mmi1 (図 10C) を発現させた場合には、自己相互作用は観察されなかった (図 10B、レーン 4)。全長 Mmi1 同士の結合は酵母 2 ハイブリッド法によっても確認された (図 10D)。よって、Mmi1 は N 末側の領域で自己結合することが明らかとなった。

自己相互作用に必要な領域を欠損した *mmi1*($\Delta 61-120$) 遺伝子は、*mmi1-ts* 変異株の温度感受性を回復させることができず、産物は Mmi1 としての機能を喪失していると考えられた (図 10D)。また、体細胞分裂期における Mmi1($\Delta 61-120$) の局在を観察したところ、この変異型 Mmi1 は点状の局在を示さず、核内に一様に分布していた (図 10E)。以上から、Mmi1 は自己相互作用を介して核内で凝集し、複数の点に局在していると考えられた。

次に、Mmi1($\Delta 61-120$) が *meiRNA* のドット形成を誘導できるか検討した。*mmi1* 破壊株に全長の Mmi1 を発現するベクターを導入したところ、*meiRNA* のドットが観察された (図 10F)。しかし、Mmi1($\Delta 61-120$) を発現させた場合には、*meiRNA* のドットを観察することはできなかった。以上から、*meiRNA* が *sme2* 遺伝子座に留まってドット形成するためには、Mmi1 と *meiRNA* の結合に加えて、Mmi1 同士の自己相互作用が重要であることが示唆された。

さらに、Mmi1 の自己相互作用に必要な領域について、より詳細な解析を行った。まず、Mmi1 の局在を指標として、点状の局在を示すために必要な領域を探索した。1-240 残基のみ、または 61-240 残基のみを発現させた場合、これらの短い Mmi1 は点状に局在することができたが、1-180 残基のみを発現させた場合には、核内

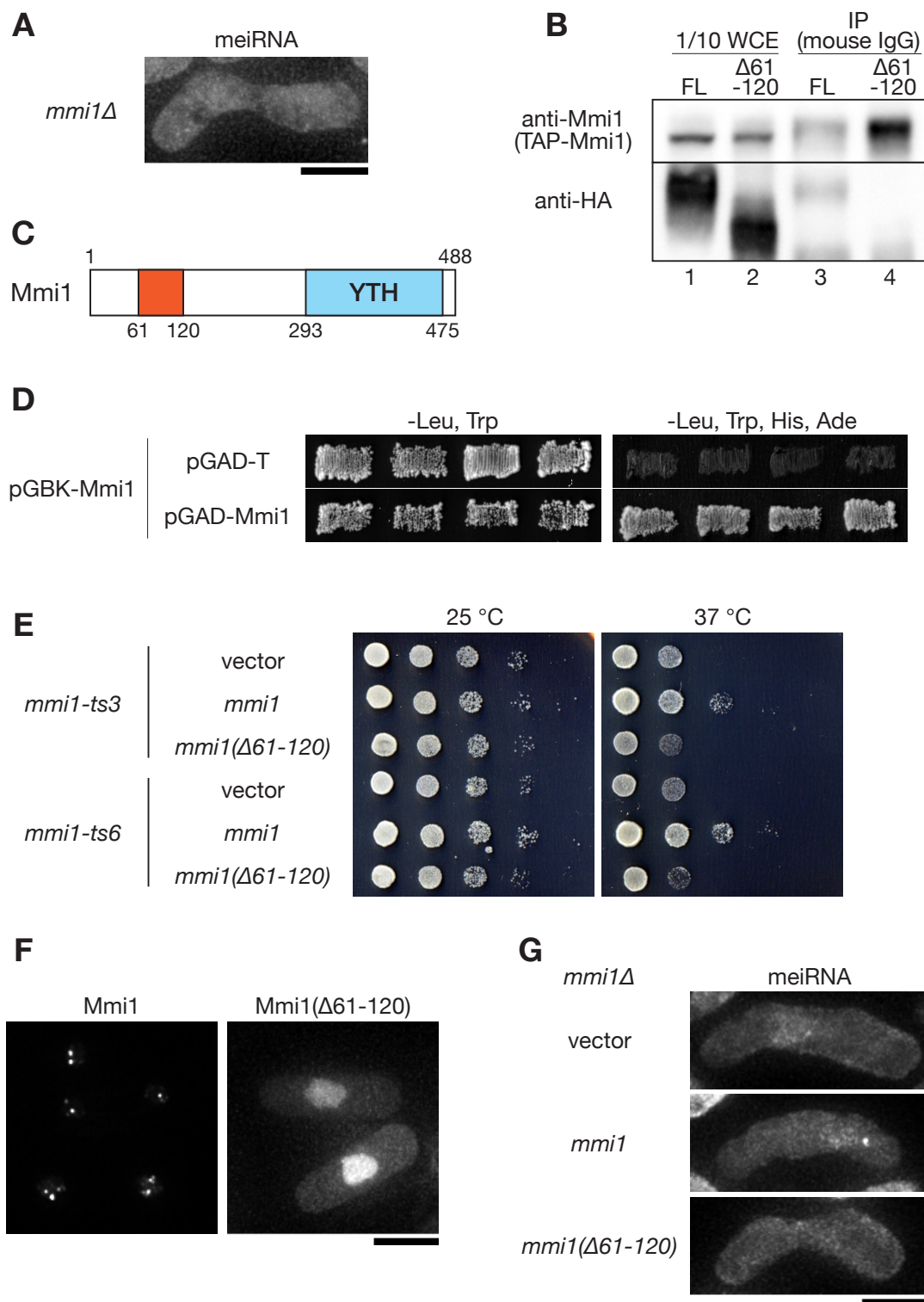


図 10 *meiRNA* は Mmi1 の自己相互作用によってドット形成する

(A) *mmi1* 破壊株における *meiRNA* の局在。*mmi1 mmi4* 二重破壊株 (JS7) を SPA 培地で 30°C 5 時間培養し、観察した。MS2 タグが付加された *meiRNA* は自身のプロモーターから、MS2-GFP は *adh41* プロモーターから発現されている。スケールバー：5 μm 。(B) Mmi1 の免疫沈降。TAP タグが付加された Mmi1 を発現する株 (JT685) に 3 コピーの HA タグが(次頁へ)

に一様に分布した (図 11A)。よって、Mmi1 が点状に局在するためには、61-240 残基が必要であると考えられた。また、GFP タグが付加された Mmi1(1-240) と HA タグが付加された Mmi1(1-240) を同時に発現させ、免疫沈降を行ったところ、Mmi1(1-240) の自己相互作用が観察された (図 11B)。よって、N 末端側の 1-240 残基のみで Mmi1 は自己相互作用し、ドット化できることが示された。しかし、Mmi1(1-240) は *mmi1-ts* 株の温度感受性を回復させることはできなかったことから、Mmi1 としての完全な機能は保持していないと考えられた (図 11C)。これらの観察から、Mmi1 の機能には、自己相互作用に必要なドメインと YTH ドメインの両方が必要であることが示唆される。

DSR をもつ mRNA はドットを形成する

meiRNA のドット形成に DSR が重要であることが分かったので、DSR をもつ他の転写産物について局在を観察した。DSR をもつ *ssm4* 遺伝子と、DSR を持たない *ura4* 遺伝子に MS2 配列を付加し、過剰発現用プロモーターである *nmt1* プロ

付加された全長 Mmi1 (FL) および部分欠失 Mmi1 (Δ 61-120) を発現する pREP41 ベクターを導入し、そこからタンパク質を抽出した。TAP-Mmi1 はマウス IgG ビーズを用いて免疫沈降した。沈降物 (IP、レーン 3-4) と 10% WCE (whole cell extract、レーン 1、2) は抗 Mmi1 抗体および抗 HA 抗体によって検出した。(C) Mmi1 タンパク質の概略。C 末端側の 293-475 残基が YTH ドメインである。今回欠損させた領域を赤で示した。(D) 酵母 2 ハイブリッド法による Mmi1 の自己相互作用の確認。出芽酵母 AH109 株に全長 Mmi1 を発現する pGBK ベクターと全長 Mmi1 を発現する pGAD ベクターを形質転換し、ヒスチジン、アデニンを含む SD 培地およびヒスチジン、アデニンを欠く SD 培地上において 30°C で 3 日間生育させた。T 抗原を発現するベクターはコントロールとして用いた。(E) 全長 Mmi1 および Mmi1(Δ 61-120) を発現する *mmi1-ts* 株の生育。*mmi1-ts3* 株 (JV579) および *mmi1-ts6* 株 (JV582) に 3HA タグが付加された全長 Mmi1 と Mmi1(Δ 61-120) を発現する pREP41 ベクターを導入し、MM+N 培地に 10 倍ごとの細胞数となるようにスポットして 25°C および 37°C で 4 日間培養した。(F) Mmi1(Δ 61-120) の局在。野生株 (JY878) に GFP タグが付加された全長 Mmi1 と Mmi1(Δ 61-120) を発現する pREP81 ベクターを導入し、体細胞分裂期における局在を観察した。スケールバー：5 μ m。(G) Mmi1(Δ 61-120) を発現する細胞における *meiRNA* の局在。*mmi1 mei4* 二重破壊株 (JS7) に 3HA タグが付加された全長 Mmi1 および Mmi1(Δ 61-120) を発現する pREP41 ベクターを導入し、減数分裂期における *meiRNA* の局在を観察した。スケールバー：5 μ m。

モーターの下流にクローニングした。これらのコンストラクトを1番染色体の遺伝子間領域である CO2 領域へ導入し、各 mRNA の局在を観察した。体細胞分裂期の細胞の核内において、*ssm4* mRNA は単一のドット状の局在を示したが、*ura4* mRNA ではそのような局在化は観察されなかった (図 12)。よって、*mei*RNA 以外の RNA も、DSR を介してドットを形成しうることが示唆された。

