

学位論文

分裂酵母における減数分裂進行と胞子形成を制御する

Spo5 タンパク質の解析

**Analysis of Spo5 protein that regulates meiotic progression
and spore formation in the 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

富樫直之

要旨

細胞分裂には、細胞の増殖に必要な体細胞分裂と、生殖細胞を生み出すのに必要な減数分裂の 2 つの様式が存在する。減数分裂は酵母からヒトまで真核生物で広く保存されており、その分子メカニズムには種を超えた類似点が多いと考えられる。しかし、体細胞分裂に比べて減数分裂のメカニズムについては不明点が多く、特に転写後調節に関する知見がすくない。そこで私は、減数分裂における転写後調節に着目し、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る Spo5 の機能を解析した。Spo5 は、減数第二分裂の進行と胞子形成に必須の役割を果たす。また、RRM (RNA-recognition motifs) と呼ばれる RNA 結合ドメインを 2 つ持つ。現在まで、そのターゲット RNA 分子は未知であった。

本研究では、Spo5 の核外移行の重要性を明らかにし、またいくつかのターゲット mRNA を同定した。Spo5 は RRM をもちいて、mRNA 輸送経路を介して核外移行すること、核外移行は Spo5 の機能に重要であることを見出した。また、Spo5 が結合するターゲット mRNA として、ATF/CREB ファミリーの転写因子をコードする *pcr1* mRNA、体細胞分裂および減数分裂に必須のサイクリン B をコードする *cdc13* mRNA、減数分裂・胞子形成を制御する転写因子をコードする *mei4* mRNA、および APC/C によるサイクリン B の分解を部分的に抑制することで減数第二分裂の進行を保証する因子をコードする *mes1* mRNA を同定した。遺伝学的解析の結果は、これらの因子が全て Spo5 の下流で働くことを示唆した。また、Pcr1 や Mei4 が *cdc13*⁺ 遺伝子の転写を調節する可能性を見出した。以上より、Spo5 の下流では様々な因子が働くとともに、複数の機構によって Cdc13 の発現が促進され、減数第二分裂の進行と胞子形成が制御されていると推測した。

一方、私は *spo5Δ* 株の胞子形成不能を抑圧するサプレッサーの解析をおこない、Cdc13 を分解へと導く APC/C の活性化因子の欠損が *spo5Δ* 株の胞子形成の異常を抑圧すること、さらに興味深い結果として、Pcr1 以外の ATF/CREB 因子が欠損すると胞子形成の回復が見られることを突き止めた。このことは、ATF/CREB 因子が Cdc13 の発現を抑制し、Cdc13 の発現を促進する Spo5 と拮抗的に働くことで、胞子形成の開始が制御される可能性を示唆している。

Abstract

There are two types of cell division. One is mitosis, cell division essential for the cell growth for all organisms. The other is meiosis, a special type of cell division, which produces germ cells in eukaryotes. Meiosis is conserved from yeast to humans and its molecular basis is thought to be similar beyond species. However, we know less about the molecular mechanisms of meiosis than that of mitosis, especially about post-transcriptional regulations. For that reason, I focused on post-transcriptional regulations during meiosis. I analyzed the function of a meiotic RNA-binding protein called Spo5 in fission yeast. Spo5 plays an essential role for the progression of meiosis II and spore formation. Although we have already known that Spo5 has two putative RRM_s (RNA-recognition motifs), target RNA molecules of it have not been identified yet.

Here I show the functional significance of nuclear export and the identification of target mRNAs of Spo5. Spo5 is exported to the cytoplasm through its RRM_s and an mRNA-export pathway, and nuclear export is important for its function. I identified mRNAs of the following genes as target mRNAs of Spo5: *pcr1*⁺, encoding an ATF/CREB transcription factor; *cdc13*⁺, encoding a cyclin B essential for mitosis and meiosis; *mei4*⁺, encoding a transcription factor which regulates meiosis and spore formation; and *mes1*⁺, encoding a factor that ensures the progression of meiosis II by inhibiting APC/C activity partially and thereby preventing Cdc13 degradation. A series of genetic experiments showed that these factors may all act downstream of Spo5. I also found that Pcr1 and Mei4 might regulate the expression of the *cdc13*⁺ gene as transcriptional activators. I speculate that Spo5 may boost the expression of Cdc13 through multi-step pathways by multiple factors including itself, therefore regulating the progression of meiosis II and spore formation properly.

By analyzing suppresser mutations, which would suppress the spore formation deficiency in *spo5Δ* cells, I found that the depletion of an APC/C activator that leads to Cdc13 destruction could suppress their defects. Interestingly, the disruption of ATF/CREB factors except for Pcr1 could also induce spore formation in *spo5Δ* cells. These data suggest that ATF/CREB factors may repress the expression of Cdc13 by counteracting Spo5 that conversely boosts the expression of Cdc13, and thus regulate the initiation of spore formation.

目次

序章.....	1
結果と考察.....	9
1 章 Spo5 の核外移行の意義とターゲット RNA の同定	9
1-1. スクリーニングにより <i>spo5</i> 温度感受性変異株を単離した	9
1-2. RRM は Spo5 の局在と機能に必須の役割を果たす	10
1-3. RRM への変異導入が機能低下の原因であることの確認.....	12
1-4. <i>spo5</i> 変異体によって孢子形成能には大きな違いがあった.....	12
1-5. Spo5 の核外移行は mRNA 輸送因子 Rae1 に依存する	13
1-6. Spo5 の核外移行は孢子形成に重要な役割を果たす	14
1-7. <i>spo5</i> (S365P)は他の RRM 点変異体とは違う <i>spo5</i> 変異体である	16
1-8. <i>pcr1</i> mRNA は Spo5 のターゲット mRNA である	17
1-9. Spo5 は <i>pcr1</i> mRNA の ORF とは結合せず、UTR と結合する	20
1-10. Spo5 は <i>cdc13</i> mRNA とも結合する	20
1-11. Pcr1 は <i>cdc13</i> ⁺ 遺伝子の上流に結合し、転写を促進する	23
1-12. Pcr1 の過剰発現による <i>spo5Δ</i> の抑圧は <i>cdc13</i> mRNA の発現に依存し ている可能性が高い	23
1-13. Spo5 は <i>mei4</i> mRNA と 3'-UTR を介して結合する	25
1-14. Spo5 の機能は Mes1 を介しても発揮される.....	27
1-15. 1 章の考察	29
1-16. 1 章のまとめ	33

2 章 ATF/CREB 因子と胞子形成の関連について	34
2-1. Fzr1 の欠損は <i>spo5Δ</i> の胞子形成不能を抑圧する	34
2-2. Atf1, Atf21 および Atf31 の欠損は <i>spo5Δ</i> の胞子形成不能を抑圧する	34
2-3. Atf21 および Atf31 の欠損は <i>mes1Δ</i> の胞子形成不能を抑圧する	35
2-4. Pcr1 の過剰発現による <i>spo5Δ</i> の胞子形成不能の抑圧には、Atf1 や Atf31 は不要である	36
2-5. 2 章のまとめと考察	38
2-6. 減数分裂進行に関与する RNA 結合タンパク質と今後の展望	40
結論	41
材料と方法	42
方法-表 本研究でもちいた株	52
謝辞	55
参考文献	56

序章

体細胞分裂

細胞分裂には体細胞分裂 (Mitosis) と減数分裂 (Meiosis) の2種類の様式が存在する。体細胞分裂は細胞増殖に必須の分裂である。細胞が自分と同一の細胞を生み出すためには、生存に必要な遺伝情報を持った DNA とヒストンからなる染色体を DNA 複製によって倍加させ、それを2つに分ける過程が必要である。すなわち、体細胞分裂は DNA 複製・分配と細胞質分裂によって細胞のクローンを増やす過程であるといえる。体細胞分裂の細胞周期は、DNA 複製準備期 (G1 期、G: Gap)、DNA 複製期 (S 期、S: Synthesis)、分裂準備期 (G2 期)、そして分裂期 (M 期、M: Mitosis) からなる。G1, S, G2 期を総称して間期 (Interphase) と呼ぶ。二倍体の生物の体細胞分裂では、DNA 複製によって DNA 量が倍加 ($4n$) したあと、細胞分裂により $2n$ へと変化する (n はゲノム 1 セットを表す)。

分裂期は、前期 (prophase)、前中期 (prometaphase)、中期 (metaphase)、後期 (anaphase)、終期 (telophase)、細胞質分裂 (cytokinesis) から構成される。分裂前期には染色体凝縮が開始し、中心体間で微小管が形成され始め、紡錘体が形成される。分裂前中期には染色体凝縮が進行して姉妹染色体を形成し、中心体が両極に移動する。中心体から伸びた微小管は染色体を捕捉する。分裂中期には染色体は整列し、全ての染色体が微小管によって捕捉されると、紡錘体チェックポイントが解除され分裂後期へと移行する。分裂後期には姉妹染色体が分離し、両極へ移動する。分裂終期には染色体は脱凝縮する。核分裂が完了したあと、赤道面に収縮環が形成され、アクチンやミオシンによって細胞がくびり切られる細胞質分裂が起こる。細胞質分裂が完了すると細胞は間期へと戻る。

細胞周期の各時期には決まった因子 (細胞周期制御因子) が厳密に細胞周期を制御するが、異常が起こればそれを検知して細胞周期制御因子の働きを抑制し、細胞周期をストップさせるチェックポイント機構が働く [1]。細胞周期制御因子は、遺伝子発現の調節、染色体の構築や分配、微小管などの細胞骨格の制御、細胞内シグナル伝達など、細胞分裂時にみられる多くの細胞内生命現象に重要な役割を果たす。サイクリン B/サイクリン依存性キナーゼ複合体はその中心的な因子である。この複合体に関しては後述する。

出芽酵母や本研究でもちいた分裂酵母は、生活環に一倍体の状態が存在するため遺伝学的手法により自由に遺伝子改変しやすいこと、スクリーニング等により多くの変異体を得られていること、哺乳類と比べて短期間で研究結果が得られること等が研究するうえでのメリットとなる。これらのメリットを活かし

た両酵母をもちいた研究によって、体細胞分裂に関する多くの知見が蓄積してきた。近年の可視化技術の進歩によって、細胞分裂中に細胞内構造体がダイナミックに変化する過程を高感度で経時的に撮影できるようになった。生育が速く、培養してから観察するまでの時間が短くてすむ酵母をもちいた細胞分裂研究は、現在でも細胞生物学において重要な位置を占めている。

減数分裂を研究する意義

減数分裂は、真核生物が精子や卵子、孢子などの有性生殖に必要な配偶子を形成するためにおこなう分裂である。減数分裂は DNA 複製に続く二度の連続した核分裂と、その後の配偶子形成の過程からなる。DNA 複製を間に挟まない二度の核分裂により、染色体数が半減した配偶子の形成が保証される。すなわち、二倍体の生物 ($2n$) では減数分裂前 DNA 複製によって DNA 量が倍加 ($4n$) したあと、2 回の連続した分裂により配偶子 (n) が形成される。減数第一分裂は還元分裂と呼ばれ、染色体の乗り換えにつづいて組み換えが起き、相同染色体が分離する。染色体の組み換えは、真核生物が遺伝的に多様な子孫を残すためだけでなく、相同染色体が正しく両極に分配されるためにも必須の過程である。他方、減数第二分裂は姉妹染色体が分離する均等分裂をおこなうことから、体細胞分裂と類似点が多いと考えられる[2]。このように、減数分裂は体細胞分裂とは大きく異なる第一分裂と、体細胞分裂と類似した第二分裂からなる。従来、染色体分配装置などは減数分裂でも体細胞分裂と同様のものを利用すると考えられてきた。しかし、近年の研究により、体細胞分裂と減数分裂で共通だと考えられていた装置の構成要素が異なる例が複数報告されている[3-5]。このような複雑さが、体細胞分裂に比べ減数分裂の理解が遅れている一つの要因である。

近年、減数分裂期における染色体分配の研究が進んでいる[2, 6]。減数分裂で染色体が正常に分配されないと染色体不分離 (chromosome nondisjunction) が起こる。染色体不分離では配偶子の染色体数に異常が生じる (異数性、aneuploidy) ため、不妊や個体の致死、ダウン症などの染色体異常疾患を引き起こす。また、減数分裂進行の異常によって、生殖細胞の減少に伴う不妊を引き起こすことも知られる[7]。減数分裂は個体が遺伝情報を正常に子孫に伝達するために必要な過程であり、減数分裂と疾患との関わりを考えると、減数分裂を正確に理解することは医学的にも重要である。生命活動の基本的な過程であり、体細胞分裂と比べ未知の点が多い減数分裂について、その機構および意義を解明することが、基礎生物学の発展において重要であることは言うまでもない。

酵母の扱いやすさと先行研究による知見の蓄積を利点として、私は分裂酵母

を材料として減数分裂の解析をおこなった。分裂酵母および出芽酵母では、転写制御因子が中心となって、減数分裂および胞子形成の各過程が順序立てて進むように制御をおこなう[8-11]。しかし、減数分裂を制御する転写後の制御機構については不明な点が多い。近年、高等生物だけでなく出芽酵母でも、転写後制御に関与する RNA 結合タンパク質が減数分裂の進行に重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある[12, 13]。そこで本研究では、減数分裂特異的に発現する RNA 結合タンパク質である Spo5 に注目した。Spo5 を説明する前に、分裂酵母の生活環と *spo5* 遺伝子同定の経緯について概観する。

分裂酵母の生活環

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は通常一倍体で生育する。分裂酵母の細胞周期は特に G2 期が長い。窒素源が枯渇すると体細胞分裂は G1 期で停止し、接合フェロモンを放出することで接合型の違う一倍体細胞同士が接合する。接合後に減数分裂過程に入り、DNA 複製と染色体組み換えが起こる。分裂酵母では、この時期に対合した染色体が細胞内でダイナミックに移動する現象がみられる。その時の核の様子が馬の尾に似ていることから、ホーステール運動と呼ばれる[14]。その後、二度の連続した核分裂が起こる。減数第二分裂中期には、高等生物の中心体に相当する構造体である SPB (Spindle pole body) の構造がドット状から三日月型に変化し、つづく胞子膜の形成を誘導することが知られる。この胞子膜は前胞子膜 (FSM; forespore membrane) と呼ばれ、将来の胞子の細胞膜となる。また、前胞子膜が形成されたあと、減数第二分裂終了後に胞子壁 (spore wall) が形成される。胞子壁形成後にはストレスに対する耐久性を獲得し、成熟した胞子が完成する。1つの接合子から胞子は4個形成され、胞子は発芽する条件が整うと、元の一倍体に戻り生育する。減数分裂および胞子形成過程の詳細は以下の Review にまとめられている[15, 16]。また、分裂酵母の生活環の概要は図 1A に示した。

spo⁺遺伝子の同定

spo⁺遺伝子は、減数分裂・胞子形成に異常のある変異体のスクリーニングによって同定された[17]。分裂酵母では、*spo*⁺遺伝子は体細胞分裂、減数分裂には不要だが胞子形成 (sporulation) に必要な因子をコードする遺伝子と当初定義された。その後、多くの研究者による解析で、分裂酵母の胞子形成過程の詳細が明らかにされるとともに[16]、これまで体細胞分裂には不要とされていた *spo*⁺遺伝子が細胞の生存や成長などに関与する例も明らかにされている[18, 19]。また、

減数分裂にも異常を示す *spo* 変異体が知られ、この中には本研究で解析をおこなった *spo5* 変異体も含まれる[20-22]。すなわち、胞子形成に必要な因子が体細胞分裂や減数分裂の進行にも重要な役割を担う場合があり、特に減数第二分裂と胞子形成が同時期に進行する際に両者が別々の経路で独立に制御されるのか、あるいは協調的に制御されるのかについてはまだよく解明が進んでいない。そのため、減数第二分裂と胞子形成の両方を制御する Spo5 の解析によって、いずれの可能性が正しいかを明らかにできることが期待された。

Spo5 について

転写後調節をおこなう因子が減数分裂と胞子形成を制御する機構には、不明点が多い。そこで、私は減数分裂特異的に発現する RNA 結合タンパク質である Spo5 に注目した。RNA 結合タンパク質は、mRNA のプロセッシングや輸送、局在化、安定性、翻訳などの転写後調節に関与することが知られる[23]。そのため、Spo5 も転写後調節に関与することが予想される。Spo5 は C 末端側領域 (192-567) に 2 つの RRM (RNA-recognition motif、RNA 認識配列) をもつ RNA 結合タンパク質である (図 1B)。*spo5* 破壊株 (*spo5Δ*) では多数の細胞で減数第二分裂の進行に異常が生じ、胞子形成は全くできない (図 1C)。また、C 末端側領域のみで機能する (図 1C) が、N 末端側領域のみでは機能しない (後述)。RRM を含む C 末端側領域が機能に重要な役割を果たすことから、Spo5 は RRM を介して働くことが予想されるが、結合する RNA 分子は未知であった。一方、先行研究では、C 末端側領域よりも N 末端側領域が機能に重要であることが示唆されており[20]、本研究とは矛盾が生じていた。以上の知見を出発点として、RRM の詳細な解析に加え、Spo5 が結合する RNA 分子の同定をおこなった。

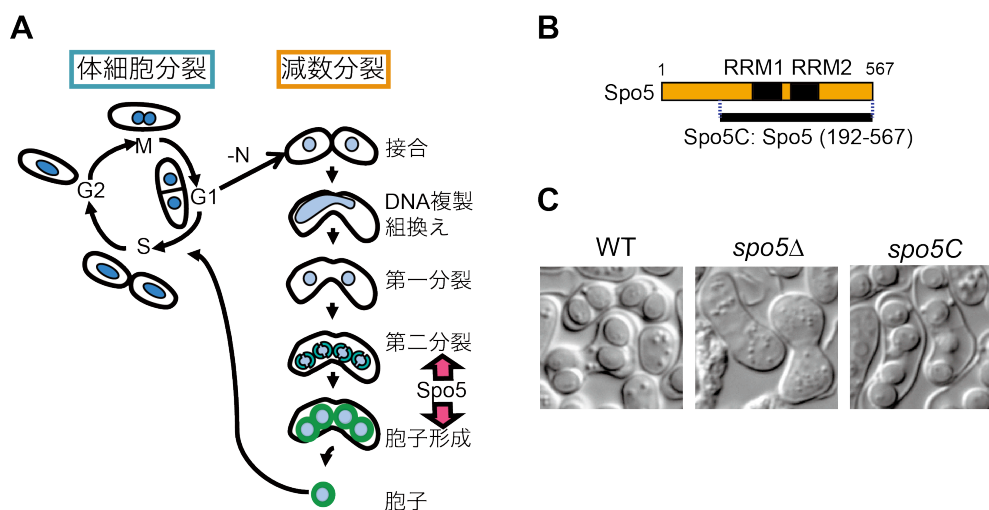


図 1. 分裂酵母の生活環と Spo5 の概要

(A) 分裂酵母の体細胞分裂と減数分裂。Spo5 は減数第二分裂の進行と胞子形成を制御する。(B) Spo5 は減数分裂特異的に発現する RNA 結合タンパク質で、C 末端領域 (192-567) に 2 つの RRM (RNA-recognition motif) をもつ。(C) *spo5Δ* では胞子形成できないが、*spo5C* (*spo5*(192-567)) では胞子形成可能である。WT は、Wild Type (野生型) を示す。

細胞周期進行を制御する Cdc2/Cdc13 複合体と APC/C

本研究では、Spo5 のターゲット mRNA として *cdc13* mRNA を同定した。そこで本節では、分裂酵母の *cdc13⁺* 遺伝子とその関連因子に関して概説する。

細胞周期に異常のある *cdc* (cell division cycle) 変異体が単離された[24]。分裂酵母では、*cdc2⁺* 遺伝子はサイクリン依存性キナーゼ (CDK; Cyclin-dependent kinase) を、*cdc13⁺* 遺伝子はサイクリン B をコードしていた。Cdc2 と Cdc13 は複合体を形成し、Cdc13 の結合が Cdc2 を活性化させる。Cdc2/Cdc13 複合体の活性 (CDK 活性) は細胞周期を通して変化する。CDK 活性が細胞周期の時期を決定するため、CDK 活性は細胞周期を進行させるエンジンとも表現される[25]。

体細胞分裂期の CDK 活性は、主にサイクリン B の合成と分解により制御されている。細胞分裂の進行には、不要になったタンパク質の分解が重要な役割を果たしており、サイクリン B もその重要な標的である。この分解にはユビキチン-プロテアソーム系が関与しており、標的タンパク質をユビキチン化して 26S プロテアソームによる分解へと導く。特に、基質に直接結合しユビキチンを付加するユビキチン転移酵素 (ユビキチンリガーゼ、E3) は重要であり、分裂期では APC/C (Anaphase promoting complex/cyclosome) というユビキチンリガーゼがはたらく。APC/C は細胞周期の各段階で活性化因子によってその活性を制御される。APC/C は分裂中期から後期にかけてサイクリン B とセキュリンを分解する。セキュリンの分解はセパレーズの活性化を誘導し、活性化型セパレーズは染色体をつなぐコヒーシンを切断する。これによって染色体は分離可能となり、微小管によって両極へと分配され、分裂後期へと移行する[26]。

分裂酵母の減数分裂における CDK 活性の制御と、減数分裂の進行と完了の関係についての知見を以下にまとめる。分裂酵母 Cdc13 は減数分裂にも必須であり、Cdc13 の合成と分解を介した CDK 活性の調節により減数分裂進行が制御される。APC/C による分裂後期への移行は体細胞分裂と減数分裂で共通している。分裂酵母の減数分裂では、Slp1 と減数分裂でのみ発現する Fzr1 の二つの活性化因子が APC/C を第一分裂および第二分裂の後期の直前に活性化し、Cdc13 を分解へと導く。二度の連続した分裂を保証するために、第一分裂で Cdc13 を完全

には分解せず、第二分裂開始のために蓄積しておく仕組みが必要である。この役割を担うのが Mes1 であり、減数第一分裂後期に Slp1 や Fzr1 の活性を抑制することで Cdc13 の分解を一部阻害し、第一分裂から第二分裂への移行を保証する[27]。減数第二分裂後期では、Fzr1 の活性が Mes1 の活性を上回ることにより、Cdc13 を完全に分解して減数分裂を完了させ、正常な孢子形成を誘導する[28]。

以上をまとめると、分裂酵母では Cdc13 の発現量が APC/C によって厳密に制御されることで、減数分裂の進行と完了が制御されている (図 2)。

しかし、Cdc13 が各分裂前に増加・蓄積する分子メカニズムには不明点が多く残されていた。そこで本研究では、Cdc13 がどのように発現制御機構を受けているかにも注目した。その結果、*spo5⁺* 遺伝子と遺伝学的に関連し、かつ Cdc13 の発現制御に寄与する因子を同定した。

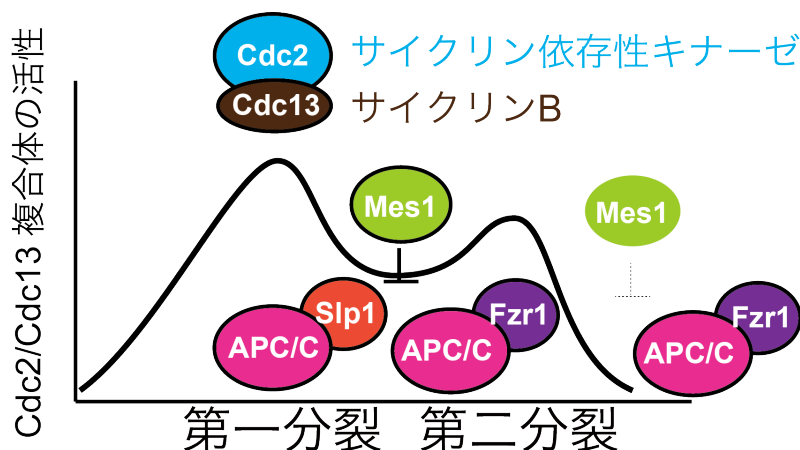


図 2. 分裂酵母の減数分裂における Cdc2/Cdc13 複合体の活性制御

分裂酵母の減数分裂の進行は、主に Cdc2/Cdc13 複合体の活性、すなわち CDK 活性の制御により調節される。減数第一分裂前には Cdc2 が活性化し、Cdc13 が蓄積してさらに CDK 活性は高まる。第一分裂後期へ移行すると、Slp1 や Fzr1 によって活性化された APC/C は Cdc13 を分解する。減数第一分裂と第二分裂の間では、Mes1 が Slp1 や Fzr1 と拮抗して APC/C の活性を部分的に抑制し、Cdc13 が完全に分解されることを防ぐ。残った Cdc13 により CDK 活性が維持され、減数第二分裂が開始される。減数第二分裂後期には Mes1 の活性が低下する一方で Fzr1 の活性が上昇し、Cdc13 を完全に分解することで、減数分裂を正常に完了させる。

減数分裂進行と孢子形成に関与する転写制御因子

RNA 結合タンパク質である Spo5 に注目して本研究を開始したが、研究の過程で転写制御因子と減数分裂・孢子形成の関連についても注目した。本節では、Spo5 と関連が見出されたフォークヘッド型転写因子ファミリーと ATF/CREB 転

写因子ファミリーについての知見を述べる。

減数分裂特異的に発現する転写因子 Me_i4 はフォークヘッド型ファミリーに属し、Forkhead ドメインを介して FLEX 配列と呼ばれる保存された配列を認識する[29, 30]。分裂酵母では Me_i4 の他に Fkh2, Fhl1 および Sep1 がこのファミリーに属す[31] (図 3A)。Me_i4 は、細胞周期や胞子形成に関与する因子を含む Middle genes の転写促進をおこなう[32] (図 3B)。

減数分裂期に発現する ATF/CREB ファミリーには、Atf1, Pcr1, Atf21 および Atf31 の 4 つの転写因子が存在する[8] (図 3C)。ATF/CREB ファミリーは bZIP ドメインを介して二量体化し、CRE 配列と呼ばれる保存された配列を認識して DNA と相互作用する[33-35]。Atf1 と Pcr1 は bZIP ドメインを介してヘテロ二量体を形成し、減数分裂期の開始と減数分裂組換えに関与する[34-36]。どちらの破壊株でも接合に大きな異常を生じる (図 3D)。Atf21 に欠損があると胞子壁に異常が生じ、できた胞子が正常に発芽しない[9, 33]。写真は、野生型と *atf21Δ* の胞子を示す (図 3E)。 *atf21Δ* では生成された胞子が未熟であり、胞子の直径が野生型よりも小さい。しかし *atf21Δ* で減数分裂は正常に進行する。Atf21 と Atf31 は Late genes の制御に関与することが知られている[9] (図 3F)。このように、減数分裂期に発現する ATF/CREB 因子は各々が異なる機能をもつ。他方、これらの因子が機能的な重なりをもつことも示唆されている[37, 38]。ATF/CREB 因子と減数分裂進行や胞子形成との関連については、いまだ不明点が多い。そこで本研究では、ATF/CREB 因子と胞子形成の関係についても解析した。

