

論文の内容の要旨

論文題目

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)

氏名 富樫直之

細胞分裂には、体細胞分裂と減数分裂の 2 つの様式が存在する。体細胞分裂は、細胞が増殖するために必要である。一方、減数分裂は、真核生物が卵子や精子、胞子などの生殖細胞を形成するために必要である。減数分裂は、酵母からヒトを含む哺乳類まで真核生物において広く保存されており、その分子メカニズムも生物種間で類似点が多くあると考えられる。しかし、体細胞分裂と比べて減数分裂には不明な点が多い。私は、遺伝学的な解析にすぐれたモデル生物である分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* をもちいて減数分裂を研究した。

分裂酵母では、栄養源飢餓、特に窒素源の飢餓に応答して一倍体細胞どうしが接合し、減数分裂過程へと移行する。減数分裂は、二度の連続した核分裂からなる。核内で減数第二分裂が起こる時期に、細胞質では胞子の細胞膜の前駆体である前胞子膜が形成される。分裂が完了すると胞子壁が形成され胞子が成熟する。

高等真核生物の卵では、サイクリン B などの減数分裂進行に関与する因子の mRNA が翻訳制御を受ける。最近、出芽酵母でも、サイクリン B mRNA の翻訳制御が減数分裂の進行に重要な働きをすることが明らかとなった。そのため、近縁種である分裂酵母の減数分裂においても mRNA の転写後調節は重要な役割を果たすと考えられる。分裂酵母では、減数分裂に必要な mRNA を体細胞分裂期に選択的に除去する Mmi1 システムが存在し、mRNA を不安定化して分解することで、不適切な時期に減数分裂が開始しないように制御をおこなう。しかし、減数分裂の進行や胞子形成が起こる時期にも同様の制御があるかは不明である。

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 に着目した。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。しかし、そのターゲット RNA 分子は未知であった。

先行研究で、Spo5 は RRM (RNA-recognition motif) を 2 つもつ RNA 結合タンパク質であり、C 末端側の 2 つの RRM を含む領域が正常な局在に必要な局在に必要であることが示唆されていた。このことから、RRM が Spo5 の局在制御に必要な働きをしている可能性がある。この可能性を検討するため、本研究ではまず RRM を欠失させた *spo5* 変異体の解析をおこなった。Spo5 に関する概要は図 1 にまとめた。

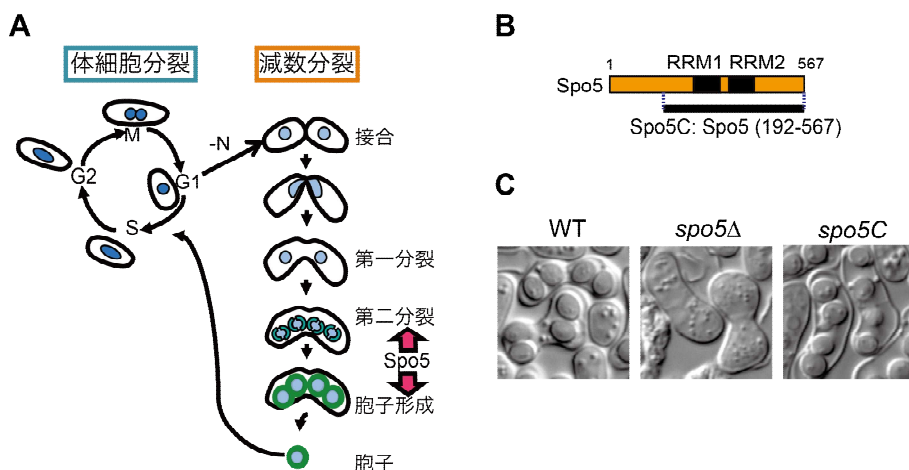


図 1. 分裂酵母の減数分裂と Spo5 の概要。

(A) 分裂酵母の減数分裂と胞子形成。(B) Spo5 タンパク質の構造。C 末端領域 (Spo5C, 192-567) は 2 つの RRM をもつ。(C) Spo5C が Spo5 の機能領域である。*spo5Δ* では胞子形成できない。