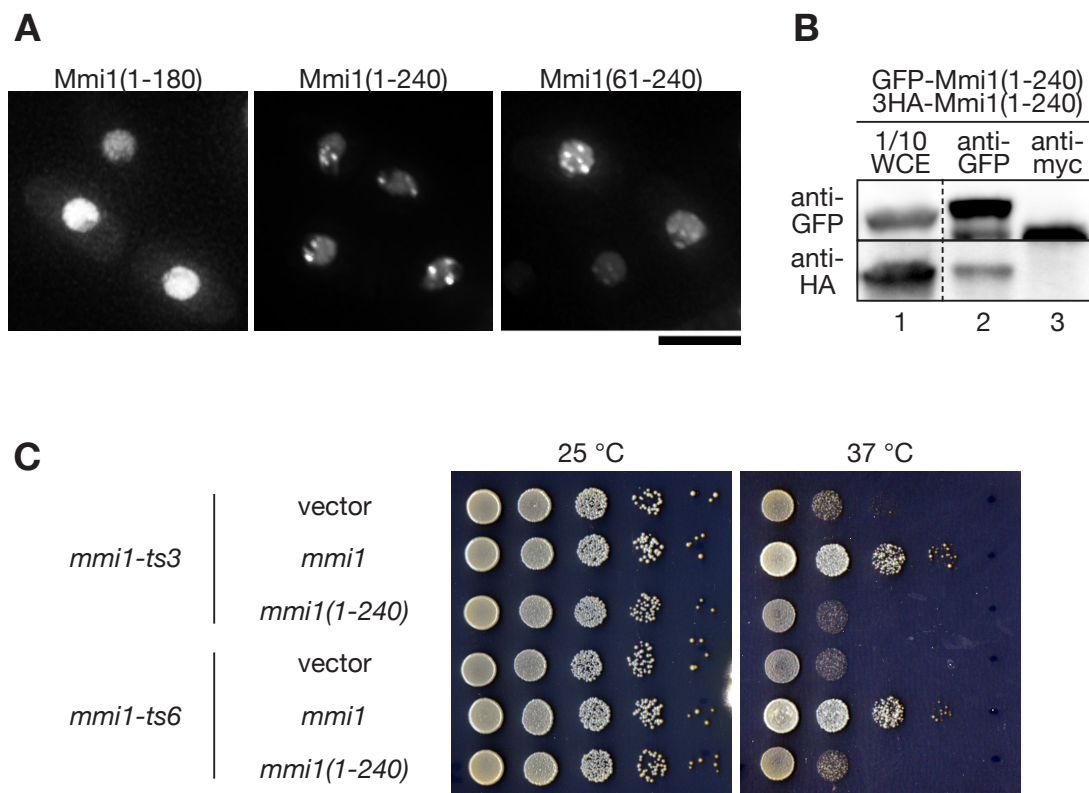


図 11 Mmi1 の自己相互作用には N 末端側の領域が必要である

(A) Mmi1 の N 末端側断片の局在。野生株 (JY878) に GFP タグが付加された Mmi1(1-180)、Mmi1(1-240)、Mmi1(61-240) を発現する pREP42 ベクターを導入し、体細胞分裂期における局在を観察した。スケールバー：5 μ m。 (B) Mmi1(1-240) の免疫沈降。野生株 (JY878) に 3HA タグが付加された Mmi1(1-240) を発現する pREP41 ベクターと GFP タグが付加された Mmi1(1-240) を発現する pREP42 ベクターを導入し、そこからタンパク質を抽出して、GFP に対する免疫沈降を行った。沈降物 (IP、レーン 2-3) と 10% WCE (レーン 1) は抗 GFP 抗体および抗 HA 抗体によって検出した。 (C) Mmi1(1-240) を発現する *mmi1-ts* 株の生育。*mmi1-ts3* 株 (JV579) および *mmi1-ts6* 株 (JV582) に、3HA タグが付加された全長 Mmi1 と Mmi1(1-240) を発現する pREP41 ベクターを導入し、MM 培地に 10 倍ごとの細胞数となるようにスポットして 25°C および 37°C で 4 日間培養した。

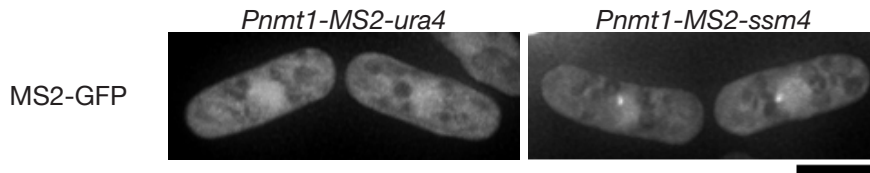


図 12 DSR をもつ mRNA はドットを形成する

体細胞分裂期における *ura4* および *ssm4* mRNA の局在。*nmt1* プロモーターの下流に MS2 タグが付加された *ura4* 遺伝子および *ssm4* 遺伝子をクローニングし、CO2 領域に導入した *Pnmt1-MS2-ura4* 株 (JS31) と *Pnmt1-MS2-ssm4* 株 (JS32) を観察した。MS2-GFP は pREP81 ベクターから発現させた。スケールバー：5 μ m。

meiRNA は DSR モチーフを介して Mmi1 を *sme2* 遺伝子座に誘引する

減数分裂期の細胞において、Mmi1 は *sme2* 遺伝子座に集められ、1 点となっている (図 8B)。これは meiRNA が Mmi1 の擬似餌として働き、Mmi1 を自らの遺伝子座に引き寄せているためだと考えられる。そこで、体細胞分裂期の細胞における Mmi1 と *sme2* 遺伝子座の関係を詳細に観察したところ、複数の点として観察される Mmi1 のうちの 1 つが、*sme2* 遺伝子座に局在していることが分かった (図 13A)。また、Mmi1 と共局在して減数分裂特異的な mRNA 分解系で働く因子である Red1 も、同様に *sme2* 遺伝子座に局在していることが明らかとなった (図 13A)。

次に、上でみられた体細胞分裂期における Mmi1 の *sme2* 遺伝子座への局在化と、meiRNA の転写との関係性について検討した。*sme2* 遺伝子のプロモーター中に存在する TATA ボックスに変異を導入し、meiRNA の発現を阻害した *sme2-m* 株 (Shimada et al, 2003) では、Mmi1 と Red1 の共局在は観察されたが、両者とも *sme2* 遺伝子座には局在していないことが分かった (図 13B)。さらに、*sme2-DSRless* 株で同様の検討を行ったところ、Mmi1 と Red1 は共に *sme2* 遺伝子座に局在していなかった (図 13C)。以上から、体細胞分裂期の細胞でも、弱く転写された meiRNA の DSR モチーフを Mmi1 が認識することで、Mmi1 や Red1 が *sme2* 遺伝子座に誘引されていると考えられた。

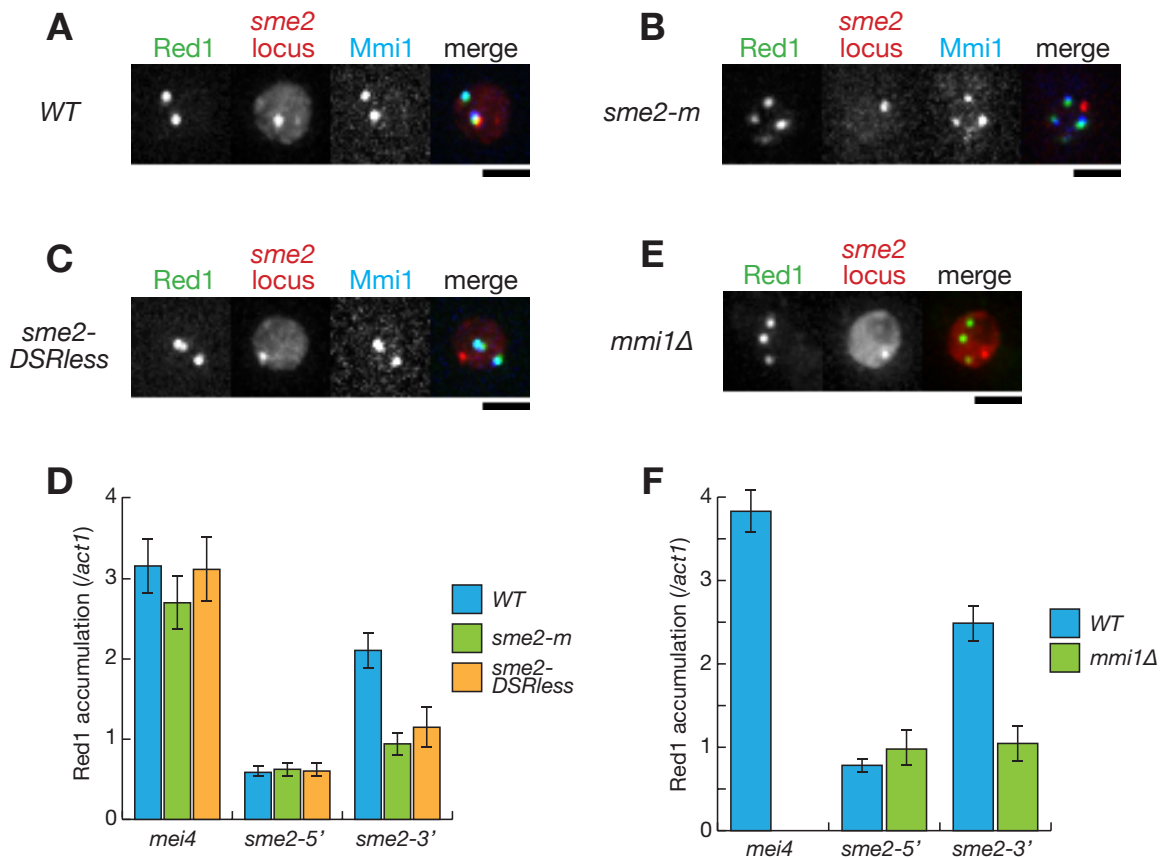


図 13 *mei*RNA は DSR モチーフを介して Mmi1 を *sme2* 遺伝子座に誘引する

(A) 野生株における Mmi1 および Red1 の局在。Red1-YFP と CFP-Mmi1 をそれぞれの遺伝子のプロモーターから、4mCherry-LacI-NLS を *adh41* プロモーターから発現させた体細胞分裂期の野生株 (JS8) を観察し、核の拡大図を示した。lacO 配列は *sme2* 遺伝子上流に挿入した。Merge: Red1-YFP (緑)、*sme2* 遺伝子座 (赤)、CFP-Mmi1 (青)。スケールバー: 2 μ m。(B) *sme2-m* 株における Mmi1 および Red1 の局在。Red1-mCherry、GFP-LacI、CFP-Mmi1 を発現させた体細胞分裂期の *sme2-m* 株 (JS9) を観察し、核の拡大図を示した。Merge: Red1-mCherry (緑)、*sme2* 遺伝子座 (赤)、CFP-Mmi1 (青)。スケールバー: 2 μ m。(C) *sme2-DSRless* 株における Mmi1 および Red1 の局在。Red1-YFP、4mCherry-LacI-NLS、CFP-Mmi1 を発現させた体細胞分裂期の *sme2-DSRless* 株 (JS10) を観察し、核の拡大図を示した。Merge: Red1-YFP (緑)、*sme2* 遺伝子座 (赤)、CFP-Mmi1 (青) スケールバー: 2 μ m。(D) クロマチン免疫沈降法による Red1 の局在。体細胞分裂期の野生株 (JS12)、*sme2-m* 株 (JS13)、*sme2-DSRless* 株 (JS14) について、Red1 に対する免疫沈降を行い、沈降された *mei4* 遺伝子座および *sme2* 遺伝子座の 5' 側と 3' 側の DNA 量を、*act1* 遺伝子座の DNA 量と比較した。3 回独立に反応を行い、平均 \pm 標準偏差を示した。(E) *mmi1* 株における Red1 の局在。Red1-GFP、4mCherry-LacI-NLS を発現させた体細胞分裂期の *mmi1 mei4* 二重破壊株 (JS11) を観察し、核の拡大図を示した。Merge: Red1-YFP (緑)、*sme2* 遺伝子座 (赤)、スケールバー: 2 μ m。(F) *mmi1* 破壊株におけるクロマチン免疫沈降法による Red1 の局在。体細胞分裂期の野生株 (JS12)、*mmi1 mei4* 二重破壊株 (JS15) について、Red1 に対する免疫沈降を行い、沈降された *mei4* 遺伝子座および *sme2* 遺伝子座の 5' 側と 3' 側の DNA 量を、*act1* 遺伝子座の DNA 量と比較した。3 回独立に反応を行い、平均 \pm 標準偏差を示した。