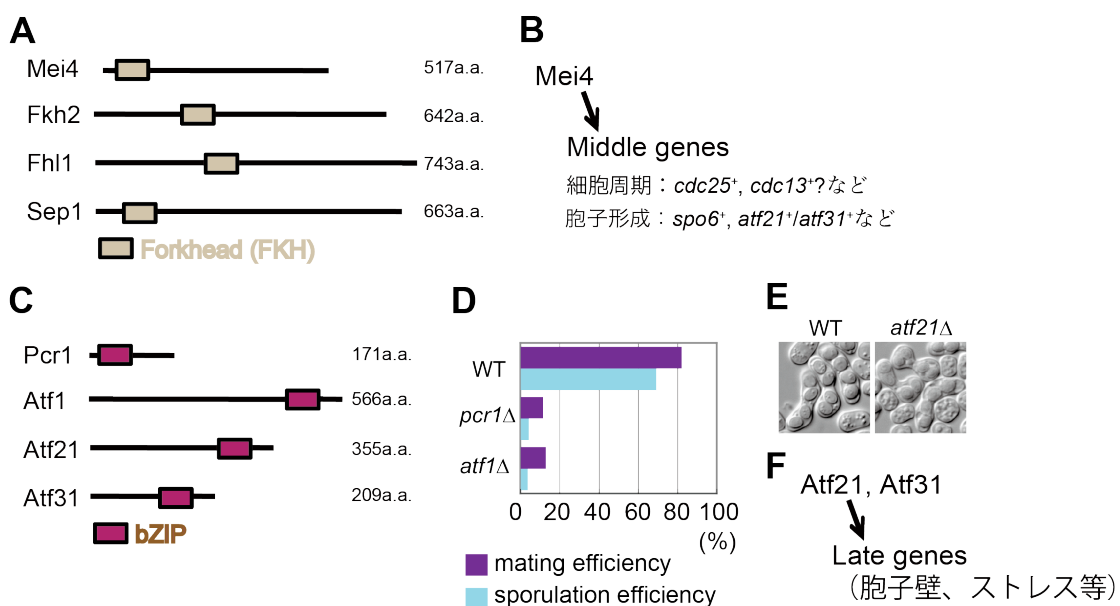


図 3. 分裂酵母のフォークヘッド型転写因子ファミリーと ATF/CREB 転写因子ファミリー

(A) 分裂酵母のフォークヘッド型転写因子ファミリー。Mei4, Fkh2, Fhl1 および Sep1 が存在する。いずれも DNA 結合ドメインである Forkhead ドメインを持つ。(B) Mei4 は主に Middle genes の転写を促進する。その中には減数分裂進行と胞子形成に関与する因子が含まれる。(C) 分裂酵母の減数分裂で働く ATF/CREB 転写因子ファミリー。Pcr1, Atf1, Atf21 および Atf31 が存在する。いずれも bZIP ドメインを持ち、このドメインを介して二量体化する。bZIP ドメインは二量体化に必要なだけでなく、二つの bZIP ドメインによって DNA を挟む構造を取ること、DNA と相互作用する。(D) WT、*pcr1Δ* および *atf1Δ* の接合率と胞子形成率。SPA プレートに各細胞をスポットして 30°C で 24 時間置いたあとカウントした。(E) (D)と同様にして WT および *atf21Δ* を減数分裂に誘導し、DIC (Differential interference contrast; 微分干渉コントラスト) で撮影した。(F) Atf21 および Atf31 は胞子壁形成やストレス応答に関与する Late genes の転写を制御する。

本研究の目的

減数分裂進行の分子メカニズムを明らかにすることを目的として本研究をおこなった。減数分裂の進行は、時期特異的に発現する転写制御因子によって、段階的にかつ不可逆的に制御されることが知られている。本研究では、これまで先行研究での知見が蓄積していた転写制御因子ではなく、知見の少ない RNA 結合タンパク質に注目した。特に、RNA 結合タンパク質の中でも、減数分裂特異的に発現し、減数第二分裂の進行と胞子形成を制御する RNA 結合タンパク質である Spo5 に注目した。先行研究でおこなわれた Spo5 のドメイン解析の結果と本研究の予備実験で得られていた結果には矛盾が生じており、RNA 結合ドメインである RRM が Spo5 の機能にどの程度関与しているか不明であった。一方、RRM 以外に機能ドメインが存在するかも不明であった。そのため、最初に Spo5 の機能ドメインを同定することを目標として、*spo5* 温度感受性株のスクリーニングをおこなった。その結果、RRM の重要性が強く示唆されたことから、RRM の詳細を解析することが本研究の一つ目の目標となった。また、Spo5 と結合する RNA 分子は知られていなかったため、それらを同定することが二つ目の目標となった。

以上をまとめると、Spo5 の RRM の詳細な解析および Spo5 のターゲット RNA 分子の同定をおこなうことで、減数分裂進行の分子メカニズムの解明へとつながることを期待した。

結果と考察

1 章 Spo5 の核外移行機構とターゲット RNA の同定

1-1. スクリーニングにより *spo5* 温度感受性変異株を単離した

先行研究の結果から、RRM を含む C 末端側領域よりも、N 末端側領域の方が機能に重要な役割を果たすことが示されていた[20]。このことは、Spo5 が RRM 以外にも機能領域を持つ可能性を示唆していた。そこで、Spo5 の機能領域を同定するため、減数分裂進行と胞子形成に異常を示す *spo5* 温度感受性変異株のスクリーニングをおこなった。PCR 変異導入法をもちいて、*spo5* ORF にランダムに点変異を導入した *spo5* 温度感受性変異株を複数単離した。ORF にストップコドンが入った変異体は除外し、*spo5* ミスセンス変異体を選択した。このスクリーニングで単離された変異体のリストを図 4 に示す。得られた全ての *spo5* 変異体（多重変異を含む）が RRM にミスセンス変異を持っていた。以上より、RRM が Spo5 の機能に重要な役割を果たす可能性が強く示唆された。

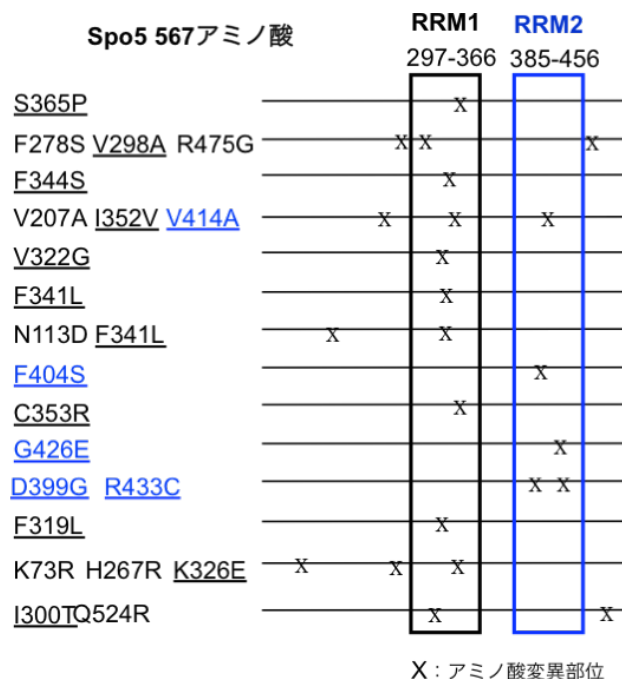


図 4. スクリーニングによって取得した *spo5* 温度感受性変異株とアミノ酸変異部位

スクリーニングによって得られた新規 *spo5* 温度感受性変異株のリストと、アミノ酸変異部位 X を示す。RRM1 に含まれる変異を黒四角で、RRM2 に含まれる変異を青四角で囲み、それぞれの変異と対応するアミノ酸の色を変更し下線を付した。変異は RRM 以外にも含まれていた。

1-2. RRM は Spo5 の局在と機能に必須の役割を果たす

個々のタンパク質は適切な細胞内局在を取ることでその正しい機能を発揮する。Spo5 の局在に関しては、先行研究で C 末端領域 (192-567) が局在に重要であることが明らかにされた[20]。この領域には、RNA 結合ドメインである RRM が含まれていた (図 1B)。一方、1-1. で示したように、RRM は機能にも重要である可能性が示唆された。そこで、RRM が Spo5 の局在および機能を制御するのではないかと予想し、RRM を含む領域を欠失した部分欠失型 *spo5* 変異体を作製した。各々の変異体は、染色体上の *spo5*⁺ 遺伝子を、変異を導入した *spo5* 遺伝子で置換し、本来の *spo5*⁺ 遺伝子のプロモーターから変異型 Spo5 が発現するように作製した。また、Spo5 の C 末端領域にタグとして GFP (green fluorescent protein) を付加し、野生型および変異型 Spo5 の局在を GFP のシグナルとして検出できるようにした。観察の結果、野生型 Spo5 は主に細胞質に局在したが、RRM を一つでも欠失した変異型 Spo5 は核に蓄積した (図 5A)。これらの変異型 Spo5 は孢子形成能を失っていた (図 5B)。このことは、RRM が Spo5 の細胞質局在と正常な機能に関与することを示している。ただし、2 つの RRM をもつ RRM2 より後ろの C 末端領域をもたない Spo5(1-456)-GFP は、細胞質に局在したが機能はなかった。一方、2 つの RRM をもち、RRM2 より後ろの C 末端領域の一部をもつ Spo5(1-525)-GFP は、細胞質に局在し機能できた。すなわち、孢子形成には、RRM に加えて RRM2 に隣接した領域が必須であることが示唆された。

RRM の RNA 結合能が Spo5 の局在と機能に重要であることを確かめるため、RNA と直接相互作用することが予想される F341 (RRM1) または F427 (RRM2) をアラニンに置換した株 *spo5*(F341A), *spo5*(F427A) と、二重変異株 *spo5*(F341A, F427A) を作製した。RRM に含まれる RNA 結合コンセンサス配列には K/R-G-F/Y-G/A-F-V-X-F/Y と RGVGFARM の 2 種類があり、それぞれ下線を付したフェニルアラニンが RNA と直接相互作用する[39]。Spo5 では F341 は KGYGFACF に、F427 は RGVGFARM に含まれる。F341A と F427A は Kasama らにより先行研究でもちいられた変異である[20]。Spo5(F341A)-GFP, Spo5(F427A)-GFP, Spo5(F341A, F427A)-GFP のいずれも、RRM 欠失型 Spo5-GFP と同様に核に蓄積した (図 5C)。これら変異型 Spo5 を発現する変異体は孢子形成しなかった (図 5D)。つづいて、スクリーニングで取得した *spo5* 変異体の局在を観察した。Spo5(F341L)-GFP のみ顕著に核に蓄積し、Spo5(S365P)-GFP や変異型 Spo5-GFP のいくつかは野生型と同様の局在を示した。それ以外は細胞質と核に均等に局在した。私は代表的な 2 つの変異体 *spo5*(F341L) と *spo5*(S365P) に注目して性格付けを進めた。Spo5(F341L)-GFP は Spo5(F341A)-GFP と同様に核に

蓄積したが、Spo5(S365P)-GFP は野生型と同様に細胞質に局在することがわかった (図 5C)。両変異体ともに顕著に孢子形成率が低下していた (図 5D)。

以上より、RNA 結合への関与が想定される F341 および F427 は、Spo5 の局在と機能に必須の役割を果たすことが明らかとなった。

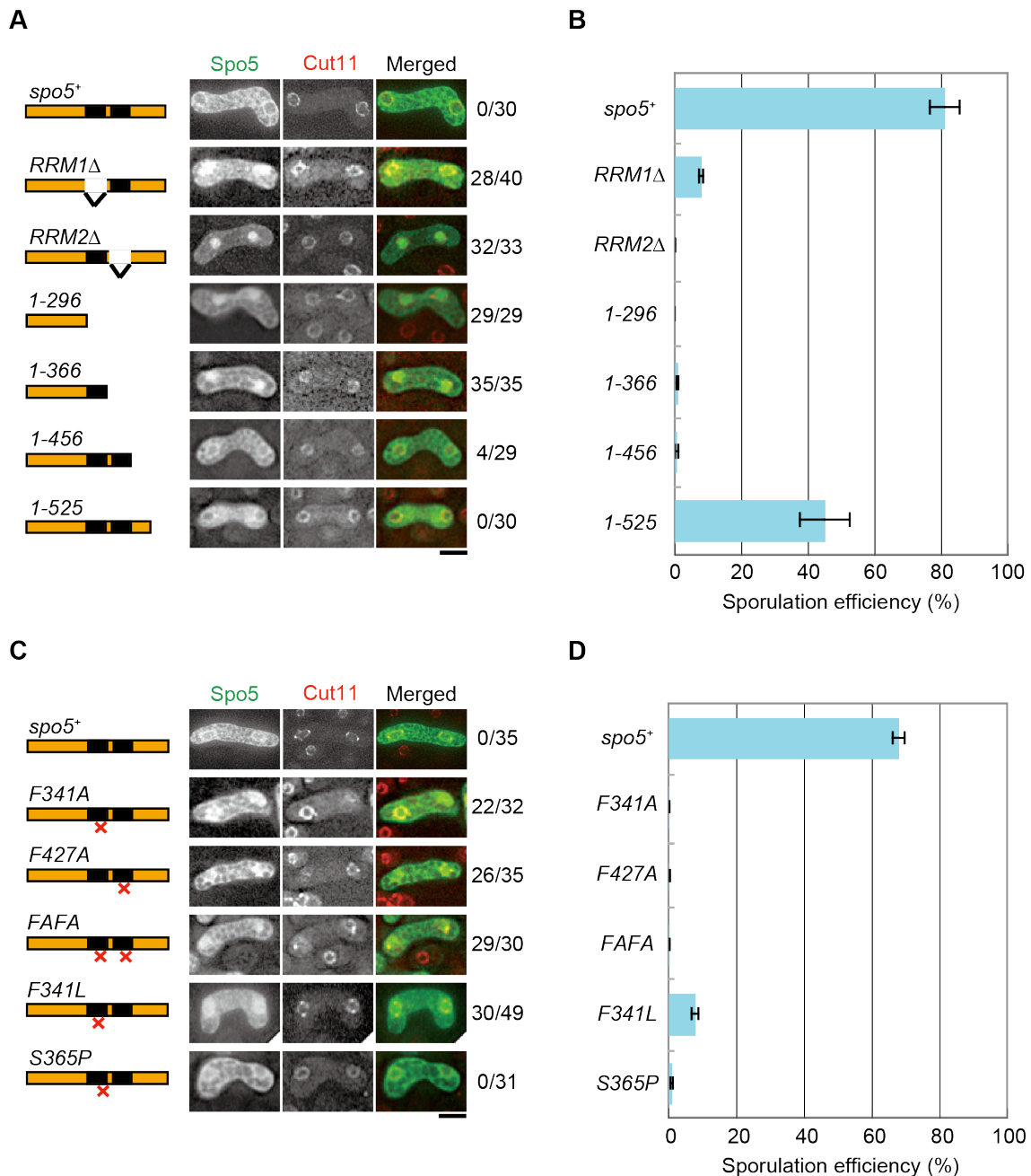


図 5. 部分欠失型 *spo5* 変異体と *spo5* ミスセンス変異体の表現型

(A) 部分欠失型 Spo5 の局在。減数第一分裂と減数第二分裂の間における Spo5-GFP および部分欠失型 Spo5-GFP の局在を、核膜のマーカーである Cut11-4mRFP とともに観察した。写真左側

には変異型タンパク質の構造を、右側には核内で GFP シグナルが強かった細胞の数を示す。黒い長方形は RRM1 および RRM2 を示す。(B) 部分欠失型 *spo5* 変異体を減数分裂に誘導し、30°C で 1 日置いたあとの胞子形成率をカウントした (n>500, 3 回以上)。(C) ミスセンス型 Spo5 の局在。(A) と同様にして観察した。(D) *spo5* ミスセンス変異体の胞子形成率を (B) と同様にして観察した。 Scale bar = 5 μ m, Error bar = Standard Deviation

1-3. RRM への変異導入が機能低下の原因であることの確認

図 5 で見られた *spo5* 変異体の表現型は、*spo5*⁺遺伝子の C 末端領域に挿入された GFP 配列および人工的ターミネーター配列の影響を受けている可能性を否定できない。そこで、これらの配列を持たず、内在性のターミネーターによって転写が終了する *spo5* 変異体を作製して表現型を再確認した。RRM 欠失型 *spo5* 変異体および *spo5* ミスセンス変異体は、いずれも、30°C で図 5 の対応する変異体と同様の胞子形成率を示した (図 6)。また、先行研究では N 末端側領域のみで胞子形成すると結論していたが、RRM を 2 つ含む *spo5*(1-456)の対応する変異体でも、胞子形成できなかった (データは示さない)。以上より、RRM への変異導入が Spo5 の機能低下を招くことが明らかとなった。また、先行研究の結論とは異なり、N 末端側領域だけでは胞子形成できないことも明らかとなった。

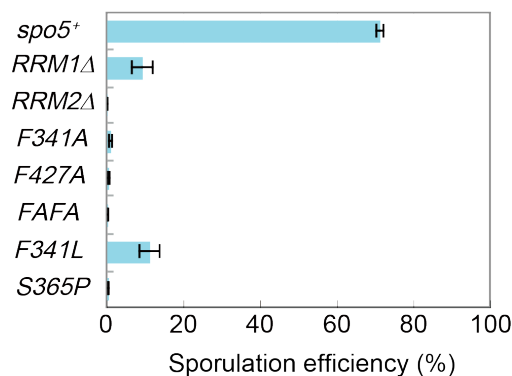


図 6. GFP タグなし *spo5* 変異体でもタグありと同様の表現型を示した

GFP タグを持たない各 *spo5* 変異体を減数分裂に誘導し、図 5 の (B) と同様の方法で胞子形成率をカウントした。Error bar = Standard Deviation

1-4. *spo5* 変異体によって胞子形成能には大きな違いがあった

次に、図 5 でもちいた変異体 (GFP タグあり) の胞子形成率を 25°C で計数した (図 7)。RRM 欠失型 *spo5* 変異体では胞子形成した細胞はわずかであった。*spo5*(F341A)や *spo5*(F341L)は野生型と同程度の胞子形成率を示した。*spo5*(F427A)や *spo5*(s365P)でも 30°C と比較して胞子形成率が上昇したが、上昇の割合は *spo5*(F341L)や *spo5*(F341A)よりも少なかった。二重変異体 *spo5*(F341A, F427A)は、RRM 欠失型 *spo5* 変異体と同様、ほとんど胞子形成しなかった。これらは、温度によって *spo5* 変異体の中で表現型に差が表れることを示唆している。

以上をまとめると、Spo5 が正常に機能するには RRM1 と RRM2 の両方が重要であり、RRM2 の欠損は RRM1 の欠損よりも顕著な機能低下を引き起こすことも明らかとなった。RRM1 と RRM2 の機能の違いについては **1-9.**で議論する。

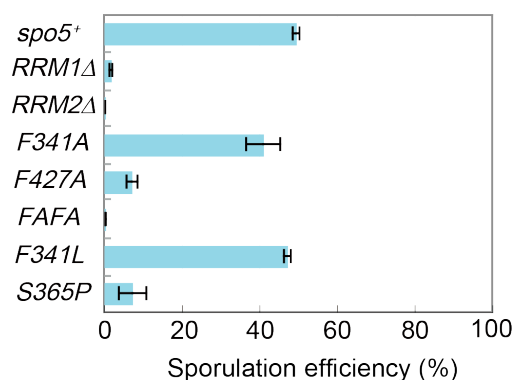


図 7. GFP タグあり *spo5* 変異体の 25°C での胞子形成率を測定した

図 5 でもちいた GFP タグありの *spo5* 変異体を減数分裂に誘導し、25°C で 1 日置いたあとの胞子形成率をカウントした。Error bar = Standard Deviation

1-5. Spo5 の核外移行は mRNA 輸送因子 Rae1 に依存する

図 5 で明らかになった RRM の局在への関与から、Spo5 は RNA に結合して核外移行する可能性が予想された。そこで、mRNA 輸送経路が Spo5 の局在制御に関与しているかどうか調べるため、mRNA 輸送因子である Rae1 の変異体内で Spo5 の局在が変化するかを検討した。Rae1 は出芽酵母からヒトまで保存された核膜孔に存在する mRNA 輸送因子である[40, 41]。分裂酵母の *rae1-167* 変異体では、制限温度下で mRNA が核に蓄積する異常が見られる[42]。野生型および *rae1-167* 変異体を 25°C で減数分裂に誘導し、36°C に移して Rae1 を失活させた。野生型では、Spo5-GFP は 25°C、36°C のいずれでも細胞質に局在した (図 8A)。*rae1-167* 変異体では、Spo5-GFP は 25°C では細胞質に局在したが、36°C では核へ蓄積した。このことは、Spo5 が mRNA 輸送経路に依存して細胞質へ輸送されることを示唆する。また、*rae1-167* 変異体では胞子形成率が顕著に低下していた (*spo5-GFP rae1*⁺-167, 83% vs. *spo5-GFP rae1-167*, 19%)。このことから、Rae1 は胞子形成に重要な働きをすることが明らかとなった。

次に、エキスポーチンに依存した核外輸送経路[43]が Spo5 の局在制御に関与するかどうか調べた。Ran GTPase は、インポート／エキスポーチンを介した核-細胞質間輸送の制御因子として知られる[44]。Ran-エキスポーチン (分裂酵母では Crm1) に依存した核外移行を、阻害剤であるレプトマイシン B (LMB) によって阻害する実験をおこなった。LMB 依存的に核蓄積することが明らかにされている Mei2[45]では LMB を入れると核蓄積が見られたが、Spo5 は細胞質に局在したままであった (図 8B)。このことから、エキスポーチン／Crm1 が Spo5 の核外移行には必要でないことが明らかとなった。

Spo5 が mRNA 輸送複合体の構成因子である可能性を検討するため、mRNA の局在をモニターする目的でポリ A 結合タンパク質 Pabp (poly (A)-binding protein) の局在を観察した[46]。先行研究の結果と同様、Pabp は *rae1-167* 変異体で核に蓄積したが、*spo5Δ* 株では細胞質に局在していた (図 8C)。このことは、Spo5 が mRNA の一般的な輸送因子ではないことを示唆している。

最後に、mRNA の転写を阻害する薬剤であるフェナントロリンにより、Spo5 の局在が変化するか確認した。薬剤を投与すると、Spo5-GFP は核へと局在が変化した (データは示さない)。この結果は、Spo5 が mRNA に依存して核外移行していることを強く示唆した。

以上より、Spo5 は Rae1 に依存して核外移行するが、一般的な mRNA の輸送には関与しないことが明らかとなった。

1-6. Spo5 の核外移行は胞子形成に重要な役割を果たす

RRM への変異の導入が Spo5 の異常な核蓄積と機能の低下を引き起こしたことから、Spo5 の核外移行は機能に必要であることが予想された。一方、RNA 結合能の低下に起因する Spo5 の局在の異常が副次的なものである可能性は完全には否定されていなかった。すなわち、RNA 結合能が正常な状態で Spo5 が核内に存在し続けた場合に、Spo5 が正常に機能できる可能性は否定されていなかった。そこで、核外移行が Spo5 の機能にとっての必要条件かどうか検討するため、Spo5 の局在を人工的に変化させる実験をおこなった。まず、Spo5 の局在を細胞質から核へと変化させるため、核局在シグナル NLS (Nuclear Localization Signal) を利用した。NLS を組み込んだ融合タンパク質 Spo5-NLS-GFP は核に蓄積した (図 9A)。Spo5-NLS-GFP を発現する細胞では、胞子形成率が低下し、胞子の形態に異常が見られるとともに、4 胞子の細胞の割合が顕著に低下していた (図 9B, C)。したがって、Spo5 の核外移行は胞子形成に重要な働きをすることが示された。しかし、生成された胞子の生存率はコントロールの細胞で生成されたものと差がみられなかった (図 9D, *spo5-GFP*, 50% vs. *spo5-NLS-GFP*, 40%)。Spo5 の核外移行は胞子の発芽能力には重要な寄与をしない、あるいは前胞子膜が形成されて成熟できた胞子では、胞子壁や胞子膜の形態などは生存率に影響を与えないのかもしれない。

次に、Spo5 を強制的に核外移行することで核に蓄積した変異型 Spo5 の機能を回復させることができるか検討した。RRM1 の欠失では、多くの細胞で胞子形成できないが、一部の細胞で胞子形成可能であった (図 5B)。そこで、Spo5 RRM1Δ に核外移行シグナル NES (Nuclear Export Signal) を付加したところ、

