

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
contributes to spindle assembly
in fission yeast

2020年2月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科
生命医科学専攻 細胞骨格ロジスティクス研究

白杉 豊

Yutaka SHIRASUGI

略語集	1
1 章 序論	2
1.1 染色体分配と紡錘体	2
1.2 分裂酵母の紡錘体形成.....	5
1.3 14 型キネシンによって発生する内向きの力	8
1.4 Cut7 非依存的に発生する外向きの力.....	11
2 章 材料と方法.....	13
2.1 菌株	13
2.2 培地	17
2.4 遺伝学的操作	24
2.5 スポットテストによる細胞生育の解析	30
2.6 蛍光顕微鏡による観察	30
2.7 蛍光シグナル間の距離の定量化.....	31
3 章 結果	32
3.1 <i>cut7Δ pkl1Δ</i> 株は減数分裂に異常を示す	32
3.2 <i>cut7Δ pkl1Δ</i> 株は減数第一分裂の SPB 分離に異常を示す	35
3.3 体細胞分裂と減数第一分裂では内向きの力と外向きの力のバランスが異なる .	37
3.4 倍数性の違いは SPB の分離に影響しない.....	39
3.5 体細胞分裂型の染色体は SPB の分離を促進する	41
3.6 動原体は外向きの力を発生させる力学的な支点として機能する	44
3.7 セントロメアどうしの接着が外向きの力を促進する	47
3.8 動原体と微小管の結合が外向きの力を促進する	51
4 章 考察とまとめ	55
4.1 Cut7 非依存的に発生する外向きの力	55
4.2 減数第一分裂と体細胞分裂では、内向きと外向きの力のバランスが異なる	58
4.3 減数第一分裂で SPB が分離しにくいことの意義.....	59

4.4 高等生物における動原体を介した中心体分離システム.....	61
4.5 動原体と微小管が外向きの力を発生させるモデル.....	64
4.6 それぞれのキネシンが発生させる力の強さの違い.....	67
4.7 動原体を介した外向きの力の大きさ.....	70
4.8 14型キネシンの発生させる内向きの力の重要性.....	73
4.9 本研究のまとめ.....	76
5章 参考文献.....	77
謝辞.....	91
研究業績.....	92

略語集

CFP: cyan fluorescent protein

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

GFP: green fluorescent protein

SPB: spindle pole body, 紡錘極体

YFP: yellow fluorescent protein

1 章 序論

1.1 染色体分配と紡錘体

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次世代に正確に受け継がれる必要がある。染色体は DNA 合成によって複製され、その後細胞分裂によって次世代の細胞へと分配される。真核生物の細胞は、状況に応じて2種類の細胞分裂を使い分ける。一つは通常細胞増殖のために行われる体細胞分裂、もう一つは精子や卵子などの配偶子を形成するために行われる減数分裂である。

体細胞分裂では、間期のうちに複製された姉妹染色分体が分離し、母細胞から2つの娘細胞へ均等に分配される (**Fig. 1A**)。結果として、体細胞分裂では元の細胞と同じ本数の染色体を持つクローンが形成される。このとき染色体が娘細胞に均等に分配されないと、遺伝子発現のバランスが崩れるため細胞死やがん化の原因となり得る (Lengauer et al., 1998; Weaver and Cleveland, 2006; Sheltzer et al., 2011; Chunduri and Storchová, 2019)。

体細胞分裂では元の細胞のコピーが形成されるのに対して、減数分裂では元の細胞の半数の染色体を持つ配偶子が形成される。減数分裂では相同染色体の間で組換えが生じることで、相同染色体どうしが腕部で連結する (左、**Fig. 1B**)。その後、減数第一分裂で相同染色体が分離し、続いて行われる減数第二分裂で姉妹染色分体が分離する (**Fig. 1B**)。このように染色体分配を2回連続で行うことによって、半数体の配偶子が形成される。このような配偶子どうしが受精することで、染色体の本数が再び体細胞と同数となり、正常な個体へと発生することができる。減数分裂の染色体分配に異常が生じると、異常な染色体数の配偶子が形成されるため、不妊や流産、ダウン症などの原因となり得る (Hassold and Sherman, 2000;

Herbert et al., 2015)。

このように、どちらの細胞分裂においても染色体を正確に分配することが必須である。そのため、染色体分配の分子メカニズムを解明することは重要な研究課題と言える。

染色体は、分裂期に形成される紡錘体によって分配される。紡錘体は、微小管と呼ばれる管上の細胞骨格で構成される構造体である。微小管は α/β -チューブリン 2 量体が直線上に連なった高分子ポリマーであり、末端が重合と脱重合を繰り返すことで、その長さがダイナミックに変化する (Kirschner and Mitchison, 1986)。分裂期において、微小管は両極に位置する中心体を足場として形成される。両極の中心体から伸長した微小管が、2つの中心体の間で逆平行に束ねられることで紡錘体が形成される (左、**Fig. 1C**)。紡錘体を構成する微小管の一部は、染色体のセントロメア領域に形成される動原体と呼ばれるタンパク質複合体と結合する。すべての微小管が動原体と結合し染色体が紡錘体の中央部に整列すると、微小管が短縮することで染色体が両極の中心体へと分配される (右、**Fig. 1C**)。

このような染色体分配の様式は、酵母からヒトまで高度に保存されている。分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は遺伝子破壊などの操作が容易であり、世代時間が短く、染色体の本数が3本と少ない。そのため、染色体分配の遺伝学的な解析に適したモデル生物である。また窒素源を枯渇させることで減数分裂を容易に誘導し観察できることから、減数分裂の解析にも優れている。そこで本研究では分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を用いて、染色体分配において中心的な役割を担う紡錘体の形成機構を追究した。まず 1.2 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する。

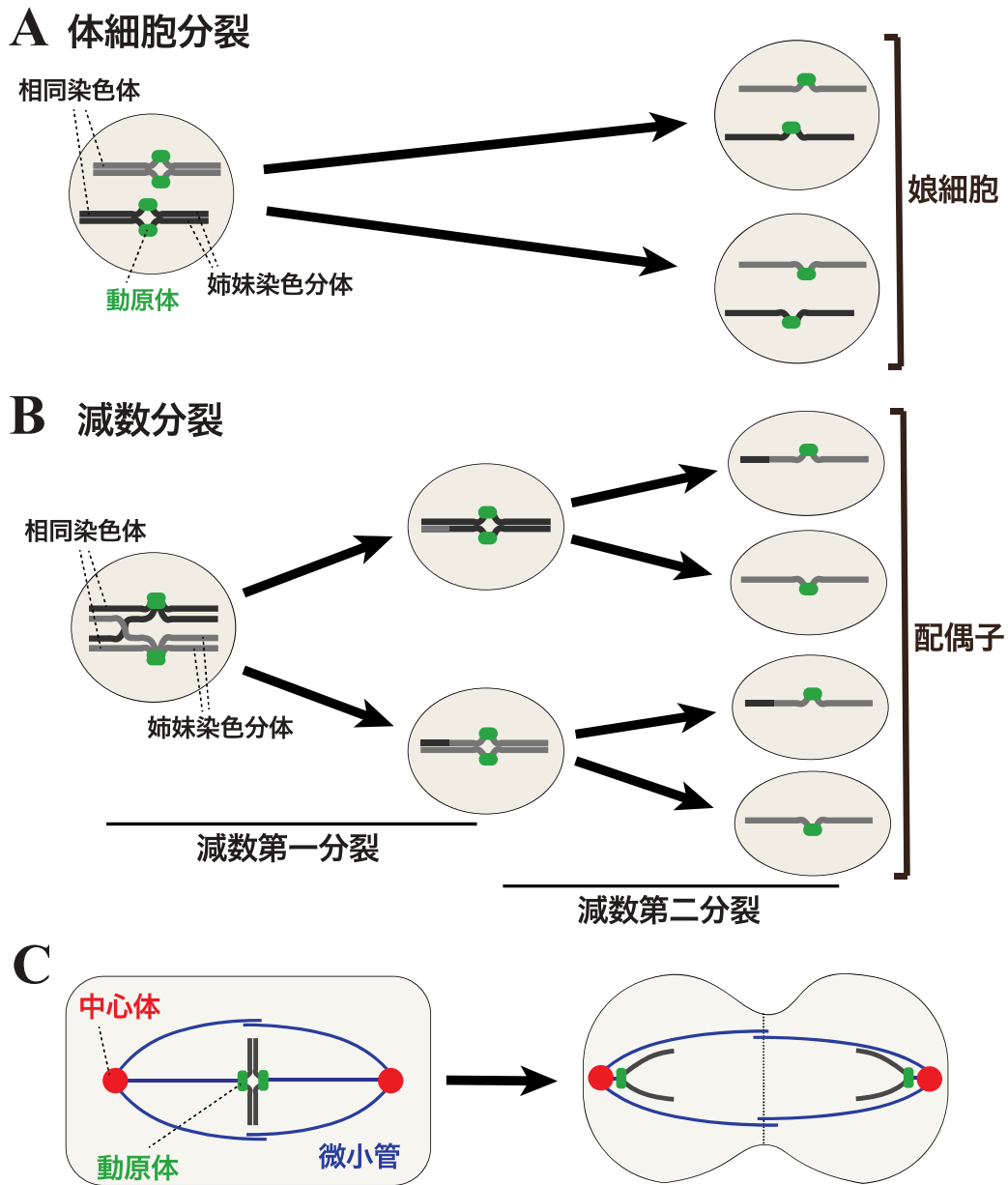


Figure 1 体細胞分裂と減数分裂の染色体分配

- A. 体細胞分裂では姉妹染色分体が娘細胞へ均等に分配される。動原体を緑で表す。
- B. 減数分裂では相同染色体が腕部で連結した後、染色体分配が2回連続で行われる。減数第一分裂では相同染色体は分配されるが姉妹染色分体は分離しない。それに対して減数第二分裂では姉妹染色分体が均等に分配され、元の半数の染色体を持つ配偶子が形成される。
- C. 両極の中心体(赤)から微小管(青)が伸長し、それらが束ねられて紡錘体が形成される。これらの微小管の一部が染色体上の動原体(緑)と結合する。全ての動原体が微小管と結合すると細胞は分裂期後期に移行し、染色体が両極の中心体へと分配される。

1.2 分裂酵母の紡錘体形成

分裂酵母には、高等生物の中心体に相当する構造体として SPB (Spindle Pole Body) が存在する。中心体が 2 本の円柱が直行したような構造体であるのに対して、SPB は円盤状の構造体である(Adams and Kilmartin, 2000)。このように構造が大きく異なるにも関わらず、両者を構成する因子には機能的に相同なものが多く存在する(Adams and Kilmartin, 2000; Ruthnick and Schiebel, 2016)。また、どちらも微小管を形成するための起点として機能し、分裂期には紡錘体の極としての役割を担う。SPB は間期に複製され、分裂期が開始するまで 2 つの SPB が 1 箇所にとまって存在する(Paoletti et al., 2003; Bouhlef et al., 2015; Bestul et al., 2017)。分裂期が開始すると、2 つの SPB から多数の微小管が形成され、SPB が分離して移動し、2 つの極を形成する (Fig. 2A)。このとき、両極から伸長した微小管が 2 つの SPB の間で束ねられて紡錘体となる (Fig. 2A)。分裂期に SPB が分離しないと紡錘体の極が 1 つしか形成されないため、染色体が正確に分配されない (Hagan and Yanagida, 1990, 1992)。すなわち、SPB が分離することは正常な紡錘体を形成するために必須である。

SPB の分離には、SPB から形成された微小管と特定のキネシン分子が重要な役割を果たす。キネシンは、ATP を加水分解しながら微小管上を一定方向に進むモータータンパク質である。キネシンはアミノ酸配列の比較によって 14 のサブファミリーに分類され、各ファミリーでそれぞれ異なる機能を持つと考えられている (Lawrence et al., 2004; Miki et al., 2005)。微小管上をプラス端 (先端) 方向に進む 5 型キネシンは真核生物で広く保存されており、紡錘体の形成において中心的な役割を担う (Hagan and Yanagida, 1990, 1992; Heck et al., 1993; Mayer et al.,

1999; Kapoor et al., 2000)。分裂酵母の 5 型キネシンである Cut7 は 4 量体を形成し (Akera et al., 2015)、別々の SPB から伸長した 2 本の微小管と結合する (Hagan and Yanagida, 1990, 1992)。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で、結果的にそれら 2 本を引き離す (Hagan and Yanagida, 1990, 1992) (Fig. 2B)。このように、Cut7 によって SPB どうしを遠ざける外向きの力が発生し、SPB が分離する。

Cut7 は分裂酵母の生育に必須な因子であり、*cut7* の温度感受性変異体では制限温度下で SPB が分離せず、異常な紡錘体が形成される (Hagan and Yanagida, 1990, 1992)。*cut7* 変異体における SPB 分離の異常は、微小管をマイナス端 (SPB 側) 方向に進む 14 型キネシンを破壊することによって解消される (Pidoux et al., 1996; Troxell et al., 2001; Yukawa et al., 2018)。このように、Cut7 によって SPB 間に発生する外向きの力は、14 型キネシンが発生させる力と拮抗している。そこで 1.3 では、14 型キネシンが SPB 間で発生させる内向きの力について説明する。

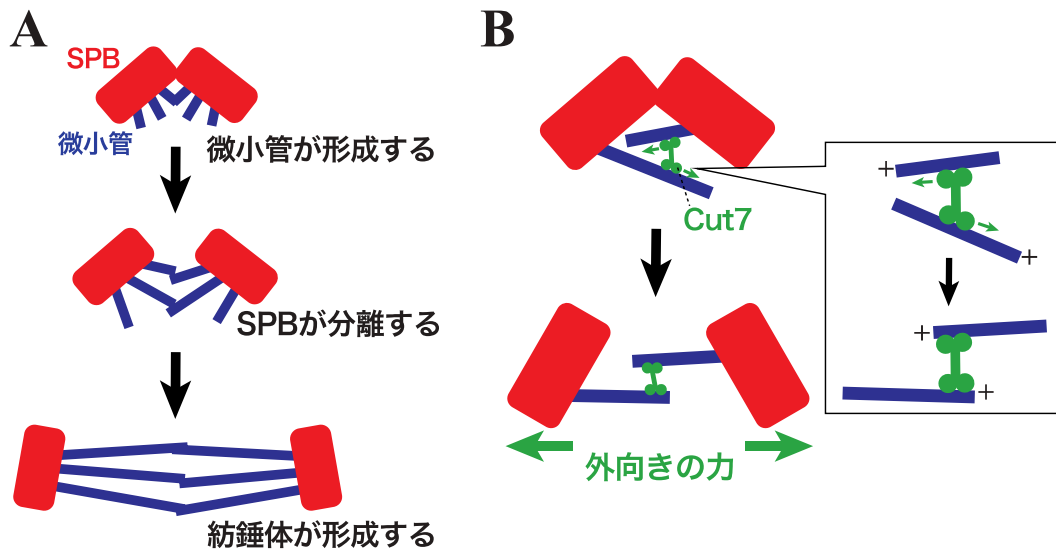


Figure 2 分裂酵母の紡錘体形成

A. 分裂期が開始すると2つのSPB(赤)から多数の微小管(青)が形成される。その後SPBが分離し、2つのSPBの間で微小管が束ねられて紡錘体となる。

B. 5型キネシンであるCut7(緑)は別々のSPBから伸長した2本の微小管を逆平行に束ねる。その後2本の微小管上をプラス端方向に進むことで(吹き出し内を参照)、SPBどうしを遠ざける外向きの力を発生させる。

1.3 14 型キネシンによって発生する内向きの力

14 型キネシンは、ホモ二量体を形成して微小管上をマイナス端 (SPB 側) 方向に進むキネシンである。分裂酵母には Pkl1 と Klp2 の 2 種類の 14 型キネシンが存在する (Pidoux et al., 1996; Troxell et al., 2001)。分裂期において、Pkl1 は SPB と紡錘体に局在し、Klp2 は紡錘体に局在する (Troxell et al., 2001; Simeonov et al., 2009; Yukawa et al., 2018)。これらのキネシンは対極の SPB から伸長した微小管と結合し、その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る (Pidoux et al., 1996; Troxell et al., 2001; Rincon et al., 2017; Yukawa et al., 2017, 2018) (**Fig. 3A, B**)。Klp2 を欠損した細胞では、分裂中期から後期の紡錘体が野生型よりも長くなる (Troxell et al., 2001; Choi and McCollum, 2012)。また Pkl1 を欠損した細胞では、Cut7 によって外向きにスライドした微小管が SPB を貫通し、異常な形の紡錘体が形成される (Syrovatkina et al., 2013; Syrovatkina and Tran, 2015, **Fig. 3C, D**)。このような *pk11* 破壊株で見られる紡錘体の形態異常は、内向きの力を発生させる Klp2 を破壊することで顕著になり、外向きの力を発生させる Cut7 を破壊することで改善される (Syrovatkina and Tran, 2015; Yukawa et al., 2018)。このように Pkl1 や Klp2 が発生させる内向きの力は、Cut7 による外向きの力と拮抗し、紡錘体の形態や長さを制御する。Pkl1 と Klp2 によって発生する内向きの力は SPB 分離時にも機能し、Cut7 によって発生する外向きの力と拮抗する。Pkl1 または Klp2 を過剰に発現させると、*cut7* 変異体と同様に SPB の分離が阻害され、単極性の異常な紡錘体が形成される (Pidoux et al., 1996; Troxell et al., 2001; Rincon et al., 2017; Yukawa et al., 2018) (**Fig. 3E**)。このように外向きの力と内向きの力がバランスよく作用することが、SPB を分離

し紡錘体を形成するために必要である。

SPB 分離を制御する力を発生させるのはこれらのキネシン分子だけなのだろうか。Cut7 は分裂酵母の生育に必須だが、内向きの力を発生させる *pk11* と同時に *cut7* を破壊した細胞は生育が可能である (Olmsted et al., 2014)。このとき、*cut7* *pk11* 二重破壊株 (以下 *cut7* Δ *pk11* Δ 株とする。 Δ は遺伝子破壊を表す。) の体細胞分裂では SPB が分離し紡錘体が形成される (Olmsted et al., 2014; Rincon et al., 2017; Yukawa et al., 2017)。このことから、Cut7 非依存的に発生する外向きの力が存在し、SPB の分離を促進することが明らかとなった。そこで 1.4 では、*cut7* Δ *pk11* Δ 株の SPB 分離に働く Cut7 非依存的な外向きの力について説明する。

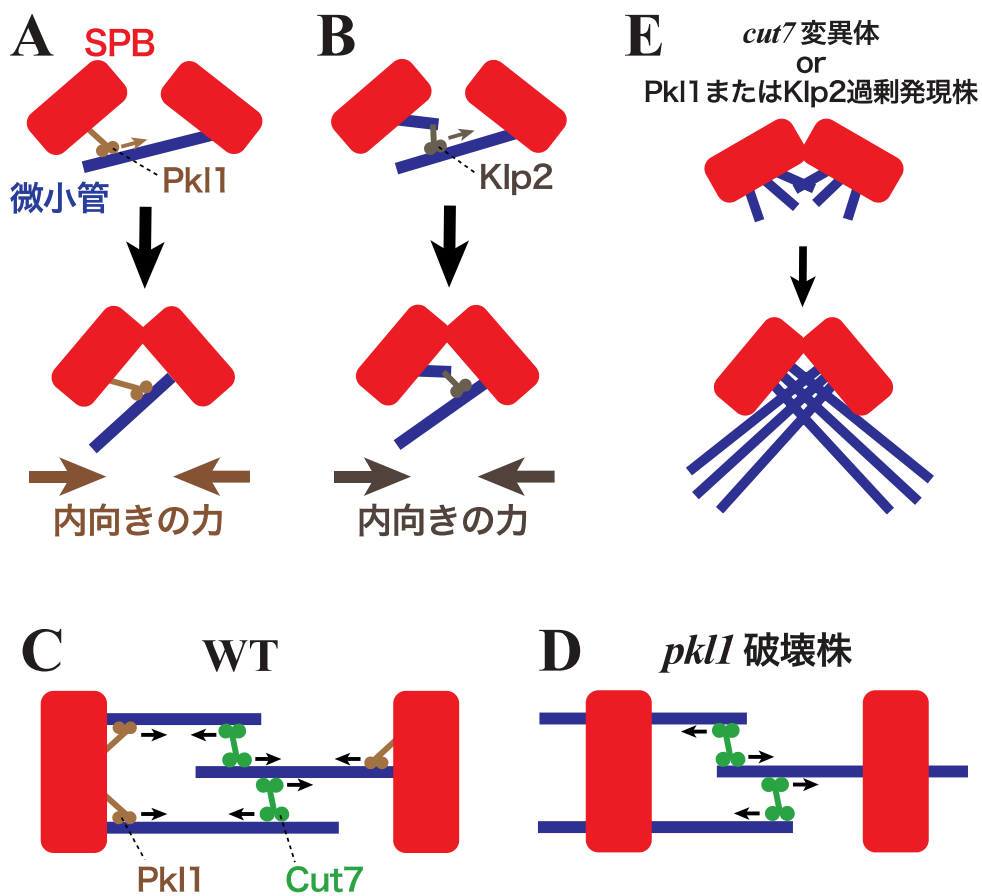


Figure 3 14型キネシンはSPB どうしを近づける内向きの力を発生させる

- A. Pkl1/kinesin-14 は SPB に局在し、対極の SPB から伸長した微小管と結合する。その後、微小管上をマイナス端方向へ進むことで SPB どうしを近づける内向きの力を発生させる。
- B. Klp2/kinesin-14 は微小管に局在し、対極の SPB から伸長した微小管と結合する。その後 Pkl1 と同様に微小管上をマイナス端方向に進み、内向きの力を発生させる。
- C. WT の紡錘体では Cut7 によって外向きにスライドした微小管を、SPB に局在する Pkl1 が内向きに押し返す。黒矢印はそれぞれのキネシンによって微小管に作用する力の方向を表す。
- D. *pkl1* 破壊株では Cut7 によって外向きにスライドした微小管が SPB を貫通する。
- E. *cut7* 変異体、Pkl1 過剰発現株または Klp2 過剰発現株では SPB が分離せず異常な紡錘体が形成される。