Mmi1 を含む複合体の染色体上における局在をより詳細に解析するため、Red1 をマーカーとしてクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行った。Red1 は野生株において、既に報告されている通り *mei4* 遺伝子座に強く局在しており (Hiriart et al, 2012; Tashiro et al, 2013; Zofall et al, 2012)、それに加えて今回 *sme2* 遺伝子座の 3' 側への蓄積が観察された (図 13D)。しかし、*sme2* の 5' 側には局在していなかった。一方、*sme2-m* 変異株および *sme2-DSRless* 株では、Red1 の *mei4* 遺伝子座への局在は観察されたが、*sme2* 遺伝子 3' 側への局在は観察できなかった (図 13D)。これらの結果は、蛍光顕微鏡観察の結果と一致しており、転写された meiRNA の DSR モチーフによって、Mmi1-Red1 の複合体が *sme2* 遺伝子座の 3' 側に誘引されていることが強く示唆される。

また、*mmi1* 破壊株における Red1 の局在を観察したところ、Red1 は *sme2* 遺伝子座に局在していなかった (図 13E)。ChIP 解析においても同様に、Red1 の *sme2* 遺伝子座への蓄積は失われていた (図 13F)。よって、Red1 は Mmi1 を介して *sme2* 遺伝子座に局在することが分かった。

meiRNA は散在する Mmi1 を 1 つに束ねる能力をもつ

Mmi1 が meiRNA の DSR に依存して *sme2* 遺伝子座へ局在していたことから、meiRNA は自らの遺伝子座に Mmi1 を集合させる能力があると考えられる。また、上述したように、減数分裂期の *sme2-3'* 株において、Mmi1 は meiRNA ドットに集められ 1 点として観察されたが、Mei2 はドットを形成していなかった (図 9B)。これらの結果から、meiRNA は Mei2 に依存せずに Mmi1 を集め、1 点に束ねる能力を持っている可能性が示唆される。この可能性を検証するために、Mmi1 が核内に散在し、複数個の点状に観察される体細胞分裂期の細胞において、meiRNA を過剰発現した時の Mmi1 の局在に与える影響を観察した。

sme2 遺伝子のプロモーターを強力な過剰発現プロモーターである *nmt1* プロモーターに置換したところ、野生株では *meiRNA* のドットが観察されない体細胞分裂期においても、*meiRNA* のドット形成がみられた (図 14A、C)。このドットは *LacI-lacO* によって標識された *sme2* 遺伝子座のシグナルと一致していた (図 14A)。さらに、*meiRNA* の転写を活性化する因子 *Ste11* を過剰発現した場合も、体細胞分裂期の細胞において *meiRNA* のドットを観察することができた (図 14B)。以上から、体細胞分裂期の細胞において *meiRNA* のドットが観察されないのは、*meiRNA* の発現量が低いためであり、*meiRNA* のドット形成能力は体細胞分裂期でも機能することが明らかとなった。

nmt1 プロモーターから *meiRNA* を過剰発現する株において、核内に観察される *Mmi1* の点の数を計測したところ、*Mmi1* が 1 点に局在する細胞の割合が、野生株より顕著に上昇していることが分かった (図 14C、D)。*meiRNA* の過剰発現株で 1 点に集束した *Mmi1* は、*meiRNA* のドットと共局在していた (図 14C)。また、*sme2* 遺伝子の 5' 側のみを過剰発現した場合は、*Mmi1* が 1 点に集められる細胞の比率の上昇はみられなかったが、3' 側の過剰発現では全長の場合と同様に上昇が観察された (図 14D、E)。以上から、体細胞分裂期の細胞においても、*meiRNA* は 3' 側の領域を介して *Mmi1* を誘引し、1 点に束ねていると考えられた。

***meiRNA* の過剰発現による *Mmi1* の集合は *Mei2* 非依存的である**

次に、体細胞分裂期の細胞での、*meiRNA* の過剰発現により *Mmi1* が 1 つに束ねられる現象に対する *Mei2* の寄与を検討した。その結果、*mei2* 破壊株においても野生株と同様に、*meiRNA* の全長または 3' 側の過剰発現により、*Mmi1* が 1 点に集められている細胞の比率が上昇することが分かった (図 15A-C)。このことから、*meiRNA* の *Mmi1* を束ねる能力は、*Mei2* に依存しないことが分かった。

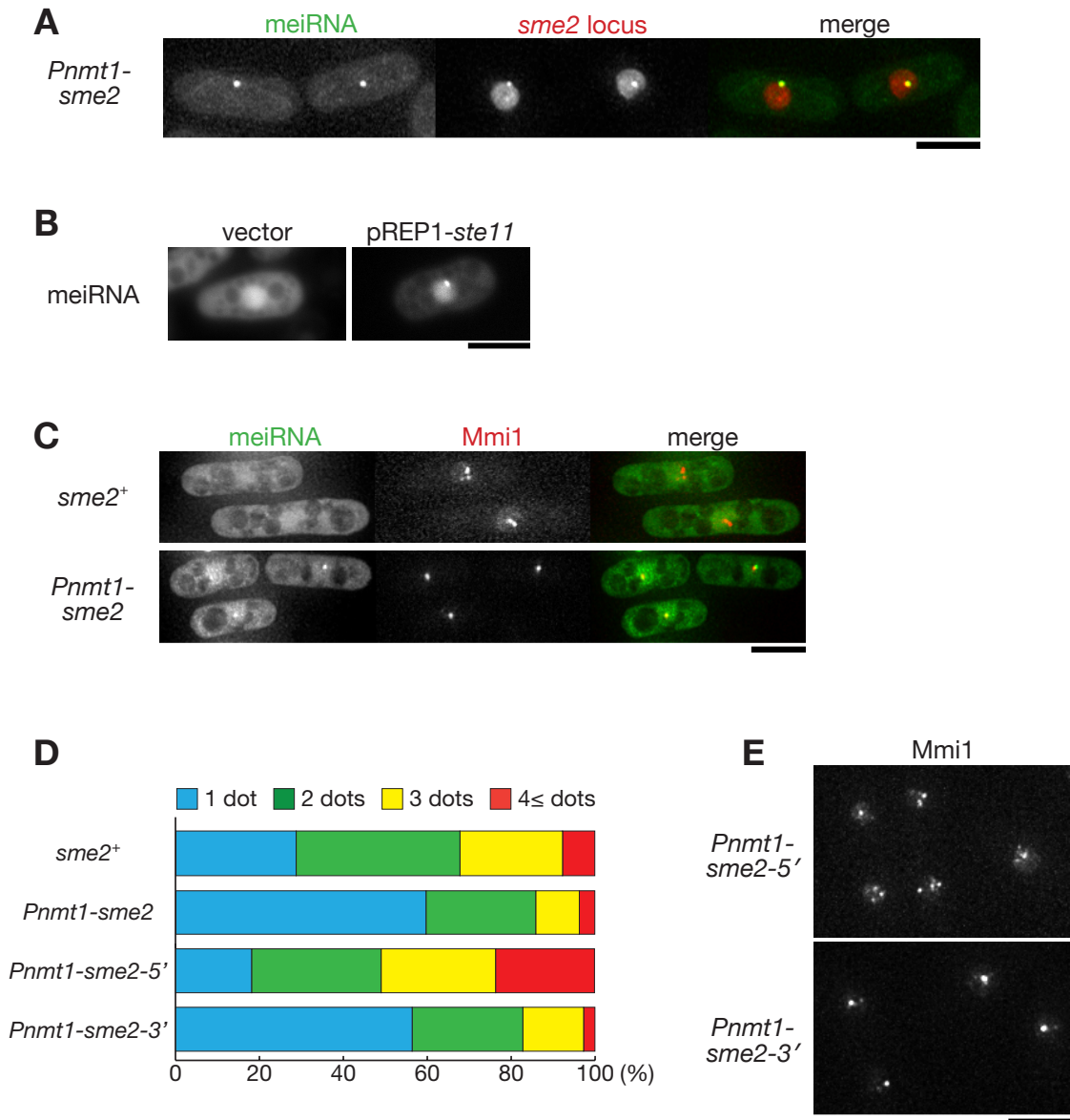


図 14 meiRNA の過剰発現により核内に散在する Mmi1 が 1 点に集められる
(A) 体細胞分裂期において過剰発現された meiRNA の局在。体細胞分裂期の *nmt1* プロモーターから MS2 タグが付加された meiRNA を発現する株 (JS16) を観察した。Merge : meiRNA (MS2-GFP、緑)、*sme2* 遺伝子座 (赤)。スケールバー : 5 μ m。**(B)** *ste11* 過剰発現株における meiRNA の局在。体細胞分裂期の MS2 タグが付加された meiRNA を発現する株 (JS33) に、*ste11* をクローニングした pREP1 ベクターおよび MS2-GFP をクローニングした pREP82 ベクターを導入し、体細胞分裂期の細胞を観察した。スケールバー : 5 μ m。**(C)** 体細胞分裂期における *sme2* 過剰発現株の Mmi1 の局在。CFP-Mmi1 を発現する体細胞分裂期の *sme2*⁺ 株 (JS17)、*Pnmt1-sme2* 株 (JS18) を観察した。スケールバー : 5 μ m。**(D)** Mmi1 ドットを 1 つ、2 つ、3 つ、および 4 つ以上もつ細胞の割合。体細胞分裂期の *sme2*⁺ 株 (JS17)、*Pnmt1-sme2* 株 (JS18)、*Pnmt1-sme2-5'* 株 (JS19)、*Pnmt1-sme2-3'* 株 (JS20) の核内に存在する Mmi1 の点の個数を 100 細胞以上計測した。**(E)** 体細胞分裂期における *sme2-5'* および *sme2-3'* 過剰発現株の Mmi1 の局在。CFP-Mmi1 を発現する体細胞分裂期の *Pnmt1-sme2-5'* 株 (JS19)、*Pnmt1-sme2-3'* 株 (JS20) を観察した。スケールバー : 5 μ m。