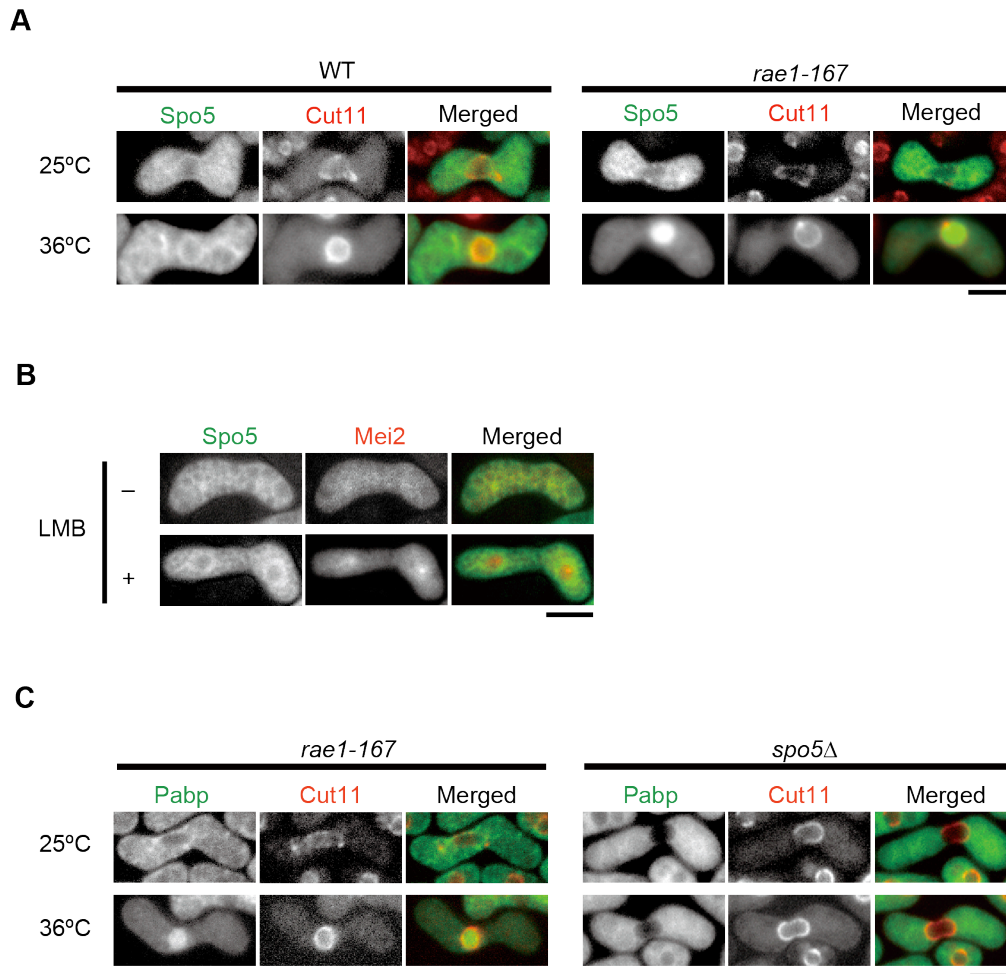


図 8. Spo5 は Rae1 に依存して核外移行するが、一般的な mRNA 輸送を制御しない

(A) *rae1-167* 変異体における Spo5-GFP の局在。細胞を 25°C で 6 時間置いて減数分裂を開始する時期まで誘導したあと、36°C に移して 3 時間置いてから核膜のマーカーである Cut11-4mRFP とともに観察した。(B) LMB 処理後の Spo5-GFP の局在。100ng/ml の LMB を加え、30°C で 1 時間インキュベートしたあと観察した。Mei2-mCherry は LMB 感受性のコントロールとして同時に観察した。+: LMB 処理した細胞、 -: LMB 処理しなかった細胞。(C) *rae1-167* 変異体における Pabp-GFP の局在。(A) と同様にして観察した。 Scale bar = 5μm

Spo5-RRM1Δ-NES-GFP は細胞質に局在した (図 9E)。しかし、孢子形成率は Spo5-GFP より顕著に低く、Spo5 RRM1Δ-GFP と同程度であった (図 9F)。Spo5(F341L)への NES 付加でも同様の結果が得られ、かつ野生型 Spo5 への NES 付加でその機能は低下しなかった (データは示さない)。以上より、Spo5 は RRM を介して核外移行するとともに、RRM は細胞質で機能するためにも必須であると結論した。

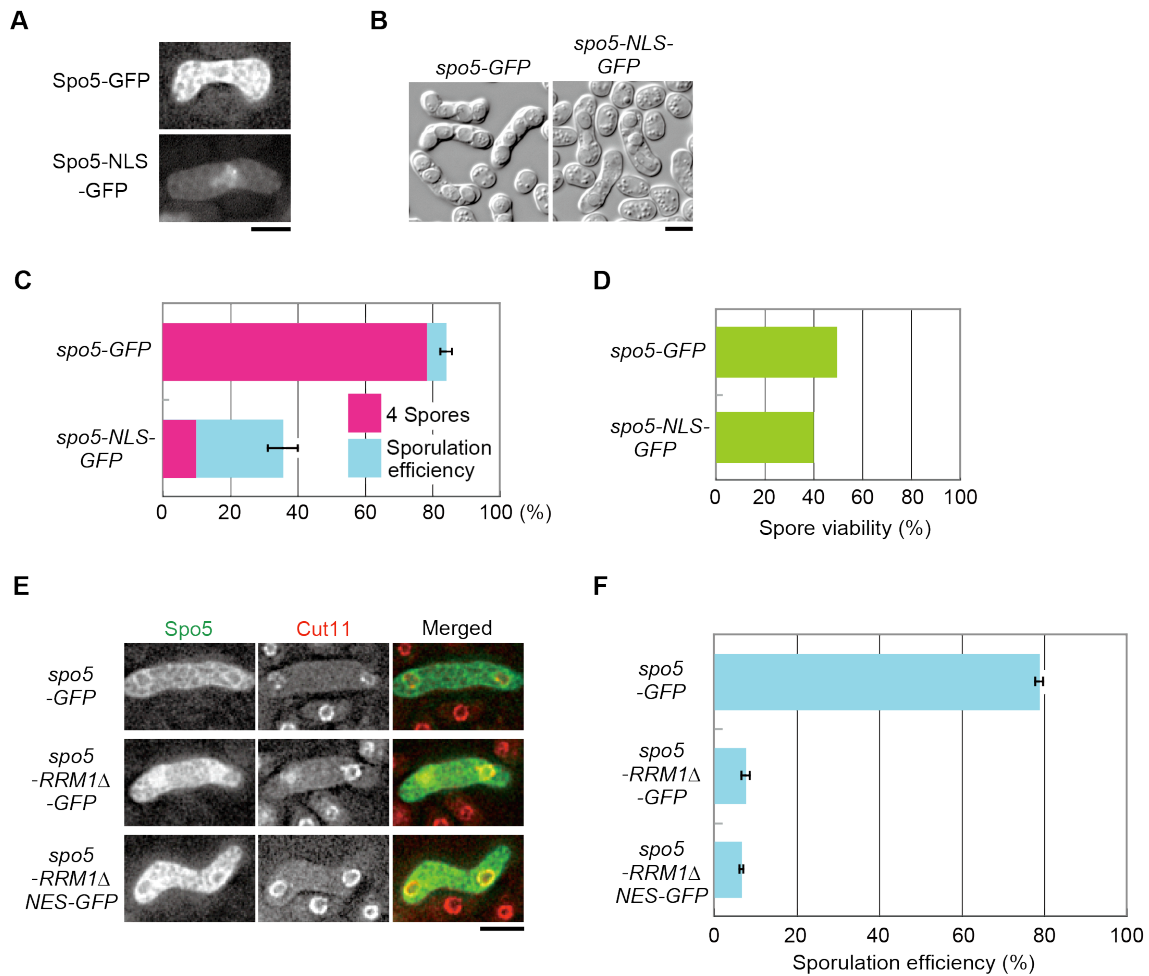


図 9. Spo5 の核外移行は孢子形成に重要な役割を果たす

(A) Spo5-GFP および Spo5-NLS-GFP の局在。NLS の配列は材料と方法の項に記載した。(B) *spo5-GFP* および *spo5-NLS-GFP* の DIC の撮影像。(C) *spo5-GFP* および *spo5-NLS-GFP* の 30°C における孢子形成率と、孢子形成した細胞の中で 4 孢子を形成した細胞の割合を示す。孢子形成率は図 5 の (B) と同様にしてカウントした。(D) *spo5-GFP* および *spo5-NLS-GFP* によって形成された孢子の生存率。ランダムスポア処理によって生存率をカウントした。(E) Spo5-GFP、Spo5 RRM1Δ-GFP および Spo5 RRM1Δ-NES-GFP の局在。図 5 の (A) と同様に、核膜のマーカーである Cut11-4mRFP とともに観察した。NES の配列は材料と方法の項に記載した。(F) Spo5-GFP、Spo5 RRM1Δ-GFP および Spo5 RRM1Δ-NES-GFP を発現する細胞の 30°C における孢子形成率。(C) と同様にしてカウントした。Scale bar = 5μm, Error bar = Standard Deviation

1-7. *spo5(S365P)* は他の RRM 点変異体とは違う *spo5* 変異体である

スクリーニングによって得られた *spo5* ミスセンス変異体の中に、RNA 結合能への影響が示唆される *spo5(F341A)* などの変異体とは表現型の異なる *spo5(S365P)* が存在していた。図 5 で示したように、Spo5(S365P)-GFP は Spo5-GFP

と同様の細胞質局在を示したことから、*rae1-167* 変異体で Spo5(S365P)-GFP が核に蓄積するかどうか検討した。興味深いことに、*rae1-167* 変異体で発現した Spo5(S365P)-GFP は、Rae1 が機能しない制限温度下でも多くが細胞質に局在した (図 10A)。このことは、Spo5(S365P)ではむしろ核移行に異常があることを示唆する。また、25°C において、*spo5(F341L)*は野生型と同等に胞子形成するが、*spo5(S365P)* は胞子形成率が低いことが、ヨウ素染色および顕微鏡での観察によって確認された (図 10B, C)。これらのことは、*spo5(S365P)* が新しいタイプの *spo5* ミスセンス変異体であることを示している。

1-8. *pcr1* mRNA は Spo5 のターゲット mRNA である

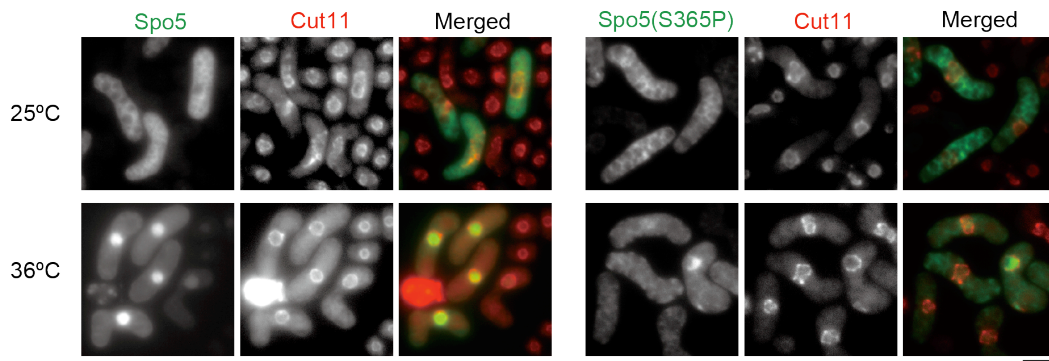
Spo5 と相互作用する新規因子の同定を目指して、新しいタイプの変異株 *spo5(S365P)* をもちいて、その胞子形成不能を抑圧する多コピー抑圧因子を探索した。スクリーニングの概要は材料と方法の項で示した。cDNA ライブラリーを *spo5(S365P)*に導入し、ヨウ素染色で染色されるコロニーを選択した。それらから回収した cDNA を分析し、主要なクローンとして *pcr1*⁺遺伝子を単離した。*pcr1*⁺遺伝子は ATF/CREB ファミリーに属する転写因子をコードする遺伝子で、先行研究において *spo5* 変異体の多コピー抑圧因子として既に単離されていた [34]。また、Pcr1 は Atf1 とヘテロ二量体を形成し、減数分裂特異的な組換えに関与することが示されている [35, 36]。しかし、Spo5 と Pcr1 の関連性はこれまで詳細に研究されていなかった。そこでそれらの関連性を追究した。

pcr1⁺遺伝子の転写産物は減数分裂の後半にかけて上昇することから [8]、Pcr1 が組み換え以外の減数分裂過程にも関与すると予想された。*pcr1*⁺遺伝子を過剰発現させると、*spo5(S365P)*だけでなく、*spo5Δ*を含む全ての *spo5* 変異体でその胞子形成の異常を抑圧した (図 11A, B)。このことは、Pcr1 が十分量あれば Spo5 がなくても減数分裂が進行しうることを示唆する。

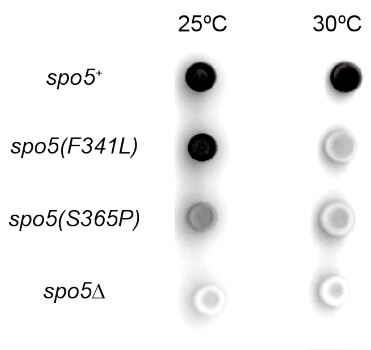
分裂酵母の減数分裂期には、Pcr1, Atf1, Atf21 および Atf31 の 4 つの ATF/CREB ファミリー転写因子が発現する [8]。それら全ての因子を調べたところ、Pcr1 のみが過剰発現によって *spo5Δ*の胞子形成不能を抑圧することが明らかとなった (図 11C)。このことは、Spo5 と Pcr1 に何らかの関連があることを示唆する。

先行研究および本研究で、Spo5 は RNA 結合タンパク質であることが示唆されたが、それを直接示すデータはない。そこで、Spo5 が RNA 結合タンパク質として *pcr1* mRNA と結合するか確かめるため、*in vitro* で EMSA (Electro mobility shift assay; ゲルシフトアッセイ、図 11D)をおこなった。次に *in vivo* では RIP assay (RNA Immunoprecipitation; RNA 免疫沈降、図 11E)をおこなった。ゲルシフト

A



B



C

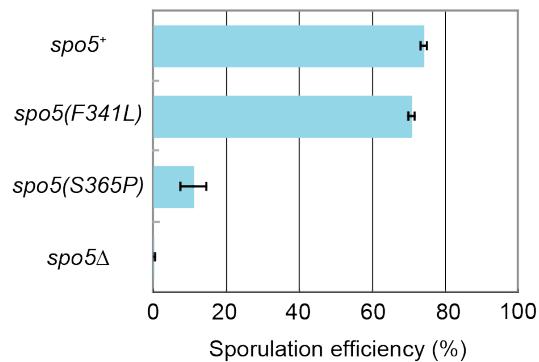


図 10. *spo5*(S365P)は新規のタイプの *spo5* ミスセンス変異体である

(A) *rae1-167* 変異体における Spo5-GFP および Spo5(S365P)-GFP の局在。図 8 の (A) と同様に観察した。(B) ヨウ素染色後の野生型細胞および *spo5* 変異体細胞。それぞれの細胞を SPA プレート上にスポットして、25°C または 30°C で 24 時間置いたあとヨウ素染色をおこなった。(C) 25°C で 1 日置いたあとの野生型および *spo5* 変異体 (GFP タグつき株) の胞子形成率。図 5 の (A) と同様にしてカウントした。 Scale bar = 5μm, Error bar = Standard Deviation

アッセイでは、大腸菌から精製した Spo5 タンパク質と、*in vitro* で合成した *pcr1*⁺ RNA 全長 (5'-UTR, ORF および 3'-UTR を含む) をもちいた。2つの RRM を含む Spo5 の C 末端領域 (Spo5C, 192-567) を GST と融合させた GST-Spo5C は、コントロールの RNA とは相互作用しなかったが、*pcr1*⁺ RNA とは相互作用した (図 11D)。つづいて、Spo5 と *pcr1* mRNA との生体内での結合を確かめるため、*spo5-GFP* 株をもちいて RIP アッセイをおこなった。GFP 抗体による免疫沈降および RT-PCR による検出によって、*pcr1* mRNA は Spo5-GFP と共沈することが認められたが、他の ATF/CREB 因子の mRNA は共沈しなかった (図 11E)。このことから、*pcr1* mRNA は Spo5 の特異的なターゲット mRNA であると結論した。

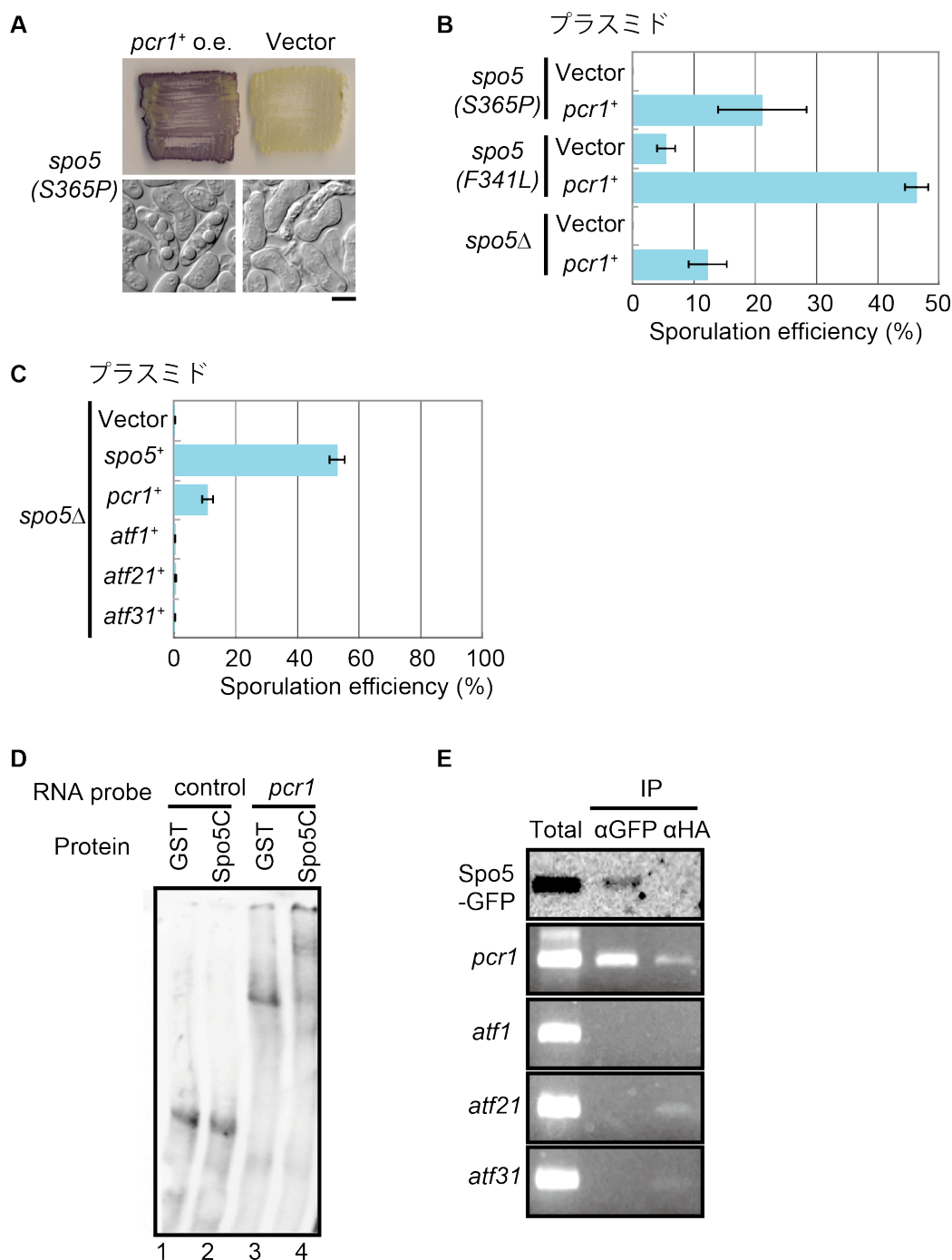


図 11. Spo5 は *pcr1* mRNA と結合する

(A) Pcr1 を過剰発現した時の *spo5*(S365P) のヨウ素染色と DIC の撮影像。(B) Pcr1 を過剰発現した時の各 *spo5* 変異体の胞子形成率。SSA プレート上で 30°C 3 日置いたあと、胞子形成率を図 5 の (B) と同様にカウントした。(C) *spo5Δ* で Spo5, Pcr1, Atf1, Atf21 および Atf31 を過剰発現した時の胞子形成率をカウントした。(B) と同様にカウントした。(D) 大腸菌から精製した GST-Spo5C 20ng と、*in vitro* で合成した *pcr1* RNA 4ng をもちいて、ゲルシフトアッセイをおこなった。コントロールタンパク質には GST 50ng を、コントロール RNA には GFP の ORF 4ng をも

ちいた。(E) 二倍体細胞で減数分裂を誘導して Spo5-GFP を発現させたのちに集菌し、その細胞抽出液をもちいて GFP 抗体およびコントロールの HA 抗体で免疫沈降をおこない、RT-PCR で *pcr1*, *atf1*, *atf21*, および *atf31* mRNA の発現を検出した。免疫沈降後のタンパク質は、GFP 抗体をもちいてウェスタンブロッティングで検出した。Scale bar = 5 μ m, Error bar = Standard Deviation

1-9. Spo5 は *pcr1* mRNA の ORF とは結合せず、UTR と結合する

cDNA ライブラリーから単離した *pcr1*⁺ クローンは、特徴的な長い 5'-UTR および 3'-UTR を含んでいた (図 12A)。これらの UTR の境界はデータベースの記載とほぼ一致していた[47]。そこで、*pcr1* mRNA を 5'-UTR, ORF および 3'-UTR に分け、Spo5 が *pcr1* mRNA のどこに結合するかを検討した。その結果、Spo5 は *pcr1* mRNA の ORF とは結合せず、5'-UTR または 3'-UTR を含むプロープと結合することが分かった (図 12B)。

RRM が RNA 結合に果たす役割を明らかにするため、精製した RRM 欠失型 Spo5C と *pcr1* RNA の相互作用を検討した。Spo5C RRM1 Δ は *pcr1* RNA と相互作用したが、Spo5C RRM2 Δ はしなかった (図 12C)。このことは、RNA 結合に関して RRM1 と比べ RRM2 がより重要な役割を担うことを示唆する。

最後に、F341 と F427 をアラニンに置換した Spo5C(F341A, F427A)では、Spo5C と比べ顕著に RNA 結合能が低下していた (データは示さない)。Spo5(F341A, F427A)が核に蓄積した結果と合わせると、Spo5 は *pcr1* mRNA を含む様々な mRNA と結合して核外移行していることが強く示唆された。そのため、1-10.以降では Spo5 と結合する複数の mRNA について解析をおこなった。

1-10. Spo5 は *cdc13* mRNA とも結合する

当研究室で同時期に行われた研究で、Arata は、Spo5 が Cdc13 の mRNA およびタンパク質の発現量に関係することを示唆していた[48]。また、全長の Spo5 をもちいて、*in vitro* で Spo5 が *cdc13* mRNA と結合する可能性も示した。Mes1 による Cdc13 の分解抑制によって減数第二分裂の進行が調節されるという先行研究[27]の存在から、*spo5* Δ で減数第二分裂進行に異常が生じたのは Cdc13 の発現異常に起因すると考えた。そこで、私も独立に、上述した Spo5C をもちいて Spo5 が *cdc13* mRNA と結合するかどうか検討した。*pcr1* mRNA (図 11)と同様の解析をおこなった結果、Spo5 が *cdc13* mRNA の全長と結合することを *in vitro* で確認した (図 13A)。*cdc13*⁺, *cdc25*⁺, *ste9*⁺などの細胞周期進行に関与する因子の mRNA は特徴的に長い 3'-UTR をもち、それらは窒素源枯渇時の mRNA 安定

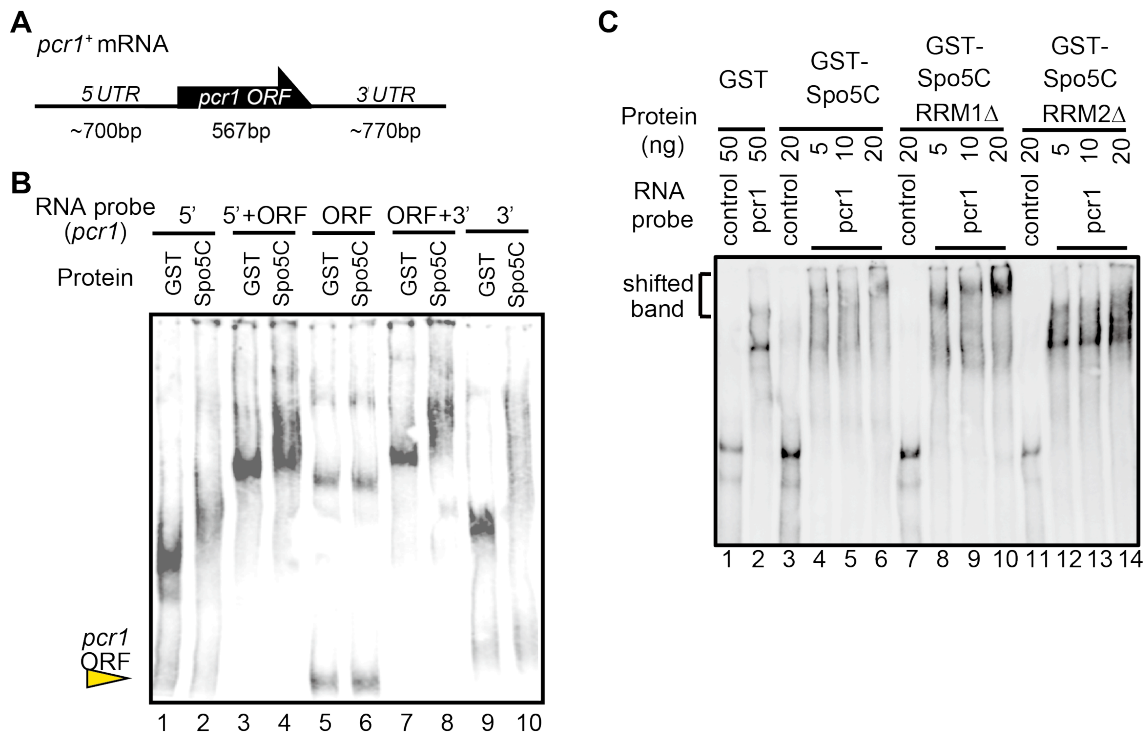


図 12. Spo5 は *pcr1* mRNA の ORF と結合する

(A) *pcr1*⁺遺伝子の転写産物の構造。cDNA をもとに UTR の境界を推定した。(B) GST-Spo5C と *pcr1* RNA 全長(5'-UTR, ORF, 3'-UTR) をもちいたゲルシフトアッセイ。図 11 の (D) と同様にアッセイをおこなった。黄色の矢頭は *pcr1* ORF の Free Probe を示す。(C) 大腸菌から精製した GST-Spo5, GST-Spo5C RRM1Δおよび GST-Spo5C RRM2Δ 5, 10, 20ng と、*in vitro* で合成した *pcr1* RNA 4ng をもちいて、図 11 の (D) と同様にゲルシフトアッセイをおこなった。コントロールのタンパク質には GST 50ng を、コントロールの RNA には GFP の ORF 4ng をそれぞれもちいた。

性に寄与することが予想されている[49]。データベースを基に *cdc13* mRNA の UTR の境界を推定し (図 13B)、Spo5C が *cdc13* mRNA のどこに結合するか検討したところ、5'-UTR や 3'-UTR だけでなく、ORF とも結合していた (図 13C) ([48]でも同様の結果が得られている)。また、Spo5 が *cdc13* mRNA と結合することを *in vivo* でも確認した (図 13D)。