1.4 Cut7 非依存的に発生する外向きの力

cut7Δ pk11Δ 株の体細胞分裂では、2つの SPB から形成された微小管が SPB 間で逆平行に束ねられ、それらが伸長することで SPB が分離すると考えられている (Rincon et al., 2017; Yukawa et al., 2017) (Fig. 4A)。これには、逆平行に束ねられた微小管を安定化する微小管結合タンパク質である Ase1/PRC1 (Loiodice et al., 2005; Yamashita et al., 2005) が必要である (Rincon et al., 2017; Yukawa et al., 2017)。 *cut7Δ pk11Δ* 株において Ase1 の発現を強制的に抑制すると、単極性の異常な紡錘体が形成されて細胞は死んでしまう (Rincon et al., 2017; Yukawa et al., 2017)。また In silico のシミュレーションにおいても、Ase1 によって束ねられた微小管が発生させる外向きの力が *cut7Δ pk11Δ* 株の SPB を分離させ得ることが示された (Rincon et al., 2017)。このように SPB の分離は、(1) Cut7 による外向きの力、(2) Pkl1 と Klp2 による内向きの力、(3) 逆平行に束ねられた微小管による外向きの力、の3者がバランスよく作用することで達成される (Fig. 4B)。しかし、これまでの *cut7Δ pk11Δ* 株の解析はすべて体細胞分裂に関して行われており、Cut7 非依存的な外向きの力が減数分裂でも同様に機能するのかは不明であった。

本研究では、*cut7Δ pk11Δ* 株の減数第一分裂では SPB が分離せず、異常な紡錘体が形成されることを見つけた。このような SPB 分離の異常は、減数第一分裂に特徴的な染色体の形態を解消することで改善した。このことから、染色体が SPB を分離するための外向きの力に影響を及ぼすことが示唆された。また、動原体と微小管の結合に異常を示す変異を *cut7Δ pk11Δ* 株に導入したところ、SPB の分離が遅延した。このように動原体が微小管による外向きの力を促進し、Cut7 非依存的に SPB の分離を促進することが明らかとなった。

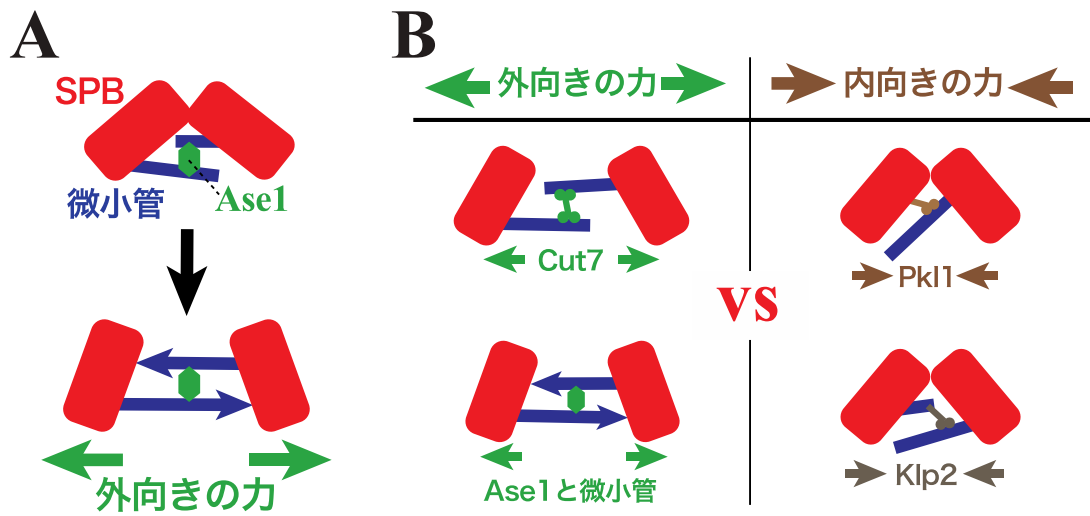


Figure 4 キネシン非依存的に SPB が分離するメカニズム

A. 2つの SPB から伸長した微小管が、SPB の間で Ase1 によって束ねられる。これらの微小管が伸長するとき、反対側の SPB を押し離すことで外向きの力が発生し SPB が分離する。

B. Cut7 によって発生する外向きの力と、Ase1 によって束ねられた微小管によって発生する外向きの力によって SPB が分離する。これらの外向きの力は、Pkl1 と Klp2 によって発生する内向きの力と拮抗している。

2章 材料と方法

2.1 菌株

本研究で用いた大腸菌株

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

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

本研究で用いた分裂酵母株

株番号	遺伝子型	図
JY879	<i>h90 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	5A, 5C, 7A, 11B, 11E, 11H, 11I
MJ0660	<i>h90 pkl1::LEU2 leu1-32 ura4-D18 ade6-M216</i>	5A, 5C, 7A, 11E
YS0982	<i>h90 pkl1::LEU2 cut7::bsd leu1-32 ura4-D18 ade6-M210</i>	5A, 5C,
YS0976	<i>h90 cdc13-YFP-kan Z2-mCherry-atb2-hph sfi1-CFP-nat leu1-32 ura4-D18</i> <i>ade6-M216</i>	5B, 6A, 6C, 7C, 9D, 12D
YS0978	<i>h90 cdc13-YFP-kan Z2-mCherry-atb2-hph sfi1-CFP-nat pkl1::ura4+ cut7::bsd</i> <i>leu1-32 ura4-D18 ade6-M216</i>	5B, 6B, 6C, 7B, 7C, 9D, 12D
MJ0662	<i>h90 klp2::LEU2 leu1-32 ura4-D18 ade6-M216</i>	7A
YS1052	<i>h90 pkl1::ura4+ cut7::LEU2 leu1-32 ura4-D18 ade6-M210</i>	7A
YS1085	<i>h90 klp2::LEU2 pkl1::ura4+ cut7::bsd leu1-32 ura4-D18 ade6-M210</i>	7A
YS1087	<i>h90 klp2::LEU2 pkl1::ura4+ leu1-32 ura4-D18 ade6-M210</i>	7A

YS1078	<i>h90 cdc13-YFP-kan Z2-mCherry-atb2-hph sfi1-CFP-nat pkl1::ura4+ cut7::bsd</i> <i>klp2::LEU2 leu1-32 ura4-D18 ade6-M216</i>	7B, 7C, 12C, 12D
YS1010	<i>h⁺/h⁻ cdc13-YFP-kan/cdc13-YFP-kan sfi1-CFP-nat/ sfi1-CFP-nat</i> <i>Z2-mCherry-atb2-hph/Z2-mCherry-atb2-hph leu1-32/leu1-32</i> <i>ura4-D18/ura4-D18 ade6-M216/ade6-M210</i>	8A, 8B
YS1022	<i>h⁺/h⁻ cdc13-YFP-kan/cdc13-YFP-kan sfi1-CFP-nat/ sfi1-CFP-nat</i> <i>Z2-mCherry-atb2-hph/Z2-mCherry-atb2-hph pkl1::ura4+/pkl1::ura4+</i> <i>cut7::bsd/cut7::bsd leu1-32/leu1-32 ura4-D18/ura4-D18 ade6-M216/ade6-M210</i>	8A, 8B
YS1070	<i>h90 pkl1::LEU2 cut7::bsd rec12::kan cdc13-YFP-kan Z2-mCherry-atb2-hph</i> <i>sfi1-CFP-nat leu1-32 ura4-D18 ade6-M210</i>	9C, 9D
YS1203	<i>h90 pkl1::LEU2 cut7::bsd moa1::ura4+ rec12::kan cdc13-YFP-kan</i> <i>Z2-mCherry-atb2-hph sfi1-CFP-nat leu1-32 ura4-D18 ade6-M210</i>	9C, 9D
YS1152	<i>h90 cnt1::kan-lacO-6k his7+-Pdis1-GFP-lacI-NLS Z2-mCherry-atb2-hph</i> <i>sfi1-CFP-nat pkl1::ura4+ cut7::bsd leu1-32 ura4-D18 ade6-M210</i>	10B, 10C
YS1120	<i>h90 cnt1::kan-lacO-6k his7+-Pdis1-GFP-lacI-NLS Z2-mCherry-atb2-hph</i> <i>sfi1-CFP-nat leu1-32 ura4-D18 ade6-M210</i>	10B, 10C
YS1218	<i>h90 Z2-mCherry-atb2-hph pkl1::ura4+ cut7::bsd plo1-GFP-kan leu1-32 ura4-D18</i> <i>ade6-M216</i>	11C, 11D, 11F, 11G, 12A, 12B
MJ0080	<i>h90 pkl1::ura4+ leu1-32 ura4-D18 ade6-M216</i>	11B

YS0974	<i>h90 pkl1::ura4+ cut7::bsd leu1-32 ura4-D18 ade6-M210</i>	11B, 11E, 11H, 11I
YS1188	<i>h90 rad21-K1 leu1-32</i>	11B, 11H
YS1192	<i>h90 pkl1::LEU2 rad21-K1 leu1-32</i>	11B
YS1194	<i>h90 pkl1::LEU2 cut7::bsd rad21-K1 leu1-32</i>	11B, 11H
YS1225	<i>h90 Z2-mCherry-atb2-hph pkl1::ura4+ cut7::bsd plo1-GFP-kan rad21-K1 leu1-32 ura4-D18 ade6-M216</i>	11C, 11D
YS1221	<i>h90 Z2-mCherry-atb2-hph plo1-GFP-kan rad21-K1 leu1-32</i>	11D
YK1174	<i>h90 swi6::nat leu1-32 ura4-D18 ade6-M210</i>	11E, 11I
YS1162	<i>h90 pkl1::LEU2 swi6::nat leu1-32 ura4-D18 ade6-M216</i>	11E
YS1184	<i>h90 pkl1::ura4+ cut7::bsd swi6::nat leu1-32 ura4-D18 ade6-M210</i>	11E, 11I
YS1212	<i>h90 Z2-mCherry-atb2-hph pkl1::ura4+ cut7::bsd swi6::nat plo1-GFP-kan leu1-32 ura4-D18 ade6-M216</i>	11F, 11G
YS1231	<i>h⁻ Z2-mCherry-atb2-hph plo1-GFP-kan swi6::nat leu1-32 ura4-D18 ade6-M216</i>	11G
YS1196	<i>h90 klp2::LEU2 pkl1::ura4+ cut7::bsd rad21-K1 leu1-32</i>	11H
YS1198	<i>h90 klp2::LEU2 pkl1::ura4+ rad21-K1 leu1-32</i>	11H
YS1084	<i>h90 klp2::LEU2 pkl1::ura4+ cut7::bsd leu1-32 ura4-D18 ade6-M216</i>	11I
YS1178	<i>h90 klp2::LEU2 pkl1::ura4+ cut7::bsd swi6::nat leu1-32 ura4-D18 ade6-M216</i>	11I
YS1272	<i>h⁻ pkl1::LEU2 cut7::bsd Z2-mCherry-atb2-hph plo1-GFP-kan nuf2-2::ura4+ leu1-32 ura4-D18 ade6-M216</i>	12A, 12B

YS1216	<i>h⁻ Z2-mCherry-atb2-hph plo1-GFP-kan leu1-32 ura4-D18 ade6-M216</i>	12B, 11C, 11D, 11F, 11G
YS1271	<i>h⁻ Z2-mCherry-atb2-hph plo1-GFP-kan nuf2-2::ura4+ leu1-32 ura4-D18 ade6-M216</i>	12B
YS1305	<i>h90 cdc13-YFP-kan Z2-mCherry-atb2-hph sfi1-CFP-nat pkl1::ura4+ cut7::bsd klp2::LEU2 nuf2-2::ura4+ leu1-32 ura4-D18 ade6-M216</i>	12C, 12D

2.2 培地

大腸菌の培養に用いた培地

大腸菌の培養は LB 培地で行った。必要に応じて Ampicillin (Meiji Seika Pharma) を終濃度 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、あるいは kanamycin Sulfate (Wako) を終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加した。寒天培地として使用する際には Agar (三井製糖) を 1 L 当たり 15 g 添加した。以下に培地の組成を示す。

LB培地 (1Lあたり)

Bacto Yeast extract (BD) 10 g

Yeast extract (BD) 5 g

NaCl (Wako) 5 g

分裂酵母の培養に用いた培地

分裂酵母の培養及び株の操作は Moreno et al., 1991 を参考に行った。完全培地として YE5S 培地を、合成培地として SD 培地または EMM-N 培地を用いた。また、アデニン要求性変異体である *ade6-M210* 変異体と *ade6-M216* 変異体を選別するために YELA 培地を用いた。細胞を減数分裂に誘導するために SPA 培地を用いた。また、細胞の接合型を判定するために SSA 培地を用いた。次のページにそれぞれの培地の 1 L 当たりの組成を示す。

YE5S 培地 (1L あたり)

Bacto Yeast extract (BD)	5 g
D-Glucose (Wako)	30 g
5 Supplements* ¹	0.35 g
Agar (三井製糖)* ²	20 g

培地1Lあたりの5S Supplementsの組成(*1)を以下に示す。

	添加量	終濃度
Adenine hemisulfate dehydrate (TCI)	0.075 g	75 µg/mL
Uracil (Wako)	0.05 g	50 µg/mL
Leucine (Wako)	0.05 g	50 µg/mL
Lysine (Wako)	0.05 g	50 µg/mL
Histidine (Wako)	0.1 g	100 µg/mL

*²寒天培地を作製する場合に加える。

Kan耐性、Hyg耐性、Nat耐性、Bsd耐性株の選択時には、YE5S培地に対してG-418 sulfate (Wako, 終濃度 100 µg/mL), Hygromycin B (Wako, 終濃度 100 µg/mL), ClonNat (WERNER BioAgents, 終濃度 50µg/mL), Blasticidin S Hydrochloride (Wako, 終濃度 10 µg/mL) をそれぞれ添加した。また、死細胞を判別するため際には Phloxine B (Magdala red, 終濃度 2 µg/mL)をYE5S培地に添加した。

・ YELA 培地

アデニン要求性変異体である *ade6-M210* 変異体と *ade6-M216* 変異体を選別するために用いた。アデニン非要求性株 (*ade6+*)は YELA 培地上で白色のコロニーを、*ade6-M210* 変異体は赤色のコロニーを、*ade6-M216* 変異体はピンク色のコロニーをそれぞれ形成する。

YELA培地 (1Lあたり)

Bacto Yeast extract (BD)	5 g
D-Glucose (Wako)	30 g
Agar (三井製糖)	20 g
Adenine hemisulfate dehydrate (TCI)	終濃度 7.5 $\mu\text{g/mL}$

・ SD 培地

栄養要求性株の選択および栄養増殖中の細胞の蛍光観察に用いた。必要に応じて 5 Supplements^{*1} の中で必要な栄養素を(*1)と同濃度で添加した。

SD培地 (1Lあたり)

Yeast nitrogen base w/o amino acids (BD)	6.7 g
D-Glucose (Wako)	20 g
Agar (三井製糖) ^{*2}	20 g

*2寒天培地を作製する場合に加える。

・ EMM-N培地

最少培地であるEMM培地に窒素源を加えない培地。減数分裂中の細胞を蛍光観察するために用いた。

EMM-N培地 (1Lあたり)

KH phthalate (Wako)	3 g
Na ₂ HPO ₄ (Wako)	2.2 g
50x MM ^{*4}	20 mL
Four Vitamins ^{*5}	1 mL
Trace elements ^{*6}	100 μL
Citric acid (1g/100mL) (Wako)	100 μL
5 Supplements ^{*1}	0.35 g
D-Glucose (Wako)	20 g

^{*4} 50x MM

MgCl ₂ -6H ₂ O (Wako)	53.3 g
CaCl ₂ -2H ₂ O (Wako)	0.735 g
KCl (Wako)	50.0 g
Na ₂ SO ₄ (Wako)	2.0 g

*⁵ Four Vitamins

Calcium pantotenate (Wako)	0.1 g
Nicotinic acid (Wako)	0.1 g
Myo-inositol (SIGMA)	1 g
Biotin (SIGMA)	1 mg

*⁶ Trace elements

H ₃ BO ₃ (Wako)	0.5 g
MnSO ₄ (Wako)	0.4 g
ZnSO ₄ -7H ₂ O (Wako)	0.4 g
FeCl ₃ -6H ₂ O (Wako)	0.2 g
MoO ₄ -2H ₂ O (Wako)	0.16 g
KI (Wako)	0.1 g
CuSO ₄ -5H ₂ O (Wako)	0.04 g

・ SPA 培地

窒素源飢餓培地であり、細胞を減数分裂に誘導するために用いた。

SPA 培地 (1L あたり)

KH ₂ PO ₄ (Wako)	1.0 g
D-Glucose (Wako)	10 g
Four Vitamins ^{*5}	1 mL
Trace elements ^{*6}	100 µL
Adenine hemisulfate dehydrate (TCI)	終濃度 75 µg/mL
Agar (三井製糖)	30 g

・ SSA 培地

窒素源を少量含む培地であり、細胞がコロニーを形成した後で減数分裂を開始し胞子形成を行う。

SSA 培地 (1L あたり)

20x SSA ^{*7}	1.0 g
D-Glucose (Wako)	10 g
1M CaCl ₂	0.68 mL
1N NaOH	4.2 mL
Four Vitamins ^{*5}	1 mL
5 Supplements ^{*1}	0.35 g

Agar (三井製糖) 20 g

*7 20x SSA

Aspartic Acid 10 g

KH_2PO_4 (Wako) 40 g

Na_2HPO_4 (Wako) 4 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (nacalai tesque) 0.4 g

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Wako) 40 g

2.4 遺伝学的操作

大腸菌の遺伝学的操作

大腸菌の形質転換などの一般的な遺伝子クローニング操作は標準的なプロトコルに従って行った (Sambrook et al., 1989)。形質転換にはXL1-blue株のコンピテントセルを使用した。氷上で溶かしたコンピテントセル溶液100 μ Lに対してプラスミドDNA溶液を1~2 μ L添加して氷上で10分間静置した。その後、42°Cで30~60秒間の熱ショックを与え、氷上で90秒静置し、1.5 mLのLB + ampicillin 培地またはLB + kanamycin 培地にまいて37°Cで一晩培養した。

分裂酵母の遺伝学的操作

・分裂酵母からのゲノム DNA の単離

YE5S 培地上で一晩培養した細胞を 0.2 mL の breaking buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH8.0], 1 mM EDTA [pH8.0], 2% Triton X-100, 1%SDS)に加え、その後 0.3g 酸洗浄ガラスビーズおよび 0.2 mL Phenol-Chloroform (Wako)を添加し、細胞ホモジナイザー (FastPrep, MP Biomedicals)により細胞破碎した (強度 5, 10sec)。そこに 0.2 mL TE (10 mM Tris-HCl [pH8.0], 1 mM EDTA [pH8.0])を添加して 10000 rpm で 5 分間遠心した。分離した上層を別の 1.5 mL チューブに移し、そこに 1 mL 100% Ethanol (Wako)を添加してピペッティングした後、室温で 5 分間静置した。その後 10000 rpm で 3 分間遠心して上清を廃棄し、0.5 mL の 70% Ethanol を加えて再び 10000 rpm で 30 秒間遠心し、上清を廃棄した。沈殿したゲノム DNA を風乾し、50 μ L TE に懸濁して DNA 溶液とした。

