

博士論文概要

論文題目

分裂酵母の紡錘体形成に寄与する
新規メカニズムの解析

Analysis of novel mechanisms that
contribute to spindle assembly
in fission yeast

申請者

白杉	豊
Yutaka	SHIRASUGI

生命医科学専攻 細胞骨格ロジスティクス研究

2019年12月

細胞が正常に増殖するためには、遺伝情報を司る染色体が母細胞から娘細胞へ正確に分配されなければならない。染色体の分配は、分裂期に形成される紡錘体によって行われる。正常な紡錘体を形成するためには、中心体が分離し両極へ移動する必要がある。そのため、中心体が分離する分子メカニズムを解明することは染色体分配の分子機構を理解するために重要である。本研究では分裂酵母を用いて、中心体の分離に寄与する新たなメカニズムの一端を明らかにした。

第1章の序論では、本研究の内容を理解するために必要な知見について記載した。第1節では、体細胞分裂と減数分裂という2種類の細胞分裂における染色体分配の概略を説明した。体細胞分裂では、染色体が娘細胞に均等に分配されることで元の細胞のコピーが作られる。一方で減数分裂では、染色体分配が2回連続で行われることで元の細胞の半数の染色体を持つ配偶子が形成される。どちらの細胞分裂においても、染色体は紡錘体によって分配される。

第2節では、分裂酵母の紡錘体が形成される分子メカニズムについて説明した。分裂酵母では、高等生物の中心体に相当する SPB (spindle pole body) が分離し、2つの極を形成する。SPB の分離には、微小管上をプラス端方向に進む5型キネシンである Cut7 が重要な役割を担う。Cut7 は、別々の SPB から伸長した2本の微小管と結合することでそれらを束ねる。その後 Cut7 は、それらの微小管上をプラス端方向に進むことによって結果的にそれら2本を引き離す。このように Cut7 は SPB どうしを遠ざける外向きの力を発生させ、SPB を分離する。

第3節では、SPB の分離を阻害する14型キネシンについて説明した。分裂酵母の14型キネシンには、Pkl1 と Klp2 の2種類が存在する。これらのキネシンは微小管上をマイナス端方向に進むことで SPB どうしを近づける内向きの力を発生させ、SPB の分離を阻害する。

第4節では、近年の *cut7 pkl1* 二重破壊株 (以下、*cut7Δ pkl1Δ* 株とする。Δ は遺伝子破壊を表す。) の解析によって明らかとなった、Cut7 非依存的な外向きの力について説明した。Cut7 は分裂酵母の生存に必須だが、Cut7 と14型キネシンである Pkl1 を破壊した二重破壊株は生育が可能である。このとき *cut7Δ pkl1Δ* 株は Cut7 による外向きの力が機能しないにも関わらず SPB を分離することから、Cut7 非依存的な外向きの力が存在することが明らかとなった。このように *cut7Δ pkl1Δ* 株は体細胞分裂において SPB の分離が可能だと報告されているが、これを減数分裂で解析した例は存在しない。本研究では、*cut7Δ pkl1Δ* 株が減数第一分裂の SPB の分離に異常を示すことを発見した。このことから Cut7 非依存的な外向きの力は減数第一分裂では機能しにくいことが示唆された。本研究では、その原因を明らかにすることで SPB の分離に寄与する新たな分子メカニズムの一端を解明した。

第2章では、本研究で使用した大腸菌株と分裂酵母株、培地の組成などについて記載した。また、本研究で用いた実験手法について記載した。

第3章では、*cut7Δ pkl1Δ* 株の解析結果について記載した。第1節では、*cut7Δ*

pk11Δ 株が減数分裂で異常を示すことを明らかにした。*cut7Δ pk11Δ* 株は、通常の生育では野生型と比較して差は見られなかったが、減数分裂によって形成させる胞子の数に異常が見られた。そこで第 2 節では、*cut7Δ pk11Δ* 株の減数分裂を生細胞で経時観察し、胞子の数が異常になる原因を探索した。その結果、*cut7Δ pk11Δ* 株は減数第一分裂で SPB が分離せず、異常な紡錘体を形成することが明らかとなった。これに対して *cut7Δ pk11Δ* 株の減数第二分裂では SPB が分離した。