Cdc13 が Pcr1 と同様、Spo5 の下流で働いているかどうか調べるため、様々なプロモーター下で Cdc13 を過剰発現し、*spo5Δ*の胞子形成不能を抑圧するかどうか検討した。チアミンが存在しないと発現が誘導される *nmt1* プロモーターには、それよりも活性の低い *nmt41* プロモーターや、さらに活性の低い *nmt81* プロモーターが存在する。また、*mes1* プロモーターは減数第一分裂と第二分裂の間で

発現誘導するためにもちいられる[27]。興味深いことに、*nmt81* プロモーター下で過剰発現させると *spo5Δ* の孢子形成不能を抑圧できたが、他のプロモーター下では抑圧できなかった (図 13E)。Arata は、Cdc13 量の増加は減数第二分裂の進行異常を回復させることはできるが、孢子形成は回復させないと結論していた。本研究により Cdc13 の過剰発現で *spo5Δ* の孢子形成不能を抑圧しうることが新たに分かった。このことは、Cdc13 が孢子形成を制御しうることを示唆する。

以上より、*cdc13* mRNA も Spo5 の特異的なターゲットであると結論した。

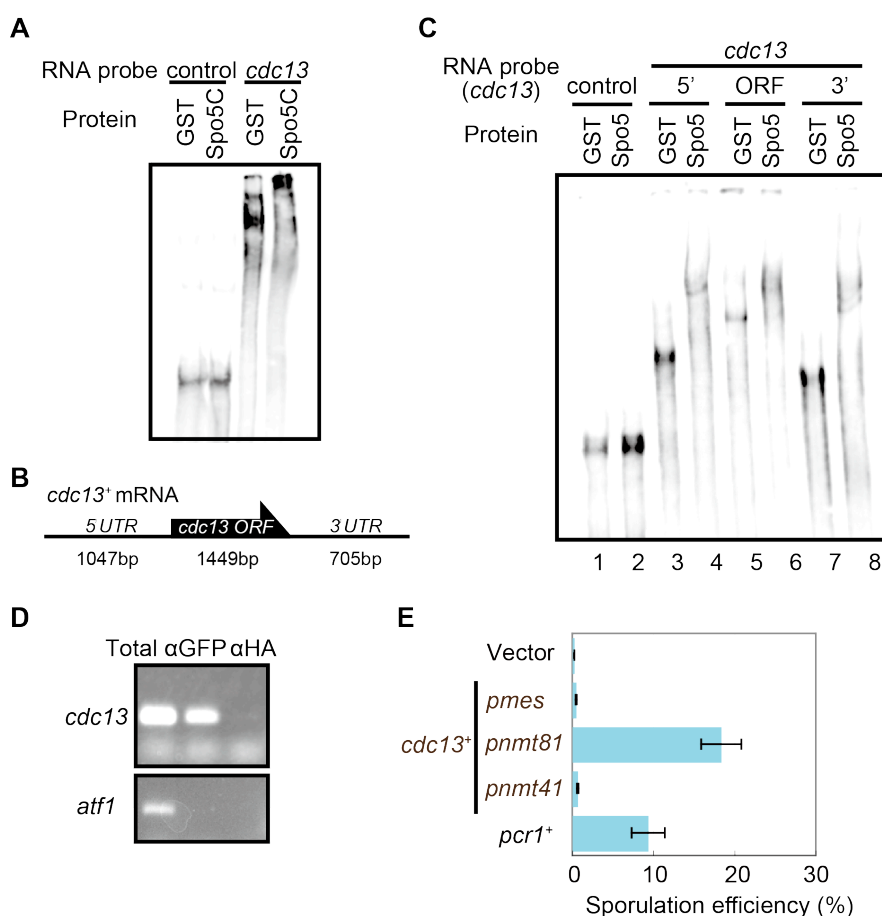


図 13. Spo5 は *cdc13* mRNA と結合し、Spo5 の下流で Cdc13 が働く

(A) GST-Spo5C と *cdc13* RNA 全長 (5'-UTR+ORF+3'-UTR) をもちいたゲルシフトアッセイ。(B) *cdc13*⁺ 遺伝子の転写産物の構造。境界領域はデータベースをもとに推定した。(C) GST-Spo5C と *cdc13* RNA (5'-UTR, ORF, 3'-UTR) をもちいたゲルシフトアッセイ。(D) RIP アッセイによる Spo5-GFP と共沈する mRNA の検出。図 11 の (E) と同様の方法で、*cdc13* mRNA を検出した。コントロールとして *atf1* mRNA をもちいた。(E) *spo5Δ* に、Pcr1 および Cdc13 を過剰発現した時の孢子形成率をカウントした。カウントは図 11 の (B) と同様にしておこなった。Pcr1 は pREP3 を、Cdc13 は p*Pmes*-REP1, pREP41, pREP81 をもちいて発現した。Error bar = Standard Deviation

1-11. Pcr1 は *cdc13*⁺遺伝子上流に結合し、転写を促進する

遺伝学的な解析から、Spo5 の下流で Pcr1 および Cdc13 が働くと考えられた。Pcr1 がどの遺伝子の転写制御をおこなうか、一例 (*cgs2*⁺遺伝子[50]) を除いてこれまで不明である。本研究では Blast (Basic Local Alignment Search Tool、URL は方法と材料の項に記載) をもちいて、CRE 配列 (TGACGTCA[34]あるいは TAACGTCA[51]) をプロモーター領域に含む遺伝子を検索した。興味深いことに、*cdc13*⁺遺伝子上流に CRE 配列を 1 ヶ所みつけた (図 14A)。そこで、この CRE 配列と、変異型 CRE 配列を中央に含む DNA プローブをそれぞれ作製し、精製 Pcr1 と混ぜて DNA ゲルシフトアッセイをおこなった。Pcr1 添加量の増加により、CRE 配列を含むプローブと Pcr1 の結合が確認されたが、変異型 CRE 配列を含むプローブとは結合しなかった (図 14B)。また、Pcr1 はコントロールプローブとも結合しなかった。この結果は、Pcr1 が *cdc13*⁺遺伝子上流に直接結合することを強く示唆している。

次に、Pcr1 による *cdc13*⁺遺伝子の転写制御を明らかにするため、Pcr1 過剰発現時の *cdc13* mRNA の発現量をノーザンブロッティングで検出した。減数分裂期には *cdc13* mRNA の発現が急激に増加するという結果が予備実験で得られており、減数分裂期の細胞をもちいた測定では実験誤差が生じる可能性があると考えられた。そこで、体細胞分裂期に Pcr1 を過剰発現させたところ、*cdc13* mRNA の発現量はコントロールに比べ有意に増加した (図 14C)。さらに、*cdc13*⁺遺伝子の転写開始点および CRE 配列を含む *cdc13*⁺遺伝子上流約 700bp (図 14A) を GFP 発現ベクターにクローニングし、レポーターGFP を体細胞分裂期の細胞で発現させた。その結果、GFP の発現量は変異型 CRE 配列の時に減少した (図 14D)。この系で Pcr1 を共発現した時に、野生型 CRE 配列で GFP の発現が促進されなかった原因は不明であるが、既に GFP の発現量が飽和していた実験系の不備の可能性も考えられる。

以上より、Pcr1 は *cdc13*⁺遺伝子上流に結合し、転写を促進すると推定した。

1-12. Pcr1 の過剰発現による *spo5Δ*の抑圧は *cdc13* mRNA の発現に依存している可能性が高い

高等生物で、Pcr1 のホモログである CREB の結合サイトがゲノムワイドに解析され[52]、CREB はサイクリン B を含む多くのサイクリンのプロモーター領域に結合することが明らかになっている。また、CREB が結合する領域の下流 300bp 以内に TATA 配列を含む遺伝子は、CRE 配列をプロモーター領域に含む遺伝子のうち 1/3 程度を占めていた。そこで、さらに *cdc13*⁺遺伝子上流を調べたところ

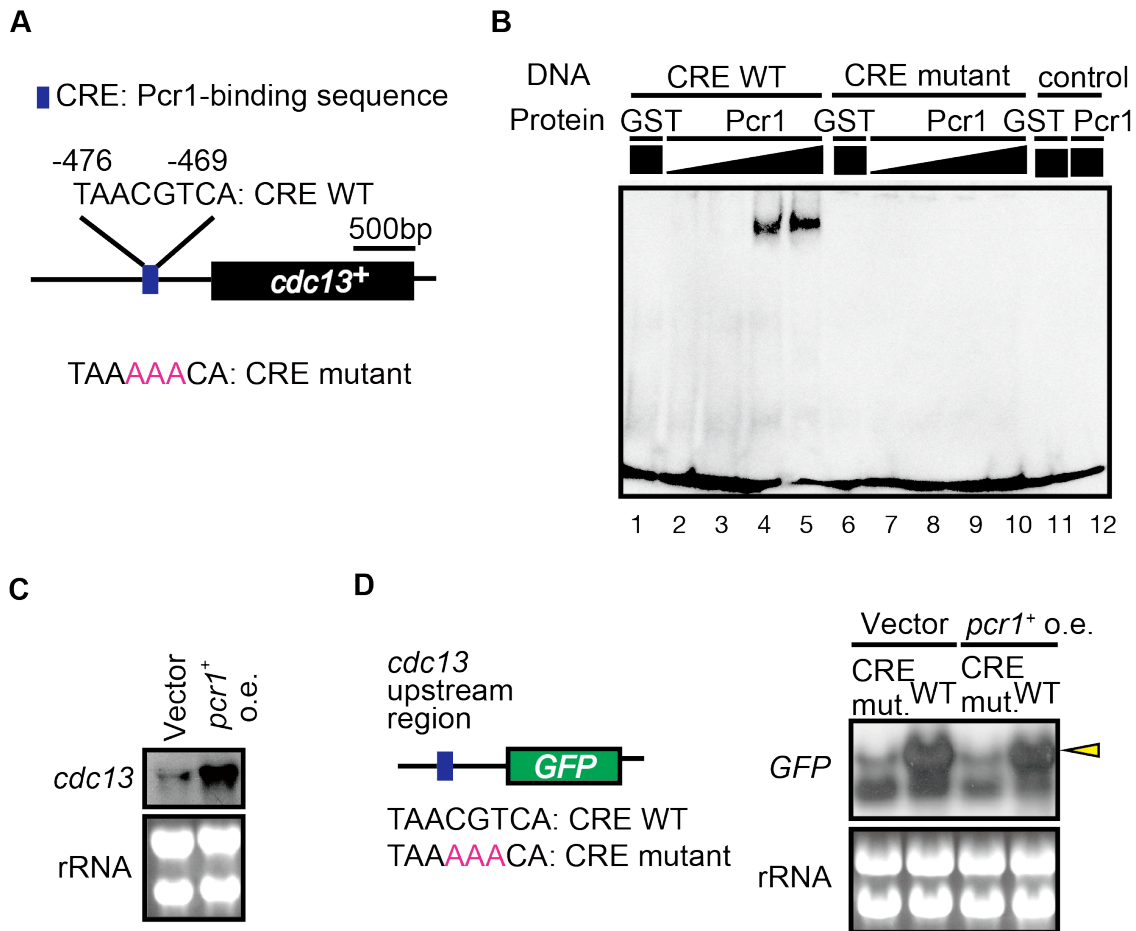


図 14. Pcr1 は *cdc13⁺* 遺伝子の上流に結合し、その転写を促進している可能性が高い

(A) *cdc13⁺* 遺伝子周辺の構造。*cdc13* ORF の上流には、Pcr1 結合配列である CRE 配列 TAACGTCA が存在した。CRE 配列の変異箇所はマゼンタで示す。(B) 精製した GST-Pcr1 と、CRE 配列または変異型 CRE 配列を中心を含む 40bp の DNA プローブを混ぜて、DNA ゲルシフトアッセイをおこなった。DNA プローブは 4ng を、GST-Pcr1 は 0, 50, 100, 200ng を、GST は 200ng くわえた。黒い直角三角形は Pcr1 の添加量を表す。コントロールの DNA プローブとして Oct2A の結合配列をもちいた。(C) 二倍体の野生型で Pcr1 を過剰発現し、体細胞分裂期に発現する *cdc13* mRNA をノーザンブロッティングによって検出した。ローディングコントロールとして rRNA をもちい、*cdc13* mRNA の発現量を定量した。数字は *cdc13* mRNA/rRNA を示し、コントロールを 1.0 とした。(D) GFP 発現ベクターに CRE 配列を含む *cdc13⁺* 遺伝子の上流約 700bp の DNA 断片と CRE 配列に変異を導入した同様の DNA 断片をクローニングし、*pcr1⁺* 遺伝子を持つベクターとともに野生型に導入した。この株で体細胞分裂を誘導し、発現する RNA を回収したあと、GFP の発現を (C) と同様の方法で検出した。黄色の矢頭は、GFP および *cdc13* mRNA の 5'UTR を含む転写産物である。

ろ、CRE 配列のすぐ下流に TATA 配列と類似した配列を見つけた (図 15A)。これらの配列に変異を導入するため、*ura4⁺* 遺伝子カセットによる破壊株を作製し、その表現型を観察した。*cdc13 5'Δ* と *cdc13 TATAΔ* はいずれも 25°C で生育可能であった (図 15B)。一方、*cdc13 5'Δ* は高温でも生育可能であったが、*cdc13 TATAΔ* は生育できなかった。どちらの変異体でも、生育可能な温度で細胞がやや伸長する異常が見られたので、体細胞分裂期で *cdc13⁺* 遺伝子の発現に異常があることが推測された。異常が比較的軽度な *cdc13 5'Δ* について減数分裂での表現型を観察したところ、多くの細胞は孢子形成したが、その大半は子嚢内に 1 または 2 孢子を形成していた (図 15C, D)。また、*cdc13 5'Δ* では、体細胞分裂期および減数分裂期のどちらでも *cdc13* 転写産物の量が減少していた (図 15E)。以上の結果から、*cdc13 5'Δ* では *cdc13⁺* 遺伝子の転写制御に異常があると考えられた。

Pcr1 の過剰発現による *spo5Δ* の孢子形成不能の抑圧が *cdc13⁺* 遺伝子の発現に依存するかを調べるため、*cdc13 5'Δ spo5Δ* 株の細胞内で Pcr1 を過剰発現させた。その結果、Pcr1 による抑圧は見られなくなった (図 15F)。このことは、Pcr1 の機能は主に *cdc13* mRNA の転写制御を介して発揮されていることを示唆する。

1-13. Spo5 は *mei4* mRNA と 3'-UTR を介して結合する

これまでの結果から、Spo5 は Pcr1 を介して、および直接的に *cdc13* mRNA の発現を制御することで、減数第二分裂の進行と孢子形成を制御していると考えられる。しかし、Pcr1 あるいは Cdc13 の過剰発現のみでは十分に *spo5Δ* の孢子形成不能を抑圧できなかった。すなわち、Spo5 は *pcr1* mRNA や *cdc13* mRNA 以外にも機能と関連したターゲットをもつ可能性が高い。そこで、細胞周期や孢子形成を制御する因子の中で重要な因子をえらび、それらの過剰発現が *spo5Δ* の孢子形成不能を抑圧するかどうか調べた。特に、孢子形成関連因子の転写を制御する Mei4 に注目した。序章で述べたように、Mei4 は細胞周期や孢子形成に関与する Middle genes を制御する転写因子で、体細胞分裂期での過剰発現によって前孢子膜とよく似た細胞膜の形成を誘導することが明らかにされている [53]。そこで、*mei4* プロモーター下流で Mei4 を過剰発現するプラスミドを *spo5Δ* 株に導入して、孢子が形成されるかどうか観察した。その結果、2 割程度の細胞で孢子がみられたが、それらの多くは子嚢内に 1 孢子あるいは 2 孢子を形成した (図 16A, B)。次に、ゲルシフトアッセイをおこなったところ、Spo5 は *mei4* 3'-UTR を含むプローブと強く相互作用した (図 16C)。さらに、RIP アッセイによって、Spo5-GFP と *mei4* mRNA が共沈することが明らかとなった (図 16D)。

以上は、Spo5 が *mei4* mRNA と 3'-UTR を介して結合することを示している。

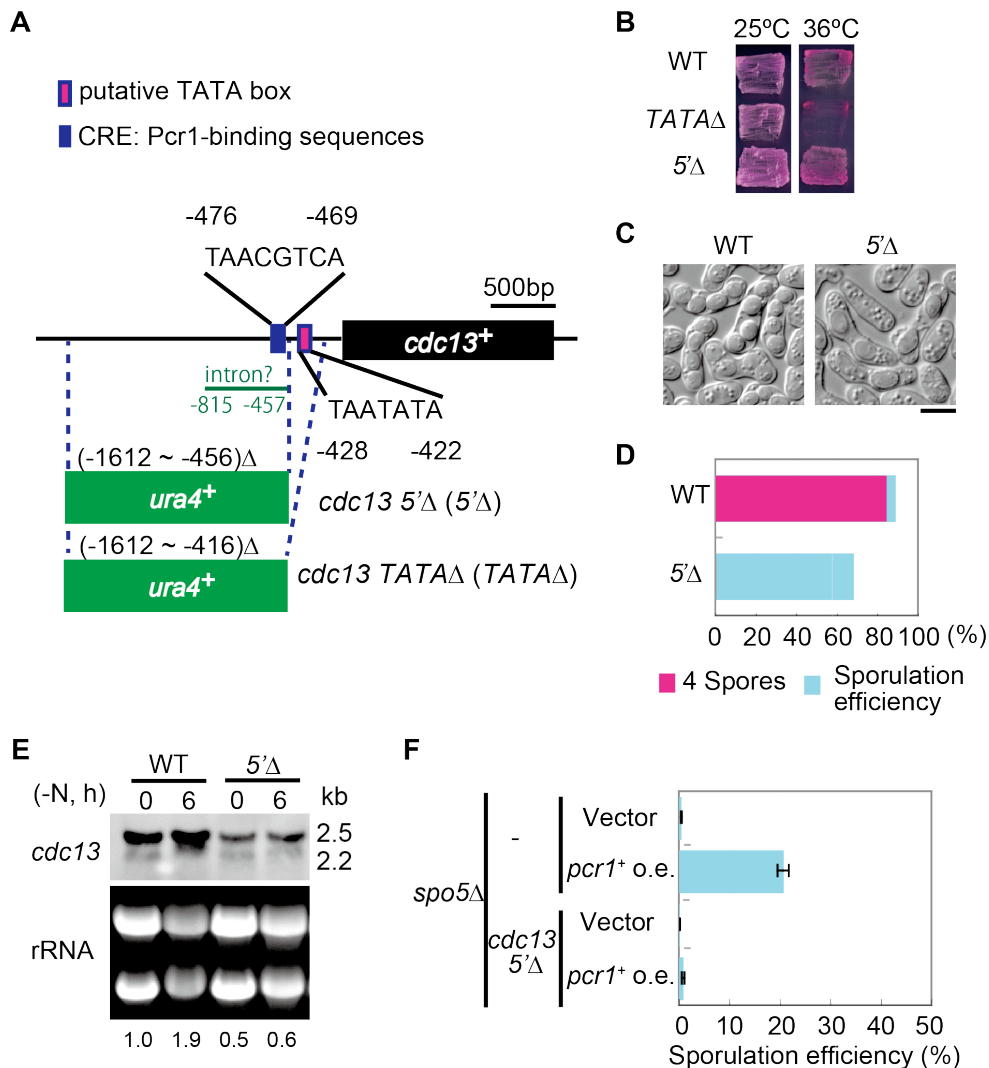


図 15. Pcr1 は *cdc13*⁺遺伝子の転写制御を介して機能している可能性が高い

(A) *cdc13*⁺遺伝子周辺の構造。Pcr1 の結合配列である CRE 配列と、予想された TATA 配列の位置を示す。また、予想イントロン配列の位置も示す。*ura4*⁺遺伝子と *cdc13*⁺遺伝子のプロモーター領域とを交換して *cdc13* 5' Δ と *cdc13* TATA Δ を作製した。(B) フロキシシン B を含む栄養培地上で野生型細胞、*cdc13* 5' Δ 株および *cdc13* TATA Δ 株を、25°C と 36°C で 3 日間生育し、プレート培地の写真を撮影した。(C) (D) 野生型と *cdc13* 5' Δ を SPA プレート上にスポットし、30°C で 24 時間置いたあと観察し (C)、孢子形成率をカウントした (D)。(E) 二倍体の野生型および *cdc13* 5' Δ を減数分裂に誘導し、細胞から RNA を回収したあと、その中に含まれる *cdc13* mRNA をノーザンブロッティングによって検出した。写真の上の数字は窒素源飢餓後の時間 (h) を、右の数字は転写産物の長さを示す。図 14 の (C) と同様にして、*cdc13* mRNA の発現量を定量した。数字は *cdc13* mRNA/rRNA を示し、野生型細胞の 0 時間を 1.0 とした。(F) *spo5* Δ および *spo5* Δ *cdc13* 5' Δ で Pcr1 を過剰発現させた時の孢子形成率をカウントした。カウントは図 11 の (B) と同様にしておこなった。Scale bar = 5 μ m, Error bar = Standard Deviation

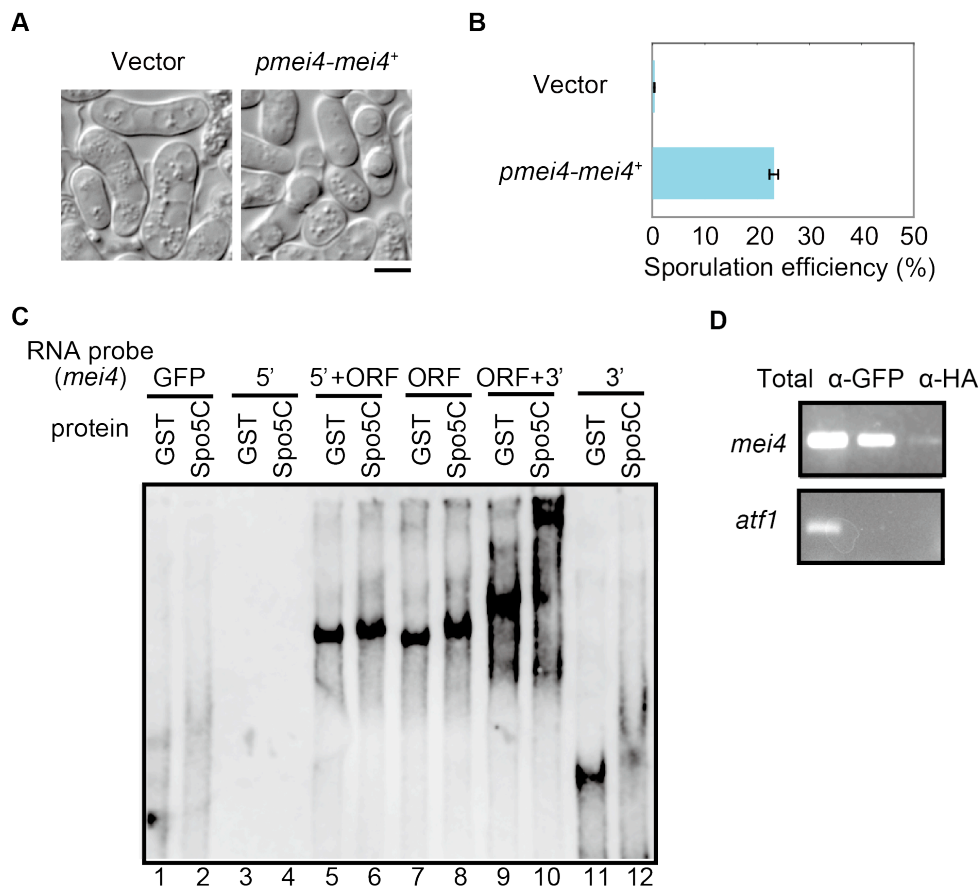


図 16. Spo5 は *mei4* mRNA の 3'-UTR に結合する

(A) (B) *spo5Δ*で *Mei4* を過剰発現した時の胞子形成の DIC による撮影像 (A) と胞子形成率 (B)。胞子形成率のカウントは図 11 の (B) と同様にしておこなった。(C) GST-Spo5C と *mei4* RNA (5'-UTR, 5'-UTR+ORF, ORF, ORF+3'-UTR, 3'-UTR) をもちいたゲルシフトアッセイ。図 11 の (D) と同様にしてアッセイをおこなった。(D) RIP アッセイによる Spo5-GFP と共沈する mRNA の検出。図 11 の (E) と同様の方法で、*mei4* mRNA を検出した。コントロールとして減数分裂期に発現する *atf1* mRNA をもちいた。 Scale bar = 5μm, Error bar = Standard Deviation

1-14. Spo5 の機能は Mes1 を介しても発揮される

これまでの解析で、減数分裂過程における Cdc13 の発現が様々なレベルで、複数の因子によって制御されていることが示唆された。序章で述べたように、Cdc13 は APC/C によって細胞周期に依存した分解を受ける（分裂後期に分解される）が、減数第一分裂と第二分裂の間では Mes1 が APC/C の活性を一部ブロックすることで、Cdc13 の完全な分解を防ぐ[27]。*mes1Δ*では *spo5Δ*同様に減数第二分裂の進行に異常があるため、Cdc13 の発現量をタンパク質レベルで制御する Mes1 も Spo5 と関係する可能性があるかと推測された。

Mes1 が Spo5 の機能と関連している可能性を確かめるため、胞子形成を指標とする遺伝学的な解析をおこない、つづいて Spo5 が *mes1* mRNA に結合するかを検討した。Mes1 の過剰発現は各 *spo5* 変異体の胞子形成不能あるいは低下を抑圧した (図 17A)。Pcr1 を過剰発現した時の傾向 (図 11B) と違い、Mes1 の過剰発現では各変異体での胞子形成率に大きな差はみられなかった。次に、ゲルシフトアッセイと RIP アッセイにより、Spo5 が *mes1* mRNA と *in vitro* および *in vivo* で相互作用することを明らかにした (図 17B, C)。これらの結果は、Spo5 が *mes1* mRNA と結合し、Mes1 が Spo5 の機能と関連していることを示唆する。

本研究ではさらに、*mes1Δ* 株および *spo5Δ* 株において様々なプロモーター下で Cdc13 を過剰発現させ、Cdc13 の発現制御に関して Mes1 と Spo5 で機能的なオーバーラップがあるかを検討した。*nmt81* プロモーターで Cdc13 を過剰発現させると *spo5Δ* の胞子形成不能は抑圧できたが、*mes1Δ* は抑圧できなかった。一方、*mes1* プロモーターで Cdc13 を過剰発現させた場合は、*spo5Δ* は抑圧できなかったが、*mes1Δ* は抑圧できた (データは示さない)。以上の結果をまとめると、Mes1 と Spo5 では Cdc13 の発現制御に違いがあるものの、Spo5 の機能は Mes1 がその一部を担っていると推測された (後述)。