・ 遺伝子破壊株の作製

遺伝子破壊株の作製は Bahler et al., 1998a. および Sato et al., 2005. の方法を参考に行った。目的遺伝子の ORF の上流 500 bp (開始コドンの手前まで) を P1 および P2 プライマーで、同様に下流 500 bp (終止コドンの直後から) を P3 および P4 プライマーで増幅し、これらを 1st PCR 産物とした。P2 および P3 プライマーには特定の 20 bp (JB20) を付加した。同様の 20 bp を持つプラスミドを鋳型として、1st PCR 産物をプライマーとして 2nd PCR を行った。これによって増幅された産物を 2nd PCR 産物として分裂酵母に形質転換した。なお 1st PCR 産物と 2nd PCR 産物は FAVORGEN PCR purification kit (FAVORGEN) を用いて精製し、使用した。1st PCR と 2nd PCR の条件を以下に示す。

・ 1st PCR

P1, P2 および P3, P4 の組み合わせで 1st PCR を行った。

5x Prime STAR buffer (Takara)	10 μ L
dNTP mixture (Takara)	5 μ L
genomic DNA	2.5 μ L
Primer (5 μ M) P1 or P3	2.5 μ L
Primer (5 μ M) P2 or P4	2.5 μ L
H ₂ O	27 μ L
Prime STAR polymerase (Takara)	0.5 μ L

PCR method

1:	95°C	3:00
2:	95°C	0:30
3:	52°C	0:30
4:	72°C	0:45
5:	Go To Step2	additional 29 cycles
6:	12°C	forever

• 2nd PCR

5x Prime STAR buffer (Takara)		10 µL
dNTP mixture (Takara)		5 µL
plasmid DNA		2.5 µL
Primers (5µM)	P1	2.5 µL
	P4	2.5 µL
1st PCR products	P1+P2	2.5 µL
	P3+P4	2.5 µL
H ₂ O		22 µL
PrimeSTAR polymerase (Takara)		0.5 µL

PCR method

1:	95°C	5:00
2:	95°C	0:30
3:	52°C	0:30
4:	72°C	3:00 ^{*8}
5:	Go to step2	additional 34 cycles
6:	12°C	forever

*8 増幅産物の長さ1kbあたり1分として時間を適宜変更した。

・分裂酵母の形質転換

YE5S 寒天培地で培養した分裂酵母株を YE5S 液体培地に適量入れて $0.5 \sim 1 \times 10^7$ cells/mL となるまで一晩培養した。培養液を 50 mL チューブに移して 2000 rpm で 3 分間遠心し上清を除去した。沈殿した細胞を 1 mL 滅菌水に懸濁し、1.5 mL チューブに移して 2000 rpm で 3 分間遠心し上清を除去した。沈殿した細胞を 0.2 mL LiOAc/TE (0.1 M lithium acetate [pH7.5], 10 mM Tris-HCl [pH7.5], 1 mM EDTA [pH7.5]) で懸濁し、細胞懸濁液とした。新しい 1.5 mL チューブに以下の試薬を加えて 25°C あるいは 30°C で 1~2 時間保温した。

DNA (PCR fragment)	10 μ L
Carrier DNA (Clontech)	5 μ L
細胞懸濁液	100 μ L
40% (w/v) PEG#4000 (nacalai tesque)	240 μ L

その後、43 μL DMSO (Wako)を添加し、42°C で 10 分間熱ショックを与え、5000 rpm で 10 秒間遠心して上清を取り除いた。沈殿した細胞を 100 μL 滅菌水で懸濁し、YE5S 寒天培地にまいて 26.5°C または 30°C で一晩培養した。その後、適切な抗生物質を添加した YE5S 寒天培地にレプリカし、26.5°C または 30°C で 3~4 日培養した。形成したコロニーから細胞を一部かきとり、コロニーPCR によって目的の形質転換体かを確認した。次のページにコロニーPCR の組成を示す。

反応液

Sapphire Amp Fast PCR Master Mix (Takara)	5 μL
Primer 1 (100 μM)	0.1 μL
Primer 2 (100 μM)	0.1 μL
H ₂ O	4.8 μL

Primer 1 は抗生物質耐性遺伝子内に設計された TEF terminator の配列を元に設計した。Primer 2 は 1st PCR で用いた P4 より C 末端側に設計した。

・SPA スポットによる減数分裂の誘導とランダムスポア処理

YE5S 寒天培地で一晩培養した分裂酵母株を適量掻き取り、1.5 mL チューブに加えて 5 μL Leucine/ Uracil 混合液で懸濁した。細胞懸濁液を SPA 培地にスポットし、25°C あるいは 30°C で 1~2 日培養した。孢子が形成したことを確認し、SPA 培地から細胞を適量掻き取って 100 μL の 2% Glusulase (Perkin Elmer)に懸濁した後、30°C で 1 時間反応させることで孢子嚢を融解し、孢子を遊離させた。その後、

43 μ L 100% ethanol を加えて室温で5分間静置し、2000 rpm で1分間遠心して上清を廃棄し、500 μ L YE5S 液体培地で懸濁した。この孢子懸濁液を適当な濃度に希釈して YE5S 寒天培地にまき、25°C または 30°C で3~4日間培養した。その後、適切な寒天培地にレプリカして一晩培養することで目的の変異体を選択した。

・2倍体細胞の作製

2倍体細胞の作製にはアデニン要求性変異体である *ade6-M210* 変異体と *ade6-M216* 変異体を用いた。YE5S 寒天培地で一晩培養した2種類の分裂酵母株を1.5 mL チューブに加えて、5 μ L Leucine/Uracil 混合液で懸濁した。細胞懸濁液を SPA 培地にスポットし、30°C で10時間培養した。細胞が接合していることを確認した後、SPA 寒天培地から細胞を適量掻き取り、アデニンを含まない SD 寒天培地 (SD-A) に塗り広げて30°C で6~7日間培養した。*ade6-M210* 変異体または *ade6-M216* 変異体はアデニン非存在下では生育できないが、*ade6-M210* 変異と *ade6-M216* 変異を両方持つ2倍体細胞はアデニン非存在下でも生育するため SD-A 培地で2倍体細胞を選択することができる。

2.5 スポットテストによる細胞生育の解析

YE5S 寒天培地で一晩培養した細胞を、細胞濃度が 2×10^5 cells/ μ L となるように滅菌水で懸濁した。その後、細胞懸濁液を 2×10^1 cells/ μ L まで 10 倍ずつ希釈し、YE5S 寒天培地または YE5S + Phloxine B 寒天培地に各濃度の懸濁液を 5 μ L ずつスポットした。その後適切な温度で 3~4 日間培養した。

2.6 蛍光顕微鏡による観察

体細胞分裂または減数分裂中の細胞を Delta-Vision SoftWoRx システム(Applied Precision)を用いて蛍光顕微鏡観察を行った。細胞の厚みを考慮し、z 軸方向の撮影は 0.5 μ m おきに 10 ~ 12 セクション行った。撮影画像は SoftWoRx ソフトウェアによってデコンボリューションおよびプロジェクション処理を行った。

・体細胞分裂の細胞の生細胞観察

YE5S 液体培地で $0.5 \sim 1 \times 10^7$ cells/mL となるまで一晩培養した細胞を観察に用いた。*rad21-K1* 変異体の場合は 25°C で一晩培養した後 36°C で 2.5 時間培養し観察に用いた。また *nuf2-2* 変異体の場合は 25°C で一晩培養した後 36°C で 4 時間培養し観察に用いた。35 mm glass-bottomed dish (Iwaki glass)にレクチン溶液 (0.2 mg/mL, lectin from *Glycine max* (Sigma))を 50 μ L 添加して室温で 3 分間静置し、レクチン溶液を除去して細胞培養液を 100 μ L 添加して室温で 15 分間静置した。その後 SD + 5 Supplements (SD5S) 液体培地を 3 mL 加えて室温で蛍光顕微鏡観察を行った。*rad21-K1* 変異体または *nuf2-2* 変異体の観察は 36°C で行った。

・減数分裂中の細胞の生細胞観察

YE5S 寒天培地で一晚培養した細胞を適量掻き取り、1.5 mL チューブに加えて 5 μ L Leucine/ Uracil 混合液で懸濁して SPA 寒天培地にスポットした。その後、30°C で 7 ~ 10 時間培養し観察に用いた。*nuf2-2* 変異体の場合は 30°C で 5 時間培養した後、36°C で 2 時間培養して観察に用いた。細胞を EMM-N 液体培地に懸濁し、レクチンで処理した 35 mm glass-bottomed dish に加えて、室温で 15 分間静置した。その後 EMM-N 液体培地を 3 mL 加えて室温で蛍光顕微鏡観察を行った。*nuf2-2* 変異体の観察は 36°C で行った。

・孢子の観察

YE5S 寒天培地で一晚培養した細胞を適量掻き取り、1.5 mL チューブに加えて 5 μ L Leucine/ Uracil 混合液で懸濁して SPA 寒天培地にスポットし、30°C で 24 時間培養した。細胞が孢子を形成していることを確認した後、細胞を適量掻き取り 100% ethanol で 30 分間固定した。その後 ethanol を除去し 100 μ L PBS で懸濁してスライドガラス上で風乾し、VECTASHIELD mounting medium with DAPI (Vector Laboratories) でマウントして撮影した。

2.7 蛍光シグナル間の距離の定量化

Plo1-GFP のシグナル間の距離は Delta-Vision SoftWoRx システム (Applied Precision) 付属の Measure Distances により行った。解析にはデコンボリューション処理のみをした画像データを用いた。

3章 結果

1章で述べたように、*cut7Δ pkl1Δ* 株では SPB の分離に必要な Cut7 が欠損しているにもかかわらず、体細胞分裂で SPB が分離する (Olmsted et al., 2014; Rincon et al., 2017; Yukawa et al., 2017)。このことから、Cut7 に依存しない SPB 分離のメカニズムが存在することが明らかとなった。

本研究では *cut7Δ pkl1Δ* 株が減数第一分裂で SPB を分離せず、異常な紡錘体が形成されることを発見した。このことから、Cut7 非依存的な紡錘体形成システムが減数第一分裂では十分に機能しないことが示唆された。

3.1 *cut7Δ pkl1Δ* 株は減数分裂に異常を示す

Cut7 に依存しない SPB 分離の分子メカニズムを解明するために、*cut7Δ pkl1Δ* 株 (Olmsted et al., 2014) を作製した。まず *cut7Δ pkl1Δ* 株の生育を確認したところ、野生型 (以下 WT とする) および *pkl1* 破壊株 (以下 *pkl1Δ* 株とする) と比較して *cut7Δ pkl1Δ* 株に生育の異常は見られなかった (Fig. 5A)。

そこで *cut7Δ pkl1Δ* 株が体細胞分裂で SPB を分離するのかを生細胞で経時観察した。細胞は、SPB のマーカーである Sfi1 (Kilmartin, 2003) の C 末端に CFP を融合した Sfi1-CFP で SPB を、 α -tubulin である Atb2 の N 末端に mCherry を融合した mCherry-Atb2 (Sato et al., 2009) で微小管をそれぞれ可視化した。また分裂期サイクリンである Cdc13 (Decottignies et al., 2001) を、C 末端に YFP を融合することで可視化した (Cdc13-YFP)。WT と *cut7Δ pkl1Δ* 株はどちらも 0 min で 1 点だった SPB が 4 min で 2 点に分離し、SPB 間で微小管が束ねられて紡錘体が形成された (Fig. 5B)。このように、先行研究と同様に *cut7Δ pkl1Δ* 株の体細胞分裂で SPB が分

離することが確認された (Olmsted et al., 2014; Rincon et al., 2017; Yukawa et al., 2017)。

次に *cut7Δ pkl1Δ* 株が減数分裂を正常に行うかを確認する目的で、細胞を窒素源飢餓条件下で培養した。分裂酵母は窒素源が枯渇すると接合して減数分裂を行い、胞子を形成する。WT や *pkl1Δ* 株では、減数第一分裂と減数第二分裂によって核が4つに分配されることで、一つの接合子に胞子が4つ形成された (WT, *pkl1Δ*, **Fig. 5C**)。これに対して、*cut7Δ pkl1Δ* 株の接合子では1つまたは2つの胞子が形成された (*cut7Δ pkl1Δ*, **Fig. 5C**)。このように、*cut7Δ pkl1Δ* 株は減数分裂に異常を示すことが明らかになった。

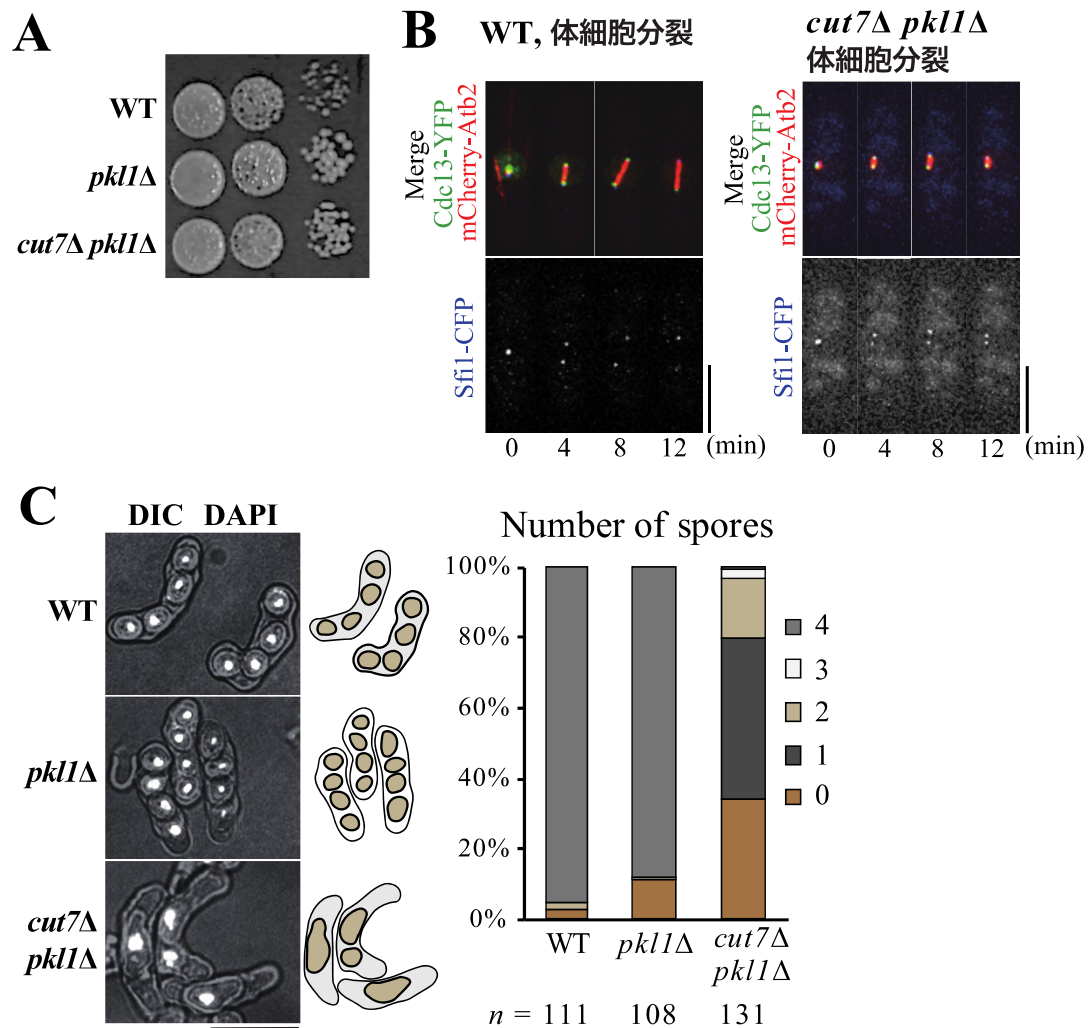


Figure 5 *cut7*Δ *pk11*Δ 株は減数分裂に異常を示す

A. それぞれの分裂酵母株の細胞懸濁液を 10 倍毎に希釈し、YE5S 培地にスポットして 30°C で 4 日間培養した。

B. WT および *cut7*Δ *pk11*Δ の体細胞分裂を観察した。分裂期サイクリンを Cdc13-YFP (緑)、微小管を mCherry-Atb2 (α -tubulin, 赤)、SPB を Sfi1-CFP (青)の融合タンパク質によって可視化した。スケールバー: 5 μ m。

C. 野生型、*pk11* 破壊株および *cut7*Δ *pk11*Δ をそれぞれ減数分裂に誘導し、形成された孢子数を定量化した。細胞は DAPI 染色によって核を可視化した。それぞれの変異体の孢子の模式図を中央に示した。スケールバー: 10 μ m。n: 測定した接合子の数。

図は Shirasugi and Sato, 2019 (Figs. 1 and S1)を改変し、転載した。

3.2 *cut7Δ pkl1Δ* 株は減数第一分裂の SPB 分離に異常を示す

cut7Δ pkl1Δ 株で異常な数の胞子が形成された原因を調べるために、WT と *cut7Δ pkl1Δ* 株の減数分裂を生細胞で経時観察した。WT では、0 min で 1 点だった SPB が 8 min で 2 点に分離し、SPB の間で微小管が束ねられて紡錘体が形成された (Fig. 6A)。その後、24 min で分裂期サイクリンである Cdc13-YFP のシグナルが消失した (Fig. 6A)。これは減数第一分裂が中期から後期へ移行したことを示す。減数第一分裂の後期では紡錘体が伸長し、核が分裂する (24-40 min, Fig. 6A)。56 min では Cdc13-YFP のシグナルが再度 SPB に表れた (Fig. 6A)。これは減数第二分裂が開始したことを示している。減数第二分裂ではそれぞれの SPB が分離することで、一つの接合子の中に紡錘体が 2 つ形成された (64 min, Fig. 6A)。

これに対して *cut7Δ pkl1Δ* 株の減数第一分裂では、約 85% の細胞で SPB が分離されないまま Cdc13-YFP のシグナルが消失し、減数第一分裂後期が開始した (0-40 min, Fig. 6B, C)。その後 *cut7Δ pkl1Δ* 株では、SPB が分離しないままの状態 Cdc13-YFP のシグナルが再度 SPB に表れた (48 min, Fig. 6B)。これは減数第一分裂が失敗した状態で、時間の経過に伴い減数第二分裂が開始されたことを意味している。減数第二分裂では *cut7Δ pkl1Δ* 株の SPB が 2 点に分離し、紡錘体が形成された (48-64 min, Fig. 6B)。以上の結果から、Cut7 非依存的に SPB を分離するシステムは、減数第一分裂でのみ十分に機能しないことが明らかとなった。

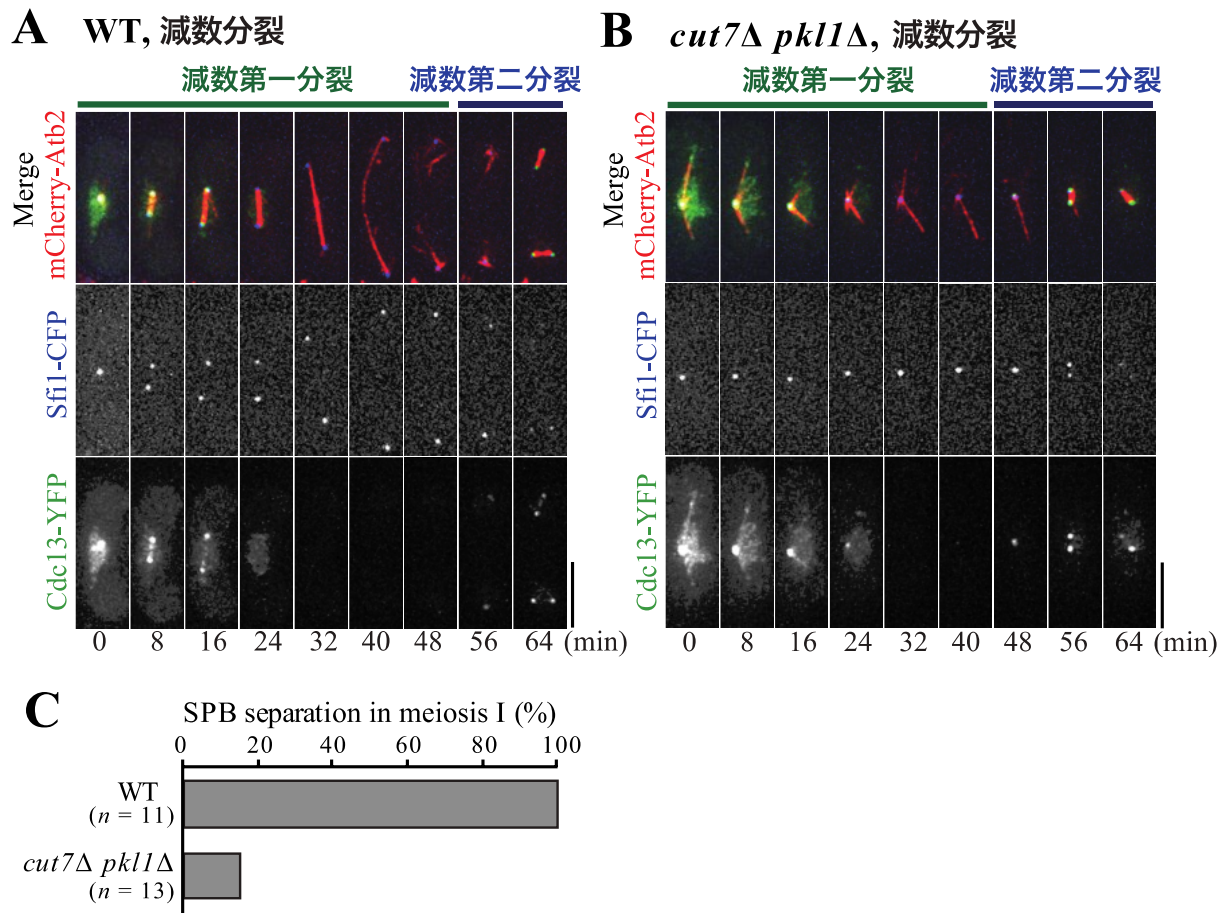


Figure 6 *cut7Δ pkl1Δ* 株は減数第一分裂の SPB 分離に異常を示す

A, B. WT および *cut7Δ pkl1Δ* 株の減数分裂を経時観察した。分裂期サイクリンを Cdc13-YFP (緑)、微小管を mCherry-Atb2 (赤)、SPB を Sfi1-CFP (青)の融合タンパク質によって可視化した。スケールバー: 5 μ m。