1. Spo5 の核外移行の意義とターゲット RNA の同定

野生型 Spo5 は、主に細胞質に局在する。RRM を欠失させた変異型 Spo5 では、機能低下とともに核への異常な蓄積がみられた。このことは、RRM が機能と局在に必須の役割を果たすことを示す。つづいて、先行研究でももちいられた、RNA 結合に関与すると予想されるフェニルアラニン (F) をアラニン (A) に置換した FA 型 *spo5* 変異体を作製したところ、FA 型 Spo5 は核へ蓄積した。以上より、Spo5 は RNA 結合能に依存して核外移行することが示唆された。

ドメイン解析の結果から、Spo5 は mRNA と結合して核外移行していると考えられた。そこで、mRNA 輸送に異常のある *rae1* 変異体をもちいて、Spo5-GFP の挙動を観察したところ、Spo5 は Rae1 に依存して核外移行することが分かった。また、mRNA の局在をモニターするためにもちいたポリ A 結合タンパク質の挙動から、Spo5 は一般的な mRNA の輸送には関与しないことが明らかとなった。

Spo5 の核外移行が機能に必要なか検討するため、Spo5 に NLS を付加して強制的に核移行させた時の表現型を観察した。Spo5-NLS-GFP は核に蓄積し、胞子の形態や胞子形成率に異常を引き起こした。このことは、Spo5 の核外移行が機能に重要であることを示す。また、核蓄積する Spo5 RRM1Δ では機能が残っていたため、NES によって細胞質へ移行させた時に機能が回復するかどうか調べた。Spo5 RRM1Δ-NES は細胞質に局在したが、胞子形成率は回復しなかった。以上より、RNA 結合能は細胞質での機能にも重要であることが示唆された。

Spo5 は mRNA に結合すると予想されたため、Spo5 が結合する mRNA の同定を次の目標とした。Spo5 と機能的に関連のある因子を同定するために、*spo5* 変異体の胞子形成不能を過剰発現によって抑圧する、多コピー抑圧因子を検索した。その結果、先行研究でも単離されていた *pcr1*⁺ 遺伝子を含むクロー

ンを単離した。*pcr1*⁺遺伝子はATF/CREBファミリーに含まれる転写因子をコードしており、減数分裂期にはPcr1以外にAtf1, Atf21, Atf31が発現する。この中で、Pcr1の過剰発現のみが*spo5Δ*細胞の孢子形成不能を抑圧できた。このことは、Spo5がPcr1と機能的に関連することを示唆する。次に、Spo5と*pcr1* RNAの結合を検証した。*in vitro*でのゲルシフトアッセイと*in vivo*でのRIP (RNA Immunoprecipitation) アッセイにより、Spo5が*pcr1* RNAに特異的に結合することを明らかにした。以上より、*pcr1* mRNAはSpo5のターゲットmRNAであると結論した。

つづいて、Spo5の新規ターゲットmRNAを同定するために、複数のmRNAとSpo5との結合を検証した。その結果、*cdc13*, *mei4*および*mes1* mRNAが、Spo5のターゲットmRNAとして同定された。Cdc13は体細胞分裂および減数分裂進行に必須のサイクリンBであり、CDK (Cyclin-dependent kinase) であるCdc2とともに働く (図2A)。Cdc13は分裂後期にAPC/C複合体 (Anaphase-promoting complex/cyclosome) によってユビキチン化され、プロテアソームによって分解される。Mes1は、減数第一分裂後期にCdc13がAPC/Cによって完全に分解されるのを抑制することで減数第二分裂への移行を保証する因子であり、*mes1Δ*では減数第二分裂が開始しない。Mei4は孢子形成関連因子の転写制御をおこなう転写因子である。遺伝学的解析から、Cdc13, Mei4およびMes1は全てSpo5の下流で働くことが示唆された (図2B)。