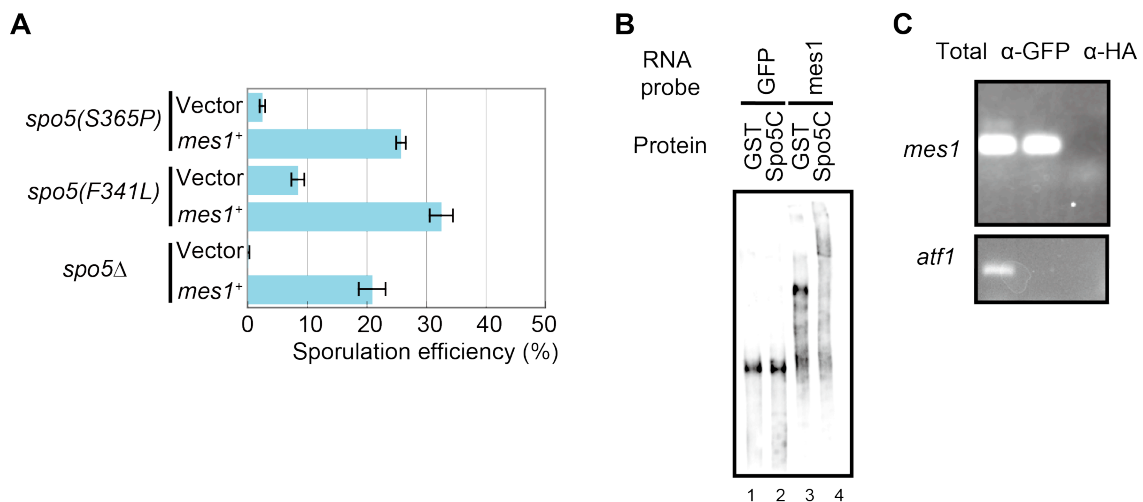


図 17. Spo5 は Mes1 を介して胞子形成を誘導する

(A) Mes1 を過剰発現した時の各 *spo5* 変異体の胞子形成率。胞子形成率は、図 11 の (B) と同様にカウントした。(B) GST-Spo5C と *mes1* RNA 全長 (5'-UTR+ORF+3'-UTR) をもちいたゲルシフトアッセイ。図 11 の (D) と同様にしてアッセイをおこなった。(C) RIP アッセイによる Spo5-GFP と共沈する mRNA の検出。図 11 の (E) と同様に、*mes1* mRNA を検出した。コントロールとして減数分裂期に発現する *atf1* mRNA をもちいた。Error bar = Standard Deviation

1-15. 1 章の考察

本研究で、Spo5 の核外移行の機構とその意義が明らかになった。最初に、RRM とそこに含まれる 2 つのフェニルアラニンが Spo5 の局在制御と正常な機能の両方の役割を担っている (図 5) という興味深い知見を見出した。Kasama らの先行研究では、Spo5(F341A, F427A)-GFP は細胞質と核にわたって点状に局在すると報告されており[20]、核に蓄積するという本研究での観察結果とはやや異なっていた。この違いの原因は、Kasama らは内在性の *spo5*⁺ 遺伝子領域とは別の領域から変異型 Spo5-GFP を発現させていたが、本研究では内在性の *spo5*⁺ 遺伝子領域から発現させていたことにあると考えられる。

つづいて、Spo5 が Rae1 を介した mRNA 輸送経路で核外移行し、細胞質で機能していることを示した (図 8, 9)。近年、ハエの RAE1 がオスの減数分裂および精子形成に必須の役割を果たすことが明らかにされている[54]。このことから、分裂酵母の Rae1 も、減数分裂の進行と配偶子である胞子の形成に関与している可能性が高い。さらに、mRNA に依存した RNA 結合タンパク質の核外移行は他の生物でも見られる現象であって[55-57]、このような機構が真核生物全般で広く保存されているのかもしれない。

分裂酵母において、Spo5 以外の RNA タンパク質でも同様の機構が働いている可能性がある。減数分裂期に発現する RRM 型 RNA 結合タンパク質 Mug28 で、RRM に含まれるフェニルアラニンが機能および局在に重要な働きをしていることが明らかにされており[58]、Mug28 も Rae1 に依存して核外移行している可能性がある。また、RRM 型 RNA 結合タンパク質 Crp79/Meu5 は、Rae1 に依存して核外移行するだけでなく mRNA 輸送の補助因子として機能し、減数分裂期に mRNA の安定性を制御するという報告がされている[32, 59]。Crp79 は Spo5 と同様、一般的な mRNA 輸送には関与しないことから、Spo5 も mRNA 輸送の補助因子として、あるいは特異的に結合する mRNA の輸送因子として働く可能性が残されている。これらの知見を総合すると、*rae1-167* 変異体で見られた胞子形成率の顕著な低下は、上記 3 つの因子を含む複数の mRNA 結合タンパク質が核に蓄積したことに起因する可能性が考えられる。今後これらのタンパク質の機能を比較検討することで、減数分裂期に発現する RRM 型の RNA 結合タンパク質の挙動に関して新たな知見が生み出されることが期待される。

Spo5(S365P)-GFP は野生型 Spo5-GFP と同様の局在を示す特徴的な変異型 Spo5 であり (図 5C)、S365 は RNA 結合に関与せずに別の必要な働きをしているのではないかと予想された。実際、図 10A で示すように、Spo5(S365P)-GFP は核移行に異常があることが判明した。Spo5 が核に入れないことでどのような不都合

が起こるのかに関しては、今後検討していく必要がある。前述した通り、Spo5 が特異的に結合する mRNA を輸送している可能性が残されており、Spo5 が核移行する意義と絡んだ興味深い問題である。近年、mRNA の可視化技術が進歩しており[60][61]、本研究で新たに同定した Spo5 のターゲット mRNA の個々の挙動から Spo5 の果たす役割を明らかにできるかもしれない。

本研究では、Spo5 が結合する複数の mRNA 分子も明らかにした。最初に、*spo5Δ* の胞子形成不能を抑圧する多コピー抑圧因子として *pcr1⁺* 遺伝子を単離し、そこから転写される mRNA と Spo5 との結合を、ゲルシフトアッセイおよび RIP アッセイによって示した (図 11)。これらは、Arata が報告した Spo5 が *cdc13* mRNA と結合するという結果[48]の下支えになったと言っても差し支えないだろう。

本研究で構築したゲルシフトアッセイの系は、変異型 Spo5 の RNA 結合能低下と局在異常を結びつけるうえでも役立った。図 12 で示すように RRM2 の欠損では顕著な RNA 結合能の低下が見られ、またデータは示していないが F341A と F427A の両変異によっても RNA 結合能が低下した。これらは、Spo5 が実際に RNA 結合タンパク質として RRM を介して機能していることを示した初めての証拠である。また、変異型 Spo5 が核蓄積した主因は RNA 結合能の低下にあることが実証された。これらの結果から考察すると、*spo5(F341A)* と *spo5(F427A)* で表現型に差がみられた (図 6B) のは、RNA 結合に対する RRM1 と RRM2 の寄与の違いが原因であろう。一方、ゲルシフトアッセイは必ずしも生体内の状況を反映しないこと、部分欠失型の精製 Spo5 (Spo5C) を使用したことが、RRM1 の欠損で RNA 結合能の低下がみられなかった原因かもしれない (図 12C)。Spo5 は RRM を複数持つことで安定的に mRNA と結合できるだけでなく、RRM ごとに mRNA との結合能を変えることで、多くの種類の mRNA との結合を実現している可能性も考えられる。このように、RRM を複数持つ RNA 結合タンパク質で、RRM ごとに mRNA との結合様式が違う例は複数存在する[62, 63]。今後は、RIP アッセイによって野生型と RRM1Δでの RNA 結合能の違いを比較し、RRM1 の RNA 結合への関与の程度を検討することも必要かもしれない。

つづいて、[48]と同様、Spo5 は *cdc13* mRNA と結合することを示し、特に本研究では *in vivo* での結合も確認することができた (図 13A, D)。Spo5 は *cdc13* mRNA の UTR と強く結合すると予想したが、ORF とも結合した (図 13C)。*cdc13* 3'-UTR が *cdc13* mRNA の安定性に寄与している可能性が先行研究で報告されている[49]。今後は、*cdc13* 3'-UTR や *pcr1* 3'-UTR と Spo5 との結合が mRNA の安定性に関与しているかを確認、Spo5 が mRNA に与える影響を評価したい。

本論文の図 13 から導かれる結論として、Cdc13 が Spo5 下流で胞子形成に関

与している可能性を述べた。しかし、Cdc13 の過剰発現が *spo5Δ* 株において胞子形成を誘導した原因として、Cdc13 自身の本来の機能とは無関係である可能性も排除できないため、Cdc13 が実際に胞子形成にどの程度寄与しているかは現在不明である。また、*nmt81* プロモーターからの発現で胞子形成が回復し、それよりも強い *nmt41* プロモーターからの発現では回復しなかった理由も不明である。これらに関しては、この節の最後でまとめて述べる。

本研究の結果の中でも重要度が高いと考えられるのは、Pcr1 が *cdc13⁺* 遺伝子の発現を促進しているという結果であり、減数分裂進行と胞子形成の分子メカニズムの解明につながる一歩となるであろう。図 14D でレポーターアッセイの系でうまく結果が出なかった理由については、いまだ不明である。今後は、2つのプラスミドを導入する系は避けて、細胞間でのプラスミド発現の誤差をなるべく排除し、発現量も調節する。すなわち、*pcr1* 破壊株でレポーターGFP をちょうどよく発現させるアッセイ系を構築し、Pcr1 が CRE 配列を介して転写制御をおこなう可能性をさらに検討したい。また、本研究で得られた新規の *cdc13* 変異体も今後の研究での利用価値があると考えられる。ただし、欠失した *cdc13* 5'領域には他の転写因子が結合できる配列が含まれる可能性が残っている。そのため、CRE 配列あるいは TATA 配列のみをピンポイントで欠損した変異体の作製が急務である。これらの変異体を解析にもちいることで Pcr1 と *cdc13⁺* 遺伝子との関連が明らかになると予想している。また、*cdc13⁺* 遺伝子の転写開始点を厳密に決定することで、より詳細な解析をおこなうことができるだろう。

Spo5 は *mei4*, *mes1* mRNA といった、減数分裂でのみ働く因子の mRNA にも結合していた (図 16, 17)。 *spo5Δ* でみられる多様な表現型は、多数の Middle genes の転写制御に関与する Mei4 の発現異常が原因の一つかもしれない。今後は、Mei4 がどのような遺伝子をターゲットにしているのかを明らかにしていきたい。また、Spo5 と Mes1 はどちらも Cdc13 の発現制御に関与しているが、本研究の結果からその制御の仕方は異なっていると考えられた (本節の最後を参照)。

本研究では Spo5 と複数の mRNA との結合を中心に解析してきた。今後は、野生型株と *spo5Δ* 株をもちいて、Spo5 と結合することが確認された各 mRNA の発現量や、それらがコードするタンパク質の発現量をきちんと押さえておく必要もあるだろう。野生型株と *spo5Δ* 株で *pcr1* mRNA の発現量は差がない、というデータが既に得られている。これをきっかけとして、Spo5 が制御する転写後調節機構の実体に迫りたい。

本節の最後に、いまだ答えていない疑問点についてまとめる。本研究で、Spo5 の機能は Pcr1, Cdc13 や Mes1 を介して発揮される可能性が強く示唆された。ま

た、Cdc13 や Mes1 の発現上昇が胞子形成率の上昇につながるということが認められたが、これらの因子が胞子形成を制御しているとただちに結論づけることはできない。Cdc13 や Mes1 の過剰発現が *spo5Δ* の胞子形成不能を抑圧した原因として、主に二つの可能性が考えられる。

一つ目は、*spo5Δ* では Cdc13 の発現が低くなり CDK 活性が低下した結果、この複合体により制御を受ける因子の挙動が異常となり胞子形成できない可能性である。この場合、Cdc13 や Mes1 の発現によって Cdc13 の発現量低下が補填された結果、胞子形成できたと考えられる。この可能性は、Mes1 の主な機能が Cdc13 の分解抑制にあり、*mes1Δ* で *mes1* プロモーターから Cdc13 を過剰発現すると、Mes1 の時と同程度に胞子形成できたとする観察[27]とも整合する。

二つ目は、Cdc13 や Mes1 の過剰発現によって、本来とは異なる生理条件が出現して胞子形成が進行できた可能性である。CDK 活性が上昇して、基質を過剰にリン酸化する可能性や本来の基質ではない因子をリン酸化する可能性は常に考えておかなければならない。そのような場合、Cdc13 が大過剰に発現すると胞子形成に阻害的になる可能性があり、*nmt41* の結果 (図 13E) はこれが原因かもしれない。実際、分解されない Cdc13 の発現によって胞子形成は人為的に阻害されうる[64]。また、増加した Cdc13 が、APC/C の活性を競合的に低下させて、本来 APC/C によって分解に誘導される胞子形成関連因子の活性が上昇し、その影響が出ている可能性もある。分裂酵母ではこれまで、Cdc13 や Mes1 が APC/C と結合しその基質となることは示されているが、胞子形成に関連する APC/C の基質は知られていない。しかし出芽酵母では、前胞子膜を閉じる過程（細胞質分裂）に関与する Ssp1 が、APC/C の活性化因子でかつ Fzr1 のホモログである Ama1 によって分解へと誘導されることが知られており[65]、分裂酵母でも胞子形成に関与する因子が Fzr1 などによって分解に導かれている可能性は十分にあり得る。出芽酵母の Ssp1 と同様、前胞子膜を閉じる過程に関与する分裂酵母 Meu14[66]は、APC/C による分解誘導の目印となる D-box[67]をもつ。以上より、分裂酵母でも APC/C が胞子形成に関与する可能性が高いと言えよう。

上記の二つの可能性を区別するため、様々な方法で APC/C の不活性化を誘導し、*spo5Δ* の胞子形成不能の抑圧に主に利いているのが Cdc13 の発現レベルであるのか、あるいは APC/C の標的である他の因子であるのかを検討していきたい。このような解析により、減数分裂と胞子形成に関して、Cdc2/Cdc13 複合体と APC/C がどのように寄与しているか明らかになるであろう。APC/C 活性化因子の変異体をもちいた実験の結果については 2 章の最初に掲載した。Cdc13 にリン酸化を受け、胞子形成に関与する因子についても探索するのが望ましい。

1-16. 1 章のまとめ

本研究で得られた成果の一つは、Spo5 が RRM と Rae1 に依存して mRNA 経路で核外移行すること、核外移行は Spo5 の機能に重要であること、そして Spo5 の新規ターゲット mRNA として *pcr1* mRNA を同定したことである。

成果の二つ目は、Spo5 下流で働く各因子の解明をすすめたことである。Spo5 は *pcr1* mRNA に結合するだけでなく、減数分裂進行の制御に中心的役割を果たすサイクリン B をコードする *cdc13* mRNA や、転写因子をコードする *mei4* mRNA、さらには減数第二分裂の進行に必須のタンパク質をコードする *mes1* mRNA に結合することが明らかとなった (図 18A)。これらの因子は全て Spo5 の下流で働くことが遺伝学的解析によって示唆された。Spo5 は *cdc13* mRNA に直接働きかけるだけでなく、Spo5 によって正の制御を受けた Pcr1 が、転写因子として機能して、*cdc13*⁺ 遺伝子の転写を促進していると推測される (図 18B)。Cdc13 の分解を阻害する Mes1 の発現上昇も、Cdc13 の細胞内レベルを上昇させると考えられる。このように、Spo5 は Cdc13 の発現量確保のために、何通りもの方法で寄与していると予想される。

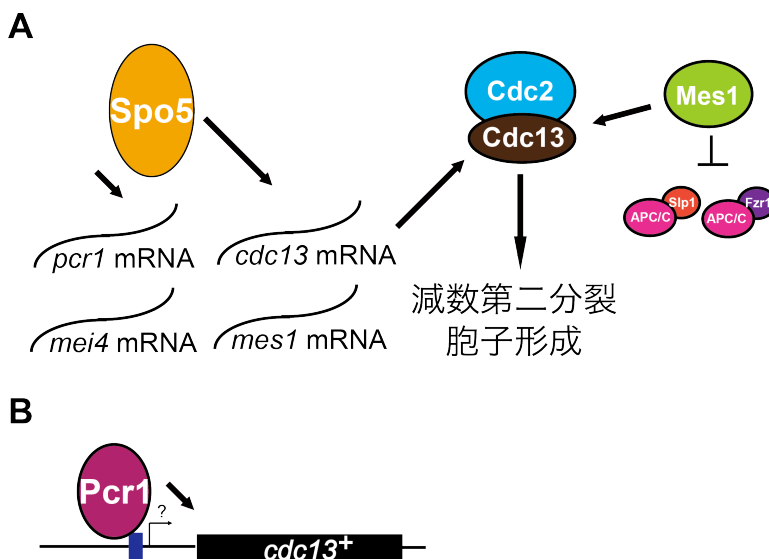


図 18. Spo5 の結合する mRNA とその下流で起こると予想される現象のまとめ

(A) Spo5 は *pcr1*, *cdc13*, *mei4* および *mes1* mRNA と結合する。Spo5 下流でこれらの mRNA から翻訳されたタンパク質が働くことで、さらには Spo5 から直接制御を受けることで、Cdc13 の発現が調節され、減数第二分裂の進行と胞子形成が誘導されることが考えられる。Mes1 は、Slp1 や Fzr1 といった APC/C 活性化因子の働きを抑え、APC/C の活性を低く保つことで Cdc13 の分解を抑制する。(B) Pcr1 は *cdc13*⁺ 遺伝子上流の CRE 配列に結合し、*cdc13* mRNA の転写を促進することで、(A)で述べたような Cdc13 の発現調節の一端に関与していると考えられる。

2 章 ATF/CREB 因子と胞子形成の関連について

2-1. Fzr1 の欠損は *spo5Δ* の胞子形成不能を抑圧する

1 章で Spo5 と Mes1 の関係が見出されたことから、過剰発現によって Mes1 が APC/C の活性を抑制することで *spo5Δ* の胞子形成不能を抑圧したのではないかと考えた。そこで、APC/C の活性化因子の変異体を持ちいて、*spo5Δ* とかけ合わせた時に胞子形成できるかを検討した。減数分裂期に働く APC/C の活性化因子として、Slp1 と Fzr1 が存在し、それぞれ *slp1-362*[27] と *fzr1Δ*[68] の変異体が存在する。[48]ではいずれも *spo5Δ* の胞子形成不能を抑圧しないと結論していたが、本研究では *fzr1Δ* が *spo5Δ* の胞子形成不能を抑圧した (図 19A, B)。先行研究との違いは、胞子形成培地等の条件の違いが原因だろう。この結果は、APC/C 活性の抑制によって *spo5Δ* でも胞子形成できることを示唆している。

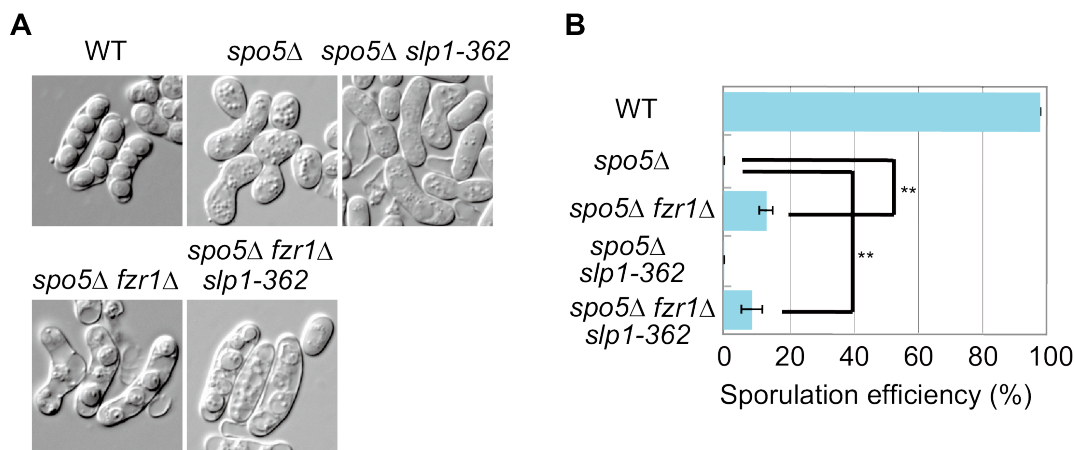


図 19. Fzr1 の欠損により、*spo5Δ* の胞子形成不能は抑圧される

(A) (B) WT, *spo5Δ*, *spo5Δ fzr1Δ*, *spo5Δ slp1-362* および *spo5Δ fzr1Δ slp1-362* を胞子形成させた時の DIC の撮影像 (A) および胞子形成率 (B) を示す。胞子形成率は、図 5 の (B) と同様にカウントした。Scale bar = 5μm, Error bar = Standard Deviation, Student's t-test = * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2-2. Atf1, Atf21 および Atf31 の欠損は *spo5Δ* の胞子形成不能を抑圧する

fzr1Δ では、減数分裂の進行に異常はないが、減数第二分裂後期から終期にかけて Cdc13 の分解に異常があり、減数分裂の完了と胞子壁形成に異常がみられる[28, 64]。 *atf21Δ* は、*fzr1Δ* 同様、減数分裂進行には異常がみられないが、胞子壁形成に異常がある変異体である[33]。また、*atf21+* 遺伝子は ATF/CREB ファミリーに含まれる転写因子の一つをコードする[8]。1 章で、Spo5 と Pcr1 の関係が示唆されたことから、他の ATF/CREB 因子も Spo5 と関連している可能性が考え

られた。そこで、*atf21Δ*をもちいて、*spo5Δ*の胞子形成不能を抑圧するか検討した。その結果、Atf21 の欠損によって *spo5Δ*の胞子形成不能の抑圧がみられた (図 20A)。このとき生成された胞子には野生型よりも小さいものが多くみられた。特に、*spo5Δ atf21Δ*で生成された胞子の多くは、*atf21Δ*の胞子と同様、胞子壁が未熟であった。また、同様にして他の ATF/CREB 因子の破壊による影響を検討したところ、Atf1 や Atf31 の欠損でも *spo5Δ*の抑圧がみられた。胞子形成率は Atf21 の欠損が一番高く、Atf1, Atf31 の順であった (図 20B)。Pcr1 の欠損では胞子形成がみられなかった。胞子の生存率を測定したところ、*spo5Δ atf21Δ*で *atf21Δ*より高い値を示した (*spo5Δ atf21Δ*, 13% vs. *atf21Δ*, 2%)。このことは、*spo5Δ atf21Δ*の胞子は胞子壁形成に異常があるが、同様の形態をもつ *atf21Δ*の胞子よりもストレス耐性が高いことを示唆する。*spo5Δ* 株と *atf21Δ*株のかけ合わせで *atf21Δ*の変異を含む株を選択した時に、その多くが *spo5Δ atf21Δ*株であり *atf21Δ*株が少数であったことは、胞子生存率の観察結果と符合する。

以上より、Pcr1 以外の ATF/CREB 因子の欠損によって *spo5Δ*の胞子形成不能が抑圧されることが分かった。すなわち、Pcr1 は胞子形成を促進する一方で、Atf1、Atf21 および Atf31 は胞子形成を抑制していると推測された。

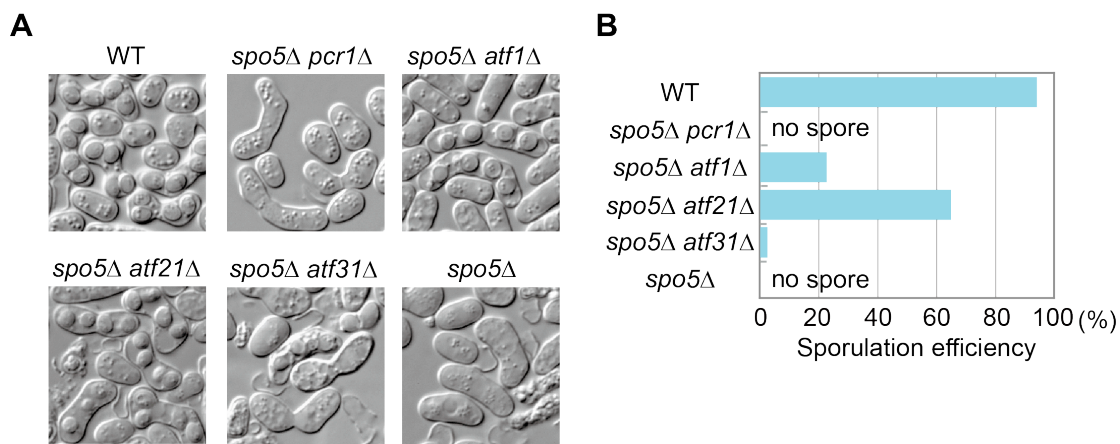


図 20. Pcr1 を除く ATF/CREB 因子の欠損により、*spo5Δ*の胞子形成不能は抑圧される

(A) (B) WT, *spo5Δ pcr1Δ*, *spo5Δ atf1Δ*, *spo5Δ atf21Δ*, *spo5Δ atf31Δ*および *spo5Δ*を胞子形成させた時の DIC の撮影像 (A) および胞子形成率 (B) を示す。胞子形成率は、図 5 の (B) と同様にしてカウントした。 Scale bar = 5μm

2-3. Atf21 と Atf31 の欠損は *mes1Δ*の胞子形成不能を抑圧する

先行研究では、Atf21 と Atf31 を同時に体細胞分裂期の細胞において過剰発現させることで、APC/C の活性化因子 *fcr1+*遺伝子の発現量が増加し、*cdc13+*遺伝