C. 減数第一分裂で SPB が分離した細胞の割合を WT と *cut7Δ pkl1Δ* について示す。n: 観察した減数分裂期の細胞の数。

図は Shirasugi and Sato, 2019 (Fig. 1)を改変し、転載した。

3.3 体細胞分裂と減数第一分裂では内向きの力と外向きの力のバランスが異なる

cut7Δ pkl1Δ 株の減数第一分裂で SPB が分離しないのは、SPB どうしを離す外向きの力が SPB どうしを近づける内向きの力よりも弱いためだと予想した。この仮説を検証するために、内向きの力を発生させる *klp2* (Troxell et al., 2001; Yukawa et al., 2018) (**Fig. 3B**) を破壊した *cut7Δ pkl1Δ klp2Δ* 株を作製した。もし外向きの力が内向きの力よりも弱いせいで SPB が分離しないのならば、*klp2* を破壊することで外向きの力が優位となり SPB が分離すると考えられる。

cut7Δ pkl1Δ 株と *cut7Δ pkl1Δ klp2Δ* 株を減数分裂に誘導し形成された胞子を観察した結果、*cut7Δ pkl1Δ* 株では4胞子を形成した接合子はほとんど見られないのに対し、*cut7Δ pkl1Δ klp2Δ* 株では約40%の接合子で胞子が4つ形成された。このように *klp2* を破壊し内向きの力を弱めることで、*cut7Δ pkl1Δ* 株における減数分裂の異常が部分的に改善されることが明らかとなった (**Fig. 7A**)。そこで *cut7Δ pkl1Δ klp2Δ* 株の減数分裂を経時観察した結果、約40%の細胞で減数第一分裂に SPB が分離した (*cut7Δ pkl1Δ klp2Δ*, 12 min, **Fig. 7B, C**)。これらのことから、*cut7Δ pkl1Δ* 株の減数第一分裂では外向きの力が内向きの力よりも弱いために SPB が分離しないことが示された。

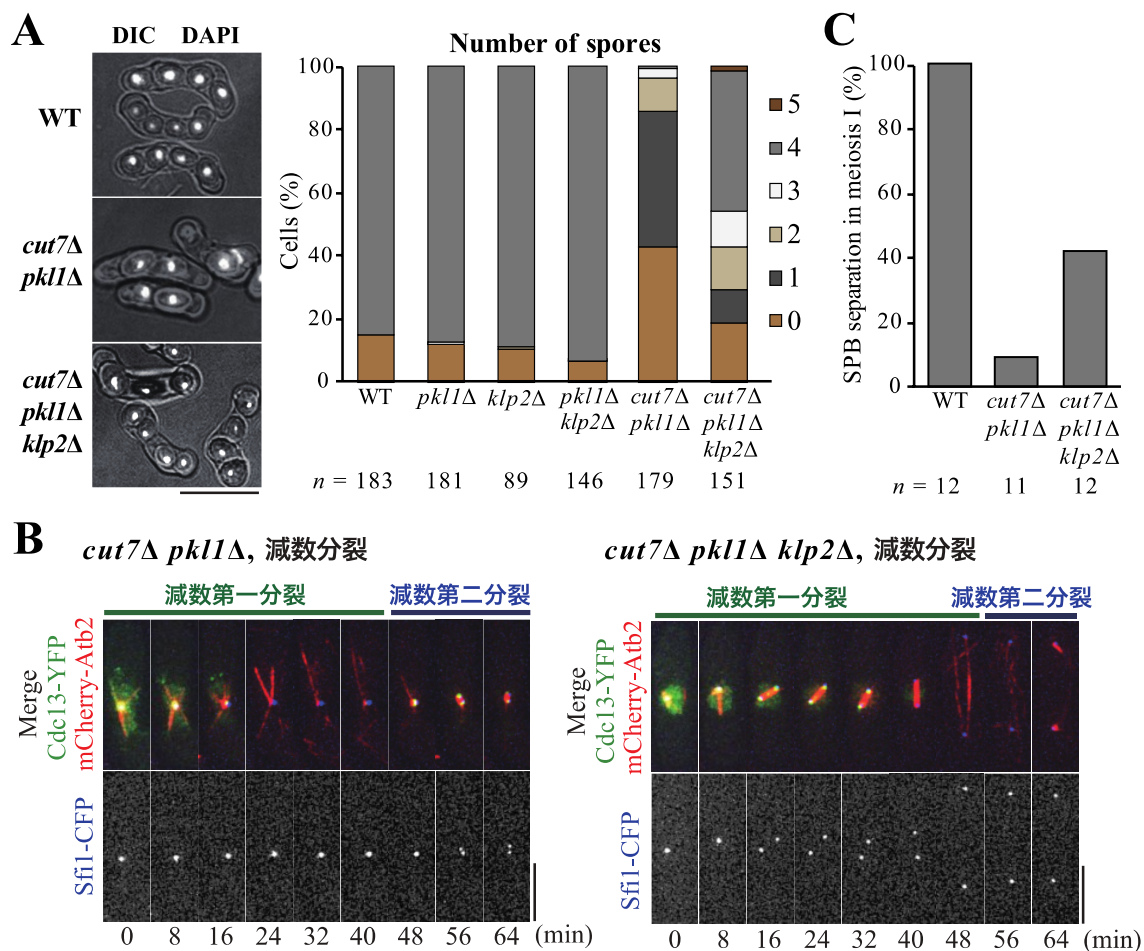


Figure 7 *cut7Δ pk11Δ* 株の減数第一分裂の SPB 分離は *klp2* を破壊することで部分的に改善される

A. WT、*pk11Δ* 株、*klp2Δ* 株、*pk11Δ klp2Δ* 株、*cut7Δ pk11Δ* 株および *cut7Δ pk11Δ klp2Δ* 株をそれぞれ減数分裂に誘導し、形成された胞子数を定量化した。細胞は DAPI 染色によって核を可視化した。WT、*cut7Δ pk11Δ* 株および *cut7Δ pk11Δ klp2Δ* 株の胞子の観察画像を左側に示した。スケールバー: 10 μ m。n: 測定した接合子の数。

B. *cut7Δ pk11Δ* 株および *cut7Δ pk11Δ klp2Δ* 株の減数分裂を観察した。分裂期サイクリンを Cdc13-YFP (緑)、微小管を mCherry-Atb2 (赤)、SPB を Sfi1-CFP (青)の融合タンパク質によって可視化した。観察を開始した点を 0 分とした。スケールバー: 5 μ m。

C. 減数第一分裂で SPB (Sfi1-CFP) が分離した細胞の割合を野生型、*cut7Δ pk11Δ* 株および *cut7Δ pk11Δ klp2Δ* 株について示す。n: 観察した減数分裂期の細胞の数。

図は Shirasugi and Sato, 2019 (Fig. 2)を改変し、転載した。

3.4 倍数性の違いは SPB の分離に影響しない

ここまでの研究によって、内向きの力と外向きの力のバランスが体細胞分裂と減数第一分裂で異なることが示された。しかしながらこれまでの実験では、体細胞分裂には一倍体の細胞を、減数分裂では二倍体の細胞を用いた。そのため、倍数性の違いが力のバランスの差の原因である可能性が排除できない。そこで二倍体で栄養増殖を行う分裂酵母株を作製し、体細胞分裂を経時観察した。力のバランスの差が倍数性の違いに起因するのならば、二倍体の *cut7Δ pkl1Δ* 株では体細胞分裂においても SPB が分離しないはずだが、WT と *cut7Δ pkl1Δ* 株いずれの二倍体細胞においても体細胞分裂で SPB (Sfi1-CFP) が分離した (**Fig. 8A, B**)。このことから、*cut7Δ pkl1Δ* 株の減数第一分裂で SPB が分離しない原因は倍数性の問題ではないことが示された。

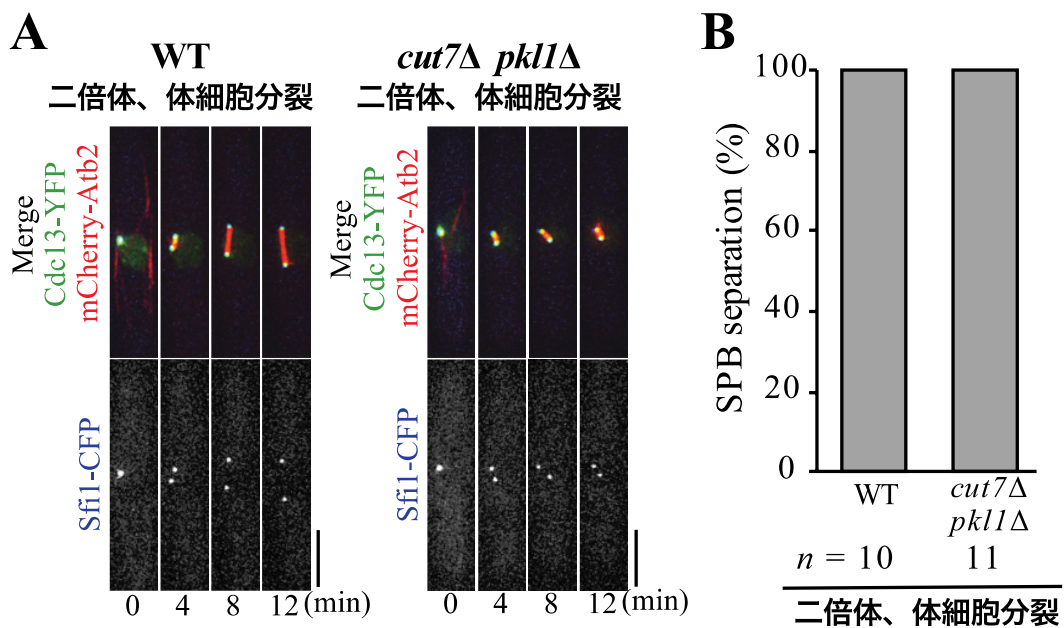


Figure 8 *cut7Δ pk11Δ* 株の二倍体細胞は体細胞分裂の SPB 分離に異常を示さない

A. WT および *cut7Δ pk11Δ* 株の二倍体細胞における体細胞分裂を観察した。分裂期サイクリンを Cdc13-YFP(緑)、微小管を mCherry-Atb2(赤)、SPB を Sfi1-CFP(青)の融合タンパク質によって可視化した。観察を開始した点を 0 分とした。スケールバー: 5 μ m。

B. 体細胞分裂で SPB (Sfi1-CFP) が分離した 2 倍体細胞の割合を WT と *cut7Δ pk11Δ* 株について示す。n: 観察した減数分裂期の細胞の数。

図は Shirasugi and Sato, 2019 (Fig. S2)を改変し、転載した。

3.5 体細胞分裂型の染色体は SPB の分離を促進する

体細胞分裂と減数第一分裂における力のバランスの違いは何に起因するのだろうか。*cut7Δpk11Δ* 株の SPB は体細胞分裂と減数第二分裂では分離するが、減数第一分裂では分離しない。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、外向きの力が発生しない原因だと予想した。

体細胞分裂と減数第二分裂に共通し、減数第一分裂で異なるものとして染色体の形態が挙げられる。体細胞分裂と減数第二分裂では姉妹染色分体がコヒーシによって接着しており、姉妹動原体が互いに背を向けるかたちで反対方向を向いている (Sakuno et al., 2009) (**Fig. 9A**)。これに対して減数第一分裂では、相同染色体の組換えによって染色体腕部に形成されたキアズマによって相同染色体が連結しており (Moore, 1998; Siomos and Nasmyth, 2003)、また姉妹動原体は一方向にまとめられ、一つの動原体のように振る舞う (Yokobayashi and Watanabe, 2005; Sakuno et al., 2011) (**Fig. 9A**)。このような染色体の形態の違いが、*cut7Δ pk11Δ* 株の減数第一分裂で SPB が分離しにくい原因だと予想した。この仮説を検証するために、*cut7Δ pk11Δ* 株において DNA 二本鎖の切断に必要な *rec12/spo11* (Cao et al., 1990; Lin and Smith, 1994; Keeney et al., 1997; Cervantes et al., 2000) を破壊した。DNA 二本鎖の切断は相同組換えに必須であるため、*rec12* を破壊するとキアズマが形成されず相同染色体の連結が解除される (Cao et al., 1990; Lin and Smith, 1994; Keeney et al., 1997; Cervantes et al., 2000) (*rec12Δ*, **Fig. 9B**)。 *cut7Δ pk11Δ rec12Δ* 株の減数第一分裂を観察したところ、*cut7Δ pk11Δ* 株と同様に約 90%の細胞で SPB が分離しなかった (*cut7Δ pk11Δ rec12Δ*, **Fig. 9C, D**)。このことから、相同染色体の連結だけが SPB の分離を阻害する原因ではないことが示唆された。

そこで、*rec12* に加えてさらに姉妹動原体をまとめる因子である *Moa1* を欠損させることで、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 (*rec12Δ moa1Δ*, **Fig. 9B**)。このような *cut7Δ pkl1Δ rec12Δ moa1Δ* 株の減数第一分裂を観察したところ、52%の細胞で SPB が2点に分離した (*cut7Δ pkl1Δ rec12Δ moa1Δ*, **Fig. 9C, D**)。また、*cut7Δ pkl1Δ moa1Δ* 株でも減数第一分裂の SPB 分離が改善したことから (*cut7Δ pkl1Δ moa1Δ*, **Fig. 9E, F**)、*Rec12* による相同染色体の連結は SPB の分離に影響を及ぼさないことが明らかとなった。これらの結果から、体細胞分裂時の姉妹動原体どうしが反対方向を向いた染色体が、*cut7Δ pkl1Δ* 株の SPB 分離に必要な外向きの力を発生させることが示唆された。

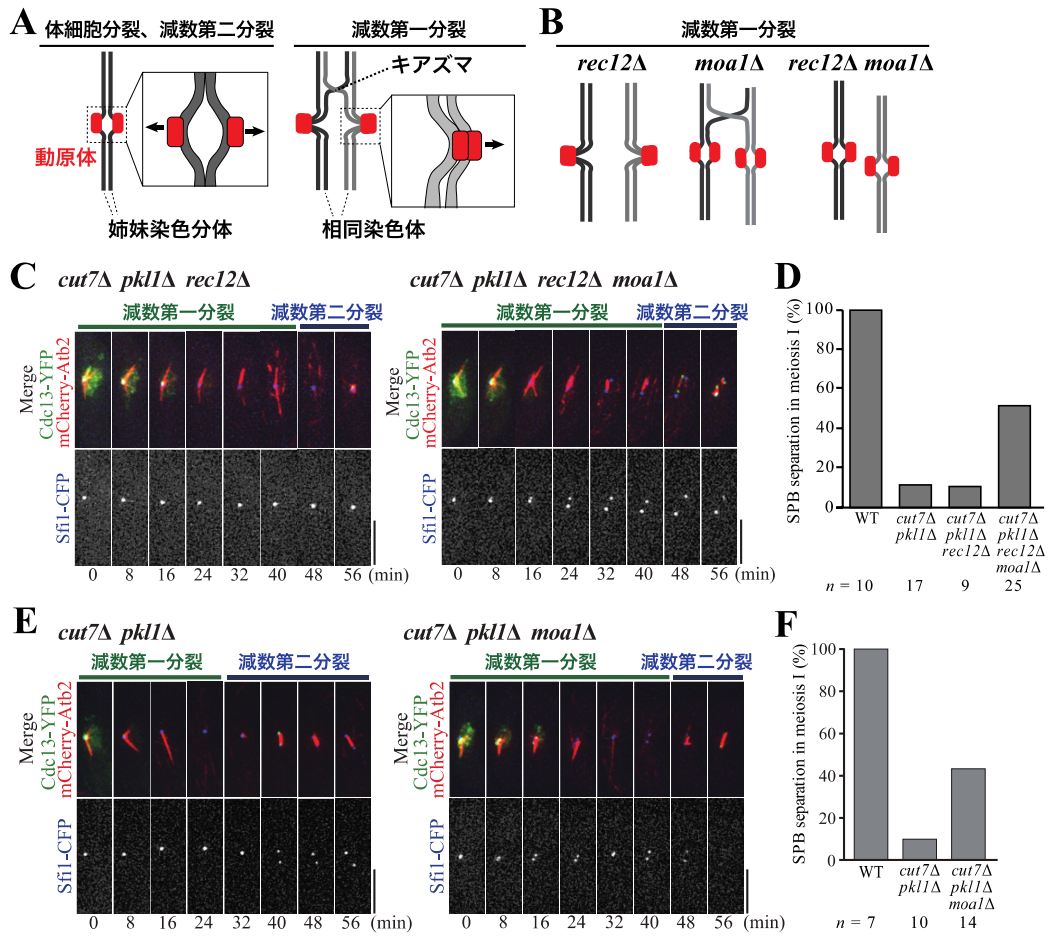


Figure 9 体細胞分裂型の染色体は *cut7Δ pk11Δ* 株の SPB 分離を促進する

A. 体細胞分裂と減数第一分裂の染色体の模式図。動原体の周辺を拡大図で示した。拡大図内の矢印は動原体の向きを表す。詳細は本文を参照。

B. *rec12Δ* 株、*moa1Δ* 株および *rec12Δ moa1Δ* 株の減数第一分裂の染色体をそれぞれ模式図に示す。

C. *cut7Δ pk11Δ rec12Δ* 株と *cut7Δ pk11Δ rec12Δ moa1Δ* 株の減数分裂を観察した。分裂期サイクリンを Cdc13-YFP (緑)、微小管を mCherry-Atb2 (赤)、SPB を Sfi1-CFP (青) の融合タンパク質によって可視化した。観察を開始した点を 0 分とした。スケールバー: 5 μ m。

D. 減数第一分裂で SPB (Sfi1-CFP) が分離した細胞の割合を WT、*cut7Δ pk11Δ* 株、*cut7Δ pk11Δ rec12Δ* 株および *cut7Δ pk11Δ rec12Δ moa1Δ* 株 について示す。n: 観察した減数分裂期の細胞の数。

E. *cut7Δ pk11Δ* 株と *cut7Δ pk11Δ moa1Δ* 株の減数分裂を観察した。分裂期サイクリンを Cdc13-YFP (緑)、微小管を mCherry-Atb2 (赤)、SPB を Sfi1-CFP (青) の融合タンパク質によって可視化した。観察を開始した点を 0 分とした。スケールバー: 5 μ m。

F. 減数第一分裂で SPB (Sfi1-CFP) が分離した細胞の割合を WT、*cut7Δ pk11Δ* 株、および *cut7Δ pk11Δ moa1Δ* 株 について示す。n: 観察した減数分裂期の細胞の数。

図は Shirasugi and Sato, 2019 (Figs. 3 and S3) を改変し、転載した。

3.6 動原体は外向きの力を発生させる力学的な支点として機能する

体細胞分裂型の染色体はどのようにして外向きの力を発生させるのだろうか。染色体は動原体を介して微小管と結合することから、微小管が動原体との結合を介して SPB を分離する外向きの力を発生させると予想した。

体細胞分裂では姉妹動原体が互いに背を向けるかたちで密着している。そのため、2つの SPB から形成された微小管が SPB の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される (体細胞分裂、**Fig. 10A**)。これに対して減数第一分裂では相同染色体どうしが密着しておらず、染色体腕部に形成されるキアズマのみで繋がっているため、相同な動原体どうしが離れやすい。したがって、このような動原体は力学的な支点として機能しにくいと予想される (減数第一分裂、**Fig. 10A**)。