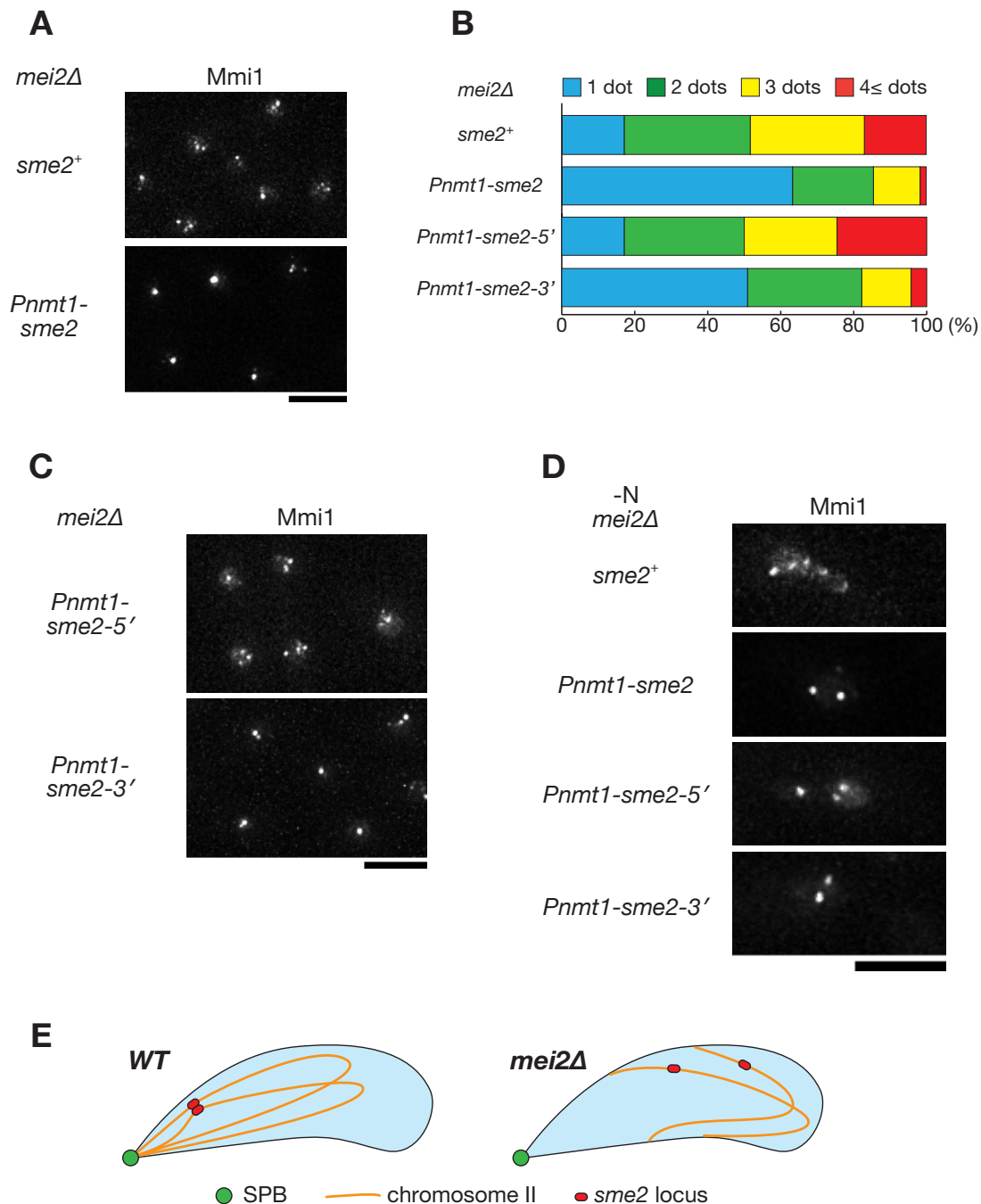


図 15 Mei2 は meiRNA の過剰発現による Mmi1 凝集に関与しない

(A) 体細胞分裂期における *sme2* を過剰発現する *mei2* 破壊株の Mmi1 の局在。体細胞分裂期の CFP-Mmi1 を発現する *mei2* が破壊された *sme2⁺* 株 (JS21)、*Pnmt1-sme2* 株 (JS22) を観察した。スケールバー：5 μm。(B) *mei2* 破壊株における Mmi1 ドットを 1 つ、2 つ、3 つ、および 4 つ以上もつ細胞の割合。体細胞分裂期の *mei2* が破壊された *sme2⁺* 株 (JS21)、*Pnmt1-sme2* 株 (JS22)、*Pnmt1-sme2-5'* 株 (JS23)、*Pnmt1-sme2-3'* 株 (JS24) の核内に存在する Mmi1 ドットの個数を 100 細胞以上計測した。(C) 体細胞分裂期における *sme2-5'* および *sme2-3'* を過剰発現する *mei2* 破壊株の Mmi1 の局在。体細胞分裂期の CFP-Mmi1 を発現する *mei2* が破壊された *Pnmt1-sme2-5'* 株 (JS19)、*Pnmt1-sme2-3'* 株 (JS20) を観察した。スケールバー：5 μm。(D) 減数分裂期における野生型および変異型 *sme2* を (次頁へ)

さらに、減数分裂期の細胞においても、*meiRNA* による *Mei2* 非依存的な *Mmi1* の凝集が観察されるかどうか検討した。*mei2* 破壊株では、減数分裂期に *Mmi1* は核内に散在したままとなり、1 点に凝集しない (図 15D、*sme2*⁺) (Harigaya et al, 2006)。しかし、*mei2* 破壊株に *sme2* 遺伝子の全長または 3' 側を過剰発現した場合、*Mmi1* は核内の 2 点に観察された (図 15D)。*mei2* 破壊株では、染色体のテロメア領域が集合する過程に異常が生じ、染色体の対合が正常に進行しないことが報告されている (Yamamoto et al, 2004)。このことを踏まえると、観察された 2 点の *Mmi1* は、相同染色体上に存在する *sme2* 遺伝子座それぞれに誘引され、各染色体上で点状となった *Mmi1* だと考えられる (図 15E)。

***meiRNA* は *Mmi1* の活性を低下させる能力をもつ**

減数分裂期において、*meiRNA* と *Mei2* によって構成される *Mei2* ドットは、*Mmi1* を 1 点に束ね、その活性を抑制すると考えられている (Harigaya et al, 2006)。*meiRNA* 自身も *Mei2* に依存せずに *Mmi1* を 1 点に束ねる能力をもつことから、*meiRNA* は単独で *Mmi1* の活性を低下させる能力をもつことが示唆される。この可能性を検討するため、*meiRNA* を過剰発現した株において、*DSR* をもつ mRNA である *mei4*、および *ssm4* の発現量を測定した。しかし、*mmi1-ts* 株を用いて高温で *Mmi1* を完全に失活させた場合とは異なり、*meiRNA* を過剰発現した株において *mei4* や *ssm4* mRNA の顕著な発現上昇はみられなかった (図 16A)。

過剰発現する *mei2* 破壊株の *Mmi1* の局在。減数分裂期の CFP-*Mmi1* を発現する *mei2* が破壊された *sme2*⁺ 株 (JS21)、*Pnmt1-sme2* 株 (JS22)、*Pnmt1-sme2-5'* 株 (JS23)、*Pnmt1-sme2-3'* 株 (JS24) を観察した。スケールバー：5 μm 。(E) *mei2* 破壊株における減数分裂期の核の模式図。青い領域が核、緑色の丸が SPB、赤が *sme2* 遺伝子座、橙色の線が 2 番染色体を表す。野生株では染色体のテロメア領域が SPB 上に束ねられるため、*sme2* 遺伝子座は近接し、*meiRNA* の効果によって早期に対合する。一方、*mei2* 破壊株ではテロメアの集合に異常が生じるため、相同染色体上の *sme2* 遺伝子座は、互いに離れた位置のままとなる。

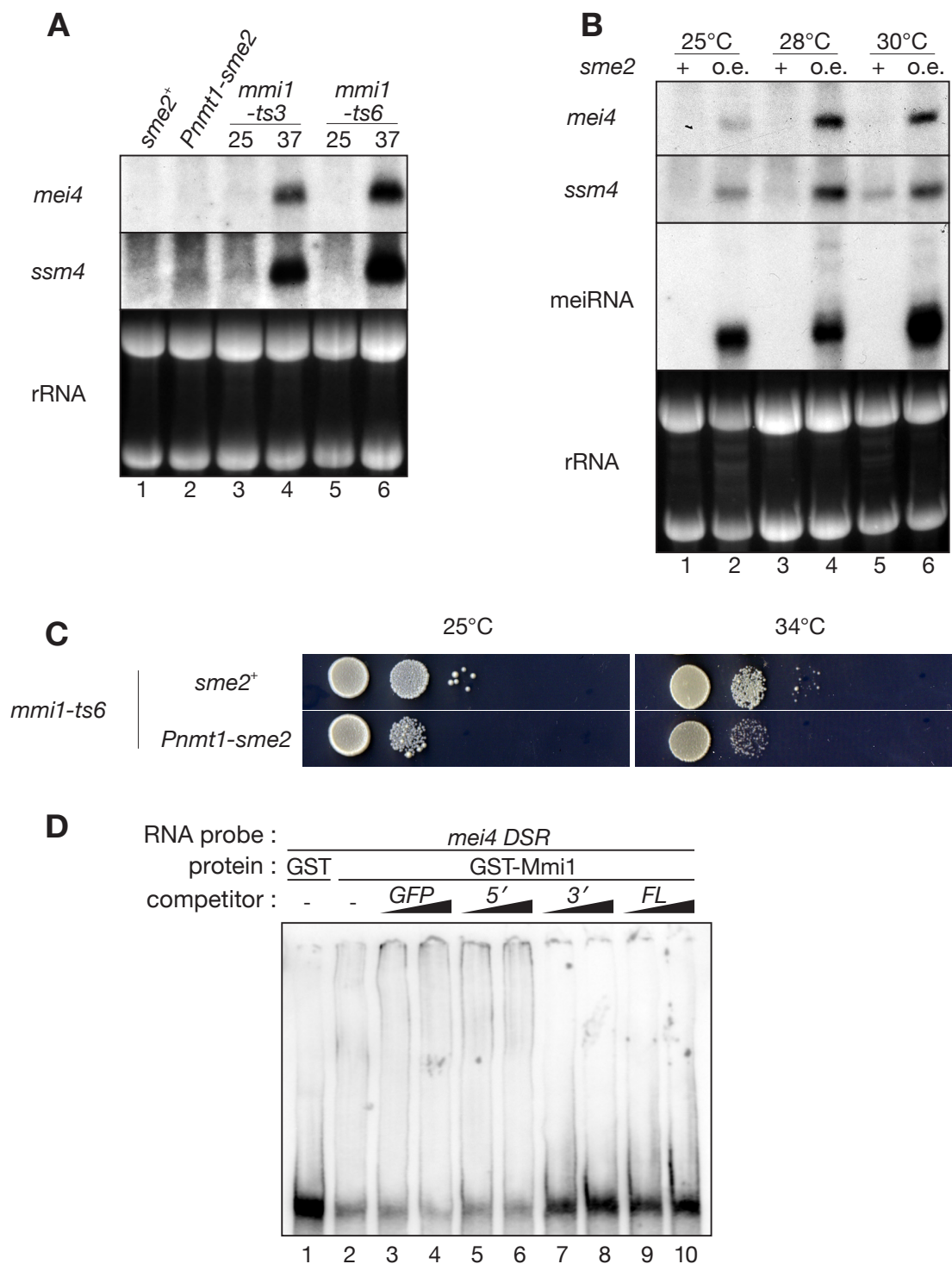


図 16 *meiRNA* の過剰発現により *Mmi1* の活性は低下する

(A) *sme2* 過剰発現株における DSR をもつ mRNA の発現。野生株 (JS33) および *Pnmt1-sme2* 株 (JS34) は MM+N 培地で 30°C 一晩培養した。*mmi1-ts3* 株 (JV579) および *mmi1-ts6* 株 (JV582) は YE 培地で 25°C 一晩培養し、37°C に移して 2 時間培養した。臭化エチジウムで染色した rRNA は RNA 量のコントロールとして用いた。(B) *sme2* を過剰発現する *mmi1* 変異株における DSR をもつ mRNA の発現。*mmi1-ts6* 株 (JV582) および *mmi1-ts6 Pnmt1-sme2* 株 (JS35) は MM+N 培地で 25°C、28°C、30°C で一晩培養した。(次頁へ)