次に、Pcr1がどのような因子の転写制御をおこなうかについて検討した。その結果、Pcr1は*cdc13*⁺遺伝子上流に存在するCRE配列に結合し、その転写を促進していることが分かった (図2C)。また、新規の*cdc13*変異体 (CRE配列を含む領域を欠損した変異体で、転写に異常がある) をもちいた解析から、*cdc13*⁺遺伝子の転写が減数第二分裂の進行に重要な働きをすることが強く示唆された。

以上より、Spo5が複数の因子を介してCdc13の発現を調節することが、正常な減数第二分裂の進行および孢子形成の制御に必要な現象の一つであることが示唆された。

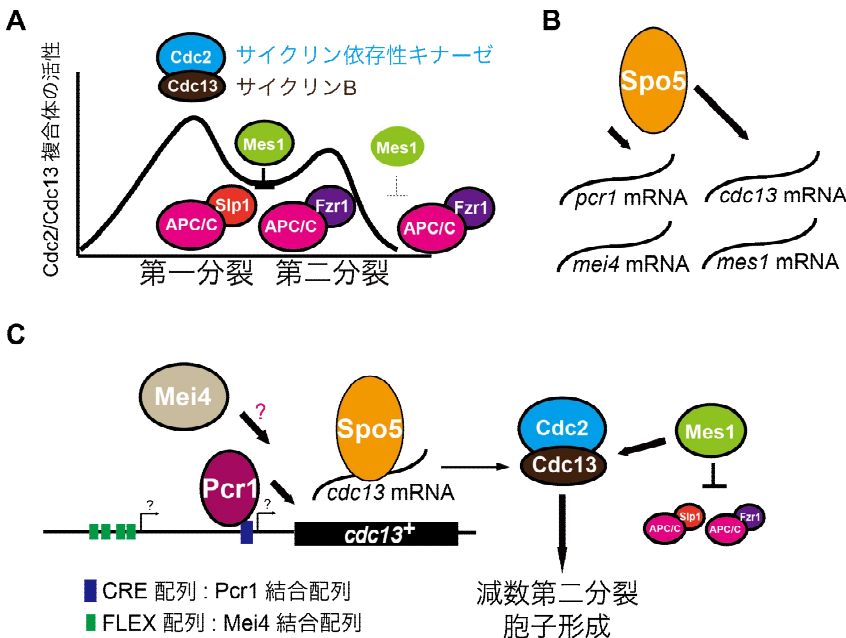


図2. Cdc13/Cdc2複合体を中心とした減数分裂進行の制御と、本研究から予想されたSpo5による制御機構の詳細。(A) Cdc2の活性は、主にCdc13の分解制御によって周期的に変動する。Mes1はSlp1やFzr1と拮抗し、第一分裂後期にAPC/Cの活性を抑制することで、Cdc13の完全な分解を抑制する。(B) Spo5は*pcr1*, *cdc13*, *mei4*, *mes1* mRNAと結合する。(C) Pcr1がCdc13の転写を調節し、Mes1がCdc13の分裂後期での過剰な分解を抑制すると考えられる。Spo5を介したこれらのCdc13の発現量調節が、減数第二分裂の進行と孢子形成に重要であると考えられる。

2. ATF/CREBファミリーと前胞子膜形成の開始を制御する機構の解析

Mes1の過剰発現によって*spo5Δ*の胞子形成不能を抑圧した原因を探るため、APC/C活性化因子の変異体を持ちて解析をおこなった。分裂酵母にはAPC/C活性化因子が5つ存在する。*spo5Δ*では5つの活性化因子のうちFzr1の欠損でのみ胞子形成した。この結果は、Mes1の過剰発現によってFzr1の機能が抑制され、*spo5Δ*の胞子形成不能を抑圧したことを示唆する。また、Fzr1が前胞子膜形成にも関与していることを示唆する。