これらの仮説を検証するために、*cnt1*-GFP システム (Sakuno et al., 2009) によって姉妹または相同な動原体の挙動を生細胞で経時観察した。*cnt1*-GFP システムでは、動原体が形成されるセントロメアの中央領域を1番染色体でのみ可視化するため、1番染色体の動原体の挙動を観察することができる。*cut7Δ pk11Δ* 株の体細胞分裂の開始時では、SPB (Sfi1-CFP) と姉妹動原体 (*cnt1*-GFP) のシグナルがわずかに離れているが (*cut7Δ pk11Δ*, 0-30 s, **Fig. 10B**)、SPB が分離する直前になるとこれらのシグナルは完全に重なった (*cut7Δ pk11Δ*, 60 s, **Fig. 10B**)。また、SPB が分離した直後では姉妹動原体が2つの SPB の間に位置した (*cut7Δ pk11Δ*, 90 s, **Fig. 10B**)。これらのことから、*cut7Δ pk11Δ* 株の体細胞分裂において姉妹動原体は外向きの力を発生させる支点として機能することが示唆された (体細胞分裂, **Fig. 10A**)。

これに対して *cut7Δ pk11Δ* 株の減数第一分裂では相同染色体の動原体どうしが

離れやすいため、動原体 (*cnt1*-GFP) のシグナルが 2 点観察された (*cut7* Δ *pkl1* Δ , **Fig. 10C**)。また、これらの動原体は SPB から離れた位置に存在した (*cut7* Δ *pkl1* Δ , **Fig. 10C**)。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ことが示唆された (減数第一分裂, **Fig. 10A, C**)。

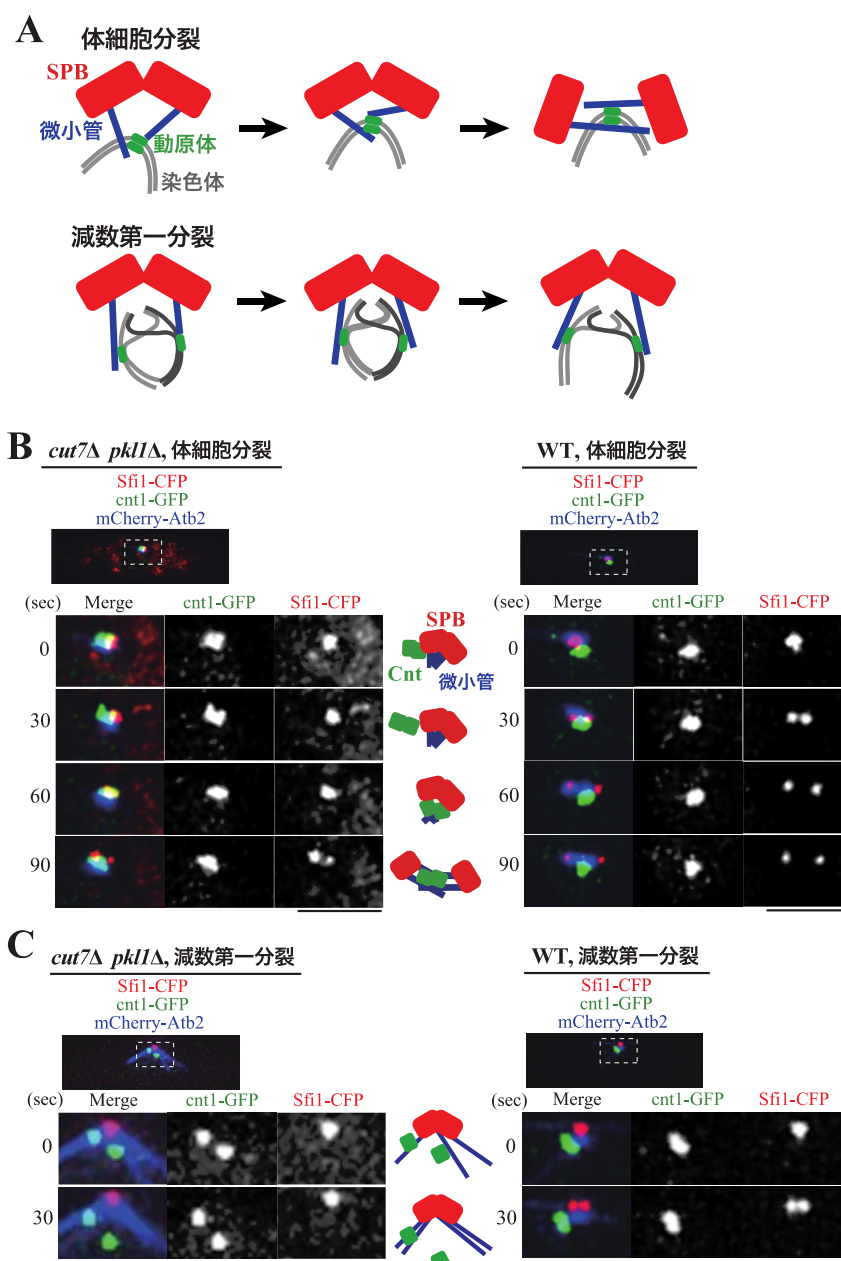


Figure 10 体細胞分裂の動原体は微小管を束ねる力学的な支点として機能する

A. 体細胞分裂の動原体は微小管と結合し、SPB の間で外向きの力を発生させる力学的な支点として機能する。減数第一分裂では相同染色体が離れているため、動原体が支点として機能しにくい。詳細は本文を参照。

B, C. *cut7Δ pk11Δ* 株および WT の体細胞分裂 (B)と減数第一分裂 (C)を観察した。1 番染色体のコアセントロメア領域を cnt1-GFP (緑)、SPB を Sfi1-CFP (赤)、微小管を mCherry-Atb2 (青)で可視化した。中央に *cut7Δ pk11Δ* 株の観察画像の模式図を示した。スケールバー: 2 μm 。

図は Shirasugi and Sato, 2019 (Fig. 4)を改変し、転載した。

3.7 セントロメアどうしの接着が外向きの力を促進する

これまでの仮説が正しいならば、体細胞分裂であっても姉妹動原体どうしを離せば外向きの力が発生しにくくなるはずである。

体細胞分裂では、姉妹染色分体のセントロメアどうしがコヒーシンによって接着することで、姉妹動原体が密着する (Tomonaga et al., 2000; Bernard et al., 2001; Nonaka et al., 2002) (WT, **Fig. 11A**)。そこで体細胞分裂の姉妹動原体どうしを離すために、コヒーシンのサブユニットである *rad21* の温度感受性変異体、*rad21-K1* を用いた (Tatebayashi et al., 1998)。*rad21-K1* 変異体では制限温度下で姉妹染色分体どうしの接着が弱まるため (Bernard et al., 2001) (*rad21-K1*, **Fig. 11A**)、動原体を介した外向きの力が機能しにくいと予想される。まず *cut7Δ pkl1Δ rad21-K1* 株を作製し、その生育を確認したところ、*cut7Δ pkl1Δ* 株や *rad21-K1* 変異体と比較して *cut7Δ pkl1Δ rad21-K1* 株は許容温度下であっても生育が悪化した (**Fig. 11B**)。そこで *cut7Δ pkl1Δ rad21-K1* 株の体細胞分裂で SPB の分離に異常が生じるかを確認するために、Plo1-GFP (Polo-like kinase) (Bahler et al., 1998b) の融合タンパク質で SPB を可視化し、制限温度下で生細胞を経時観察した。*cut7Δ pkl1Δ* 株の体細胞分裂では SPB (Plo1-GFP) が 2 点に分離した後、5-10 分間 2 つの SPB 間の距離が約 1.0-1.5 μm に保たれた (*cut7Δ pkl1Δ*, **Fig. 11C, D**)。それに対して *cut7Δ pkl1Δ rad21-K1* 株では SPB 間の距離が保たれず、分離後の SPB が再び 1 点に戻った (4-9 min, *cut7Δ pkl1Δ rad21-K1*, **Fig. 11C, D**)。したがって、姉妹染色分体間の接着が SPB どうしを遠ざける外向きの力を促進することが示された。

rad21-K1 変異体ではコヒーシンの機能が低下するため、セントロメアだけでなく染色体の腕部の接着も脆弱になる (Bernard et al., 2001) (*rad21-K1*, **Fig. 11A**)。そ

ここでセントロメアどうしの接着が外向きの力を促進することをより明確に調べるために、*swi6Δ* 株を用いた (Ekwall et al., 1995)。ヘテロクロマチンタンパク質である Swi6/HP1 はセントロメアへのコヒーシンの呼び込みに必要なため、*swi6Δ* 株では姉妹染色分体間の接着がセントロメアの周辺でのみ脆弱になる (Ekwall et al., 1995; Bernard et al., 2001; Nonaka et al., 2002) (*swi6Δ*, **Fig. 11A**)。まず *cut7Δ pkl1Δ swi6Δ* 株を作製し生育を確認したところ、*cut7Δ pkl1Δ* 株や *swi6Δ* 株と比較して *cut7Δ pkl1Δ swi6Δ* 株は生育が悪化した (**Fig. 11E**)。そこで *cut7Δ pkl1Δ swi6Δ* 株の体細胞分裂を経時観察し、SPB の分離に異常が生じるかを調べた。*cut7Δ pkl1Δ* 株では体細胞分裂を開始してから平均で 2.6 分後に SPB が分離したのに対し、*cut7Δ pkl1Δ swi6Δ* 株では SPB が分離するまでに平均 3.9 分かかった (**Fig. 11F, G**)。このように *cut7Δ pkl1Δ* 株のセントロメアの接着が脆弱になると、動原体を介した外向きの力が機能しにくくなり、SPB 分離が遅延することが明らかとなった。

cut7Δ pkl1Δ 株の減数分裂の異常は、内向きの力を発生させる *k1p2* を破壊することで部分的に改善された (**Fig. 7**)。これと同様に、*cut7Δ pkl1Δ rad21-K1* 株や *cut7Δ pkl1Δ swi6Δ* 株で見られた生育の異常は *k1p2* を破壊することで改善された (**Fig. 11H, I**)。

以上の結果を総合して、セントロメアどうしが接着していることが、動原体が外向きの力を発生させる力学的な支点として機能するために必要であることが明らかとなった。

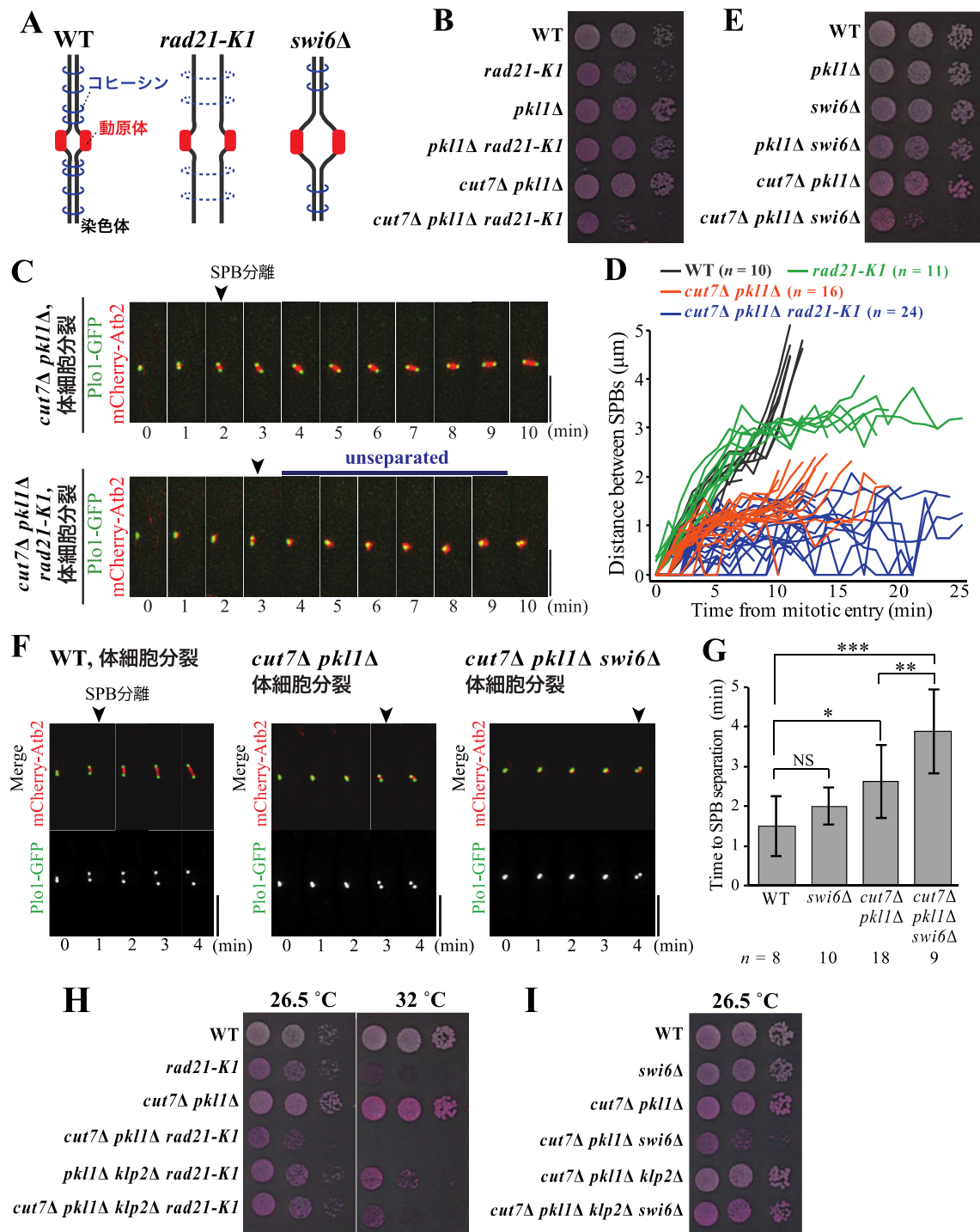


Figure 11 セントロメアの接着は動原体を介した外向きの力を促進する

A. WT、*rad21-K1* 変異体および *swi6Δ* 株の染色体の模式図を示す。動原体を赤で、コヒーシンを青で示す。詳細は本文を参照。

B. それぞれの酵母株の細胞懸濁液を 10 倍毎に希釈し、YE5S + Phloxine B 培地にスポットして

26.5°C で 3 日間培養した。

C. *cut7Δ pk11Δ* 株および *cut7Δ pk11Δ rad21-K1* 株の体細胞分裂を観察した。SPB を Plo1-GFP (緑)、微小管を mCherry-Atb2 (赤) の融合タンパク質によって可視化した。mCherry-Atb2 のシグナルが SPB の近傍でドット状に形成された点を分裂期の開始点と判断し、0 分とした。SPB が分離した点を黒色の矢頭で示した。SPB が分離後に再び重なった期間を *unseparated* と表記した。

D. SPB (Plo1-GFP) 間の距離の変化を WT、*rad21-K1* 変異体、*cut7Δpk11Δ* 株および *cut7Δpk11Δrad21-K1* 株について示した。*n*: 観察した体細胞分裂期の細胞の数。

E. それぞれの酵母株の細胞懸濁液を 10 倍毎に希釈し、YE5S + Phloxine B 培地にスポットして 26.5°C で 4 日間培養した。

F. WT、*cut7Δpk11Δ* 株および *cut7Δpk11Δ swi6Δ* 株の体細胞分裂を観察した。SPB を Plo1-GFP (緑)、微小管を mCherry-Atb2 (赤) の融合タンパク質によって可視化した。分裂開始点を 0 分とし、SPB が分離した点を黒色の矢頭で示した。

G. 分裂期を開始してから SPB が分離するまでの時間を WT、*swi6Δ* 株、*cut7Δpk11Δ* 株および *cut7Δpk11Δ swi6Δ* 株について定量化した。NS: not significant ($P > 0.01$), *: $P < 0.01$, **: $P < 0.005$, ***: $P < 0.001$ 、student の *t* 検定 (両側検定)。*n*: 観察した体細胞分裂期の細胞の数。エラーバーは標準偏差を示す。

H, I. それぞれの酵母株の細胞懸濁液を 10 倍毎に希釈し、YE5S + Phloxine B 培地にスポットして 26.5°C または 32°C で 3 日間 (H) あるいは 4 日間培養 (I) した。

スケールバー: 5 μm。

図は Shirasugi and Sato, 2019 (Fig. 5)を改変し、転載した。

3.8 動原体と微小管の結合が外向きの力を促進する

動原体が外向きの力を発生させるためには、2つの SPB から形成された微小管が動原体と結合する必要があると予想される (Fig. 10A)。この仮説を検証するために、微小管との結合に重要な動原体タンパク質である Nuf2 の温度感受性変異体を用いた。まず始めに、制限温度下で Nuf2 が動原体から脱局在する *nuf2-1* 変異体 (Nabetani et al., 2001) を *cut7Δ pkl1Δ* 株と掛け合わせることで、*cut7Δ pkl1Δ nuf2-1* 株の作製を試みた。しかし、この掛け合わせによって得られた細胞の中に *cut7Δ pkl1Δ nuf2-1* 株は存在しなかった。このことから、*cut7Δ pkl1Δ nuf2-1* 株は合成致死であると考えられる。そこで制限温度下で Nuf2 が動原体に局在し続けるものの、微小管と動原体の結合に異常が生じる *nuf2-2* 変異体 (Nabetani et al., 2001) を *cut7Δ pkl1Δ* 株と掛け合わせ、*cut7Δ pkl1Δ nuf2-2* 株を作製した。もし微小管と動原体の結合が外向きの力を発生させるのならば、*cut7Δ pkl1Δ nuf2-2* 株は体細胞分裂においても動原体を介した外向きの力が十分に働かず、SPB の分離に異常が生じると予想される。そこで *cut7Δ pkl1Δ* 株と *cut7Δ pkl1Δ nuf2-2* 株の体細胞分裂を制限温度下でそれぞれ経時観察した。*cut7Δ pkl1Δ* 株では、すべての細胞が体細胞分裂を開始してから 5 分以内に SPB を分離したのに対して、*cut7Δ pkl1Δ nuf2-2* 株では 25%以上の細胞で 5 分以上 SPB が分離されなかった (Fig. 12A, B)。このように、体細胞分裂において動原体が外向きの力を促進するためには、微小管と動原体の結合が必要であることが示された。

次に動原体と微小管の結合が減数第一分裂においても外向きの力を発生させるために必要かを調べる目的で、*nuf2-2* 変異を *cut7Δ pkl1Δ klp2Δ* 株に導入した。まず *cut7Δ pkl1Δ klp2Δ* 株の減数分裂を制限温度下で観察したところ、40%以上の細

胞が減数第一分裂で SPB を分離した (*cut7Δ pkl1Δ klp2Δ*, 16 min, **Fig. 12C, D**)。このことから、動原体を介した外向きの力は減数第一分裂でも部分的に機能すると考えられる。これに対して *cut7Δ pkl1Δ klp2Δ nuf2-2* 株では約 90%の細胞が減数第一分裂で SPB を分離しなかったことから、動原体と微小管の結合が減数第一分裂の SPB 分離を促進することが示された (*cut7Δ pkl1Δ klp2Δ nuf2-2*, ~ 24 min, **Fig. 12C, D**)。以上の結果を総合して、動原体は微小管と結合することで外向きの力を発生させる力学的な支点として振る舞い、SPB の分離を促進することが明らかとなった。