そこで、*mmi1-ts* 株を半制限温度下におき、Mmi1 の活性を部分的に低下させた状態で過剰発現の実験を行った。*mmi1-ts* 株を半制限温度である 28°C または 30°C で培養した場合、*sme2* 遺伝子の過剰発現によって *mei4*、*ssm4* の mRNA 量が増加することが分かった (図 16B、レーン 3-6)。さらに、*mmi1-ts* 株において *sme2* 遺伝子を過剰発現すると、生育が悪化することが分かった (図 16C)。以上の結果から、*meiRNA* は、単独では Mmi1 を完全に不活性化することはできないが、Mmi1 の活性を低下させる能力は備えていることが分かる。

次に、*meiRNA* が Mmi1 の活性を制御する機構について検討した。精製した GST-Mmi1 と標識された *mei4* の DSR 領域のプロープに、多量の未標識の *meiRNA* を加えて EMSA を行ったところ、全長または 3' 側のみの *meiRNA* を加えた場合、Mmi1 と *mei4* DSR の間の結合が低下することが分かった (図 16D、レーン 7-10)。よって、DSR モチーフを多数含む 3' 側の領域は、競合的に Mmi1 と他の DSR の結合を阻害し、Mmi1 の活性低下を導くことが示唆された。

(C) *meiRNA* を過剰発現する *mmi1-ts* 株の生育。*mmi1-ts6* 株 (JV582) および *mmi1-ts6 Pnmt1-sme2* 株 (JS35) を、MM+N 培地に 10 倍ごとの細胞数となるようにスポットして 25°C および 34°C で 5 日間培養した。(D) EMSA による Mmi1 と *mei4* mRNA の DSR 領域との結合に対する *meiRNA* の影響の測定。GST-Mmi1 (0.2 μM) および GST 単体 (2 μM) を DIG ラベルした *mei4* DSR プロープ (1 nM) とラベルしていない *meiRNA* プロープ (5 ないし 30 nM) と混合し、結合を測定した。GFP プロープはコントロールとして用いた。

考察と展望

本研究では、meiRNA 上に DSR モチーフが多数存在することから、meiRNA が Mmi1 のターゲットであると考え、meiRNA の機能と Mmi1 の関係性について検討した。meiRNA は多数の DSR モチーフを含む 3' 側の領域を介して Mmi1 と直接結合し、Mmi1 を介した RNA 分解系によって分解されていることがわかった (図 5、6)。また、meiRNA に含まれる DSR モチーフは、減数分裂の進行に重要であった (図 7)。さらに、meiRNA は DSR モチーフを介して、Mmi1 を *sme2* 遺伝子座に誘引することがわかった (図 13)。meiRNA を過剰発現すると、Mei2 の有無にかかわらず、Mmi1 が 1 点に集められて活性が低下することが明らかとなった (図 14-16)。一方、*mmi1* 破壊株や、meiRNA のほぼ全ての DSR モチーフに変異を導入した株では、meiRNA のドット形成は観察されなかった (図 9、10)。また、Mmi1 タンパク質同士で結合しあうことが分かり、この自己相互作用に必要な領域を欠損した *mmi1* 変異株では、meiRNA ドットが形成されないことが明らかとなった (図 10、11)。

以上の結果から、本研究の結論は以下の通りである。meiRNA は、3' 側に多数存在する DSR モチーフを介して Mmi1 と結合し、Mmi1 の自己相互作用依存的に、自らの遺伝子座に局在してドットを形成する。自らの遺伝子座に局在した meiRNA は、Mmi1 の擬似餌として働くことで Mmi1 をさらに誘引し、Mmi1 が DSR をもつ他の mRNA と結合することを競合的に阻害して、核内の Mmi1 の活性低下をもたらしている。

meiRNA を過剰発現すると、体細胞分裂期でも meiRNA のドットが観察され、Mmi1 の活性低下が誘導される (図 14A、16)。よって、体細胞分裂期でも、減

数分裂期と同様の meiRNA のドット形成機構と meiRNA による Mmi1 の活性低下機構が働いていると示唆される。減数分裂期には Ste11 依存的に meiRNA の転写が増加するため (図 4D)、体細胞分裂期に meiRNA を過剰発現した場合と近い状況となっていると考えられる。

meiRNA-S と meiRNA-L の生成機構

mmi1 変異体で meiRNA-S と meiRNA-L の発現量が上昇していたことから、meiRNA は Mmi1 のターゲットであることが示された (図 5A)。しかし、Mmi1 を介した RNA 分解系に関与する因子の変異体では、因子によって meiRNA-S および meiRNA-L の様々な発現パターンがみられた (図 5B、C)。各変異体で観察された meiRNA の発現パターンは大きく 3 つに分類できる。(1) meiRNA-S が若干増加するに留まり、meiRNA-L の発現が全くみられないもの。*plal*、*rna15*、*iss10*、*cid14* 変異体が該当する。(2) meiRNA-S の著しい増加がみられるが、meiRNA-L の増加はみられないもの。*rrp6*、*dis3*、*pab2*、*red1* 変異体が該当する。(3) meiRNA-L の増加がみられるもの。*mmi1* 変異体のみがこのグループに該当する。*mmi1 rrp6* 二重変異株では、meiRNA-S と meiRNA-L の両方の発現が強く、(2) と (3) の両方の表現型を示したと考えられる。

グループ (1) に含まれる因子は、meiRNA の分解に対する寄与が低いと考えられる。既に報告がある通り、Cid14 は Mmi1 を介した RNA 分解系に寄与しない (St-Andre et al, 2010; Yamanaka et al, 2010)。また、*iss10* 変異体では、*mmi1* や *red1* の変異体に比べて DSR をもつ mRNA の発現量が低いことが分かっている (Yamashita et al, 2013)。よって、*cid14* および *iss10* 変異体において得られた結果は、既知の事実と反しない。また、*plal* や *rna15* 変異体においては、DSR をもつ mRNA でも、発現の増加がみられるものと増加がみられないものが存在すること

が報告されている (Yamanaka et al, 2010)。例えば、*pla1*、*rna15* のどちらの変異体においても、*mei4* や *ssm4* の mRNA の増加がみられるが、*spo5* mRNA の増加はみられない。meiRNA もこれらの例と同様に、*pla1* や *rna15* の影響が観察されにくい転写産物であると考えられる。

グループ (2) に *pab2*、*rrp6*、*dis3* 変異体が含まれることから、meiRNA-S は poly(A) を介したエキソソームによる分解を受けているといえる。しかし、これらの変異体では meiRNA-L の増加は観察されなかった。この原因を探るため、まず meiRNA-S と meiRNA-L の生成機構について考察する。meiRNA-S と meiRNA-L は 5' 側が共通であり、3' 末端側のみが異なっていることから、meiRNA-S および meiRNA-L の 3' 末端に相当する箇所それぞれにおいて転写終結がおきる可能性と、転写された meiRNA-L が 3' 側から何らかのプロセッシングにより短縮されて meiRNA-S となる可能性が考えられる (図 17A)。現段階ではどちらの可能性が妥当か判断できる結果は得られていないが、meiRNA-S も poly(A) 付加を受けていることから (Watanabe and Yamamoto, 1994)、前者の 2 段階の転写終結による可能性が高いと考えられる。パラスペックル形成に必須な *NEAT1* RNA も 2 段階の転写終結によって、長短 2 種類のアイソフォームが生成されることが報告されている (Naganuma et al, 2012)。*NEAT1* の転写終結の切換には HNRNPK というタンパク質が必要である。HNRNPK は転写された *NEAT1* の、短いアイソフォームに相当する転写終結箇所付近に結合し、poly(A) 付加の過程をスキップさせる。これにより、*NEAT1* の転写がさらに伸長し、長い *NEAT1* が生成される。分裂酵母にも *NEAT1*-HNRNPK のように、meiRNA-S の転写終結をスキップするための機構が存在すると考えられる。

今回観察した様々な変異体のうち、*mmi1* 変異体でのみ meiRNA-L の発現が上昇したことから、次のような仮説が考えられる。Mmi1 が meiRNA-L 上の

DSR を認識すると、優先的に meiRNA-S に相当する箇所での転写終結がおこる。meiRNA-L は殆ど転写されず、転写された meiRNA-S もエキソソームによる分解を受け、両者とも体細胞分裂期には観察されない (図 17B)。この仮説に立脚して考えると、*rrp6* や *pab2* の変異体における meiRNA の発現は、Mmi1 の機能によって meiRNA-L の転写は低く抑えられ、エキソソームによって分解できなかった