*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のCdc13の分解と、胞子壁形成に異常があることが知られる。このことから、胞子壁形成に異常がある変異体では*spo5Δ*の胞子形成不能を抑圧できるのではないかと考えた。減数分裂の進行には異常がみられないが胞子壁形成に異常のある*atf21Δ*によって、*spo5Δ*の胞子形成不能は大部分が抑圧された。一方、*atf1Δ*や*atf31Δ*でも抑圧されたが、*pcr1Δ*ではされなかった。また、*atf21Δ*や*atf31Δ*は、第一分裂後期でCdc13の発現が低下する*mes1Δ*の胞子形成不能も抑圧した。このことから、Pcr1を除くATF/CREBファミリーはCdc13の発現を抑制していると考えられた。

以上をまとめると、減数分裂の進行に関して以下のようなモデルが考えられる。減数第二分裂開始前には、Spo5を介してPcr1やMei4などの転写因子が発現を調節されたあと、*cdc13⁺*遺伝子の転写が促進されてCdc13が増加する。また、Spo5は直接Cdc13の発現を調節する。一方、Spo5を介してMes1の発現が調節されることで、第二分裂後期にCdc13が適切なレベルで分解され、減数第二分裂と同時に前胞子膜形成が起こる。前胞子膜形成の開始は、Fzr1によって活性化されたAPC/Cや、ATF/CREBファミリーが制御する(図3)。これらは、Spo5を介して制御されたCdc13やMes1と拮抗し、減数第二分裂前後での適正なCdc13量の維持に働く。特に、Atf21は*cdc13⁺*遺伝子の転写抑制をおこなうと考えられる。

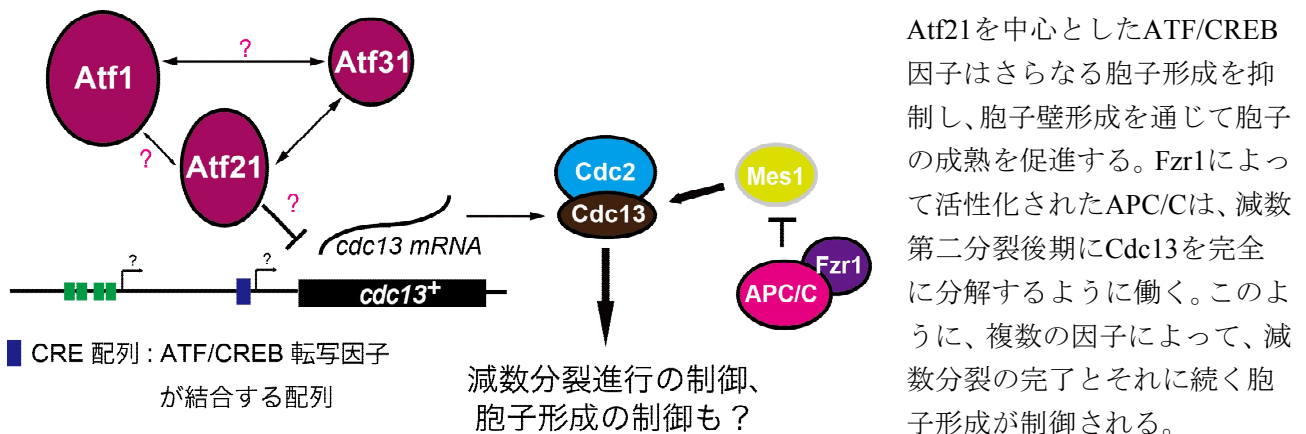


図3. ATF/CREBファミリーとAPC/Cによる胞子形成の制御機構。

3. 本研究の結論と今後の展望

本研究では、Spo5の核外移行の意義とターゲットmRNAが明らかになった。加えて、APC/CやATF/CREBファミリーによる前胞子膜形成を制御する機構の一部が明らかとなった。その結果、Spo5がターゲットmRNAの発現を調節する機構、Pcr1による*cdc13⁺*遺伝子の発現制御機構の詳細、ATF/CREBファミリーによる前胞子膜形成の制御機構の詳細などが今後の検討課題として浮かびあがってきた。