子が低下する結果が得られていた[9]。そのため、*atf21Δ*や*atf31Δ*が*spo5Δ*の胞子形成不能を抑圧した原因は、*atf21Δ*や*atf31Δ*で*fzr1⁺*遺伝子の発現量が低下し APC/C の活性が低下したからか、あるいは*cdc13⁺*遺伝子の発現量が増加したからではないかと推測された。*mes1Δ*では、Cdc13 の過剰発現や Fzr1 の欠損で胞子形成が誘導されることが示されている[27, 68]。そこで、ATF/CREB 因子の欠損で*mes1Δ*を抑圧するかどうか確認した。Atf21 や Atf31 の欠損で*mes1Δ*は低頻度で抑圧されたが、Pcr1 や Atf1 の欠損では抑圧はみられなかった (図 21A)。興味深いことに、*mes1Δ atf21Δ*では4胞子が主に形成されたが、*mes1Δ atf31Δ*では2胞子が主に形成され、その胞子壁の多くは不明瞭であった。これらの表現型は、2胞子や4胞子だけでなく3胞子など不均等な胞子形成をおこなう*mes1Δ fzr1Δ*の表現型とは異なっていた。また、Atf21 や Atf31 の欠損では、Fzr1 の欠損と比べると低頻度で抑圧した (図 21B)。*fzr1⁺*遺伝子の発現低下によって異常な減数第三分裂が起こることが知られている [28]が、*atf21Δ*では起こらなかった (データは示さない)。そのため、*atf21Δ* が*mes1Δ*を抑圧した主な原因は*fzr1⁺*遺伝子の発現量低下以外にある可能性が考えられた。Atf1 の欠損が*mes1Δ*の胞子形成不能を抑圧できなかった原因は不明である。

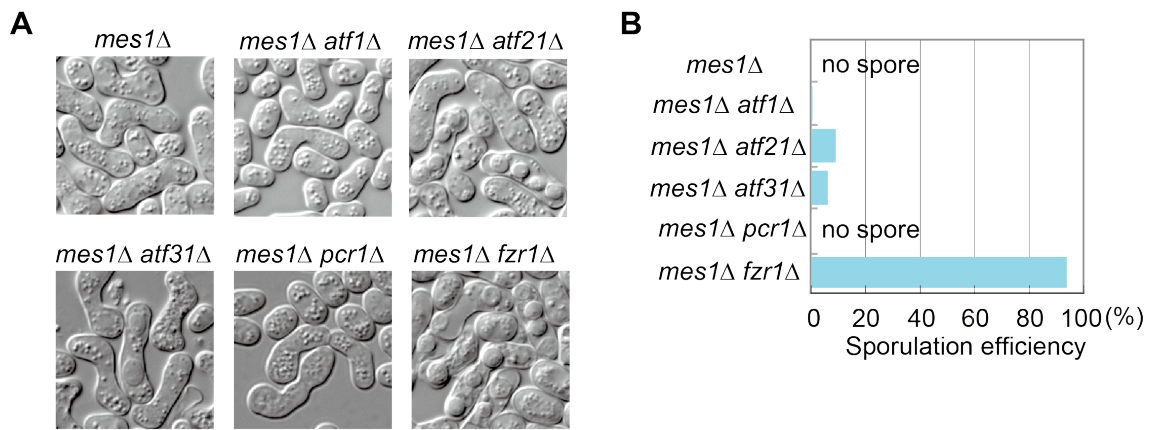


図 21. Atf21 および Atf31 の欠損により、*mes1Δ*の胞子形成不能は抑圧される

(A) (B) *mes1Δ*, *mes1Δ atf1Δ*, *mes1Δ atf21Δ*, *mes1Δ atf31Δ*, *mes1Δ pcr1Δ*および*mes1Δ fzr1Δ*を胞子形成させた時の DIC の撮影像 (A) および胞子形成率 (B) を示す。胞子形成率は、図 5 の (B) と同様にしてカウントした。 Scale bar = 5 μm

2-4. Pcr1 の過剰発現による *spo5Δ*の胞子形成不能の抑圧には、Atf1 や Atf31 は不要である

最後に、*spo5Δ atf1Δ*, *spo5Δ atf21Δ*および *spo5Δ atf31Δ*株で Pcr1 を過剰発現し、

胞子形成率を指標として、Pcr1 とともに *spo5Δ* の胞子形成不能の抑圧に関与する ATF/CREB 因子が存在するか検討した。Pcr1 はヘテロ二量体を形成して働くと考えられてきたからである[35]。*spo5Δ atf1Δ* で Pcr1 を過剰発現すると、接合率および胞子形成率の異常が低頻度で抑圧された (図 22A)。このことは、Pcr1 は Atf1 がなくても接合と胞子形成を制御しうることを示唆する。他方、*spo5Δ atf21Δ* で Pcr1 を過剰発現しても胞子形成率は上昇せず (図 22B)、生成された胞子の形態はコントロールと同様、胞子壁に異常がみられた (図 22C)。このことは、Pcr1 の過剰発現と Atf21 の欠損は、*spo5Δ* の胞子形成不能の抑圧に関して、相加的に作用しないことを示唆している。さらに、*spo5Δ atf31Δ* で Pcr1 を過剰発現すると、胞子形成率が上昇した (図 22D)。この結果から、Atf31 は Pcr1 の機能には必要がないと推測される。

以上より、少なくとも Atf1 と Atf31 に関しては、それらがなくても Pcr1 が過剰に存在すれば *spo5Δ* の胞子形成不能を抑圧できることが明らかとなった。一方、これまでの結果から Pcr1 と Atf21 との機能的な関連は見出されておらず、Atf21 がなくても Pcr1 は機能しうると予想されていた。胞子形成率の測定から、Pcr1 の過剰発現による *spo5Δ* の胞子形成不能の抑圧は、Atf21 の欠損によってその影響が隠されることが分かった。そのため、Pcr1 の下流で Atf21 が働き、Pcr1 と Atf21 が同一経路に関して逆の作用を及ぼしている可能性が考えられた。しかし、*spo5Δ atf21Δ* ではコントロールでも既に高い胞子形成率を示しており、それ以上胞子形成率が上がらないようにみえるだけの可能性も考えられた。

今後は、Atf21 のターゲットに着目し、*spo5Δ* の胞子形成不能を大きく抑圧した理由を探りたい。特に、Atf21 は既に CRE 配列と結合することが示されており[33]、Pcr1 の時と同様にして、そのターゲットを探索することができよう。また、*spo5Δ atf21Δ* で Mes1などを過剰発現することによって、Pcr1 の過剰発現ではこれ以上の抑圧が見られなかった理由を追究したい。さらに、Pcr1 はヘテロ二量体を形成して働いているのか、それともホモ二量体によって働いているのか等、その転写制御機構には謎が残されており、詳細な制御機構を調べる必要がある。

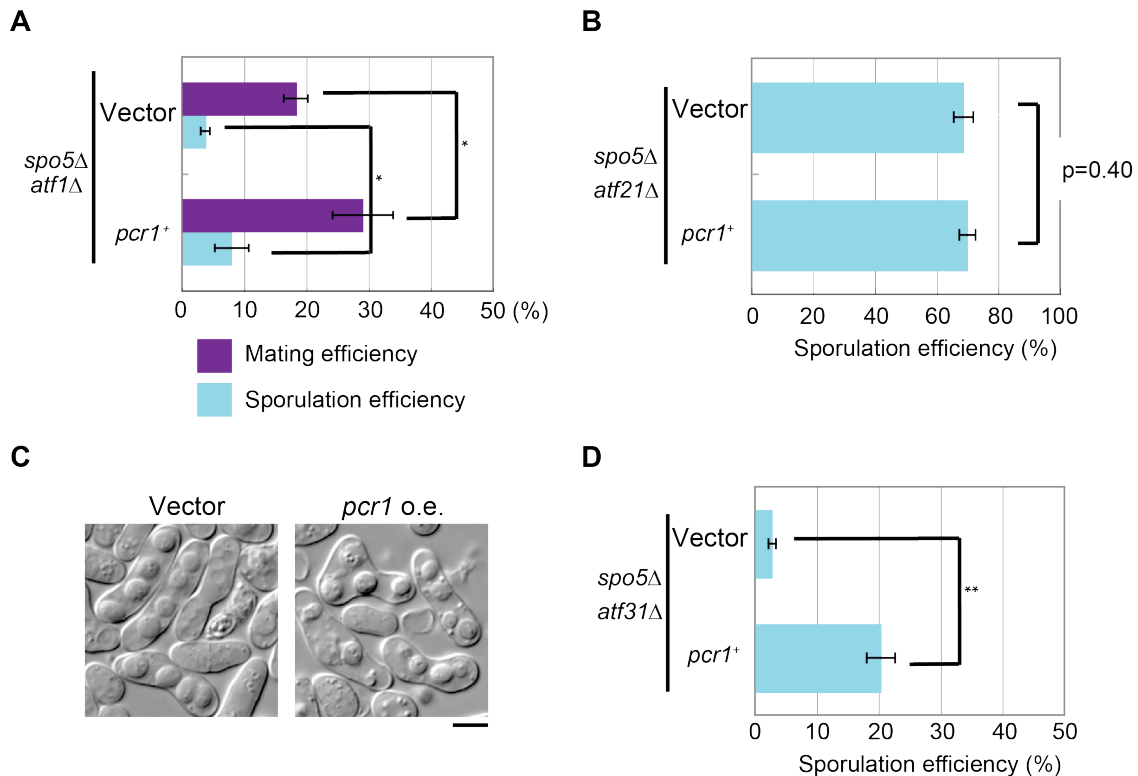


図 22. Pcr1 の過剰発現による *spo5Δ* の胞子形成不能の抑圧に Atf1 および Atf31 は必要ではない (A) Pcr1 を過剰発現した時の *spo5Δ atf1Δ* の接合率と胞子形成率。 (B) (C) Pcr1 を過剰発現した時の *spo5Δ atf21Δ* の胞子形成率 (B)。 *spo5Δ atf21Δ* の DIC の撮影像 (C)。 (D) Pcr1 を過剰発現した時の *spo5Δ atf31Δ* の胞子形成率。胞子形成率はいずれも、図 10 の (B) と同様にしてカウントした。 Scale bar = 5μm, Error bar = Standard Deviation, Student's t-test = * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2-4. 2 章のまとめと考察

Atf1 は Pcr1 とヘテロ二量体を形成して働くと考えられてきた[35]が、*spo5Δ* の抑圧において胞子形成を促進する Pcr1 とは逆の作用を示した。すなわち、Atf1 は胞子形成を抑制すると考えられた。Atf1 と Pcr1 の機能の違いは先行研究で既に指摘されていた[69]が、本研究によって胞子形成に関する機能にも違いがあることが明らかとなった。

今後、本実験でもちいた変異体によって生成された胞子の性状や生存率などを詳細に調べ、ATF/CREB 因子がどのように胞子形成に関わっているかを追究したい。

spo5Δ や *mes1Δ* をもちいた遺伝学的解析により、ATF/CREB ファミリーに属する転写因子である Atf1, Atf21 および Atf31 が胞子形成を抑制することが示唆された。本研究の結果からも示唆されたように、ATF/CREB 因子は一部オーバー

ラップした機能をもつが、それぞれが違う機能を発揮することを示唆する結果も得られている[9, 37, 69]。このことから、減数分裂期においても ATF/CREB 因子は様々な組み合わせではたらくと予想される。また、同じ因子でも転写活性化と抑制化の両方に関与することがしられる[50]。今後は、どのような組み合わせで転写を促進あるいは抑制するかを、減数分裂期ではたらく 4 つの ATF/CREB 因子全てに注目しながら解析を進めていくことが大事である。

先行研究で、分裂酵母では転写因子が段階的に発現し、トランスクリプトームを大きく変化させることで、減数分裂と胞子形成を促進することが示された[9]。この論文で Mata らは、転写因子はその前の段階で発現していた遺伝子の発現を抑制し、次の段階で必要な遺伝子の発現を促進していると指摘した。本研究によって、胞子壁形成を誘導する時に必要な Atf21 が、前の過程である胞子形成過程の開始を抑制する可能性が示唆された。このことは Mata らの主張を支持する。今後、Pcr1 や Atf21 に注目することで、減数分裂期に発現する ATF/CREB 因子の機能が解明され、これまで知られていなかった胞子形成の制御機構が浮き彫りになるであろう。

本研究をまとめると、以下のモデルが考えられる (図 23)。第一章で見たように、Spo5 を介して Mes1 や Cdc13 の発現量が調節される。その一方で、Fzr1 によって活性化された APC/C による Cdc13 の分解が起こることで、減数分裂が正常に完了へと導かれると同時に胞子形成が誘導される。その後、Atf21 を中心とした ATF/CREB 因子が、さらなる胞子形成の誘導を抑制することで胞子壁形成を促進し、成熟した胞子が形成される。今後は、現在のモデルが正しいかを、分子遺伝学的・細胞生物学的解析を含む複数の観点から検討していきたい。

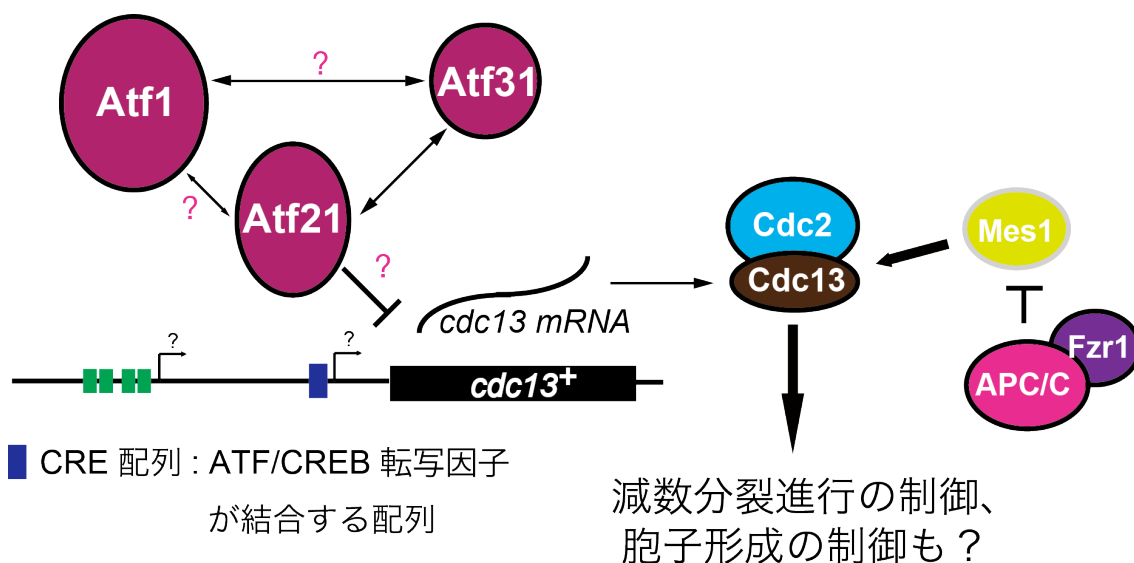


図 23. ATF/CREB ファミリーと APC/C による胞子形成の制御機構

Fzr1 によって活性化された APC/C は、減数第二分裂後期に Cdc13 を完全に分解するように働く。また、Atf21 を中心とした ATF/CREB 因子がさらなる胞子形成の誘導、すなわち前胞子膜の形成を抑制し、胞子壁形成を促進することで、成熟した胞子を形成していると考えられる。

2-5. 減数分裂進行に関与する RNA 結合タンパク質と今後の展望

他の生物の減数分裂では、Spo5 と同様の RNA 結合タンパク質は存在するのだろうか？高等生物では、CPEB1 と呼ばれる RNA 結合タンパク質が Aurora キナーゼによって減数分裂初期に必要な因子の翻訳を活性化する[70]。一方、減数第一分裂前には Cdc2 にリン酸化されて CPEB1 が一部分解されることで、CPEB1 が結合し翻訳を抑制していたサイクリン B mRNA が放出されて翻訳が開始され、減数分裂が進行する[71] (図 24A)。また、出芽酵母の Rim4 と呼ばれる RNA 結合タンパク質は減数第一分裂ではサイクリン B である Clb3 の翻訳を抑制するが、減数分裂特異的に発現する hCDK2 ホモログの Ime2 によってリン酸化されることで減数第二分裂時に発現量が低下する。このことがきっかけとなって翻訳抑制が解除されると、減数第二分裂特異的に Clb3 が翻訳され、減数第二分裂進行と胞子形成が誘導される[13] (図 24B)。このように、RNA 結合タンパク質によるサイクリン B の翻訳抑制と、リン酸化につづいて起こる RNA 結合タンパク質の活性化による翻訳促進あるいは分解による翻訳促進が、減数分裂進行に重要な役割を果たしていることが知られている。

今後の展望として、Spo5 でも同様な翻訳制御機構があるか検討したい。また、Spo5 のリン酸化と機能の関係についても検討したい。本研究では既に、ツーハイブリッドスクリーニングにより、複数の翻訳制御因子を Spo5 の相互作用因子の候補として取得している。また、Spo5 のリン酸化と機能あるいは局在の関連性について予備的なデータを得ている。そのため、Spo5 の相互作用因子やリン酸化が Spo5 の下流で働く因子の発現制御にどのように関与するか、今後十分に検討していきたい。これらの解析によって、減数分裂進行と胞子形成を制御する分子メカニズムの解明が進むことが期待される。さらに、真核生物の減数分裂期にはたらく RNA 結合タンパク質の類似・相違点の比較検討から、これらの RNA 結合タンパク質が制御する分子メカニズムの違いや存在意義が明らかになるであろう。

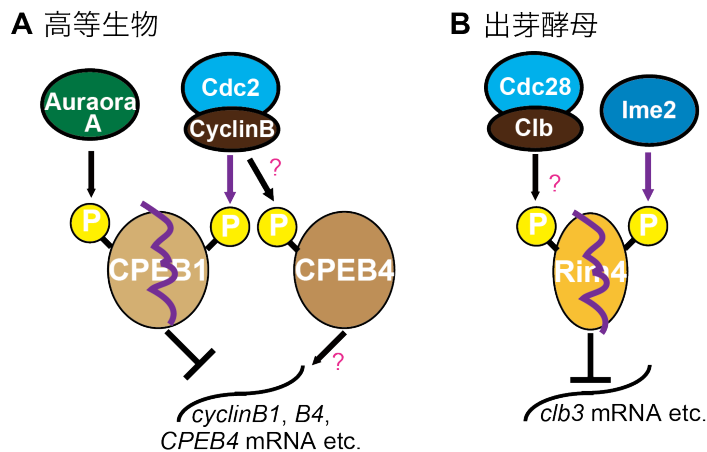


図 24. 減数分裂進行を制御する RNA 結合タンパク質による翻訳制御機構

(A) 高等生物の減数分裂で働く RNA 結合タンパク質。CPEB1 や CPEB4 は時期特異的にサイクリン B や自身の発現を制御し、それぞれ Prophase I から Metaphase I の進行と、Metaphase I から Metaphase II への進行を制御する。CPEB1 は Cdc2 によってリン酸化されると分解へと誘導され、CPEB1 と結合していたサイクリン B などの mRNA の翻訳が促進する。CPEB4 のリン酸化と分解および翻訳制御との関連は不明である。(B) 出芽酵母の減数分裂で働く RNA 結合タンパク質。Rim4 は減数第一分裂にサイクリン B である Clb3 の翻訳を抑制するが、減数第二分裂には Ime2 によってリン酸化されて分解され、翻訳が解除された Clb3 が減数第二分裂の進行と胞子形成を制御する。Rim4 が Cdc28/Clb 複合体によりリン酸化されるかは不明である。

材料と方法

1. 分裂酵母株

本研究でもちいた分裂酵母株とその遺伝子型を方法-表に示した。遺伝子名は”*spo5*”のようにアルファベット3文字と数字1文字をもちいて小文字のイタリック体で表記する。遺伝子アレルを表記する場合は、”*rae1-167*”のように遺伝子名とアレル番号をハイフンでつなぐ。

2. 培地

<大腸菌>

大腸菌の培養は TY (1% polypepton, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7.0) 培地、または LB (1% Bacto Tryptone, 1% Yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7.6) 培地でおこなった。必要に応じて、ampicilin を終濃度 40 μ g/ml (1000 \times)で添加した。

<分裂酵母>

完全栄養培地である YE、最小培地である SD と MM (EMM; Edinburgh minimal medium と呼ばれる)、孢子形成培地である SSA と SPA はそれぞれ標準的な組成に従った[72][90]。SD は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の選択にもちいた。また、チアミンを含有するため、後述する *nmt* プロモーターは抑制される。MM はチアミンを含有しないため、*nmt* プロモーターは脱抑制される。SSA は窒素源が少量含まれているために、細胞が増殖したあとに接合および孢子形成をおこなう。SPA は窒素源を全く含まないため、細胞は直ちに接合および孢子形成をおこなう。必要に応じて、アデニン (50 μ g/ml)、ウラシル (50 μ g/ml)、ロイシン (100 μ g/ml)、ヒスチジン (50 μ g/ml)、リジン (50 μ g/ml)、アルギニン (100 μ g/ml) を加えた。

YE は、上記6種類の栄養素のうちアルギニンを除く5種類を加えた YE5S を標準的にもちい、本論文では YE5S を単に YE と呼ぶことにした。ただし、二倍体細胞を YE で培養する場合は、上記6種類の栄養素のうちアデニンとアルギニンを除く4種類を加えた YE4S をもちいた。*kan^R*, *hph^R*, *nat^R*, *bsd^R* 遺伝子挿入株の選択時には、YE プレートにそれぞれ G418 (Roche; 100 μ g/ml)、ハイグロマイシン B (和光純薬; 100 μ g/ml)、clonNAT (Werner BioAgents; 100 μ g/ml)、ブラストサイジン S (フナコシ; 30 μ g/ml) を加えたものをもちいた[73, 74]。また、ウラシル要求性株を選択する際には、YE プレートに 5-フルオロチン酸 (5-FOA、和光純薬; 1mg/ml) を加えた。

＜出芽酵母＞

出芽酵母の培養は、酵母生育培地である YPD (1% Yeast extract, 2% Bacto Peptone, 2% Glucose) と、最小培地である SD (0.67% Yeast nitrogen base w/o Amino Acid, 2% Glucose, CSM 4-Amino Acid Dropout Mixtures: CSM-His-Leu-Trp-Ade) でおこなった。必要に応じて、アデニン (50 μ g/ml)、ロイシン (50 μ g/ml)、ヒスチジン (50 μ g/ml) を加えた。

3. 組換え DNA 操作

一般的な組換え DNA 操作は標準的なプロトコールに従った[75]。分裂酵母からの DNA 大腸菌の形質転換は 18°C 法[76]およびエレクトロポレーション法によりおこなった。大腸菌株は XL1-Blue, DH5 α または BL21 をもちいた。プラスミドベクターとして、pUC119 (Stratagene), pGEX-KG (Stratagene) および TOPO TA ベクター (invitrogen) をもちいた。部位特異的に変異を導入する場合は、PrimeSTAR Mutagenesis basal kit (タカラバイオ) をもちいた。塩基配列の決定は ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) をもちいておこなった。

4. 分裂酵母の一般的な取り扱いと遺伝学的手法

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[91]。分裂酵母の胞子は胞子壁にアミロース様の多糖類を蓄積するため、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。

形質転換は酢酸リチウム法に従った[77]。細胞は対数増殖期に入るまで培養し (1.0 $\times 10^7$ cells/ml を超えない程度を目安とした)、遠心集菌したあと、酢酸リチウム/TE 溶液 (0.1M 酢酸リチウム pH7.5、10mM Tris-HCl pH7.5、1mM EDTA pH8.0) に懸濁した。懸濁液を 0.1ml ずつマイクロチューブに分注し、DNA (0.1~1mg)、ニシン DNA および酢酸リチウム/TE 溶液に終濃度 40% (w/v) で溶解したポリエチレングリコール(#4000) を 260 μ l を添加して 25°C または 30°C で 1 時間以上培養した。その後、42°C で 5~15 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。必要であれば、熱ショック後に適当な培地で 30 分~1 時間培養し、細胞のリカバリーをおこなった。

分裂酵母からの DNA の調製は以下の方法をもちいた。1.5~5ml の適当な培地で培養した細胞を遠心集菌し、細胞を 0.2ml の breaking buffer (2% Triton X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA)、0.3g のグラスビーズ

($\phi=0.5\text{mm}$)、および 0.2ml のフェノール／クロロホルムを加えた。この混合液を、FastPrep（フナコシ）をもちいて Speed5 で 10 秒間激しく攪拌して細胞を粉碎した。攪拌後、0.2ml 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。1ml のエタノールを加えて -20°C で静置して DNA を沈降させた。エタノールを除去して風乾したあと、滅菌水に溶解して DNA 溶液とした。

ホモタリック h^{90} 株の細胞を接合、減数分裂、孢子形成へ誘導するためには、YE で培養した細胞を滅菌水で 1 回洗い、等量のロイシン・ウラシル混合液（それぞれ、20mg/ml と 2.5mg/ml）に懸濁して SPA（アデニンを $50\mu\text{g/ml}$ 添加）上にスポットした。30°C 24h または 25°C 24h で培養したのち、細胞の接合率・孢子形成率の測定にもちいた。あるいは SSA にひきのぼし、接合、減数分裂、孢子形成へ誘導した。30°C 3 日間または 26.5°C 4 日間で培養した。*rae1-167* 変異体では、25°C 6h で培養し、さらに 36°C 3h で培養したのちに観察した。その後、36°C 15h で培養し孢子形成率を測定した。減数分裂をおこなう細胞のライブセルイメージングをおこなう場合は、SPA 上で 30°C 9h 培養した細胞をもちいた。

交配の際には *ade6* 変異をマーカーとしてもちいた。アデニン要求性変異である *ade6-M216* 変異と *ade6-M210* 変異は同一遺伝子座の変異であるが、相補し合い、この二つのアレ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）。*ade6-M216* 変異を持つ株と *ade6-M210* 変異を持つ株とを交配し、アデニン非要求性の細胞を選択することで容易に 2 倍体を得ることができる。この 2 倍体を SPA プレート上で培養して孢子を形成させ、アデニンを抜いた SD プレート上で生育させることで 2 倍体を得た。

ランダム・スポア分析は、細胞を破壊して孢子だけを抽出したあと、適当な培地にまいて目的の子孫細胞を選択する方法である。株同士のかけ合わせなどによくもちいられる。孢子形成しているプレート上の細胞をかき取り、滅菌水に懸濁したあと、カタツムリから抽出した消化酵素グルスラーゼ（NEN）により孢子嚢を溶解し、遊離の孢子とした。99.9%エタノールを適量入れて 5 分静置し、グルスラーゼとエタノールを除いて滅菌水で孢子を洗浄した。最後に、適量の滅菌水に懸濁し、適当な培地に孢子をまいた。孢子生存率の測定には、ランダム・スポア分析をもちいた[78]。SPA プレート上で目的の細胞をスポットし、30°C 24h で培養したあと、グルスラーゼ処理を 1h おこなった。孢子の数は顕微鏡でカウントし、それらをアデニン入りの YE プレートにまいて 25°C で 5~6 日置いたあと、コロニー数をカウントした。「コロニー数／まいた孢子の数」を求めることで、孢子生存率を算出した。