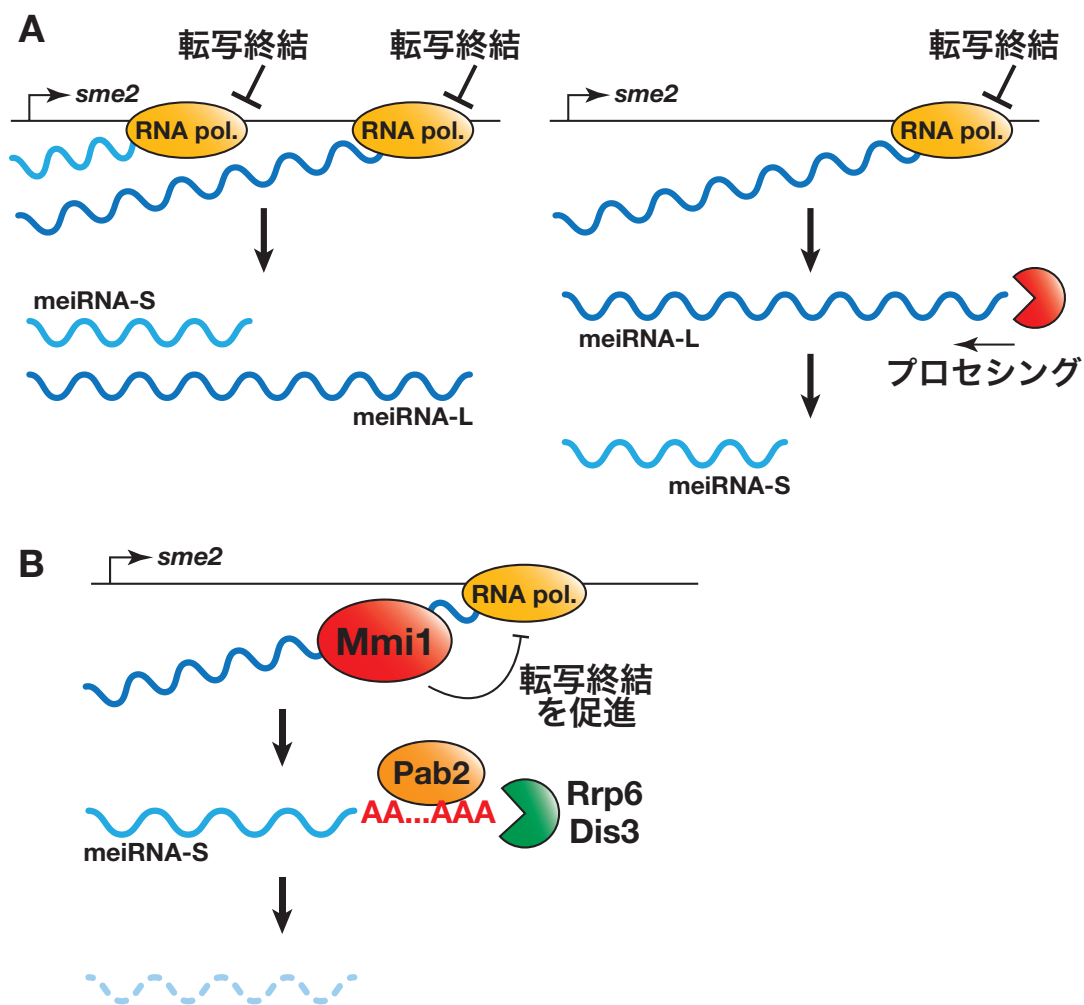


図 17 meiRNA-S と meiRNA-L の生成機構

(A) meiRNA-S と meiRNA-L の生成に関する 2 つのモデル。(左) *sme2* 遺伝子には 2 箇所の転写終結点が存在し、上流側で終結すると meiRNA-S が、下流側で終結すると meiRNA-L が生成される。(右) meiRNA-L に相当する箇所での転写終結し、生成された meiRNA-L が 3' 側からプロセッシングを受けることで meiRNA-S が生成される。(B) Mmi1 が meiRNA の生成に与える影響のモデル。meiRNA 上の DSR を Mmi1 が認識すると、優先的に meiRNA-S に相当する箇所での転写終結が起こる。生成された meiRNA-S は poly(A) およびエキソソーム依存的に分解される。

meiRNA-S のみが観察されるというように説明できる。meiRNA-L が Mmi1 依存的かつエキソソーム非依存的な RNA 分解を受けている可能性も否定できないが、現段階ではエキソソーム以外の RNA 分解系で Mmi1 と関連するものは発見されておらず、この可能性は低いと考えている。

また、*red1* の変異体では、グループ (2) に属する他の変異体で観察された meiRNA-S のバンドに比べて、高い位置にバンドがもう 1 本検出された。このバンドは、Mmi1 と協働する Red1 の破壊によって部分的に Mmi1 の活性が低下し、meiRNA-S と meiRNA-L の中間に相当する新たな箇所転写が終結したものと考えることができる。*red1* 変異体で観察されたこの meiRNA の 3' 末端を詳しく解析することによって、meiRNA-S と meiRNA-L の生成機構についてより深く迫ることができると期待される。

Mmi1 がもつ 2 つの機能

Mmi1 の C 末端側の 293-475 残基には DSR との結合に必須な RNA 結合ドメインである YTH ドメインが存在しているが、それ以外に明確な機能領域は見出されていなかった (Harigaya et al, 2006; Yamashita et al, 2012)。本研究において、N 末端側の 60 アミノ酸 (61-120 残基) を欠損した Mmi1 は、自己相互作用できず、Mmi1 としての機能を失うことがわかった (図 10B-D)。また、Mmi1 は N 末端側の 1-240 残基のみで自己相互作用することが明らかとなった (図 11B)。以上の結果から、Mmi1 の N 末端側は自己相互作用ドメインであるといえる。

しかし、自己相互作用できる N 末端領域のみの Mmi1(1-240) は、Mmi1 としての機能を喪失していた (図 11C)。よって、Mmi1 の機能には、自己相互作用に必要な N 末端側の領域に加えて、RNA と結合する C 末端側の領域が必須であるといえる。このことから、Mmi1 は DSR をもつ mRNA を認識し、自己相互作

用を介して集合させ、その分解を誘導していると考えられる。実際に、DSRをもつ mRNA に RNA 分解を阻害する配列をもたせて、分解途中にあると考えられる RNA の局在を観察すると、Mmi1 の点の 1 つと共局在することが分かっている (山下私信)。また、Mmi1 と Pla1、Rrp6、Pab2 などの因子は共局在していることが知られている (Yamanaka et al, 2010)。以上の知見から、Mmi1 は DSR をもつ RNA と RNA 分解系の因子を一箇所に集合させるための足場として働き、効率的な RNA 分解を可能にしていると考えられる。Mmi1 の自己相互作用が他の RNA 分解系の因子とどのように関係しているかの検討は今後の課題である。

DSR をもつ RNA の分解箇所

体細胞分裂期の細胞核において、Mmi1 は複数個の点状の局在を示すが、その点の正確な位置は明らかになっていなかった。本研究において、その中の 1 つが *sme2* 遺伝子座であることが示された。体細胞分裂期に観察される Mmi1 の点状の局在は、細胞によって 1 個から数個と様々であるが (Harigaya et al, 2006)、Mmi1 が 1 点となっている細胞であっても、その Mmi1 の点は *sme2* 遺伝子座に局在していることが分かった。このことから、*sme2* 遺伝子座は DSR をもつ RNA の主要な分解箇所であると考えられる。本研究の結果から、DSR をもつ *ssm4* mRNA もドット状の局在を示すことが明らかとなった (図 12)。このドットの位置を特定し、Mmi1 の点状の局在との関係性を検討することで、Mmi1 を介した RNA 分解系についてより深い知見を得ることができると考えられる。

meiRNA が自らの遺伝子座に係留される機構

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、mRNA の核外排出に関する因子の変異体において、*HSP104* や *SSA4* などの熱ショックタンパク質をコードする遺

伝子の mRNA が、poly(A) 鎖の伸長を受けて、自らの遺伝子座ないしその近傍でドット状の局在を示すことが知られている (Jensen et al, 2001; Libri et al, 2002; Rougemaille et al, 2007; Thomsen et al, 2003; Zenklusen et al, 2002)。HSP104 や SSA4 mRNA のドット化は、mRNA の poly(A) 付加を行う通常の poly(A) ポリメラーゼをコードする *pap1* の変異によって、mRNA の poly(A) 鎖が短縮された場合でも観察されるため (Hilleren et al, 2001)、poly(A) 長の異常に応じて mRNA がドットになると考えられている。この mRNA のドット化には、エキソソームの機能サブユニット Rrp6 が必要であることが知られている (Hilleren et al, 2001; Libri et al, 2002; Rougemaille et al, 2007; Thomsen et al, 2003)。本研究において、meiRNA のドット形成には Mmi1 が中心的な働きをすることが示された。Mmi1 を介した RNA 分解系において重要な役割を担っている Pla1 や Rrp6 は、それぞれ出芽酵母の Pap1 および Rrp6 の分裂酵母ホモログである。よって、Pla1 や Rrp6 の meiRNA のドット形成に対する寄与を検討し、出芽酵母における mRNA のドット化機構と比較することで、meiRNA のドット形成機構のより詳細な解明につながると期待される。

本研究の結果から、meiRNA が Mmi1 の自己相互作用によってドット形成することが明らかになったが、ドットが自らの遺伝子座に係留される機構については明らかになっていない。哺乳類細胞において、X 染色体の不活性化に中心的な役割を果たす lncRNA である *Xist* RNA については、次の機構で染色体上に係留されていることが報告されている。*Xist* RNA は雌のもつ 2 本の X 染色体のうち、将来不活性化を受ける方 (Xi 染色体と呼ばれる) からのみ転写される。転写された *Xist* RNA は、まず Xi 染色体の *Xist* 遺伝子内に存在する *Xic* (X-inactivation center) 領域に局在化する (Borsani et al, 1991; Brockdorff et al, 1992; Brown et al, 1991a; Brown et al, 1991b; Brown et al, 1992)。*Xist* RNA は *Xic* に凝集した後、Xi 染

染色体全体を覆うように広がり、Xi 染色体全体のサイレンシングを誘導する。*Xist* RNA が *Xic* に係留される機構において中心的な役割を担っているタンパク質が YY1 である。YY1 は DNA と RNA に結合する能力を持ち、Xi 染色体の *Xic* と *Xist* RNA の両方に結合して、両者を橋渡しすることができる。この *Xist* RNA の例を踏まえると、YY1 のような、RNA と染色体を橋渡しする何らかの因子または因子群が、*meiRNA* のドット形成機構にも存在し、*meiRNA* と *sme2* 遺伝子座を繋ぎ留めていると考えられる。*meiRNA* を *sme2* 遺伝子座に繋ぎ留める因子を同定することは、*meiRNA* のドット形成機構を解明する上で最も重要な課題の 1 つである。

DSR 依存的に RNA がドットを形成することの生理的な意義

先述の通り、出芽酵母では poly(A) 付加の異常によってドット化する例が知られている。このドット化した mRNA を強制的に核外排出すると、生育が非常に悪化することが報告されている (Kallehauge et al, 2012)。強制排出された異常 mRNA は翻訳されないことから、mRNA のドットは翻訳に適さない未成熟な転写産物を一時的に蓄えておく場所であると考えられている。本研究において、*meiRNA* だけでなく *ssm4* mRNA もドットを形成することがわかり、様々な DSR をもつ RNA が核内でドットを形成する可能性が示唆された (図 12)。出芽酵母の例を踏まえると、*Mmi1* は DSR をもつ RNA を核内ドットとして留めることで、その核外排出を抑える働きがあると考えられる。体細胞分裂期には、*Mmi1* を介した RNA 分解によって、減数分裂特異的な遺伝子の発現は非常に低いレベルに抑えられているが、それに加えて、分解を免れた、または RNA 分解系へ誘導される前の mRNA を *Mmi1* によって核内でドット化し、それらの翻訳を回避している可能性がある。これは分裂酵母において、減数分裂特異的な遺伝子の発現を厳しく