このように *cut7Δ pk11Δ* 株が減数第一分裂で SPB を分離しないのは、Cut7 非依存的な外向きの力が減数第一分裂で機能しにくいためであると予想した。そこで第 3 節では、内向きの力を発生させる Klp2 を欠損させた *cut7Δ pk11Δ klp2Δ* 株を観察した。*cut7Δ pk11Δ klp2Δ* 株の減数第一分裂では、*cut7Δ pk11Δ* 株で見られた SPB 分離の異常が改善された。このことから、減数第一分裂では Cut7 非依存的な外向きの力が十分に機能しないために SPB が分離しないことが示唆された。

減数第一分裂で外向きの力が弱い原因の一つとして、細胞の倍数性の違いが考えられた。これまでの実験では体細胞分裂には一倍体の細胞を、減数分裂には二倍体の細胞を用いていた。そこで第 4 節では二倍体で体細胞分裂を行う *cut7Δ pk11Δ* 株を観察し、倍数性が SPB の分離に影響するか否かを検証した。二倍体の *cut7Δ pk11Δ* 株が体細胞分裂で SPB を分離したことから、減数第一分裂で外向きの力が発生しにくい原因は倍数性以外に存在することが示唆された。

cut7Δ pk11Δ 株の SPB は体細胞分裂と減数第二分裂では分離し、減数第一分裂では分離しなかった。このことから、減数第一分裂でのみ見られる何らかの現象が原因となり、外向きの力が発生しにくいと予想された。そこで第 5 節では、減数第一分裂に特徴的な染色体の形態がその原因である可能性を検証した。体細胞分裂では姉妹染色分体が接着しており、それらの動原体（姉妹動原体）は互いに背を向けるかたちで密着している。これに対して減数第一分裂では相同染色体が腕部に形成されたキアズマによって連結しており、さらに姉妹動原体がまとめられることで一つの動原体のように振る舞う。このような染色体の形態の違いが SPB の分離に影響を及ぼすか否かを検証するために、キアズマの形成に必要な Rec12/Spo11 と姉妹動原体をまとめる因子である Moa1 を破壊することで、減数第一分裂の染色体の形態を体細胞分裂と同様のものにした。このような *cut7Δ pk11Δ rec12Δ moa1Δ* 株の減数第一分裂を観察したところ、*cut7Δ pk11Δ* 株と比較して SPB の分離が改善した。このことから体細胞分裂型の染色体が外向きの力を発生させ、SPB の分離を促進することが明らかとなった。

このような染色体の形態の違いは、どのようにして外向きの力の違いを生み出すのだろうか。染色体は動原体を介して微小管と結合することから、動原体が微小管との結合を介して外向きの力を発生させると予想した。そこで第 6 節では、姉妹動原体の挙動を *cut7Δ pk11Δ* 株の体細胞分裂と減数第一分裂でそれぞれ観察した。体細胞分裂では、SPB 分離の直前に姉妹動原体が SPB の近傍に移動した。

また SPB が分離した直後では、動原体は 2 つの SPB の間に位置した。これらのことから、2 つの SPB から形成された微小管が SPB 間で動原体と結合し、そこを力学的な支点として外向きの力を発生させると予想した。これに対して、減数第一分裂では相同染色体の動原体どうしが離れており、またこれらの動原体は SPB から離れた位置に存在した。したがって、減数第一分裂の動原体は外向きの力を促進する力学的な支点としての働きが弱いと予想された。