四分分子分析（テトラド）は、親株によって形成された四つの孢子（一つの子

囊に一つ含まれる) を一つ一つ顕微鏡下でガラス針をもちいて分離し、それらの表現型を観察する方法である。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観察が可能である。また、遺伝子破壊株を単離する際にももちいた。

5. 分裂酵母株の作製とプラスミド DNA

選択マーカー遺伝子カセットをもちいた遺伝子破壊株、融合タンパク質発現株の作製には、PCR に基づく標準的な遺伝子ターゲティング法をもちいた[74, 79, 80]。 *spo5-GFP* 株 (*spo5* 変異体を含む) の作製には pFA6a-GFP-KanMX プラスミドを、 *cdc13 TATA'Δ*, *cdc13 5'Δ*, *cdc13 FLEXΔ*, *atf21Δ* および *atf31Δ* 株の作製には pFA6a-ura4 プラスミドをもちいた。

pREP1 はチアミンで抑制される *nmt1* プロモーターを持ち、その下流にマルチクローニングサイトが存在する[81]。マーカー遺伝子として出芽酵母 *LEU2* 遺伝子を持つため、ロイシンを除去した培地で pREP1 を保持した株を選択することが可能である。また、大腸菌ベクター pUC119 を元に作製されており、大腸菌内でも複製されることに加え、分裂酵母由来の自立複製配列 (*ars1*) を持つので分裂酵母内でも複製できる。Atf1, Atf21 および Atf31 の過剰発現は細胞周期進行に異常を生じさせることから、pREP1-*atf1*, pREP1-*atf21* および pREP1-*atf31* の *nmt1* プロモーターを *nmt81* プロモーターと交換した。pREP1-*atf1*, pREP1-*atf21* および pREP1-*atf31* は山田貴富博士から分与して頂いた。また、Cdc13 の過剰発現も細胞に悪影響を与えるため、*cdc13* の発現には *nmt41* プロモーターと *nmt81* プロモーターを持つ pREP41 と pREP81 をもちいた。pREP41-*cdc13* は新井邦夫博士に、pREP81-*cdc13* は新真由美氏からそれぞれ分与して頂いた。pREP41 と pREP81 では、*nmt1* プロモーターの TATA ボックスに変異が導入されることにより発現が抑制されている。pREP1 に比べて、pREP41 の発現量は約 1/6、pREP81 では約 1/80 に低下する[82]。減数分裂期における過剰発現を達成するため、*mei4⁺* 遺伝子あるいは *mes1⁺* 遺伝子のプロモーター領域[27, 30]を pREP1 の *nmt1* プロモーターと交換し、マルチクローニングサイト下流に *mei4-DSR* (determinant of selective removal) 配列[83]を融合させた DNA 断片をもちいた。これらは先行研究でももちいられた[48]。pDB-*mes1* は山本研究室でのスクリーニングによって単離された。Spo5 と Pcr1 の過剰発現にもちいたプラスミドは、スクリーニングによって単離された pREP3-*spo5*, pREP3-*pcr1* をもちいた。本研究でもちいた pREP3 のプロモーター配列には異常があるとされており、通常の *nmt1* プロモーターよりも活性が落ちていると考えられる。

6. 新規 *spo5* 温度感受性変異株の単離

spo5 温度感受性変異株のスクリーニングをおこなった。PCR 変異導入法をもちいて、*spo5* の ORF と GFP との融合遺伝子および選択マーカーとなる G418 耐性遺伝子を含む配列を増幅した。この PCR ではサイクル数を通常より多い 40 サイクルとすることでランダムな点突然変異を誘発しやすくした。次に、増幅した PCR 産物を野生株に導入して、変異を含む *spo5*-GFP 断片を染色体に組み込んだ。G418 耐性を示す約 2,000 コロニーを選択した後、ヨウ素染色法により 32°C に置いた SSA プレート上で孢子形成能を示さない 153 コロニーを選択した。その後、蛍光顕微鏡で GFP の蛍光シグナルを観察し、GFP が発光する、すなわち *spo5* が全長を保持している 50 株を選別した。さらに、25°C では孢子形成能があるが、32°C ではない温度感受性株を選択したところ、17 株が選ばれた。最終的に配列解析を行い、重複する株を省いて、14 株の新規 *spo5* ミスセンス変異体を取得した (図 4)。また、14 株から発現する変異型 Spo5 は全て RRM にミスセンス変異を持っていた。

7. *spo5* 変異体の孢子形成不能を多コピーで抑圧する因子の探索

spo5 変異体の孢子形成不能を多コピーで抑圧する因子のスクリーニングをおこなった。減数分裂期の細胞から抽出した RNA をもとに合成された cDNA ライブラリーを、*spo5* ミスセンス変異体である *spo5*(S365P)に導入した。孢子形成培地である SSA プレートにおいて生育した形質転換体のうち、孢子形成能を回復したコロニーを選択した。孢子形成の有無は、ヨウ素染色法をもちいて判別した。形質転換体から抽出したプラスミドを増やしたあと、挿入された遺伝子断片の塩基配列の一部を決定し、BLAST 検索により分裂酵母の対応する遺伝子を同定した (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。取得した因子のうち、3 クローンで *pcr1*⁺遺伝子が含まれていた。*pcr1*⁺遺伝子を含むクローンで *spo5*(S365P) を再形質転換し、孢子形成が回復することを確認した。*pcr1*⁺遺伝子は過去の類似したスクリーニングにより、*spo5* 変異体の孢子形成不能を抑圧する多コピー抑圧因子として単離された[34]。

8. 人工的な核局在配列 (NLS; Nuclear localization signal) と核外移行配列 (NES; Nuclear export signal) の利用

NLS は SV40 の Large T antigen に由来する PKKKRKV のアミノ酸をコードする配列をもちいた[84]。NES は HIV-1 Rev に由来する ILPPLERLTL のアミノ酸をコードする配列をもちいた[85]。

9. 核外移行を阻害するエクスポートイン阻害剤 LMB

分裂酵母のタンパク質核外移行は Crm1/exportin によって制御される[86]。Crm1/exportin システムを阻害する薬剤として LMB（レプトマイシン B）が知られており[87]、本研究では Spo5 がエクスポートイン依存的に核外移行するか検討するためにもちいた。100ng/ml で LMB を加え、30°C で 60 分培養したあと、細胞を固定して顕微鏡で Spo5 の局在を観察した。コントロールとして、エクスポートイン依存的に核外移行する Mei2[45]の局在を観察した。

10. 蛍光顕微鏡による観察

ライブセルイメージングは DeltaVision-SoftWoRx system (GE Healthcare) をもちいておこなった[79]。レクチンであらかじめコートしたガラスボトムディッシュ（松浪硝子）に減数分裂をおこなう細胞をマウントし、ディッシュ内を MM-N 液体培地で満たした。Z 軸に沿った一連の断面図として得られた観察像は、SoftWoRx の”quick projection”アルゴリズムをもちいてスタックさせた。DIC（微分干渉顕微鏡）の観察像は、Axioplan2 蛍光顕微鏡 (Zeiss) を Slidebook software (Leeds Precision) で操作することによって得た。

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

遠心集菌により細胞を回収し、100 μ l の滅菌水に懸濁したあと、10 μ l のホルムアルデヒドをくわえて 10 分間静置して細胞を固定した。遠心によりホルムアルデヒドを除去したあと、PBS buffer (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM phosphate) で細胞を洗浄した。適当量の PBS に懸濁し、細胞懸濁液 1 μ l と DAPI 溶液 1 μ l (10 μ g~100 μ g/ml)を混合してサンプルとし、顕微鏡で観察した。

12. GST 組換えタンパク質の大腸菌からの精製

大腸菌で GST を融合した精製タンパク質を発現するため、*spo5*⁺遺伝子の C 末端領域である *spo5*(192-567)を pGEX-KG プラスミドの NcoI/HindIII サイトに挿入した。同様にして、RRM1 あるいは RRM2 を欠失した *spo5*(192-567)をクローニングした。また、GST-Pcr1 は先行研究で作製されていたものをもちいた [34]。タンパク質の精製は、以下のおこなった。上記のプラスミドをもちいて BL21 を形質転換した。先に予備実験をおこない精製タンパク質の発現が良かったコロニーを、ampicilin の入った 2 \times YT 液体培地をもちいて、37°C で適当な濃度になるまで培養した。0.2mM IPTG (Novabiochem) を加えて 3 時間 25°C で培養して発現を誘導した。4°C で細胞を回収し、PBS buffer で 1 度洗ったあと、5ml PBS

+ 3% NP40, 10mM DTT, 1mM PMSF, 1/6 tablet Complete (Roche) に懸濁して超音波処理 (Branson Sonifier® Cell Disruptor) によって細胞を破碎した。遠心処理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。Poly-Prep Chromatography Column (BIO-RAD) に充填して、PBS buffer で 2 回洗ったあと、1ml の L-Glutathione 溶液 (50mM Tris-HCl pH8.0, 3mg/ml L-Glutathione) をもちいて溶出した。

13. RNA ゲルシフトアッセイ

タンパク質は前述した方法で大腸菌から精製したものをもちいた。一方、RNA は DIG RNA Labeling kit (SP6/T7) (Roche) をもちいて、*in vitro* で合成した。RNA の濃度は、NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific)によって定量した。

RNA 結合反応は、2ng の DIG ラベルされた RNA と精製タンパク質を必要量用意し、先に 4 μ l の modified KNET buffer (20mM KCl, 80mM NaCl, 2mM ethylene glycol bis-(2-aminoethylether) tetraacetic acid (EGTA)、50mM Tris-HCl (pH7.5)、0.05% NP-40、1mM MgCl₂、2mM dithiothreitol、20% glycerol、滅菌水) と 0.5 μ l の RNase Inhibitor (Roche) を混合した溶液を調製しておこなった。コントロールの RNA プローブとして GFP のコード領域をもちいた。サンプルは 10 μ g の Carrier E.coli tRNA とともに室温で 25 分間インキュベートしたあと、RNA プローブを加えて室温でさらに 25 分間インキュベートした。つづいて、0.5 \times TBE Buffer を泳動バッファーとして、ポリアクリルアミドゲルをもちいてサンプルを電気泳動した。泳動後、ゲルをナイロンメンブレンである GeneScreen Plus (NEN) にトランスファーした。メンブレンを風乾させたあと、80°C で 2 時間ベーキングした (あるいは、風乾する前に Spectro Linker XL-1000 UV crosslinker (Spectronic Corp.) をもちいてクロスリンク処理をおこなった)。DIG Wash and Block Buffer Set (Roche) をもちいて、メンブレンを洗浄・ブロッキングした。シグナルは DIG Luminescent Detection Kit (Roche) をもちいて検出した。

14. RNA 免疫沈降と RT-PCR

Spo5-GFP を発現する二倍体を YE4S で一晩培養したあと、MM+N に移して 30°C で 15h 以上培養した。細胞濃度は 5 $\times 10^6$ cells/ml になるまで培養したあと、MM-N に移した。MM-N に移し終えて培養を再開した時間を 0h とし、6h 培養したあとに細胞を回収して免疫沈降をおこなった。遠心する前に 1mM の PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) を加えた。遠心集菌した細胞は、STOP solution

(150mM NaCl, 50mM NaF, 10mM EDTA (pH 8.0), 1mM NaN₃) で洗ったあと、液体窒素で凍らせて-80°C で保存した。その後、HB バッファー (50mM Tris-HCl (pH 7.6)、150mM KCl、5mM EDTA、1mM DTT、10% グリセロール、0.2% NP40、20mM β -glycerophosphate、0.1mM Na₃VO₄、15mM p-nitrophenyl phosphate、1mM PMSF) とガラスビーズ 0.3g を加えて激しく攪拌 (FastPrep speed6, 10sec \times 2)、遠心し、細胞抽出液を得た。遠心上清のうちの 20 分の 1 を Total サンプルとした。残りの上清を 2 つに分け、GFP 抗体 (Roche、GFP モノクローナル抗体) あるいは HA 抗体 (Abcam、16B12、HA モノクローナル抗体) と、先に調製した Dynabeads protein G (Life technologies) をそれぞれ適量加えて、0°C で 20 分間震盪した。免疫沈降した RNA はフェノール-クロロホルム抽出によって単離した。RT-PCR は TaKaRa RNA PCR kit (AMV, Ver 3.0、タカラバイオ) をもちいて、付属のプロトコールに従っておこなった。

15. ウェスタンブロッティング

RNA 免疫沈降で得られていたタンパク質をウェスタンブロッティングによって検出した。得られたタンパク質調製液に等量の 2 \times SDS PAGE sample buffer (100mM Tris-Cl pH6.8, 4% SDS, 0.2% Bromophenol Blue, 20% Glycerol, 200mM DTT) を加えてよく懸濁し、5 分間加熱して変成させたあと、SDS-ポリアクリルアミドゲル (4-12% gradient Criterion XT Precast Gel, BIO-RAD) で分離した。泳動分離したタンパク質を、Trans-Blot® Turbo (BIO-RAD) をもちいてニトロセルロース膜へと転写した。1 次抗体として、前述の抗 GFP マウスモノクローナル抗体 (1/2000 希釈) をもちいた。2 次抗体には、Horseradish peroxidase を結合させた抗マウス IgG 抗体 (Amersham Biosciences、1/10000 希釈) をもちいた。タンパク質の検出には、ECL Plus Western Blotting System (Amersham Biosciences) をもちいて発光させたルミノールを Image Quant LAS-4000 (GE ヘルスケア・ジャパン) をもちいて検出した。

16. DNA ゲルシフトアッセイ

GST-Pcr1 は Spo5 のときと同様に精製をおこなった。DIG ラベルされた DNA は、DIG Gel Shift Kit 2nd Generation (Roche) のプロトコールに従って調製した。DNA 結合反応は、4 μ l の Binding buffer (100mM Hepes pH7.6, 5mM EDTA, 50mM (NH₄)₂SO₄, 5mM DTT, Tween 20 1% (w/v), 150mM KCl)、poly [d(A-T)] 1 μ l (1 μ g)、poly L-lysine 1 μ l、DIG ラベル DNA オリゴ 1 μ l (4ng)、滅菌水 11 μ l およびタンパク質 1 μ l を混合した溶液を調製しておこなった。コントロールの DNA プローブ

として Oct2A の結合配列をもちいた。サンプルは室温で 15 分間インキュベートしたあと、6%未変成アガロースゲルをもちいて分離し、トランスファーをおこなったあと、RNA ゲルシフトと同様の操作によって検出をおこなった。

17. RNA の調製とノザンブロット解析

ノザンブロット解析は標準的なプロトコールを改変した渡邊らの方法をさらに改変し、DIG をもちいたノザンブロット解析に適した形でおこなった[88, 89]。遠心集菌した細胞にガラスビーズ 0.3g と Solution A (0.5M NaCl、0.2M Tris-HCl (pH 7.5)、0.01M Na₃EDTA (pH 8.0)、1% SDS、滅菌水) 300 μ l および 3M 酢酸ナトリウム溶液 30 μ l を加えて破碎した。上清を取り、フェノール-クロロホルム抽出を 2 度おこなったあと、エタノール沈殿をおこなった。沈殿物に対し、ジエチルピロカーボネート (DEPC) で処理した滅菌水をもちいて懸濁した。RNA は水に溶解しにくいので、Vortex と氷上での静置を 5 分ごとに 3 度繰り返した。つづいて、RNA 溶液の濃度を ARVO MX (PerkinElmer) によって測定した。10 \times MOPS buffer (0.2M MOPS、0.05M 無水酢酸ナトリウム、0.01M EDTA (pH 7.0)、NaOH 2g/l) を調製し、1 \times MOPS buffer で泳動層を浸し電気泳動をおこなった。60 $^{\circ}$ C で 5 分加熱し変成した RNA 5 μ g を含む溶液 (MOPS、ホルムアルデヒド、ホルムアミド、臭化エチジウムを適量含む) にグリセロールを含む loading buffer (大部分がグリセロール、その他に EDTA、ブロモフェノールブルー、キシレンシアノールを適量含む) を加え、1.2%変成アガロースゲル (滅菌水、1.2% 電気泳動用アガロース、10% MOPS、3% ホルムアルデヒド) で電気泳動し、GeneScreen Plus (NEN) にトランスファーした。10 \times SSC バッファー (20 \times SSC: 滅菌水、3M NaCl、0.3M クエン酸三ナトリウム二水和物) に浸した Whatman 3MM 紙 (Whatman) 2 枚を台の上にのせ、その上にゲル、メンブレン、Whatman 3MM 紙 2 枚、ペーパータオル、ガラス板、おもりをのせ、サンドイッチと呼ばれる状態を保持し、キャピラリートランスファーをおこなった。トランスファーを 6h 以上おこなったあと、メンブレンを 2 \times SSC バッファーで洗浄、風乾させ、80 $^{\circ}$ C で 2h ベーキングした。DIG DNA labeling mix (Roche) をもちいて、PCR によって末端を DIG によってラベルされた DNA プローブを合成した。次に、ハイブリダイゼーションバッファー (50% ホルムアミド、20% 滅菌水、10% デキストラン硫酸塩、1% SDS、1M NaCl) によって 42 $^{\circ}$ C で 30 分以上、メンブレンをプレハイブリダイゼーションした。さらに、加熱して変成した DIG ラベル DNA プローブと YeastmakerTM Carrier DNA (Clontech) を急冷し、ハイブリダイゼーションバッファーと混ぜて、42 $^{\circ}$ C でハイブリダイゼーションをおこなった。ハイブリダイゼ

ーションは 16h 以上おこなった。メンブレンの洗浄は、2×SSC バッファーで 5 分洗浄を 2 回、1%SDS 入りの 2×SSC バッファーで 10 分洗浄を 2 回、0.1×SSC バッファーで 5 分洗浄を 2 回おこなった。次に、メンブレンのブロッキングを 30 分以上おこなったあと、DIG 抗体を加え、RNA ゲルシフトと同様のプロトコールに従って検出をおこなった。

方法-表 本研究でもちいた株

1) 大腸菌株

番号	遺伝子型
XL1-Blue	<i>hsdR17, supE44, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1, lac/F'[proAB⁺, lac F⁺, lacZ::M15 Tn10 (tet^r)]</i>
DH5α	<i>F⁻, Φ80d lacZ::M15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rK⁻ mK⁺), phoA, supE44, λ⁻, thi-1, gyrA96, relA1</i>
BL21	<i>F⁻, ompT, hsdSB(rB⁻ mB⁻), gal(λcI 857, ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7gene1), dcm(DE3)</i>

2) 分裂酵母株

番号	遺伝子型	図
JY878	<i>h⁹⁰ ade6-M216 leu1 ura4</i>	1C, 3DE, 6, 15B-D, 19AB, 20AB
JX303	<i>h⁹⁰ atf1::ura4⁺ ade6-M216 leu1 ura4</i>	3D
KA0886	<i>h⁹⁰ spo5::ura4⁺ ade6-M216 leu1 ura4</i>	1C, 10BC, 11BC, 13E, 16AB, 17A
KA1190	<i>h⁹⁰ spo5::bsd ade6-M216 leu1 ura4</i>	15F, 19AB, 20AB
MA89	<i>h⁹⁰ spo5:: ura4⁺::spo5(192-567) ade6-M216 leu1 ura4</i>	1C
YA28	<i>h⁹⁰ mes1::nat ade6-M216 leu1 ura4</i>	21AB
YA1299	<i>h⁹⁰ mes1::nat fzf1::bsd ade6-M216 leu1 ura4</i>	21AB
NT4	<i>h⁹⁰ spo5(S365P)-GFP-kan ade6-M216 leu1 ura4</i>	4, 5D, 7, 10BC, 11AB, 17A
NT7	<i>h⁹⁰ spo5(F278S, V298A, R475G)-GFP-kan ade6-M216 leu1 ura4</i>	4
NT18	<i>h⁹⁰ spo5(F344S)-GFP-kan ade6-M216 leu1 ura4</i>	4
NT32	<i>h⁹⁰ spo5(V207A, I352V, V414A)-GFP-kan ade6-M216 leu1 ura4</i>	4
NT51	<i>h⁹⁰ spo5(V322G)-GFP-kan ade6-M216 leu1 ura4</i>	4
NT92	<i>h⁹⁰ spo5(F341L)-GFP-kan ade6-M216 leu1 ura4</i>	4, 5D, 7, 10BC, 11B, 17A
NT108	<i>h⁹⁰ spo5(N113D, F341L)-GFP-kan ade6-M216 leu1 ura4</i>	4
NT110	<i>h⁹⁰ spo5(F404S)-GFP-kan ade6-M216 leu1 ura4</i>	4
NT129	<i>h⁹⁰ spo5(C353R)-GFP-kan ade6-M216 leu1 ura4</i>	4
NT130	<i>h⁹⁰ spo5(G426E)-GFP-kan ade6-M216 leu1 ura4</i>	4
NT134	<i>h⁹⁰ spo5(D399G, R433C)-GFP-kan ade6-M216 leu1 ura4</i>	4
NT135	<i>h⁹⁰ spo5(F319L)-GFP-kan ade6-M216 leu1 ura4</i>	4
NT144	<i>h⁹⁰ spo5(K73R, H267R, K326E)-GFP-kan ade6-M216 leu1 ura4</i>	4

NT149	<i>h⁹⁰ spo5(I300T, Q524R)-GFP-kan ade6-M216 leu1 ura4</i>	4
NT180	<i>h⁹⁰ spo5-GFP-kan mei2-mCherry-hph ade6-M216 leu1</i>	8B
NT184	<i>h⁹⁰ spo5-GFP-kan ade6-M216 leu1 ura4</i>	5BD, 7, 9A-DF, 10BC
NT196	<i>h⁹⁰ spo5(S365P)-GFP-kan cut11-4mRFP-hph</i> <i>CFP-atb2-nat ade6-M216 leu1 ura4</i>	5C
NT205	<i>h⁹⁰ spo5(1-296)-GFP-kan ade6-M216 leu1 ura4</i>	5B
NT207	<i>h⁹⁰ spo5(1-366)-GFP-kan ade6-M216 leu1 ura4</i>	5B
NT209	<i>h⁹⁰ spo5(1-456)-GFP-kan ade6-M216 leu1 ura4</i>	5B
NT404	<i>h⁹⁰ spo5-GFP-kan cut11-4mRFP-hph CFP-atb2-nat</i> <i>ade6-M216 leu1 ura4</i>	5AC, 8A, 9E
NT648	<i>h⁹⁰ spo5(1-525)-GFP-kan ade6-M216 leu1 ura4</i>	5B
NT716	<i>h⁹⁰ spo5(1-525)-GFP-kan cut11-4mRFP-hph CFP-atb2-nat</i> <i>ade6-M216 leu1 ura4</i>	5A
NT735	<i>h⁹⁰ spo5::ura4⁺::spo5(RRM1Δ, Δ297-366) ade6-M216 leu1 ura4</i>	6
NT737	<i>h⁹⁰ spo5::ura4⁺::spo5(RRM2Δ, Δ385-456) ade6-M216 leu1 ura4</i>	6
NT745	<i>h⁹⁰ spo5(F341L)-GFP-kan cut11-4mRFP-hph CFP-atb2-nat</i> <i>ade6-M216 leu1 ura4</i>	5C
NT798	<i>h⁹⁰ spo5(1-296)-GFP-kan cut11-4mRFP-hph CFP-atb2-nat</i> <i>ade6-M216 leu1 ura4</i>	5A
NT799	<i>h⁹⁰ spo5(1-366)-GFP-kan cut11-4mRFP-hph CFP-atb2-nat</i> <i>ade6-M216 leu1 ura4</i>	5A
NT814	<i>h⁹⁰ spo5(1-456)-GFP-kan cut11-4mRFP-hph CFP-atb2-nat</i> <i>ade6-M216 leu1 ura4</i>	5A
NT973	<i>h⁹⁰ spo5(RRM1Δ, Δ297-366)-GFP-kan ade6-M216 leu1 ura4</i>	5B, 7, 9F
NT974	<i>h⁹⁰ spo5(RRM2Δ, Δ385-456)-GFP-kan ade6-M216 leu1 ura4</i>	5B, 7
NT1001	<i>h⁹⁰ spo5(RRM1Δ, Δ297-366)-GFP-kan cut11-4mRFP-hph</i> <i>CFP-atb2-nat ade6-M216 leu1 ura4</i>	5A, 9E
NT1002	<i>h⁹⁰ spo5(RRM2Δ, Δ385-456)-GFP-kan cut11-4mRFP-hph</i> <i>CFP-atb2-nat ade6-M216 leu1 ura4</i>	5A
NT1168	<i>h⁺/h⁻ spo5-GFP-kan/spo5-GFP-kan ade6-M216/ade6-M210</i> <i>leu1/leu1 ura4/ura4</i>	11E, 13D, 16D, 17C
NT1298	<i>h⁹⁰ spo5::bsd f_{zr1}::ura4⁺ ade6-M216 leu1 ura4</i>	19AB
NT1489	<i>h⁹⁰ spo5::ura4⁺::spo5(F427A) ade6-M216 leu1 ura4</i>	6
NT1490	<i>h⁹⁰ spo5::ura4⁺::spo5(F341L) ade6-M216 leu1 ura4</i>	6
NT1492	<i>h⁹⁰ spo5::ura4⁺::spo5(S365P) ade6-M216 leu1 ura4</i>	6
NT1495	<i>h⁹⁰ spo5::ura4⁺::spo5(F427A)-GFP-kan ade6-M216 leu1 ura4</i>	5D, 7
NT1618	<i>h⁹⁰ spo5::ura4⁺::spo5(F341A) ade6-M216 leu1 ura4</i>	6
NT1620	<i>h⁹⁰ spo5::ura4⁺::spo5(F341A, F427A) ade6-M216 leu1 ura4</i>	6