制御するため新たな機構と捉えることができ、この点を明らかにすることで Mmi1 の新たな役割の解明につながると期待される。

meiRNA による相同染色体の対合

既に報告にある通り、meiRNA は、*sme2* 遺伝子座における早期の相同染色体対合に寄与している (Ding et al, 2012)。本研究において、Mmi1 が自己相互作用により凝集することが示された (図 10、11)。このことから、*sme2* 遺伝子座における早期の相同染色体の対合は、Mmi1 の自己相互作用の結果であると考えられることができる。Mmi1 の自己相互作用によって、まず相同染色体上の *sme2* 遺伝子座それぞれに meiRNA ドットが形成され、次いで各相同染色体の *sme2* 遺伝子座上に局在する Mmi1 が自己相互作用することにより、染色体が引き寄せ合い、*sme2* 遺伝子座の対合が促進されるというモデルが成り立つ。*sme2* 遺伝子座における早期の染色体対合に対する Mmi1 の自己相互作用の寄与を検討することも、とても興味深い課題であるといえる。

meiRNA が Mmi1 の活性を抑制する機構

本研究の結果から、meiRNA には Mmi1 を 1 点に集合させ、活性を低下させる能力があると考えられた。meiRNA は、細胞が減数分裂に入る際に発現量が上昇するため (Watanabe and Yamamoto, 1994)、減数分裂期には体細胞分裂期よりも多くの Mmi1 が *sme2* 遺伝子座に集められ、1 点となると考えられる。しかし、meiRNA を過剰発現した株には、Mmi1 の機能を喪失した場合のような顕著な生育の悪化はみられない。また、meiRNA の過剰発現による Mmi1 の活性低下は、Mmi1 の機能をあらかじめ部分的に低下させた場合にのみ観察され (図 16B)、*mmi1* に変異を導入していない野生株では観察できなかった (図 16A)。これらの

結果から、*sme2* 遺伝子座に Mmi1 を集合させて 1 点とするだけでは、Mmi1 を完全に不活性化することはできないことが窺われる。

Mmi1 の完全な不活性化には、*sme2* 遺伝子座において meiRNA とともにドットを形成する Mei2 の機能が必要だと考えられる。既に報告されている通り、Mei2 ドットは Mmi1 を 1 点に集め、その活性を抑制している (Harigaya et al, 2006)。Mei2 がドット形成するためには meiRNA が必要であるため、以下のシナリオで

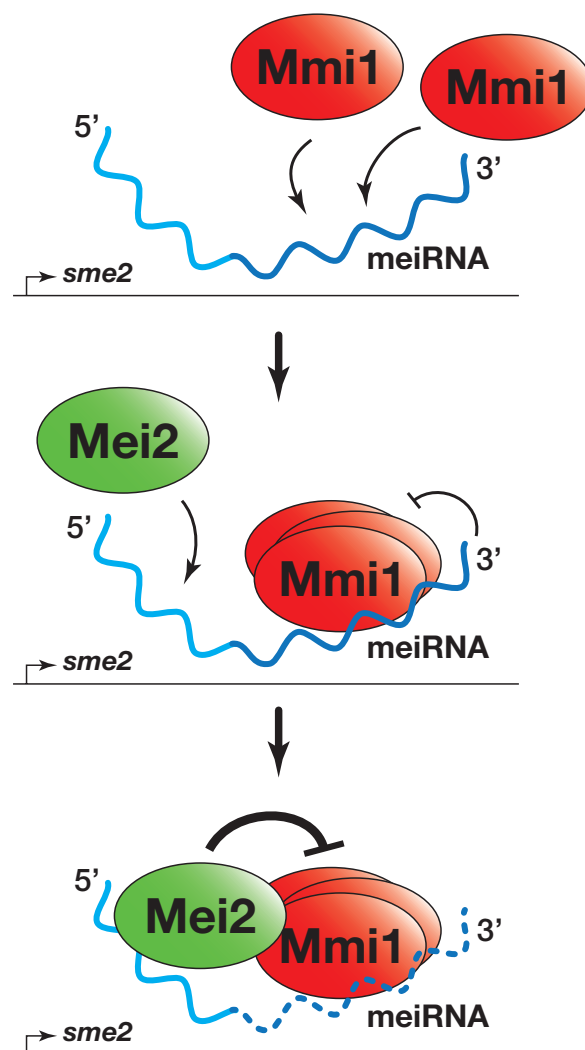


図 18 meiRNA と Mei2 による Mmi1 の活性抑制機構

Mmi1 は meiRNA の 3' 側領域によって誘引され、さらに Mmi1 の自己相互作用によって凝集し、1 点に集められる。一方、meiRNA の 5' 側領域には Mei2 が結合してドット形成する。Mei2 ドットは meiRNA によって集められている Mmi1 と結合し、その活性を完全に抑制する。この 2 つの Mmi1 の活性抑制機構によって効率よく減数分裂が進行される。

Mmi1 の活性が抑制されている可能性が考えられる (図 18)。Mmi1 の一部はあらかじめ体細胞分裂期から、meiRNA を介して *sme2* 遺伝子座に誘引されている。減数分裂期に入った細胞では、meiRNA の転写量が増加し、より多くの Mmi1 が *sme2* 遺伝子座に誘引される。減数分裂期の野生型における meiRNA-L の発現は、検出されるものの *mmi1* を不活性化した場合に比べて少ないため、meiRNA-L は減数分裂期においても分解を受けている可能性が考えられる (図 4C、5A)。しかし、誘引された Mmi1 は分解によって meiRNA-L が失われても、その自己相互作用によって凝集し、*sme2* 遺伝子座に留まり続け、1 点となる。一方、分解途中の meiRNA-L の 5' 領域や meiRNA-S によって、Mei2 が *sme2* 遺伝子座に凝集し、ドットを形成する。最終的に、meiRNA によって 1 点に集められた Mmi1 は、Mei2 ドットの働きによって完全に不活性化される。

Mei2 との結合に必要な 5' 側を欠損した 3' 側のみの meiRNA では、*sme2* 破壊株の胞子形成不能の表現型を完全には回復させることができなかったことから、減数分裂進行における Mei2 の重要性が示唆される (図 7B)。Mei2 は Mmi1 と物理的に相互作用することが報告されているが (Harigaya et al, 2006)、Mei2 が Mmi1 の機能をどのように抑制しているかについては不明な点が多く、この抑制機構を明らかにすることは、分裂酵母の減数分裂を進行させる分子機構を理解する上で非常に重要な課題である。

謝辞

本研究は、東京大学大学院 理学系研究科 生物化学専攻 山本研究室、およびかずさ DNA 研究所 遺伝子機能研究室において行われたものです。

本研究において用いた *sme2-m* 株を快く提供して下さった、大阪大学の平岡泰先生に感謝いたします。また、有益な議論や貴重な助言を下さった André Verdel 博士と丁大橋博士に感謝いたします。

東京大学およびかずさ DNA 研究所の研究生活を通じて、山下朗博士には多くのご指導、貴重な助言をいただきました。この場を借りて御礼申し上げます。また、佐藤政充博士、大坪瑤子博士をはじめ、多くの有益な議論や助言、実験材料を提供して下さった山本研究室の皆様に感謝いたします。また、研究場所をかずさ DNA 研究所に移してから東京大学における指導教員として本研究を支えて下さった飯野雄一先生に感謝いたします。

そして、6年間に渡って熱心にご指導くださり、また自由に研究させて下さった山本正幸先生に心より感謝いたします。

最後に、研究生活をいつも支援してくれた家族に心からの感謝を捧げます。

参考文献

Allmang C, Kufel J, Chanfreau G, Mitchell P, Petfalski E, Tollervey D (1999) Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J* **18**: 5399-5410

Bähler J, Wu JQ, Longtine MS, Shah NG, McKenzie A, 3rd, Steever AB, Wach A, Philippsen P, Pringle JR (1998) Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **14**: 943-951

Basi G, Schmid E, 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

Batista PJ, Chang HY (2013) Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease. *Cell* **152**: 1298-1307

Beach DH (1983) Cell type switching by DNA transposition in fission yeast. *Nature* **305**: 682-688

Benko Z, Zhao RY (2011) Zeocin for selection of *bleMX6* resistance in fission yeast. *Biotechniques* **51**: 57-60

Bertrand E, Chartrand P, Schaefer M, Shenoy SM, Singer RH, Long RM (1998) Localization of *ASH1* mRNA particles in living yeast. *Mol Cell* **2**: 437-445

Borsani G, Tonlorenzi R, Simmler MC, Dandolo L, Arnaud D, Capra V, Grompe M, Pizzuti A, Muzny D, Lawrence C, Willard HF, Avner P, Ballabio A (1991) Characterization of a murine gene expressed from the inactive X chromosome. *Nature* **351**: 325-329

Brockdorff N, Ashworth A, Kay GF, McCabe VM, Norris DP, Cooper PJ, Swift S, Rastan S (1992) The product of the mouse *Xist* gene is a 15 kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus. *Cell* **71**: 515-526

Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL, Lafreniere RG, Grompe M, Tonlorenzi R, Willard HF (1991a) A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature* **349**: 38-44

Brown CJ, Hendrich BD, Rupert JL, Lafrenière RG, Xing Y, Lawrence J, Willard HF (1992) The human *XIST* gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell* **71**: 527-542

Brown CJ, Lafreniere RG, Powers VE, Sebastio G, Ballabio A, Pettigrew AL, Ledbetter DH, Levy E, Craig IW, Willard HF (1991b) Localization of the X inactivation centre on the human X chromosome in Xq13. *Nature* **349**: 82-84

Cam HP, Sugiyama T, Chen ES, Chen X, FitzGerald PC, Grewal SI (2005) Comprehensive analysis of heterochromatin- and RNAi-mediated epigenetic control of the fission yeast genome. *Nat Genet* **37**: 809-819

Chen HM, Futch B, Leatherwood J (2011) The fission yeast RNA binding protein Mmi1 regulates meiotic genes by controlling intron specific splicing and polyadenylation coupled RNA turnover. *PLoS One* **6**: e26804

Chen LL, Carmichael GG (2009) Altered nuclear retention of mRNAs containing inverted repeats in human embryonic stem cells: functional role of a nuclear noncoding RNA. *Mol Cell* **35**: 467-478

Clemson CM, Hutchinson JN, Sara SA, Ensminger AW, Fox AH, Chess A, Lawrence JB (2009) An architectural role for a nuclear noncoding RNA: *NEAT1* RNA is essential for the structure of paraspeckles. *Mol Cell* **33**: 717-726

Ding DQ, Haraguchi T, Hiraoka Y (2013) The role of chromosomal retention of noncoding RNA in meiosis. *Chromosome Res* **21**: 665-672

Ding DQ, Okamasa K, Yamane M, Tsutsumi C, Haraguchi T, Yamamoto M, Hiraoka Y (2012) Meiosis-specific noncoding RNA mediates robust pairing of homologous chromosomes in meiosis. *Science* **336**: 732-736

Ding DQ, Yamamoto A, Haraguchi T, Hiraoka Y (2004) Dynamics of homologous chromosome pairing during meiotic prophase in fission yeast. *Dev Cell* **6**: 329-341

Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, Tilgner H, Guernec G, Martin D, Merkel A, Knowles DG, Lagarde J, Veeravalli L, Ruan X, Ruan Y, Lassmann T, Carninci P, Brown JB, Lipovich L, Gonzalez JM, Thomas M, Davis CA, Shiekhhattar R, Gingeras TR, Hubbard TJ, Notredame C, Harrow J, Guigo R (2012) The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res* **22**: 1775-1789

Egel R, Egel-Mitani M (1974) Premeiotic DNA synthesis in fission yeast. *Exp Cell Res* **88**: 127-134

Fantes PA (1981) Isolation of cell size mutants of a fission yeast by a new selective method: characterization of mutants and implications for division control mechanisms. *J Bacteriol* **146**: 746-754

Fox AH, Lam YW, Leung AK, Lyon CE, Andersen J, Mann M, Lamond AI (2002) Paraspeckles: a novel nuclear domain. *Curr Biol* **12**: 13-25

Gutz H HH, Leupold U, Loprieno N (1974) *Schizosaccharomyces pombe*. In Handbook of genetics., RD K (ed), pp 395-446. New York: Plenum Publishing Corporation

Harigaya Y, Tanaka H, Yamanaka S, Tanaka K, Watanabe Y, Tsutsumi C, Chikashige Y, Hiraoka Y, Yamashita A, Yamamoto M (2006) Selective elimination of messenger RNA prevents an incidence of untimely meiosis. *Nature* **442**: 45-50

Hilleren P, McCarthy T, Rosbash M, Parker R, Jensen TH (2001) Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome. *Nature* **413**: 538-542

Hiraoka Y, Dernburg AF (2009) The SUN rises on meiotic chromosome dynamics. *Dev Cell* **17**: 598-605

Hiriart E, Vavasseur A, Touat-Todeschini L, Yamashita A, Gilquin B, Lambert E, Perot J, Shichino Y, Nazaret N, Boyault C, Lachuer J, Perazza D, Yamamoto M, Verdel A (2012) Mmi1 RNA surveillance machinery directs RNAi complex RITS to specific meiotic genes in fission yeast. *EMBO J* **31**: 2296-2308

Inoue Y, Choi BY, Murata K, Kimura A (1990) Sexual response of *Saccharomyces cerevisiae*: phosphorylation of yeast glyoxalase I by a cell extract of mating factor-treated cells. *J Biochem* **108**: 4-6

Jensen TH, Patricio K, McCarthy T, Rosbash M (2001) A block to mRNA nuclear export in *S. cerevisiae* leads to hyperadenylation of transcripts that accumulate at the site of transcription. *Mol Cell* **7**: 887-898

Kallehauge TB, Robert MC, Bertrand E, Jensen TH (2012) Nuclear retention prevents premature cytoplasmic appearance of mRNA. *Mol Cell* **48**: 145-152

Kimura M, Kamakura T, Tao QZ, Kaneko I, 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

Kitamura K, Katayama S, Dhut S, Sato M, Watanabe Y, Yamamoto M, Toda T (2001) Phosphorylation of Mei2 and Ste11 by Pat1 kinase inhibits sexual differentiation via ubiquitin proteolysis and 14-3-3 protein in fission yeast. *Dev Cell* **1**: 389-399

LaCava J, Houseley J, Saveanu C, Petfalski E, Thompson E, Jacquier A, Tollervey D (2005) RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell* **121**: 713-724

Libri D, Dower K, Boulay J, Thomsen R, Rosbash M, Jensen TH (2002) Interactions between mRNA export commitment, 3'-end quality control, and nuclear degradation. *Mol Cell Biol* **22**: 8254-8266

Mao YS, Sunwoo H, Zhang B, Spector DL (2011) Direct visualization of the co-transcriptional assembly of a nuclear body by noncoding RNAs. *Nat Cell Biol* **13**: 95-101

Mata J, Lyne R, Burns G, Bähler J (2002) The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nat Genet* **32**: 143-147

Matera AG, Shpargel KB (2006) Pumping RNA: nuclear bodybuilding along the RNP pipeline. *Curr Opin Cell Biol* **18**: 317-324

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

Mitchell P, Petfalski E, Shevchenko A, Mann M, Tollervey D (1997) The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell* **91**: 457-466

Moreno S, Klar A, Nurse P (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* **194**: 795-823

Naganuma T, Nakagawa S, Tanigawa A, Sasaki YF, Goshima N, Hirose T (2012) Alternative 3'-end processing of long noncoding RNA initiates construction of nuclear paraspeckles. *EMBO J* **31**: 4020-4034

Nakagawa S, Naganuma T, Shioi G, Hirose T (2011) Paraspeckles are subpopulation-specific nuclear bodies that are not essential in mice. *J Cell Biol* **193**: 31-39

Okazaki K, Okazaki N, Kume K, Jinno S, Tanaka K, 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

Prasanth KV, Prasanth SG, Xuan Z, Hearn S, Freier SM, Bennett CF, Zhang MQ, Spector DL (2005) Regulating gene expression through RNA nuclear retention. *Cell* **123**: 249-263

Rinn JL, Chang HY (2012) Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem* **81**: 145-166

Rougemaille M, Gudipati RK, Olesen JR, Thomsen R, Seraphin B, Libri D, Jensen TH (2007) Dissecting mechanisms of nuclear mRNA surveillance in THO/sub2 complex mutants. *EMBO J* **26**: 2317-2326

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning a laboratory manual*, third edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sasaki YT, Ideue T, Sano M, Mituyama T, Hirose T (2009) MEN epsilon/beta noncoding RNAs are essential for structural integrity of nuclear paraspeckles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 2525-2530

Sato M, Dhut S, Toda T (2005) New drug-resistant cassettes for gene disruption and epitope tagging in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **22**: 583-591

Schul W, Groenhout B, Koberna K, Takagaki Y, Jenny A, Manders EM, Raska I, van Driel R, de Jong L (1996) The RNA 3' cleavage factors CstF 64 kDa and CPSF 100 kDa are concentrated in nuclear domains closely associated with coiled bodies and newly synthesized RNA. *EMBO J* **15**: 2883-2892

Sherman F, Fink GR, Hicks JB (1986) *Methods in yeast genetics*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Shimada T, Yamashita A, Yamamoto M (2003) The fission yeast meiotic regulator Mei2p forms a dot structure in the horse-tail nucleus in association with the *sme2* locus on chromosome II. *Mol Biol Cell* **14**: 2461-2469

Spector DL (2006) SnapShot: Cellular bodies. *Cell* **127**: 1071

St-Andre O, Lemieux C, Perreault A, Lackner DH, Bähler J, Bachand F (2010) Negative regulation of meiotic gene expression by the nuclear poly(A)-binding protein in fission yeast. *J Biol Chem* **285**: 27859-27868

Stoilov P, Rafalska I, Stamm S (2002) YTH: a new domain in nuclear proteins. *Trends Biochem Sci* **27**: 495-497

Sugimoto A, Iino Y, Maeda T, Watanabe Y, Yamamoto M (1991) *Schizosaccharomyces pombe ste11⁺* encodes a transcription factor with an HMG motif that is a critical regulator of sexual development. *Genes Dev* **5**: 1990-1999

Sugiyama T, Sugioka-Sugiyama R (2011) Red1 promotes the elimination of meiosis-specific mRNAs in vegetatively growing fission yeast. *EMBO J* **30**: 1027-1039

Sunwoo H, Dinger ME, Wilusz JE, Amaral PP, Mattick JS, Spector DL (2009) *MEN epsilon/beta* nuclear-retained non-coding RNAs are up-regulated upon muscle differentiation and are essential components of paraspeckles. *Genome Res* **19**: 347-359

Tashiro S, Asano T, Kanoh J, Ishikawa F (2013) Transcription-induced chromatin association of RNA surveillance factors mediates facultative heterochromatin formation in fission yeast. *Genes Cells* **18**: 327-339

Thomsen R, Libri D, Boulay J, Rosbash M, Jensen TH (2003) Localization of nuclear retained mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* **9**: 1049-1057

Watanabe Y, Iino Y, Furuhata K, Shimoda C, Yamamoto M (1988) The *S.pombe mei2* gene encoding a crucial molecule for commitment to meiosis is under the regulation of cAMP. *EMBO J* **7**: 761-767

Watanabe Y, Shinozaki-Yabana S, Chikashige Y, Hiraoka Y, Yamamoto M (1997) Phosphorylation of RNA-binding protein controls cell cycle switch from mitotic to meiotic in fission yeast. *Nature* **386**: 187-190

Watanabe Y, Yamamoto M (1994) *S. pombe mei2⁺* encodes an RNA-binding protein essential for premeiotic DNA synthesis and meiosis I, which cooperates with a novel RNA species meiRNA. *Cell* **78**: 487-498

Wyers F, Rougemaille M, Badis G, Rousselle JC, Dufour ME, Boulay J, Regnault B, Devaux F, Namane A, Seraphin B, Libri D, Jacquier A (2005) Cryptic pol II transcripts are degraded by a nuclear quality control pathway involving a new poly(A) polymerase. *Cell* **121**: 725-737

Yamamoto A, Hiraoka Y (2003) Monopolar spindle attachment of sister chromatids is ensured by two distinct mechanisms at the first meiotic division in fission yeast. *EMBO J* **22**: 2284-2296

Yamamoto TG, Chikashige Y, Ozoe F, Kawamukai M, Hiraoka Y (2004) Activation of the pheromone-responsive MAP kinase drives haploid cells to undergo ectopic meiosis with normal telomere clustering and sister chromatid segregation in fission yeast. *J Cell Sci* **117**: 3875-3886

Yamanaka S, Yamashita A, Harigaya Y, Iwata R, Yamamoto M (2010) Importance of polyadenylation in the selective elimination of meiotic mRNAs in growing *S. pombe* cells. *EMBO J* **29**: 2173-2181

Yamashita A, Shichino Y, Tanaka H, Hiriart E, Touat-Todeschini L, Vavasseur A, Ding DQ, Hiraoka Y, Verdel A, Yamamoto M (2012) Hexanucleotide motifs mediate recruitment of the RNA elimination machinery to silent meiotic genes. *Open Biol* **2**: 120014

Yamashita A, Takayama T, Iwata R, Yamamoto M (2013) A novel factor Iss10 regulates Mmi1-mediated selective elimination of meiotic transcripts. *Nucleic Acids Res* **41**: 9680-9687

Yamashita A, Watanabe Y, Nukina N, Yamamoto M (1998) RNA-assisted nuclear transport of the meiotic regulator Mei2p in fission yeast. *Cell* **95**: 115-123

Zenklusen D, Vinciguerra P, Wyss JC, Stutz F (2002) Stable mRNP formation and export require cotranscriptional recruitment of the mRNA export factors Yra1p and Sub2p by Hpr1p. *Mol Cell Biol* **22**: 8241-8253

Zofall M, Yamanaka S, Reyes-Turcu FE, Zhang K, Rubin C, Grewal SI (2012)
RNA elimination machinery targeting meiotic mRNAs promotes facultative
heterochromatin formation. *Science* **335**: 96-100