このような仮説が正しいのであれば、体細胞分裂であっても姉妹動原体どうしが離れば外向きの力が発生しにくくなるはずである。そこで第 7 節では、体細胞分裂で姉妹動原体どうしが離れやすい状態にしたときに、SPB の分離に異常が生じるか否かを観察した。姉妹動原体は、動原体が形成されるセントロメア領域どうしがコヒーシによって束ねられることで密着している。そこでコヒーシタンパク質の変異体である *rad21-K1* と、セントロメアへのコヒーシの呼び込みに必要な *swi6/HP1* の破壊株を利用した。*cut7Δ pkl1Δ swi6Δ* 株と *cut7Δ pkl1Δ rad21-K1* 株の体細胞分裂をそれぞれ観察したところ、どちらの株も *cut7Δ pkl1Δ* 株と比較して SPB の分離が遅延した。これらのことから、姉妹動原体どうしの接着が外向きの力を促進し、SPB の分離を促進することが明らかとなった。

ここまでの仮説の通りに姉妹動原体が微小管と結合して外向きの力を発生させるのであれば、微小管と動原体の結合に異常が生じると外向きの力が発生しにくくなると予想される。そこで第 8 節では、微小管との結合に重要な動原体タンパク質である Nuf2 の変異体 *nuf2-2* を用いて微小管と動原体の結合を失わせたときに、外向きの力が発生しにくくなるか否かを検証した。制限温度下で *cut7Δ pkl1Δ nuf2-2* 株と *cut7Δ pkl1Δ* 株の体細胞分裂をそれぞれ観察したところ、*cut7Δ pkl1Δ nuf2-2* 株では SPB の分離が遅延し、異常な紡錘体が形成された。このように微小管と動原体の結合は外向きの力を発生させるために必要であることが示された。

以上の結果から、Cut7 非存在下では動原体が外向きの力を発生させるための力学的な支点として機能し、SPB の分離を促進すると結論づけた。

第 4 章では、先行研究で報告された Cut7 非依存的な外向きの力や、高等生物の動原体が外向きの力を発生させる分子メカニズムなどを踏まえて、本研究で得られた結果に対する解釈を記載した。

本研究では、微小管が動原体と結合し、そこを支点として外向きの力を発生させることで SPB の分離を促進することを明らかにした。また、このとき外向きの力が効率的に発生するためには、姉妹動原体どうしが密着している必要があることが明らかとなった。このように本研究は SPB 分離に寄与する新たな分子メカニズムを発見し、紡錘体の形成機構の解明に貢献した。

早稲田大学 博士 (理学) 学位申請 研究業績書

氏名 白杉 豊 印

(2019年12月5日現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者 (申請者含む)
論文	○ <u>Yutaka Shirasugi</u> and Masamitsu Sato. Kinetochore-mediated outward force promotes spindle pole separation in fission yeast. Molecular Biology of the Cell (2019) 30(22): 2802-2813
学会発表	<p>1. ○<u>Yutaka Shirasugi</u> and Masamitsu Sato. Developing protocols to induce synchronous meiosis following by cell cycle arrest at the onset or metaphase of meiosis I. The 8th International Fission Yeast Meeting. Kobe, Japan, June 2015</p> <p>2. ○白杉豊、佐藤政充 減数分裂を同調的に誘導し第一分裂直前または中期で停止させる実験系の開発 酵母遺伝学フォーラム第48回研究報告会、日本・広島、9月・2015</p> <p>3. ○白杉豊、佐藤政充 多剤耐性(MDR)抑圧株酵母を用いた減数第一分裂時の動原体の精製 第39回日本分子生物学会年会、日本・神奈川、12月・2016</p> <p>4. ○白杉豊、佐藤政充 減数第一分裂の開始時に放射状の微小管が形成する分子機構の解明 第35回染色体ワークショップ、日本・愛知、12月・2017</p> <p>5. ○<u>Yutaka Shirasugi</u> and Masamitsu Sato. CDK-dependent nuclear accumulation of Alp7/TACC promotes the assembly of the radial array of microtubules in meiosis I. 第70回細胞生物学会第51回発生生物学会合同大会、日本・東京、6月・2018</p>