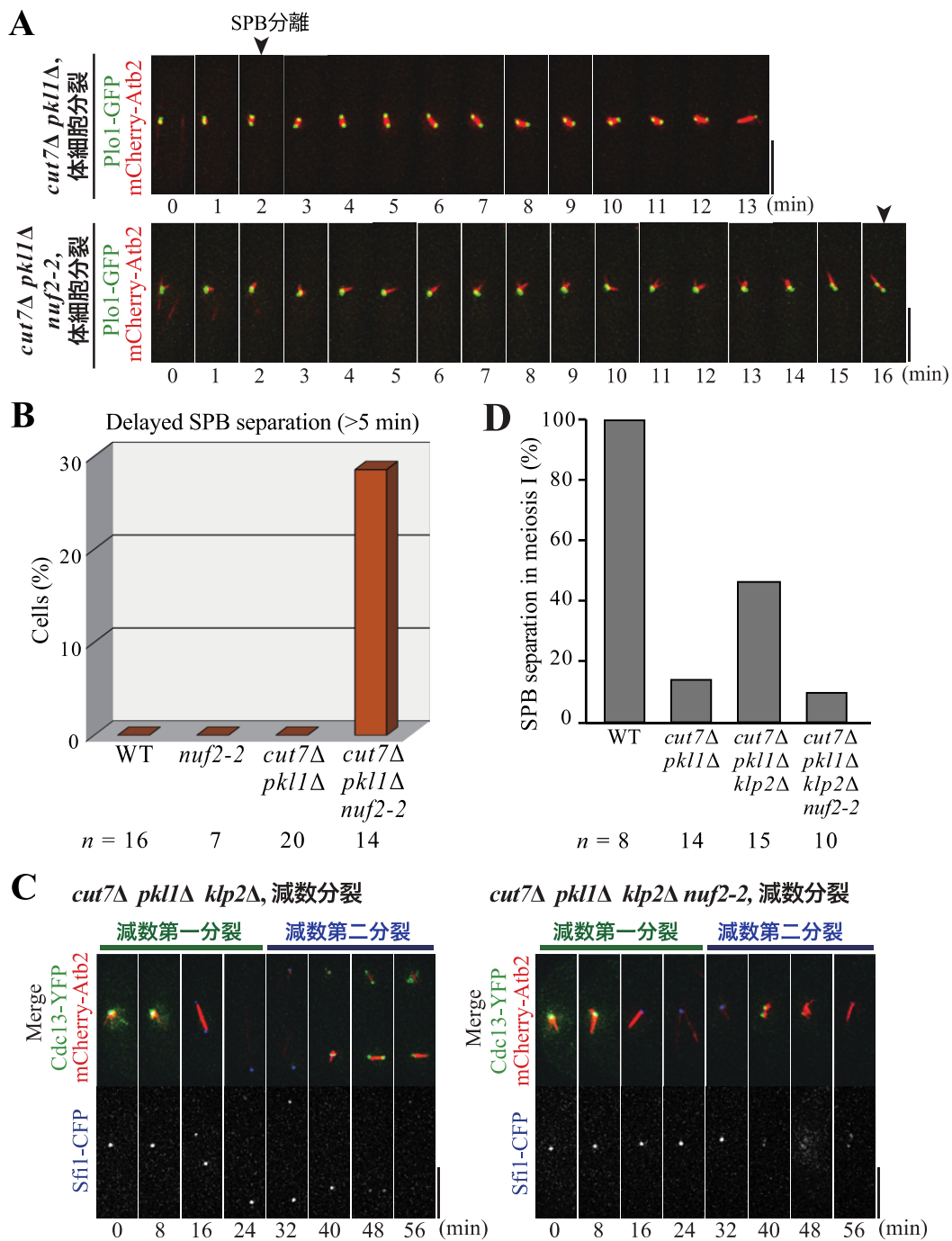


Figure 12 動原体と微小管の結合は *cut7Δ pk11Δ* 株の SPB 分離を促進する

A. *cut7Δ pk11Δ* 株および *cut7Δ pk11Δ nuf2-2* 株の体細胞分裂を観察した。SPB を Plo1-GFP (緑)、微小管を mCherry-Atb2 (赤) の融合タンパク質によって可視化した。mCherry-Atb2 のシグナルが SPB の近傍でドット状に形成された点を分裂期の開始点と判断し、0 分とした。SPB が分離した点を黒色の矢頭で示した。

B. 体細胞分裂を開始してから 5 分以上 SPB (Plo1-GFP) が分離しなかった細胞の割合を WT、*nuf2-*

2 変異体、*cut7Δpk11Δ* 株および *cut7Δpk11Δnuf2-2* 株について示す。*n*: 観察した体細胞分裂期の細胞の数。

C. *cut7Δpk11Δklp2Δ* 株および *cut7Δpk11Δklp2Δnuf2-2* 株の減数分裂を観察した。分裂期サイクリンを Cdc13-YFP (緑)、微小管を mCherry-Atb2 (α -tubulin, 赤)、SPB を Sfi1-CFP (青)で可視化した。観察を開始した点を 0 分とした。

D. 減数第一分裂で SPB(Sfi1-CFP) が分離した細胞の割合を WT、*cut7Δpk11Δ* 株、*cut7Δpk11Δklp2Δ* 株および *cut7Δpk11Δklp2Δnuf2-2* 株について示す。*n*: 観察した減数分裂期の細胞の数。

スケールバー: 5 μ m。

図は Shirasugi and Sato, 2019 (Fig. 6)を改変し、転載した。

4章 考察とまとめ

4.1 Cut7 非依存的に発生する外向きの力

本研究によって *cut7Δpk11Δ* 株の体細胞分裂では、姉妹動原体が外向きの力を発生させる力学的な支点として機能し、SPB の分離を促進することが明らかとなった。一方で Cut7 存在下では、*rad21-K1* 変異体や *swi6Δ* 株、*nuf2-2* 変異体において SPB の分離に異常が見られなかった (**Figs. 11D, G and 12B**)。これらの結果から、動原体を介した外向きの力は Cut7 存在下では SPB の分離に必須ではないことが示唆された。以上のことから、生理的条件下では Cut7 による外向きの力が SPB を分離させ、Cut7 が十分に機能しない条件では動原体を介した外向きの力が SPB の分離を促進するのではないかと予想される。

近年、*cut7Δpk11Δ* 株の体細胞分裂では微小管結合タンパク質である Ase1/PRC1 が SPB 間で微小管を束ね、外向きの力を発生させることが報告された (Rincon et al., 2017; Yukawa et al., 2017)。一方で本研究では、動原体が 2 つの SPB から伸長した微小管と結合し、外向きの力を発生させる力学的な支点として機能することを示した。これら 2 つのシステムは、Cut7 非存在下においてどのように制御し合うのだろうか。Ase1 と動原体の相互作用は知られていないため、*cut7Δpk11Δ* 株では Ase1 と動原体がそれぞれ独立して外向きの力を発生させることで、SPB の分離が達成される可能性がある。一方で、動原体が SPB 間で複数の微小管と相互作用することで、Ase1 が SPB 間に集まった微小管を束ねやすくなる可能性も考えられる。今後の研究で、動原体と Ase1 が協働して外向きの力を発生させる可能性について検証する必要がある。

また *cut7Δpk11Δ* 株において、核内に形成された微小管が核膜を押しすることによっ

て外向きの力が発生する可能性が、先行研究の *in silico* 解析によって示唆された (Rincon et al., 2017、**Fig. 13A**)。分裂酵母では高等生物と異なり、分裂期でも核膜が崩壊せずに維持される (Heath, 1980)。In silico の解析では、核膜を大きさが一定の球と定義したときに、*cut7Δpkll1Δ* 株において核膜と接触した微小管が伸長して核膜を押し出すことで、SPB が離れる可能性を報告している (Rincon et al., 2017、**Fig. 13A**)。一方で分裂酵母には Lamin のような核膜の形態を支持する因子が存在しないため (Mans et al., 2004)、実際の核膜は柔軟な構造体であり、*pkll1Δ* 株などでは微小管によって核内から押されると核膜が変形する (Syrovatkina and Tran, 2015; Yukawa et al., 2015、**Fig. 13B**)。このような核膜の柔軟性から、微小管が核膜を押し出すことによって発生する外向きの力は、実際には *in silico* で想定されたものよりも弱いと予想される (**Fig. 13B**)。そのため、*cut7Δpkll1Δ* 株において核膜を介した外向きの力が SPB 分離を促進するのか、あるいは全く影響しないのかは不明である。今後の研究で、微小管と動原体に加えて核膜によって発生する力についても注目すべきだろう。

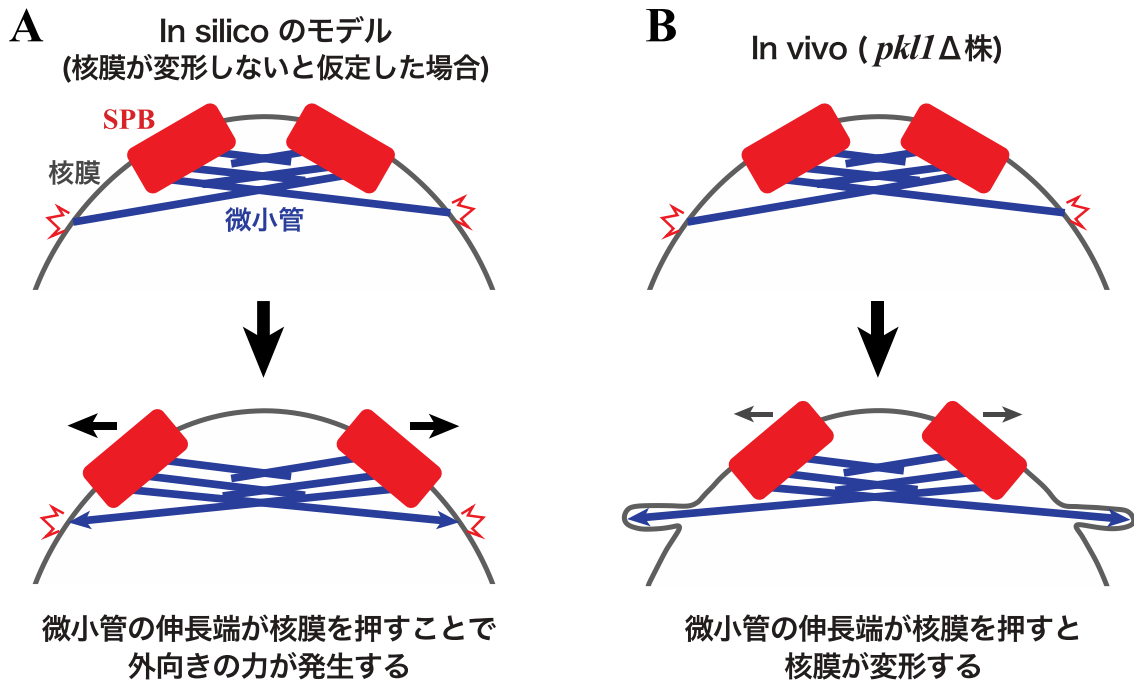


Figure 13 微小管が核膜を押し出すことで外向きの力が発生するモデル図

A. In silico における核膜によって発生する外向きの力。核膜を大きさが一定の球と定義したとき、微小管の伸長端が核膜を押し出すことで外向きの力が発生し、SPB 同士が離れる (Rincon et al., 2017)。

B. In vivo (*pkl1*Δ 株) における核膜と微小管の挙動。微小管が核膜を押し出すと核膜が変形して微小管が突出するため (Syrovatkina and Tran, 2015; Yukawa et al., 2015)、微小管と核膜によって発生する外向きの力は in silico で想定されたものよりも弱い可能性がある。

4.2 減数第一分裂と体細胞分裂では、内向きと外向きの力のバランスが異なる

本研究によって、*cut7Δpk11Δ* 株の減数第一分裂では、動原体が外向きの力が発生させるための支点として機能しにくいせいで SPB が分離しないことが明らかとなった。しかしながら *cut7Δpk11Δrec12Δmoa1Δ* 株でも約 50%の細胞で SPB が分離しなかったことから (Fig. 9C)、動原体以外にも減数第一分裂に SPB が分離しにくい原因があると考えられる。

先述の通り、*cut7Δpk11Δ* 株の SPB が分離するためには微小管結合タンパク質である Ase1 が必要であることが報告されている (Rincon et al., 2017; Yukawa et al., 2017)。このことから、*cut7Δpk11Δ* 株の減数第一分裂では Ase1 が十分に機能しないために、体細胞分裂時よりも外向きの力が弱い可能性が考えられる。一方で、Klp2 による内向きの力が減数第一分裂では体細胞分裂時よりも強いため SPB が分離しにくい可能性も排除できない。実際に *k1p2* を破壊することで、*cut7Δpk11Δ* 株の減数第一分裂における SPB の分離が部分的に改善された (Fig. 7B, C)。今後はこれらの可能性を検証するために、体細胞分裂と減数第一分裂における Ase1 と Klp2 の機能や発現量の差に注目する必要がある。

4.3 減数第一分裂で SPB が分離しにくいことの意義

分裂酵母の動原体は、間期では SPB に繋ぎ止められている (Funabiki et al., 1993) (Fig. 14A)。そのため体細胞分裂の開始時では、動原体が近くの SPB から伸長した微小管と結合しやすいため、その後の染色体分配を正確に行うことができる。一方で、減数第一分裂の開始時では動原体が SPB から離れた位置に存在する (Chikashige et al., 1994) (Fig. 14B)。これらの動原体は、SPB から放射状に形成された微小管によって捕捉されて SPB の近傍に移動し、その後で SPB が分離して紡錘体が形成される (Kakui et al., 2013) (Fig. 14B)。動原体が SPB の近傍に回収される前に紡錘体が形成されると、紡錘体の微小管が遠くの動原体と結合できないため染色体分配に異常が生じる (Kakui et al., 2013)。そのため減数第一分裂の開始時では、動原体が回収されるまでの間は SPB の分離が阻害される必要がある。

本研究によって、減数第一分裂では動原体が外向きの力を発生させる支点として機能しにくいことが明らかとなった。動原体が外向きの力を促進するためには、2つの SPB から伸長した微小管が SPB の間で動原体と結合する必要がある。このことから、減数第一分裂の開始時では動原体が SPB から離れているせいで、動原体による外向きの力が発生せず、SPB が分離しにくいと予想される。動原体が微小管によって SPB の近傍に回収されると、動原体が外向きの力を発生させる支点として働けるため、SPB の分離が促進されると考えられる。実際に減数第一分裂において、動原体を SPB の近傍に人工的に繋ぎ止めることで紡錘体の形成が促進されることが報告されている (Fennell et al., 2015)。このように動原体を介した外向きの力は、減数第一分裂の SPB 分離のタイミングを制御することで、その後の染色体分配の異常を未然に防ぐと考えられる。

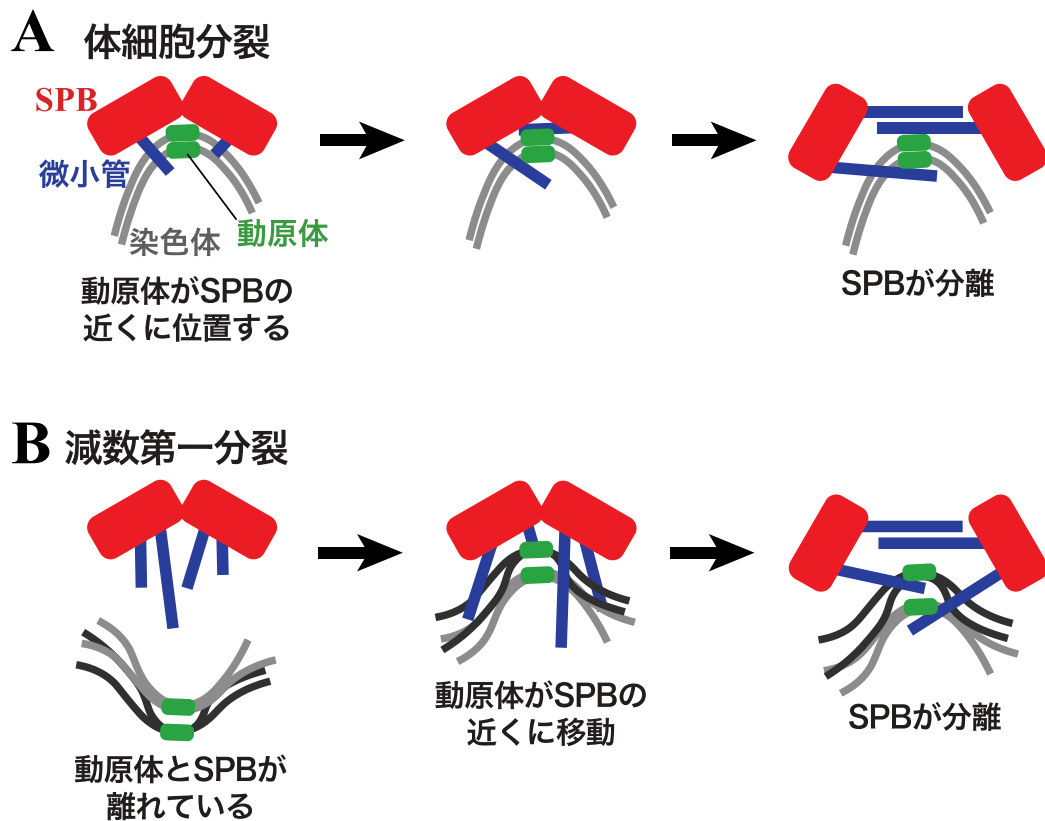


Figure 14 分裂酵母における体細胞分裂と減数第一分裂の染色体の配置

- A. 分裂酵母の体細胞分裂の開始時では、動原体が SPB の近くに位置する。
- B. 減数第一分裂の開始時では動原体が SPB から離れている。これらの動原体は微小管によって捕捉され、SPB の近くへ引き寄せられる。動原体が SPB の近くに移動した後、SPB が分離する。

4.4 高等生物における動原体を介した中心体分離システム

HeLa 細胞では、動原体タンパク質である CENP-O または CENP-L をノックダウンすると、分裂期における中心体の両極への移動が遅延することが生細胞観察によって明らかとなっている (Toso et al., 2009; Machedlishvili et al., 2012)。このとき CENP-O または CENP-L をノックダウンした細胞では、動原体に結合している微小管の本数が減少する (Toso et al., 2009; Machedlishvili et al., 2012)。また、動原体タンパク質である Nuf2R (DeLuca et al., 2005) や動原体に局在するキネシンである CENP-E (Putkey et al., 2002) をノックダウンすることで動原体と微小管の結合を阻害した場合でも、中心体の両極への移動が遅延する (Toso et al., 2009)。このように、HeLa 細胞においても動原体と微小管の結合が中心体の移動を促進すると考えられている (Toso et al., 2009)。すなわち動原体を介した中心体分離のシステムは、分裂酵母とヒト細胞で保存されていると考えられる。

また CENP-O をノックダウンした細胞では、微小管の伸長端に局在する微小管結合タンパク質である EB1 (Tirnauer et al., 2002) のシグナルが減少することや、微小管を脱重合させる因子である MCAK (Ganem and Compton, 2004) をノックダウンすることで中心体の分離の遅延が解消されることなどから、微小管の伸長が動原体を介した中心体の移動に必要であると考えられている (Toso et al., 2009)。このように、HeLa 細胞における動原体を介した中心体の移動には、動原体と微小管の結合および微小管の伸長が必要である。これらのことから、HeLa 細胞では 2 つの中心体から伸長した微小管の末端が姉妹動原体と結合し、これらの微小管が伸長して動原体を押し合うことで中心体どうしが離れるというモデルが提唱されている (Toso et al., 2009, **Fig. 15**)。このような微小管が動原体を押し合うというモ

デルは、分裂酵母を用いた本研究の結果と合致するのだろうか。4.5 では、本研究の結果から考えられる外向きの力が発生するメカニズムを、微小管と動原体の結合の仕方という観点から考察する。

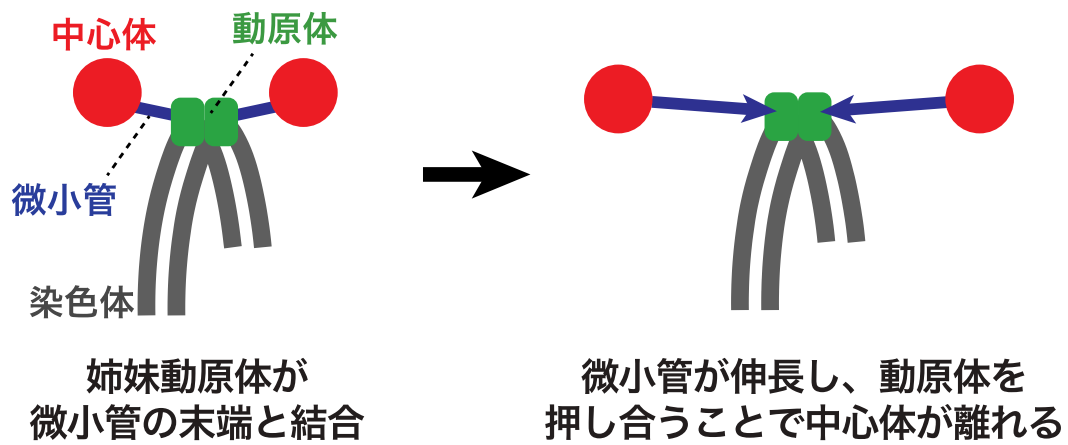


Figure 15 HeLa 細胞における動原体を介した外向きの力

HeLa 細胞では 2 つの中心体から伸長した微小管の末端が動原体と結合し、これらの微小管が動原体を押し合うことで中心体が分離すると考えられている (Toso et al., 2009; Machedlishvili et al., 2012)。

4.5 動原体と微小管が外向きの力を発生させるモデル

本研究によって、*cut7Δpk11Δ* 株では動原体が SPB 間で微小管と結合し、外向きの力を発生させることが明らかとなった。このとき動原体と微小管はどのような形で結合し、どのようにして外向きの力を発生させるのだろうか。考えられるモデルの一つは、HeLa 細胞を用いた研究で提唱されているような、2つの SPB から伸長した微小管の末端が動原体を押し合うことで外向きの力が発生するというものである (Toso et al., 2009, **Figs. 15, 16A**, 上、*cut7Δpk11Δ*)。このモデルの根拠として、HeLa 細胞では動原体と微小管の結合、および微小管の伸長が中心体の両極への移動を促進することなどがあげられている (Toso et al., 2009, 4.4 を参照)。分裂酵母である *cut7Δpk11Δ* 株でも、動原体と微小管の結合 (**Fig. 12**) および微小管の重合を促進する微小管結合タンパク質 Alp7, Alp14 が SPB の分離に必要である (Yukawa et al., 2017)。またこのモデルにおいて、*cut7Δpk11Δswi6Δ* 株のような姉妹動原体どうしが離れやすい状況では、微小管が動原体を押ししても反対側の SPB に力が効率的に伝達しないため外向きの力が発生しにくい (**Fig. 16A**, 下、*cut7Δpk11Δswi6Δ*)。このように姉妹動原体の接着が外向きの力を発生させるために必要であるという点においても、微小管が動原体を押し合うというモデルは本研究の結果と合致していると言える。