NT1622	<i>h⁹⁰ spo5::ura4⁺::spo5(F427A)-GFP-kan cut11-4mRFP-hph CFP-atb2-nat ade6-M216 leu1 ura4</i>	5C
NT1632	<i>h⁹⁰ spo5::ura4⁺::spo5(F341A)-GFP-kan ade6-M216 leu1 ura4</i>	5D, 7
NT1634	<i>h⁹⁰ spo5::ura4⁺::spo5(F341A, F427A)-GFP-kan ade6-M216 leu1 ura4</i>	5D, 7
NT1641	<i>h⁹⁰ spo5::ura4⁺::spo5(F341A)-GFP-kan cut11-4mRFP-hph CFP-atb2-nat ade6-M216 leu1 ura4</i>	5C
NT1648	<i>h⁹⁰ spo5::ura4⁺::spo5(F341A, F427A)-GFP-kan cut11-4mRFP-hph CFP-atb2-nat ade6-M216 leu1 ura4</i>	5C
NT1743	<i>h⁹⁰ spo5+NLS-GFP-kan ade6-M216 leu1 ura4</i>	9A-D
NT1769	<i>h⁹⁰ spo5-GFP-kan cut11-4mRFP rae1-167 ade6-M216 leu1</i>	8A, 10A
NT1793	<i>h⁹⁰ pabp-GFP-kan spo5::ura4⁺ cut11-4mRFP-hph ade6-M216 leu1 ura4</i>	8C
NT1898	<i>h⁹⁰ spo5(S365P)-GFP-kan rae1-167 cut11-4mRFP ade6-M216 leu1 ura4</i>	10A
NT1905	<i>h⁹⁰ pabp-GFP-kan rae1-167 cut11-4mRFP-hph ade6-M216 leu1 ura4</i>	8C
NT1922	<i>h⁹⁰ spo5(RRM1Δ)+NES-GFP ade6-M216 leu1 ura4</i>	9F
NT1943	<i>h⁹⁰ spo5(RRM1Δ)+NES-GFP cut11-4mRFP ade6-M216 leu1 ura4</i>	9E
NT2013	<i>h⁹⁰ spo5::bsd cdc13::ura4⁺(cdc13 5'Δ) ade6-M216 leu1 ura4</i>	15F
NT2016	<i>h⁹⁰ cdc13::ura4⁺(cdc13 5'Δ) ade6-M216 leu1 ura4</i>	15A-D
NT2062	<i>h⁹⁰ spo5::bsd slp1-362 ade6-M216 leu1 ura4</i>	19AB
NT2130	<i>h⁺/h⁻ ade6-M216/ade6-M210 leu1/leu1 ura4/ura4</i>	14CD, 15E
NT2185	<i>h⁹⁰ spo5::bsd fcr1::ura4⁺ slp1-362 ade6-M216 leu1 ura4</i>	19AB
NT2280	<i>h⁹⁰ pcr1::ura4⁺ ade6-M216 leu1 ura4</i>	3D
NT2281	<i>h⁹⁰ spo5::bsd pcr1::ura4⁺ ade6-M216 leu1 ura4</i>	20AB
NT2339	<i>h⁹⁰ spo5::bsd atf1::ura4⁺ ade6-M216 leu1 ura4</i>	20AB, 22A
NT2402	<i>h⁹⁰ spo5::bsd atf21::kan ade6-M216 leu1 ura4</i>	20AB, 22BC
NT2412	<i>h⁺/h⁻ cdc13::ura4⁺(cdc13 5'Δ)/cdc13::ura4⁺(cdc13 5'Δ) ade6-M216/ade6-M210 leu1/leu1 ura4/ura4</i>	15E
NT2422	<i>h⁹⁰ atf21::kan ade6-M216 leu1 ura4</i>	3E
NT2450	<i>h⁹⁰ cdc13::ura4⁺(cdc13 TATAΔ) ade6-M216 leu1 ura4</i>	15AB
NT2460	<i>h⁹⁰ spo5::bsd atf31::hyg ade6-M216 leu1 ura4</i>	20AB, 22D
NT2468	<i>h⁹⁰ mes1::nat atf1::ura4⁺ ade6-M216 leu1 ura4</i>	21AB
NT2473	<i>h⁹⁰ mes1::nat atf21::kan ade6-M216 leu1 ura4</i>	21AB
NT2475	<i>h⁹⁰ mes1::nat atf31::hyg ade6-M216 leu1 ura4</i>	21AB
NT2501	<i>h⁹⁰ mes1::nat pcr1::ura4⁺ ade6-M216 leu1 ura4</i>	21AB

※ オリジナルの *rae1-167* 株は Ravi Dhar 博士から頂きました。

結論

Spo5 が RRM を介して、また Rae1 依存的な mRNA 輸送経路によって核外移行することを明らかにした。次に、核外移行が Spo5 の機能に重要な役割を果たすことを示した。さらに、Spo5 が *pcr1* mRNA と結合することを見出した。

Spo5 の結合する mRNA の中で重要なものとして、さらに *cdc13*, *mei4* および *mes1* mRNA を同定した。これらがコードするタンパク質は全て Spo5 下流で働くことが予想された。Spo5 によって制御を受けた Pcr1 は *cdc13*⁺遺伝子のプロモーター領域に結合し、その転写を促進していると推測された。また、Mes1 も Cdc13 のタンパク質の発現量を調節することで、Spo5 の機能の一部を担っていると考えられた。本研究の結果から、Spo5 を含む複数の因子が Cdc13 の発現を制御し、減数分裂の進行と胞子形成を制御していると結論した。

また、Atf1, Atf21 および Atf31 の欠損が *spo5Δ*あるいは *mes1Δ*の胞子形成不能を抑圧したことから、Pcr1 が胞子形成を促進しているが、Pcr1 以外の ATF/CREB 因子は胞子形成を抑制していることを示した。特に Atf21 は、減数分裂終了後にさらなる胞子形成を抑制する一方で、胞子の成熟に必要な胞子壁形成を促進しているタイマー機能をもった転写因子の一種であると考えられた。

謝辞

山本研究室では多くの方が Spo5 に関わっていますが、その全ての方に感謝いたします。特に、渡邊嘉典先生、山下朗博士、辛島健博士、伊澤大介博士、新井邦夫博士、新真由美氏に感謝いたします。上記の方々の先行研究がなければ、本研究が発展し本論文が完成することはあり得ませんでした。また、同期として研究に関する色々な助言をくれた青井勇樹博士に感謝します。

rae1-167 変異体を提供してくださった Ravi Dahr 博士、*pREP1-atf1, atf21, atf31* のプラスミドを提供してくださった山田貴富博士、Pcr1 抗体を提供してくださった Elena Hidalgo 博士に感謝いたします。学会でアドバイスをくださった皆様全員に、この場を借りて御礼を申し上げます。

実験指導からはじまり研究生活に関する助言まで与えてくださった、山本研究室の佐藤政充博士および山下朗博士に感謝いたします。また、様々なマテリアルやアイデア、過ごしやすい研究環境などの恩恵を享受できたことを山本研究室の皆様に感謝いたします。かずさ DNA 研究所に移ってからは、指導教員として本研究を支えてくださった飯野雄一先生に感謝いたします。

自分が挫折しそうになったときや迷惑をかけたとき、ラボセミナーや論文をまとめるときなど、適切な助言と指導をおこなってください、また国内外で研究発表の機会を与えてくださり、最後まで全面的に本研究をバックアップしてくださった山本正幸先生に感謝いたします。

最後に、長い大学院生活を精神的にまた金銭的に支えてくれた家族と、一緒に研究を続けてきた同期の皆様に感謝いたします。

参考文献

1. Musacchio A, Salmon ED: **The spindle-assembly checkpoint in space and time.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, **8**(5):379-393.
2. Watanabe Y: **Geometry and force behind kinetochore orientation: lessons from meiosis.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012, **13**(6):370-382.
3. Kakui Y, Sato M, Okada N, Toda T, Yamamoto M: **Microtubules and Alp7-Alp14 (TACC-TOG) reposition chromosomes before meiotic segregation.** *Nat Cell Biol* 2013, **15**(7):786-796.
4. Ohta M, Sato M, Yamamoto M: **Spindle pole body components are reorganized during fission yeast meiosis.** *Mol Biol Cell* 2012, **23**(10):1799-1811.
5. Akera T, Sato M, Yamamoto M: **Interpolar microtubules are dispensable in fission yeast meiosis II.** *Nat Commun* 2012, **3**:695.
6. Marston AL, Amon A: **Meiosis: cell-cycle controls shuffle and deal.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, **5**(12):983-997.
7. Handel MA, Schimenti JC: **Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility.** *Nat Rev Genet* 2010, **11**(2):124-136.
8. Mata J, Lyne R, Burns G, Bahler J: **The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast.** *Nat Genet* 2002, **32**(1):143-147.
9. Mata J, Wilbrey A, Bahler J: **Transcriptional regulatory network for sexual differentiation in fission yeast.** *Genome Biol* 2007, **8**(10):R217.
10. Chu S, Herskowitz I: **Gametogenesis in yeast is regulated by a transcriptional cascade dependent on Ndt80.** *Mol Cell* 1998, **1**(5):685-696.
11. Chu S, DeRisi J, Eisen M, Mulholland J, Botstein D, Brown PO, Herskowitz I: **The transcriptional program of sporulation in budding yeast.** *Science* 1998, **282**(5389):699-705.
12. Igea A, Mendez R: **Meiosis requires a translational positive loop where CPEB1 ensues its replacement by CPEB4.** *EMBO J* 2010, **29**(13):2182-2193.
13. Berchowitz LE, Gajadhar AS, van Werven FJ, De Rosa AA, Samoylova ML, Brar GA, Xu Y, Xiao C, Futcher B, Weissman JS *et al*: **A developmentally regulated translational control pathway establishes the meiotic chromosome segregation pattern.** *Genes Dev* 2013, **27**(19):2147-2163.
14. Chikashige Y, Ding DQ, Funabiki H, Haraguchi T, Mashiko S, Yanagida M, Hiraoka Y: **Telomere-led premeiotic chromosome movement in fission yeast.**

- Science* 1994, **264**(5156):270-273.
15. Yamamoto M, Imai Y, Watanabe Y: **Mating and sporulation in *Schizosaccharomyces pombe***. *The Molecular and Cellular Biology of the yeast Sacchromyces*, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1997:1037-1106.
 16. Shimoda C: **Forespore membrane assembly in yeast: coordinating SPBs and membrane trafficking**. *J Cell Sci* 2004, **117**(Pt 3):389-396.
 17. Bresch C, Muller G, Egel R: **Genes involved in meiosis and sporulation of a yeast**. *Mol Gen Genet* 1968, **102**(4):301-306.
 18. Nakamura-Kubo M, Nakamura T, Hirata A, Shimoda C: **The fission yeast *spo14+* gene encoding a functional homologue of budding yeast *Sec12* is required for the development of forespore membranes**. *Mol Biol Cell* 2003, **14**(3):1109-1124.
 19. Nakase Y, Nakamura T, Hirata A, Routt SM, Skinner HB, Bankaitis VA, Shimoda C: **The *Schizosaccharomyces pombe spo20(+)* gene encoding a homologue of *Saccharomyces cerevisiae Sec14* plays an important role in forespore membrane formation**. *Mol Biol Cell* 2001, **12**(4):901-917.
 20. Kasama T, Shigehisa A, Hirata A, Saito TT, Tougan T, Okuzaki D, Nojima H: ***Spo5/Mug12*, a putative meiosis-specific RNA-binding protein, is essential for meiotic progression and forms *Mei2* dot-like nuclear foci**. *Eukaryot Cell* 2006, **5**(8):1301-1313.
 21. Nakamura T, Nakamura-Kubo M, Shimoda C: **Novel fission yeast *Cdc7-Dbf4*-like kinase complex required for the initiation and progression of meiotic second division**. *Mol Cell Biol* 2002, **22**(1):309-320.
 22. Nakamura T, Kishida M, Shimoda C: **The *Schizosaccharomyces pombe spo6+* gene encoding a nuclear protein with sequence similarity to budding yeast *Dbf4* is required for meiotic second division and sporulation**. *Genes Cells* 2000, **5**(6):463-479.
 23. Keene JD: **Minireview: global regulation and dynamics of ribonucleic Acid**. *Endocrinology* 2010, **151**(4):1391-1397.
 24. Nurse P, Thuriaux P, Nasmyth K: **Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe***. *Mol Gen Genet* 1976, **146**(2):167-178.
 25. Coudreuse D, Nurse P: **Driving the cell cycle with a minimal CDK control network**. *Nature* 2010, **468**(7327):1074-1079.
 26. Sullivan M, Morgan DO: **Finishing mitosis, one step at a time**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, **8**(11):894-903.
 27. Izawa D, Goto M, Yamashita A, Yamano H, Yamamoto M: **Fission yeast *Mes1p* ensures the onset of meiosis II by blocking degradation of cyclin *Cdc13p***. *Nature* 2005, **434**(7032):529-533.
 28. Aoi Y, Arai K, Miyamoto M, Katsuta Y, Yamashita A, Sato M, Yamamoto M:

- Cuf2 boosts the transcription of APC/C activator Fzr1 to terminate the meiotic division cycle.** *EMBO Rep* 2013, **14**(6):553-560.
29. Abe H, Shimoda C: **Autoregulated expression of Schizosaccharomyces pombe meiosis-specific transcription factor Mei4 and a genome-wide search for its target genes.** *Genetics* 2000, **154**(4):1497-1508.
 30. Horie S, Watanabe Y, Tanaka K, Nishiwaki S, Fujioka H, Abe H, Yamamoto M, Shimoda C: **The Schizosaccharomyces pombe mei4+ gene encodes a meiosis-specific transcription factor containing a forkhead DNA-binding domain.** *Mol Cell Biol* 1998, **18**(4):2118-2129.
 31. Murakami H, Aiba H, Nakanishi M, Murakami-Tonami Y: **Regulation of yeast forkhead transcription factors and FoxM1 by cyclin-dependent and polo-like kinases.** *Cell Cycle* 2010, **9**(16):3233-3242.
 32. Amorim MJ, Cotobal C, Duncan C, Mata J: **Global coordination of transcriptional control and mRNA decay during cellular differentiation.** *Mol Syst Biol* 2010, **6**:380.
 33. Morita T, Yamada T, Yamada S, Matsumoto K, Ohta K: **Fission yeast ATF/CREB family protein Atf21 plays important roles in production of normal spores.** *Genes Cells* 2011, **16**(2):217-230.
 34. Watanabe Y, Yamamoto M: **Schizosaccharomyces pombe pcr1+ encodes a CREB/ATF protein involved in regulation of gene expression for sexual development.** *Mol Cell Biol* 1996, **16**(2):704-711.
 35. Kanoh J, Watanabe Y, Ohsugi M, Iino Y, Yamamoto M: **Schizosaccharomyces pombe gad7+ encodes a phosphoprotein with a bZIP domain, which is required for proper G1 arrest and gene expression under nitrogen starvation.** *Genes Cells* 1996, **1**(4):391-408.
 36. Gao J, Davidson MK, Wahls WP: **Distinct regions of ATF/CREB proteins Atf1 and Pcr1 control recombination hotspot ade6-M26 and the osmotic stress response.** *Nucleic Acids Res* 2008, **36**(9):2838-2851.
 37. Ohmiya R, Kato C, Yamada H, Aiba H, Mizuno T: **Isolation of multicopy suppressors of the calcium sensitivity of a mutant lacking the bZIP transcription factor Atf1 in fission yeast.** *Mol Gen Genet* 1999, **261**(2):297-306.
 38. Shiozaki K, Russell P: **Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast.** *Genes Dev* 1996, **10**(18):2276-2288.
 39. Maris C, Dominguez C, Allain FH: **The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression.** *FEBS J* 2005, **272**(9):2118-2131.
 40. Murphy R, Watkins JL, Wentz SR: **GLE2, a Saccharomyces cerevisiae homologue of the Schizosaccharomyces pombe export factor RAE1, is**

- required for nuclear pore complex structure and function.** *Mol Biol Cell* 1996, **7**(12):1921-1937.
41. Kraemer D, Blobel G: **mRNA binding protein mrnp 41 localizes to both nucleus and cytoplasm.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(17):9119-9124.
 42. Brown JA, Bharathi A, Ghosh A, Whalen W, Fitzgerald E, Dhar R: **A mutation in the *Schizosaccharomyces pombe* rae1 gene causes defects in poly(A)+ RNA export and in the cytoskeleton.** *J Biol Chem* 1995, **270**(13):7411-7419.
 43. Watanabe M, Fukuda M, Yoshida M, Yanagida M, Nishida E: **Involvement of CRM1, a nuclear export receptor, in mRNA export in mammalian cells and fission yeast.** *Genes Cells* 1999, **4**(5):291-297.
 44. Moore MS, Blobel G: **The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus.** *Nature* 1993, **365**(6447):661-663.
 45. Sato M, Shinozaki-Yabana S, Yamashita A, Watanabe Y, Yamamoto M: **The fission yeast meiotic regulator Mei2p undergoes nucleocytoplasmic shuttling.** *FEBS Lett* 2001, **499**(3):251-255.
 46. Thakurta AG, Ho Yoon J, Dhar R: ***Schizosaccharomyces pombe* spPABP, a homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Pab1p, is a non-essential, shuttling protein that facilitates mRNA export.** *Yeast* 2002, **19**(9):803-810.
 47. Wood V, Harris MA, McDowall MD, Rutherford K, Vaughan BW, Staines DM, Aslett M, Lock A, Bahler J, Kersey PJ *et al*: **PomBase: a comprehensive online resource for fission yeast.** *Nucleic Acids Res* 2012, **40**(Database issue):D695-699.
 48. Arata M, Sato M, Yamashita A, Yamamoto M: **The RNA-binding protein Spo5 promotes meiosis II by regulating cyclin Cdc13 in fission yeast.** *Genes Cells* 2014, **19**(3):225-238.
 49. Daga RR, Bolanos P, Moreno S: **Regulated mRNA stability of the Cdk inhibitor Rum1 links nutrient status to cell cycle progression.** *Curr Biol* 2003, **13**(23):2015-2024.
 50. Davidson MK, Shandilya HK, Hirota K, Ohta K, Wahls WP: **Atf1-Pcr1-M26 complex links stress-activated MAPK and cAMP-dependent protein kinase pathways via chromatin remodeling of *cgs2+*.** *J Biol Chem* 2004, **279**(49):50857-50863.
 51. Kim MJ, Kang JH, Park YG, Ryu GR, Ko SH, Jeong IK, Koh KH, Rhie DJ, Yoon SH, Hahn SJ *et al*: **Exendin-4 induction of cyclin D1 expression in INS-1 beta-cells: involvement of cAMP-responsive element.** *J Endocrinol* 2006, **188**(3):623-633.
 52. Zhang X, Odom DT, Koo SH, Conkright MD, Canettieri G, Best J, Chen H, Jenner R, Herbolsheimer E, Jacobsen E *et al*: **Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005,

- 102(12):4459-4464.
53. Nakase Y, Hirata A, Shimoda C, Nakamura T: **Ectopic overproduction of a sporulation-specific transcription factor induces assembly of prespore-like membranous compartments in vegetative cells of fission yeast.** *Genetics* 2009, **183**(3):1195-1199.
 54. Volpi S, Bongiorno S, Fabbretti F, Wakimoto BT, Prantera G: **Drosophila rae1 is required for male meiosis and spermatogenesis.** *J Cell Sci* 2013, **126**(Pt 16):3541-3551.
 55. Burgess HM, Richardson WA, Anderson RC, Salaun C, Graham SV, Gray NK: **Nuclear relocalisation of cytoplasmic poly(A)-binding proteins PABP1 and PABP4 in response to UV irradiation reveals mRNA-dependent export of metazoan PABPs.** *J Cell Sci* 2011, **124**(Pt 19):3344-3355.
 56. Zhang T, Delestienne N, Huez G, Kruys V, Gueydan C: **Identification of the sequence determinants mediating the nucleo-cytoplasmic shuttling of TIAR and TIA-1 RNA-binding proteins.** *J Cell Sci* 2005, **118**(Pt 23):5453-5463.
 57. Cassola A, Frasch AC: **An RNA recognition motif mediates the nucleocytoplasmic transport of a trypanosome RNA-binding protein.** *J Biol Chem* 2009, **284**(50):35015-35028.
 58. Shigehisa A, Okuzaki D, Kasama T, Tohda H, Hirata A, Nojima H: **Mug28, a meiosis-specific protein of Schizosaccharomyces pombe, regulates spore wall formation.** *Mol Biol Cell* 2010, **21**(12):1955-1967.
 59. Thakurta AG, Whalen WA, Yoon JH, Bharathi A, Kozak L, Whiteford C, Love DC, Hanover JA, Dhar R: **Crp79p, like Mex67p, is an auxiliary mRNA export factor in Schizosaccharomyces pombe.** *Mol Biol Cell* 2002, **13**(8):2571-2584.
 60. Eliscovich C, Buxbaum AR, Katz ZB, Singer RH: **mRNA on the move: the road to its biological destiny.** *J Biol Chem* 2013, **288**(28):20361-20368.
 61. Hocine S, Raymond P, Zenklusen D, Chao JA, Singer RH: **Single-molecule analysis of gene expression using two-color RNA labeling in live yeast.** *Nat Methods* 2013, **10**(2):119-121.
 62. Deardorff JA, Sachs AB: **Differential effects of aromatic and charged residue substitutions in the RNA binding domains of the yeast poly(A)-binding protein.** *J Mol Biol* 1997, **269**(1):67-81.
 63. Lunde BM, Moore C, Varani G: **RNA-binding proteins: modular design for efficient function.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, **8**(6):479-490.
 64. Blanco MA, Pelloquin L, Moreno S: **Fission yeast mfr1 activates APC and coordinates meiotic nuclear division with sporulation.** *J Cell Sci* 2001, **114**(Pt 11):2135-2143.
 65. Diamond AE, Park JS, Inoue I, Tachikawa H, Neiman AM: **The anaphase**

- promoting complex targeting subunit Ama1 links meiotic exit to cytokinesis during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 2009, **20**(1):134-145.
66. Okuzaki D, Satake W, Hirata A, Nojima H: **Fission yeast *meu14+* is required for proper nuclear division and accurate forespore membrane formation during meiosis II.** *J Cell Sci* 2003, **116**(Pt 13):2721-2735.
 67. Li M, Zhang P: **The function of APC/CCdh1 in cell cycle and beyond.** *Cell Div* 2009, **4**:2.
 68. Kimata Y, Kitamura K, Fenner N, Yamano H: **Mes1 controls the meiosis I to meiosis II transition by distinctly regulating the anaphase-promoting complex/cyclosome coactivators Fzr1/Mfr1 and Slp1 in fission yeast.** *Mol Biol Cell* 2011, **22**(9):1486-1494.
 69. Sanso M, Gogol M, Ayte J, Seidel C, Hidalgo E: **Transcription factors Pcr1 and Atf1 have distinct roles in stress- and Sty1-dependent gene regulation.** *Eukaryot Cell* 2008, **7**(5):826-835.
 70. Mendez R, Hake LE, Andresson T, Littlepage LE, Ruderman JV, Richter JD: **Phosphorylation of CPE binding factor by Eg2 regulates translation of c-mos mRNA.** *Nature* 2000, **404**(6775):302-307.
 71. Mendez R, Barnard D, Richter JD: **Differential mRNA translation and meiotic progression require Cdc2-mediated CPEB destruction.** *EMBO J* 2002, **21**(7):1833-1844.
 72. Moreno S, Klar A, Nurse P: **Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.** *Methods Enzymol* 1991, **194**:795-823.
 73. Kimura M, Kamakura T, Tao QZ, Kaneko I, Yamaguchi I: **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* 1994, **242**(2):121-129.
 74. Sato M, Dhut S, Toda T: **New drug-resistant cassettes for gene disruption and epitope tagging in *Schizosaccharomyces pombe*.** *Yeast* 2005, **22**(7):583-591.
 75. Bandyopadhyay A, Lakshmanan V, Matsumoto T, Chang EC, Maitra U: **Moe1 and spInt6, the fission yeast homologues of mammalian translation initiation factor 3 subunits p66 (eIF3d) and p48 (eIF3e), respectively, are required for stable association of eIF3 subunits.** *J Biol Chem* 2002, **277**(3):2360-2367.
 76. Inoue H, Nojima H, Okayama H: **High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids.** *Gene* 1990, **96**(1):23-28.
 77. Okazaki K, Okazaki N, Kume K, Jinno S, Tanaka K, Okayama H: **High-frequency transformation method and library transducing vectors for cloning mammalian cDNAs by trans-complementation of**

- Schizosaccharomyces pombe**. *Nucleic Acids Res* 1990, **18**(22):6485-6489.
78. Kakui Y, Sato M, Tanaka K, Yamamoto M: **A novel fission yeast mei4 mutant that allows efficient synchronization of telomere dispersal and the first meiotic division**. *Yeast* 2011, **28**(6):467-479.
 79. Sato M, Toya M, Toda T: **Visualization of fluorescence-tagged proteins in fission yeast: the analysis of mitotic spindle dynamics using GFP-tubulin under the native promoter**. *Methods Mol Biol* 2009, **545**:185-203.
 80. Bahler J, Wu JQ, Longtine MS, Shah NG, McKenzie A, 3rd, Steever AB, Wach A, Philippsen P, Pringle JR: **Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in Schizosaccharomyces pombe**. *Yeast* 1998, **14**(10):943-951.
 81. Maundrell K: **nmt1 of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine**. *J Biol Chem* 1990, **265**(19):10857-10864.
 82. Basi G, Schmid E, Maundrell K: **TATA box mutations in the Schizosaccharomyces pombe nmt1 promoter affect transcription efficiency but not the transcription start point or thiamine repressibility**. *Gene* 1993, **123**(1):131-136.
 83. Harigaya Y, Tanaka H, Yamanaka S, Tanaka K, Watanabe Y, Tsutsumi C, Chikashige Y, Hiraoka Y, Yamashita A, Yamamoto M: **Selective elimination of messenger RNA prevents an incidence of untimely meiosis**. *Nature* 2006, **442**(7098):45-50.
 84. Goldfarb DS, Gariepy J, Schoolnik G, Kornberg RD: **Synthetic peptides as nuclear localization signals**. *Nature* 1986, **322**(6080):641-644.
 85. Wolff B, Sanglier JJ, Wang Y: **Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA**. *Chem Biol* 1997, **4**(2):139-147.
 86. Kudo N, Khochbin S, Nishi K, Kitano K, Yanagida M, Yoshida M, Horinouchi S: **Molecular cloning and cell cycle-dependent expression of mammalian CRM1, a protein involved in nuclear export of proteins**. *J Biol Chem* 1997, **272**(47):29742-29751.
 87. Kudo N, Wolff B, Sekimoto T, Schreiner EP, Yoneda Y, Yanagida M, Horinouchi S, Yoshida M: **Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1**. *Exp Cell Res* 1998, **242**(2):540-547.
 88. Thomas PS: **Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980, **77**(9):5201-5205.
 89. Watanabe Y, Lino Y, Furuhashi K, Shimoda C, Yamamoto M: **The S.pombe mei2 gene encoding a crucial molecule for commitment to meiosis is under**

- the regulation of cAMP. *EMBO J* 1988, 7(3):761-767.**
90. Sherman F, Fink GR, Hicks JB: **Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics.** *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 1986
 91. Gutz H, Haslot H, Leupold U, Loprieno N: **Schizosaccharomyces pombe. In Handbook of genetics.** *Plenum Press* 1974