一方で、動原体が微小管の末端ではなく側面と結合することで、微小管による外向きの力を促進する可能性も考えられる (**Fig. 16B**, 上、*cut7Δpk11Δ*)。先行研究では、*cut7Δpk11Δ* 株の体細胞分裂において微小管が Ase1 によって SPB 間で束ねられ、これらの微小管の伸長端が反対側の SPB を押し離すことで外向きの力が発生すると考えられている (Rincon et al., 2017; Yukawa et al., 2017, **Fig. 4A**)。Ase1 と

同様に、姉妹動原体も 2 つの SPB から伸長した微小管の側面と結合することで微小管を束ね、微小管による外向きの力を促進する可能性がある。このモデルにおいても、微小管と動原体の結合および微小管の伸長が外向きの力を発生させるために必要であり、また姉妹動原体どうしが離れやすい状況では微小管が束ねられにくいため外向きの力が発生しにくい (**Fig. 16B**, 下、*cut7Δpkl1Δswi6Δ*)。

このように、これら 2 つのモデルはどちらも先行研究および本研究の実験結果と矛盾しない。また、*cut7Δpkl1Δ* 株の動原体が分裂開始時に微小管とどのように結合しているのかを明らかにした例は存在しないため、どちらのモデルが正しいのか、あるいはどちらの現象も生じているのかは不明である。今後、*cut7Δpkl1Δ* 株の動原体が SPB 分離時に微小管とどのように結合するのかを電子顕微鏡を用いた観察 (Ding et al., 1993, 1997; McIntosh et al., 2013) などで明らかにする必要があるだろう。

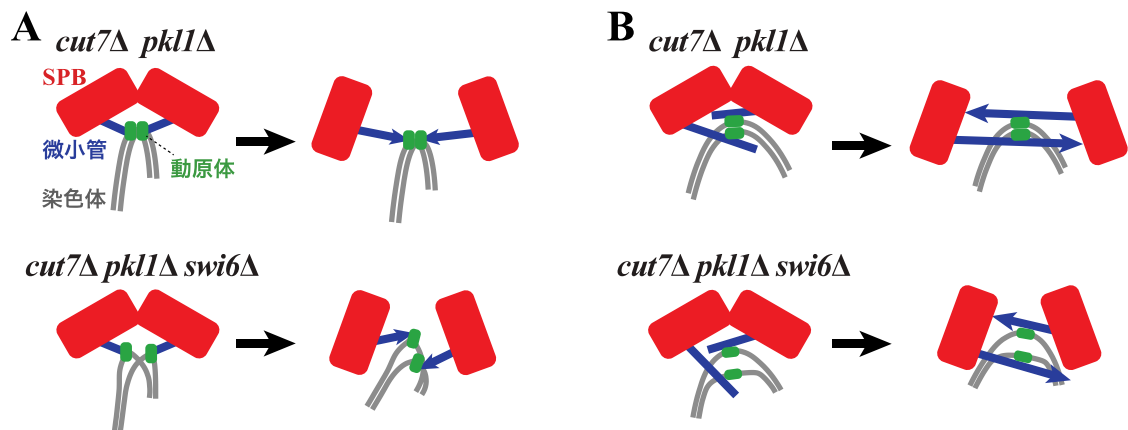


Figure 16 動原体と微小管が外向きの力を発生させるモデル

A. 動原体が微小管の末端と結合するモデル。動原体と結合した微小管が伸長し、両側から姉妹動原体を押し合うことでSPBが分離すると考えられる（上、*cut7Δ pkl1Δ*）。姉妹動原体どうしが離れやすい状況では、微小管が動原体を押ししても反対側のSPBに力が伝わりにくいと考えられる（下、*cut7Δ pkl1Δ swi6Δ*）。

B. 動原体が微小管の側面と結合し、SPB間で微小管を束ねるモデル。姉妹動原体との結合を介して束ねられた微小管が伸長し、反対側のSPBを押し離すことでSPBが分離すると考えられる（上、*cut7Δ pkl1Δ*）。姉妹動原体どうしが離れやすい状況では、微小管が動原体によって束ねられにくいいため、微小管による外向きの力が発生しにくいと予想される（下、*cut7Δ pkl1Δ swi6Δ*）。青の矢印は微小管の伸長方向を表す。

4.6 それぞれのキネシンが発生させる力の強さの違い

分裂酵母の SPB 分離には、外向きの力を発生させる Cut7 と内向きの力を発生させる Pkl1、Klp2 の 3 種類のキネシンが機能する (Rincon et al., 2017; Yukawa et al., 2017, 2018)。これらのキネシンが発生させる力の強弱の関係はどのようなになっているのだろうか。

Cut7 非依存的な外向きの力が機能しにくい *ase1Δ* 株や *muf2-2* 変異体でも SPB が分離することから (Nabetani et al., 2001; Loiodice et al., 2005; Yamashita et al., 2005; Rincon et al., 2017)、Cut7 による外向きの力は Pkl1 と Klp2 が発生させる内向きの力よりも強いと考えられる。また *cut7Δ* 株の致死性は Pkl1 による内向きの力を欠損させることで解消されるが (*cut7Δ pkl1Δ* 株は生育可能) (Olmsted et al., 2014; Rincon et al., 2017; Yukawa et al., 2017)、Klp2 による内向きの力を欠損させても *cut7Δ* 株の致死性は解消されない (*cut7Δ klp2Δ* 株は致死) (Yukawa et al., 2018)。これらのことから、Pkl1 によって発生する内向きの力は Klp2 によって発生する内向きの力よりも強いと考えられる。以上のことをまとめると、SPB 分離時では Cut7、Pkl1、Klp2 の順に発生させる力が強いと考えられる。

このようなキネシンによって発生する力の強さの違いは何によって生じるのだろうか。これらのキネシンは微小管上を一定方向に進むことで微小管をスライドさせ、力を発生させる。このことからそれぞれのキネシンのモーター活性が力の違いを生み出す原因の一つだと考えられる。ブタ脳由来のチューブリンを用いた *in vitro* の解析では、Pkl1 は微小管を 33 ± 9 nm/s で (Furuta et al., 2008)、Klp2 は微小管を 65 ± 1 nm/s で移動させる (Braun et al., 2009)。このように *in vivo* とは異なり、*in vitro* では Pkl1 よりも Klp2 の方が微小管を動かす力が強いことから、

キネシンのモーター活性の違いだけでは SPB 分離時に作用する力の強弱を説明できない。

分裂期において Pkl1 は SPB と紡錘体に局在するが (Pidoux et al., 1996; Yukawa et al., 2015)、Klp2 は紡錘体には局在するものの SPB には局在しない (Troxell et al., 2001; Yukawa et al., 2018)。 *pkl1*Δ 株で見られる紡錘体の形態異常 (Fig. 3D) が Klp2 を SPB に強制的に局在させることで改善されることや、 *cut7*Δ *pkl1*Δ 株において Klp2 を SPB に強制的に局在させると細胞が致死となることから (Yukawa et al., 2018)、Pkl1 と Klp2 が発生させる力の強さの違いはこれらのキネシンの局在の違いに起因する可能性が高い。このように Pkl1 や Klp2 が微小管よりも SPB に局在するときに、より強い力を発生させられるのはなぜだろうか。一つの可能性として、伸長と短縮を繰り返す微小管よりも SPB の方が足場として安定であるため、SPB に局在する Pkl1 の方が Klp2 よりも強い力を発生させられることが考えられる。また、SPB 分離時では核内に形成される微小管が短いため、微小管よりも SPB の方が多くのキネシン分子が局在でき、結果として強い力を発生させられる可能性も考えられる。

Pkl1 や Klp2 が *in vivo* でも *in vitro* でもマイナス端方向にのみ進むのに対して、Cut7 は *in vitro* においてはマイナス端とプラス端のどちらの方向にも進み得る (Edamastu, 2014; Britto et al., 2016)。 *In vitro* において Cut7 は、微小管上に他のモータータンパク質が多く結合しているほどプラス端方向に進みやすくなり、進む速度も上昇する (Britto et al., 2016)。このような Cut7 が SPB 分離時にどの程度の速度で微小管上を移動し、どの程度の力を発生させるのかは不明である。一方で、ヒトの 5 型キネシンである Eg5 は、1 つの 4 量体が微小管をおよそ 2 pN の力でス

ライドさせることが *in vitro* の実験で明らかとなっている (Shimamoto et al., 2015)。同様にアフリカツメガエルの 5 型キネシン Eg5 は 1.5 pN の力を発生させる (Fallesen et al., 2017)。また出芽酵母の 5 型キネシンである Cin8 は、1 つの 4 量体がプラス端方向に 1.7 pN, マイナス端方向に 1.5 pN の力を発生させることが推定されている (Fallesen et al., 2017)。これらの結果から、Cut7 も 4 量体 1 つあたりでおよそ 1.5~2 pN の力を発生させると予想される。今後は Cut7 がどの程度の力でどちらの方向に微小管をスライドさせるのかを、*in vivo* に近い条件で解析する必要がある。

このようにそれぞれのキネシンが発生させる力の強弱は少なくとも、(1) それぞれのキネシン分子のモーター活性、(2) 局在する場所、(3) 局在する量に影響されると考えられる。

4.7 動原体を介した外向きの力の大きさ

動原体を介して発生する外向きの力はどの程度の大きさなのだろうか。4.5 で議論した通り、このとき外向きの力は微小管の伸長端が動原体または SPB を押すことによって発生すると予想される (Fig. 16)。分裂酵母では 1 つの動原体につき 2~4 本の微小管が結合する (Ding et al., 1993)。すなわち、1 組の姉妹動原体につき最大で 8 本の微小管が外向きの力を発生させると考えられる。ブタ脳由来のチューブリンを用いた *in vitro* の実験から、微小管の伸長端は最大で 5 pN の力を発生させることが明らかとなっている (Dogterom and Yurke, 1997)。分裂酵母の微小管も 1 本につき 5 pN の力を発生させると仮定した場合、1 組の姉妹動原体は 8 本の微小管と結合することで最大 40 pN の力を発生させることができる (Fig. 17)。分裂酵母には染色体が 3 本存在するため、このとき動原体を介した力の合計は最大で 120 pN となる。Cut7 非存在下では、これらの外向きの力に加えて Ase1 によって束ねられた微小管による力も作用すると考えられる。これらの微小管も 1 本につき 5 pN の外向きの力を発生させると予想される (Fig. 17)。

このように推定された Cut7 に依存しない外向きの力は、*cut7Δ pkl1Δ* 株における内向きの力と比較してどの程度の大きさなのだろうか。*cut7Δ pkl1Δ* 株では Klp2 が内向きの力を発生させるが、Klp2 によって発生する力の大きさを測定した例はこれまで存在しない。一方で、ヒトの 14 型キネシンである HSET は 1 分子で 1.1 pN の力を発生させることが報告されている (Reinemann et al., 2018)。さらに HSET は 2 本の微小管を 2.5 pN の力でスライドさせることが *in vitro* の解析によって明らかとなっている (Reinemann et al., 2018)。また HSET を分裂酵母で人工的に発現させると、Klp2 の機能の一部が相補されることが示されている

(Yukawa et al., 2018)。そこで HSET と同様に、Klp2 が 2 本の微小管を束ねて 2.5 pN の力を発生させると仮定し、*cut7Δ pkl1Δ* 株における内向きの力の大きさを推定した (Fig. 17)。分裂酵母の紡錘体は約 30 本の微小管で構成される (Ding et al., 1993; Ward et al., 2014)。このことから全ての微小管が Klp2 によって束ねられたと仮定しても、このとき発生する内向きの力は最大で 75 pN である。1 組の姉妹動原体が発生させる外向きの力は最大で 40 pN なので、2 組の姉妹動原体が支点として機能すれば、外向きの力が内向きの力を上回る計算となる。しかしながら、*cut7Δ pkl1Δ* 株では動原体を介した力に加えて Ase1 を介した外向きの力も SPB 分離に必要である (Rincon et al., 2017; Yukawa et al., 2017)。これは分裂開始時では動原体と微小管の結合が不安定であるため、実際に発生する外向きの力は推定されたものよりも弱い可能性を示唆している。またこのとき、これらの外向きの力のベクトルが SPB へ向かう方向からずれる可能性も考慮する必要がある。

これらの力の大きさは別生物種の *in vitro* 実験の結果から推定したものであり、実際に分裂酵母の細胞内で生じる力とは異なる可能性がある。そのため、これらの力のバランスを詳細に議論するためには、(1) Cut7 や Pkl1, Klp2 がそれぞれどの程度の大きさの力を発生させるか、(2) これらのキネシンや Ase1 は SPB 分離時に何本の微小管に何分子結合するのか、(3) SPB 分離時に動原体は何本の微小管とどの角度で結合するのかを明らかにする必要がある。そのためには、*in vitro* によるこれらのキネシンの力の解析やシミュレーションによる解析、電子顕微鏡による SPB 分離時の動原体と微小管の詳細な観察などが求められる。これらを明らかにすれば、紡錘体形成に作用する力の全貌を解明することができるだろう。

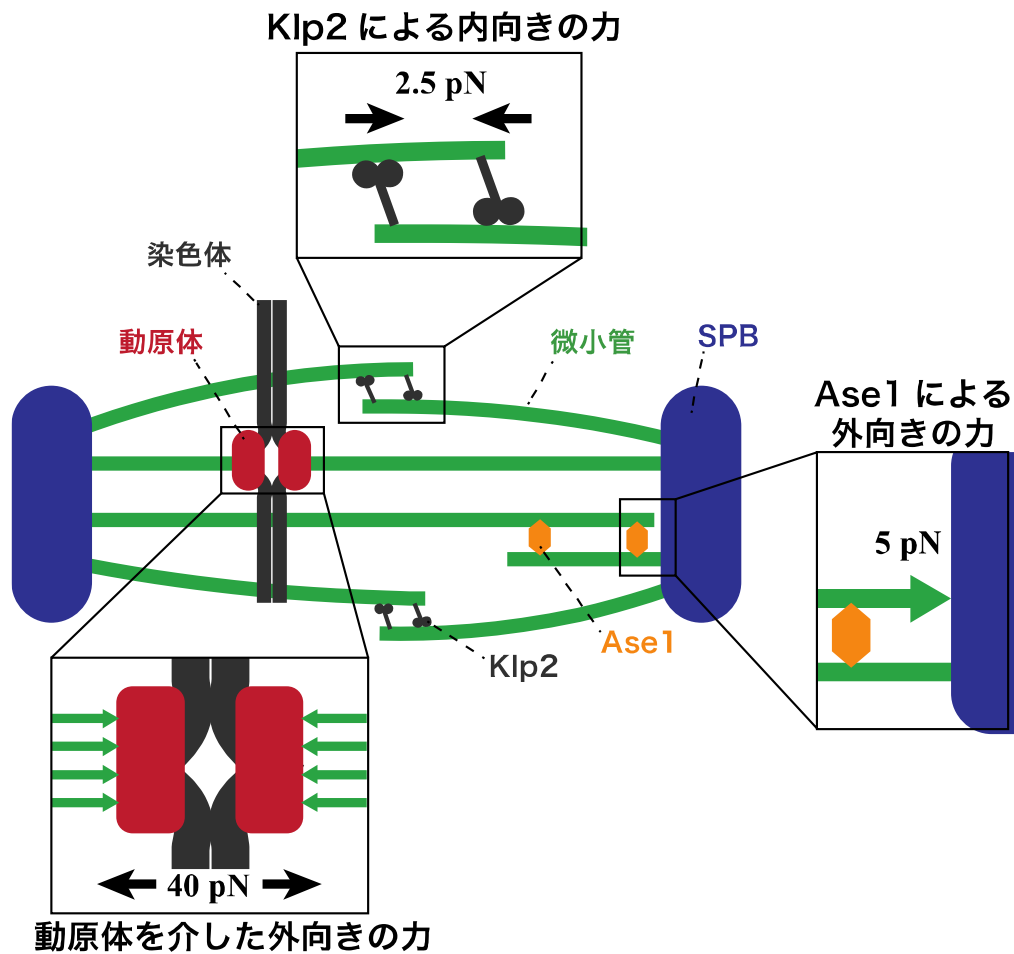


Figure 17 *cut7Δ pk11Δ* 株で想定される内向きの力と外向きの力

cut7Δ pk11Δ 株では、Klp2 が2本の微小管を束ねて 2.5 pN の内向きの力を発生させると予想される。また Ase1 によって束ねられた微小管は、逆側の SPB を押すことで 5 pN の外向きの力を発生させる。さらに姉妹動原体は両側からそれぞれ4本ずつの微小管と結合し、それらの微小管が姉妹動原体を押し合う、あるいは逆側の SPB を押すことで 40 pN の外向きの力が発生すると予想される。上図は微小管が動原体を押し合う場合のモデルを表している。

4.8 14 型キネシンの発生させる内向きの力の重要性

Pkl1 と Klp2 による内向きの力は、紡錘体の形態や長さの制御に重要である。*pk11Δ* 株では紡錘体の形態に異常が生じ、染色体分配が異常になることから (Fig. 3d)、分裂期においては特に Pkl1 による内向きの力が重要だと考えられる (Syrovatkina et al., 2013; Syrovatkina and Tran, 2015)。一方で、*klp2Δ* 株では分裂中期から後期にかけての紡錘体が長くなるものの、生育に異常は生じない (Troxell et al., 2001; Choi and McCollum, 2012)。しかしながら、Klp2 を *pk11Δ* 株で欠損させると紡錘体の形態異常が生じやすくなることから、分裂期の Klp2 は Pkl1 のバックアップとして機能すると予想される。

このように分裂酵母の 14 型キネシンが 2 種類も存在するのはなぜだろうか。ここで注目すべきことは、Pkl1 と Klp2 では機能する時期や場所が異なるという点である。Pkl1 が分裂期の SPB や紡錘体に局在するのに対して (Simeonov et al., 2009)、Klp2 は紡錘体だけでなく間期の細胞質の微小管にも局在する (Troxell et al., 2001)。このような細胞質微小管の Klp2 は、減数分裂前の核融合に重要な役割を担う。Klp2 は接合した細胞において、2 つの核から伸長した微小管どうしを束ねてそれらを近づけることで核融合を促進する (Fig. 18) (Scheffler et al., 2014)。そのため *klp2Δ* 株では核融合が遅延するほか、低温条件下で胞子の生存率が低下する (Troxell et al., 2001; Scheffler et al., 2014)。

このように分裂酵母の 14 型キネシンは、細胞質微小管では Klp2 が、紡錘体では主に Pkl1 がそれぞれ内向きの力を発生させる。このような 14 型キネシンの使い分けは出芽酵母でも知られている。出芽酵母の 14 型キネシンは Kar3 の 1 種類しか存在しないが、Kar3 は Vik1 と結合することで SPB へ、Cik1 と結合するこ

とで微小管へと局在を変化させる (Manning and Snyder, 2000)。4.6 で議論したように、これらのキネシンの局在の違いは発生する力の大きさにも影響する。このように細胞は複数の 14 型キネシンやそれに結合する因子を使い分けることで、内向きの力の大きさやそれが生じる場所を制御し、様々な生命現象に対して内向きの力を適切に利用していると予想される。

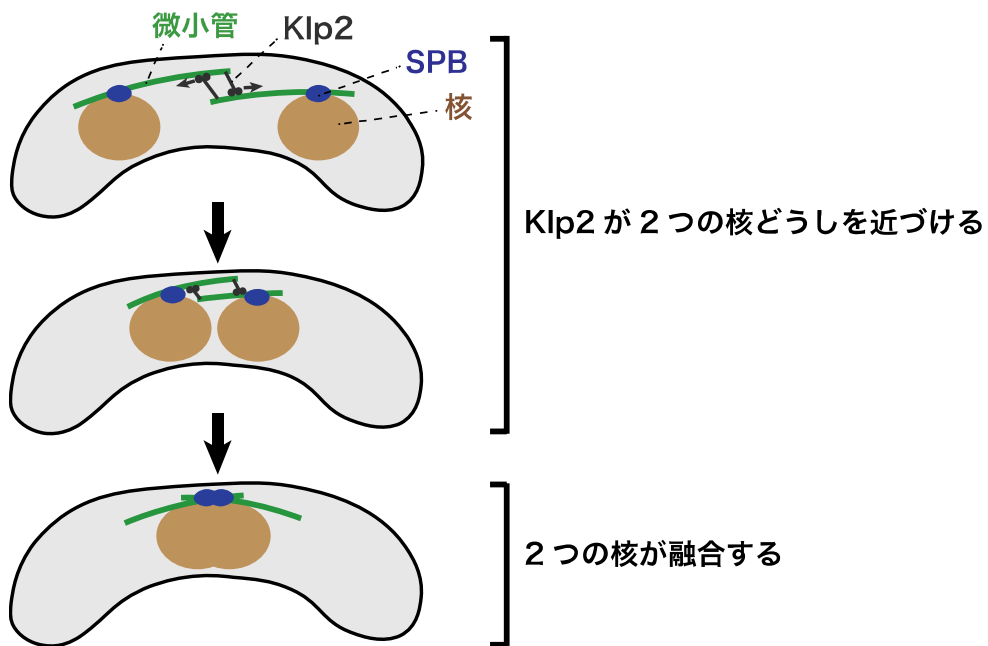


Figure 18 細胞質微小管の Klp2 は核融合を促進する

接合後の細胞において、Klp2 は 2 つの SPB から伸長した細胞質微小管を束ねる。その後それらの微小管の上をマイナス端方向に進むことで、結果的に 2 つの核を近づけて核融合を促進する (Scheffler et al., 2014)。

4.9 本研究のまとめ

本研究によって、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 の分離を促進することが明らかとなった。

体細胞分裂では姉妹動原体が互いに背を向けるかたちで密着しており、これらの動原体が2つの SPB から伸長した微小管と結合することで外向きの力を発生させるための支点として機能する。

そ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いるため、動原体が支点として十分に機能しないことが明らかとなった。実際に *cut7Δpk11Δ* 株の減数第一分裂では SPB が分離しにくい、染色体の形態が体細胞分裂型になる *cut7Δ pk11Δ rec12Δ moa1Δ* 株では SPB の分離が改善された。また、姉妹動原体が離れやすい *cut7Δ pk11Δ rad21-K1* 株や *cut7Δ pk11Δ swi6Δ* 株では体細胞分裂であっても SPB 分離が遅延した。以上のことから、姉妹動原体どうしが互いに背を向けるかたちで密着していると、これらの動原体が外向きの力を発生させる支点として機能し、SPB の分離が促進されるということが明らかとなった。

SPB の分離は、種々のキネシンによって発生する外向きの力と内向きの力がバランスよく作用することで達成される (Hagan and Yanagida, 1990; 1992; Pidoux et al., 1996; Troxell et al., 2001; Rincon et al., 2017; Yukawa et al., 2017; 2018)。今後の研究で、動原体を介した外向きの力とキネシンによって発生する力がどのように作用し合うのかを明らかにする必要がある。また、これらの SPB 分離を促進するメカニズムを、細胞がどのように使い分けているのかを明らかにすることが今後の課題である。

5 章 参考文献

Adams, I. R. and Kilmartin, J. V. (2000). Spindle pole body duplication: a model for centrosome duplication? *Trends Cell Biol.* *10*, 329-335.

Akera, T., Goto, Y., Sato, M., Yamamoto, M. and Watanabe, Y. (2015). Mad1 promotes chromosome congression by anchoring a kinesin motor to the kinetochore. *Nat Cell Biol* *17*, 1124-1130.

Bähler, J., Wu, J. Q., Longtine, M. S., Shah, N. G., McKenzie, A. 3rd., Steever, A. B., Wach, A., Philippsen, P. and Pringle, J. R. (1998a). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* *14*, 943–951.

Bähler, J., Steever, A. B., Wang, Y. L., Pringle, J. R. and Gould, K. L. (1998b). Role of polo kinase and Mid1p in determining the site of cell division in fission yeast. *J Cell Biol* *143*, 1603–1616.

Bernard, P., Maure, J. F. and Javerzat, J. P. (2001). Fission yeast Bub1 is essential in setting up the meiotic pattern of chromosome segregation. *Nat Cell Biol* *3*, 522–526.

Bestul, A. J., Yu, Z., Unruh, J. R. and Jaspersen, L. S. (2017). Molecular model of fission yeast centrosome assembly determined by superresolution imaging. *J. Cell Biol* *216*, 2409-2424.

Bouhleb, I. B., Ohta, M., Mayeux, A., Bordes, N., Dingli, F., Boulanger, J., Casquillas, G. V., Loew, D., Tran, P. T., Sato, M. and Paoletti, A. (2015). Cell cycle control of spindle pole body duplication and splitting by Sfi1 and Cdc31 in fission yeast. *J Cell Sci* 128, 1481–1493

Braun, M., Drummond, D. R., Cross, R. A. and McAinsh, A. D., (2013). The kinesin-14 Klp2 organizes microtubules into parallel bundles by an ATP-dependent sorting mechanism. *Nat Cell Biol* 11, 724-730.

Britto, M., Goulet, A., Rizvi, S., von Loeffelholz, O., Moores, C. A. and Cross, R. A. (2016). *Schizosaccharomyces pombe* kinesin-5 switches direction using a steric blocking mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 9, E7483-E7489.

Cao, L., Alani, E. and Kleckner, N. (1990). A pathway for generation and processing of double-strand breaks during meiotic recombination in *S. cerevisiae*. *Cell* 61, 1089–1101.

Cervantes, M. D., Farah, J. A. and Smith, G. R. (2000). Meiotic DNA breaks associated with recombination in *S. pombe*. *Mol Cell* 5, 883–888.

Chikashige, Y., Ding, D. Q., Funabiki, H., Haraguchi, T., Mashiko, S., Yanagida, M. and Hiraoka, Y. (1994). Telomere-led premeiotic chromosome movement in fission yeast. *Science* 264, 270–273.

Choi, S. H. and McCollum, D. (2012). A role for metaphase spindle elongation forces in correction of merotelic kinetochore attachments. *Curr Biol* 3, 225-230.

Chunduri, N. K. and Storchová, Z. (2019). The diverse consequences of aneuploidy. *Nat Cell Biol* 1, 54-62.

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

Ekwall, K., Javerzat, J. P., Lorentz, A., Schmidt, H., Cranston, G. and Allshire, R. (1995). The chromodomain protein Swi6: a key component at fission yeast centromeres. *Science* 269, 1429–1431.

DeLuca, J. G., Dong, Y., Hergert, P., Strauss, J., Hickey, J. M., Salmon, E. D. and McEwen, B. F. (2005). Hec1 and nuf2 are core components of the kinetochore outer plate essential for organizing microtubule attachment sites. *Mol Biol Cell* 16, 519–531.

Ding, R., McDonald, K. L. and McIntosh, J. R. (1993). Three-dimensional reconstruction and analysis of mitotic spindles from the yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Biol* 120, 141–151.

Ding, R., West, R. R., Morpew, D. M., Oakley, B. R. and McIntosh, J. R. (1997). The spindle pole body of *Schizosaccharomyces pombe* enters and leaves the nuclear envelope as the cell cycle proceeds. *Mol Biol Cell* 8, 1461–1479.

Dogterom, M. and Yurke, B. (1997). Measurement of the Force-Velocity Relation for Growing Microtubules. *Science* 278, 856-860.

Edamatsu, M. (2014). Bidirectional motility of the fission yeast kinesin-5, Cut7. *Biochem Biophys Res Commun* 446, 231–234.

Fallesen, T., Roostalu, J., Duellberg, C., Pruessner, G. and Surrey, T. (2018). Ensembles of Bidirectional Kinesin Cin8 Produce Additive Forces in Both Directions of Movement. *Biophys J* 113, 2055-2067.

Fennell, A., Fernández-Álvarez, A., Tomita, K. and Cooper, J. P. (2015). Telomeres and centromeres have interchangeable roles in promoting meiotic spindle formation. *J Cell Biol* 208, 415–428.

Funabiki, H., Hagan, I., Uzawa, S. and Yanagida, M. (1993). Cell cycle-dependent specific positioning and clustering of centromeres and telomeres in fission yeast. *J Cell Biol* 121, 961–976.

Furuta, K., Edamatsu, M., Maeda, Y. and Toyoshima, Y. Y. (2008). In vitro motile properties of fission yeast kinesin-14 Pkl1. *J. Biol Chem* 283, 36465-36473.

Ganem, N. J. and Compton, D. A. (2004). The KinI kinesin Kif2a is required for bipolar spindle assembly through a functional relationship with MCAK. *J. Cell Biol* 166, 473-478.

Hagan, I. and Yanagida, M. (1990). Novel potential mitotic motor protein encoded by the fission yeast *cut7+* gene. *Nature* 347, 563-566.

Hagan, I. and Yanagida, M. (1992). Kinesin-related *cut7* protein associates with mitotic and meiotic spindles in fission yeast. *Nature* 356, 74-76.

Hassold, T. and Sherman, S. (2000). Down syndrome: genetic recombination and the origin of the extra chromosome 21. *Clin. Genet.* 57, 95-100.

Heath, B. (1980). Variant mitoses in lower eukaryotes: indicators of the evolution of mitosis? *Int Rev Cytol* 64, 1-80.

Heck, M. M., Pereira, A., Pesavento, P., Yannoni, Y., Spradling, A. C. and Goldstein, L. S. (1993). The kinesin-like protein KLP61F is essential for mitosis in *Drosophila*. *J Cell Biol* 123, 665-679.

Herbert, M., Kalleas, D., Cooney, D., Lamb, M. and Lister, L. (2015). Meiosis and maternal aging: insights from aneuploid oocytes and trisomy births. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a017970.

Kakui, Y., Sato, M., Okada, N., Toda, T. and Yamamoto, M. (2013). Microtubules and Alp7-Alp14 (TACC-TOG) reposition chromosomes before meiotic segregation. *Nat Cell Biol* *15*, 786–796.

Kapoor, T. M., Mayer, T. U., Coughlin, M. L. and Mitchison, T. J. (2000). Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *J Cell Biol* *150*, 975–988.

Kashina, A. S., Baskin, R. J., Cole, D. G., Wedaman, K. P., Saxton, W. M. and Scholey, J. M. (1996). A bipolar kinesin. *Nature* *379*, 270–272.

Keeney, S., Giroux, C. N. and Kleckner, N. (1997). Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* *88*, 375–384.

Kilmartin, J. V. (2003). Sfi1p has conserved centrin-binding sites and an essential function in budding yeast spindle pole body duplication. *J Cell Biol* *162*, 1211–1221.

Kirschner, M. and Mitchison, T. (1986). Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell* *45*, 329–342.

Lawrence, C. J., Dawe, R. K., Christie, K. R., Cleveland, D. W., Dawson, S. C., Endow, S. A., Goldstein, L. S. B., Goodson, H. V., Hirokawa, N., Howard, J., Malmberg, R. L., McIntosh, J. R., Miki, H., Mitchison, T. J., Okada, Y., Reddy, A. S. N., Saxton, W. M., Schliwa, M., Scholey, J. M., Vale, R. D., Walczak, C. E. and Wordeman, L. (2004). A standardized kinesin nomenclature. *J. Cell Biol* 167, 19-22.

Lengauer, C., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643–649.

Lin, Y. and Smith, G. R. (1994). Transient, meiosis-induced expression of the *rec6* and *rec12* genes of *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 136, 769–779.

Loïodice, I., Staub, J., Setty, T. G., Nguyen, N. P. T., Paoletti, A. and Tran, P. T. (2005). *Ase1p* organizes antiparallel microtubule arrays during interphase and mitosis in fission yeast. *Mol Biol Cell* 16, 1756–1768.

Mayer, T. U., Kapoor, T. M., Haggarty, S. J., King, R. W., Schreiber, S. L. and Mitchison, T. J. (1999). Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science* 286, 971–974.

Machedlishvili, N., Wieser, S., Holtackers, R., Mouysset, J., Belwal, M., Amaro, A. C. and Meraldi, P. (2012). Kinetochores accelerate centrosome separation to ensure faithful chromosome segregation. *J. Cell Sci* *125*, 906-918.

Manning, B. D. and Snyder, M. (2000). Drivers and passengers wanted! the role of kinesin-associated proteins. *Trends Cell Biol* *10*, 281-289.

Mans, B., Anantharaman, V., Aravind, L. and Koonin, E. (2004) Comparative genomics, evolution and origins of the nuclear envelope and nuclear pore complex. *Cell Cycle* *3* 1612–1637.

McIntosh, J. R., O'Toole, E., Zhudenkov, K., Morpew, M., Schwartz, C., Ataulakhanov, F. I. and Grishchuk, E. L. (2013). Conserved and divergent features of kinetochores and spindle microtubule ends from five species. *J. Cell Biol* *4*, 459-474.

Miki, H., Okada, Y. and Hirokawa, N. (2005). Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. *Trends Cell Biol.* *15*, 467–76.

Moore, D. P. (1998). Chromosome segregation during meiosis: building an unambivalent bivalent. *Curr. Top. Dev. Biol.* *37*, 263–299.

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

Nabetani, A., Koujin, T., Tsutsumi, C., Haraguchi, T. and Hiraoka, Y. (2001). A conserved protein, Nuf2, is implicated in connecting the centromere to the spindle during chromosome segregation: a link between the kinetochore function and the spindle checkpoint. *Chromosoma* 110, 322–334.

Nonaka, N., Kitajima, T., Yokobayashi, S., Xiao, G., Yamamoto, M., Grewal, S. I. and Watanabe, Y. (2002). Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast. *Nat Cell Biol* 4, 89–93.

Olmsted, Z. T., Colliver, A. G., Riehlman, T. D. and Paluh, J. L. (2014). Kinesin-14 and kinesin-5 antagonistically regulate microtubule nucleation by γ -TuRC in yeast and human cells. *Nat Commun* 5, 5339.

Paoletti, A., Bordes, N., Haddad, R., Schwartz, C. L., Chang, F. and Bornens, M. (2003). Fission yeast *cdc31p* is a component of the half-bridge and controls SPB duplication. *Mol Biol Cell* 14, 2793–2808.

Pidoux, A. J., LeDizet, M. and Cande, W. Z. (1996). Fission yeast *pk11* is a kinesin-related protein involved in mitotic spindle function. *Mol Biol Cell* 7, 1639–1655.

Putkey, F.R., Cramer, T., Morpew, M. K., Silk, A. D., Johnson, R. S., McIntosh, J. R. and Cleveland, D. W. (2002). Unstable kinetochore-microtubule capture and chromosomal instability following deletion of CENP-E. *Dev Cell* 3, 351–365.

Reinemann, D. N., Norris, S. R., Ohi, R. and Lang, M. J. (2018). Processive Kinesin-14 HSET Exhibits Directional Flexibility Depending on Motor Traffic. *Curr Biol* 28, 2356-2362.

Rincon, S. A., Lamson, A., Blackwell, R., Syrovatkina, V., Fraisier, V. and Tran, P. T. (2017). Kinesin-5-independent mitotic spindle assembly requires the antiparallel microtubule crosslinker Ase1 in fission yeast. *Nat Commun* 8, 15286.

Rüthnick, D. and Schiebel, E. (2016). Duplication of the Yeast Spindle Pole Body Once per Cell Cycle. *Mol Cell Biol* 36, 1324-1331.

Sakuno, T., Tada, K. and Watanabe, Y. (2009). Kinetochores geometry defined by cohesion within the centromere. *Nature* 458, 852–858.

Sakuno, T., Tanaka, K., Hauf, S. and Watanabe, Y. (2011). Repositioning of aurora B promoted by chiasmata ensures sister chromatid mono-orientation in meiosis I. *Dev Cell* 21, 534–545.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*.

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

Sato, M., Toya, M. and Toda, T. (2009). Visualization of fluorescence-tagged proteins in fission yeast: the analysis of mitotic spindle dynamics using GFP-tubulin under the native promoter. *Methods Mol Biol* 545, 185–203.

Scheffler, K., Minnes, R., Fraisier, V., Paoletti, A. and Tran P. T. (2014). Microtubule minus end motors kinesin-14 and dynein drive nuclear congression in parallel pathways. *J Cell Biol* 209, 47-58.

Sheltzer, J. M., Blank, H. M., Pfau, S. J., Tange, Y., George, B. M., Humpton, T. J., Brito, I. L., Hiraoka, Y., Niwa, O. and Amon, A. (2011). Aneuploidy drives genomic instability in yeast. *Science* 333, 1026–1030.

Shimamoto, Y., Forth, S. and Kapoor, T. M. (2015). Measuring Pushing and Braking Forces Generated by Ensembles of Kinesin-5 Crosslinking Two Microtubules. *Dev Cell* 34, 669-681.

Simeonov, D. R., Kenny, K., Seo, L., Moyer, A., Allen, J. and Paluh, J. L. (2009). Distinct Kinesin-14 mitotic mechanisms in spindle bipolarity. *Cell Cycle* 8, 3571-3583.

Siomos, M. F. and Nasmyth, K. (2003). Un ménage à quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 112, 423–440.

Syrovatkina, V., Fu, C. and Tran, P. T. (2013). Antagonistic spindle motors and MAPs regulate metaphase spindle length and chromosome segregation. *Curr Biol* 23, 2423-2429.

Syrovatkina, V. and Tran, P. T. (2015). Loss of kinesin-14 results in aneuploidy via kinesin-5-dependent microtubule protrusions leading to chromosome cut. *Nat Commun* 6, 7322.

Tatebayashi, K., Kato, J. and Ikeda, H. (1998). Isolation of a *Schizosaccharomyces pombe* rad21ts mutant that is aberrant in chromosome segregation, microtubule function, DNA repair and sensitive to hydroxyurea: possible involvement of Rad21 in ubiquitin-mediated proteolysis. *Genetics* 148, 49–57.

Tomonaga, T., Nagao, K., Kawasaki, Y., Furuya, K., Murakami, A., Morishita, J., Yuasa, T., Sutani, T., Kearsley, S. E., Uhlmann, F., Nasmyth, K. and Yanagida, M. (2000). Characterization of fission yeast cohesin: essential anaphase proteolysis of Rad21 phosphorylated in the S phase. *Genes Dev* 14, 2757–2770.

Toso, A., Winter, J. R., Garrod, A. J., Amaro, A. C., Meraldi, P. and McAinsh, A. D. (2009). Kinetochores-generated pushing forces separate centrosomes during bipolar spindle assembly. *J. Cell Biol* 184, 365-372.

Troxell, C. L., Sweezy, M. A., West, R. R., Reed, K. D., Carson, B. D., Pidoux, A. L., Cande, W. Z. and McIntosh, J. R. (2001). *pk11+* and *k1p2+*: Two Kinesins of the Kar3 Subfamily in Fission Yeast Perform Different Functions in Both Mitosis and Meiosis. *Mol Biol Cell* *12*, 3476–3488.

Ward, J. J., Roque, H., Antony, C. and Nedelec, F. (2014). Mechanical design principles of a mitotic spindle. *eLIFE* *18*, e03398.

Weaver, B. A. and Cleveland, D. W. (2006). Does aneuploidy cause cancer? *Curr. Opin. Cell Biol.* *18*, 658–667.

Yamashita, A., Fujita, A. and Yamamoto, M. (2005). The roles of fission yeast *Ase1* in mitotic cell division, meiotic nuclear oscillation, and cytokinesis checkpoint signaling. *Mol Biol Cell* *16*, 1378–1395.

Yokobayashi, S. and Watanabe, Y. (2005). The kinetochore protein *Moa1* enables cohesion-mediated monopolar attachment at meiosis I. *Cell* *123*, 803–817.

Yukawa, M., Kawakami, T., Okazaki, M., Kume, K., Tang, N. H. and Toda, T. (2017). A microtubule polymerase cooperates with the kinesin-6 motor and a microtubule cross-linker to promote bipolar spindle assembly in the absence of kinesin-5 and kinesin-14 in fission yeast. *Mol Biol Cell* *28*, 3647–3659.

Yukawa, M., Ikebe, C. and Toda, T. (2015). The Msd1-Wdr8-Pkl1 complex anchors microtubule minus ends to fission yeast spindle pole bodies. *J. Cell Biol* 290, 549-562.

Yukawa, M., Yamada, Y., Yamauchi, T. and Toda, T. (2018). Two spatially distinct kinesin-14 proteins, Pkl1 and Klp2, generate collaborative inward forces against kinesin-5 Cut7 in *S. pombe*. *J. Cell Sci* 131, jcs210740.

謝辞

本研究は早稲田大学先進理工学研究科生命医科学専攻の佐藤政充研究室で行われたものです。

学部4年生からの6年間、研究環境を提供して下さり、熱心に研究指導をしてくださいました佐藤政充先生、修士2年生からの4年間にわたり研究の指導、助言をして下さった戸谷美夏先生に心より感謝申し上げます。また、研究生活を支えて下さった佐藤研究室のメンバー、特に日々実験の指導や助言をして下さった新井邦生博士、岡田直幸博士、平井隼人博士、須永智成氏に厚く感謝いたします。

また、学部1年生から生命科学についてご指導くださった早稲田大学生命医科学科の先生方、特に本論文の副査を引き受けてくださった仙波憲太郎先生と合田巨人先生に厚く感謝いたします。

また、共同研究に関してご指導していただいた東京大学の川島茂裕先生、麻布大学の伊藤潤哉先生、柏崎直巳先生、戸張靖子先生、麻布大学動物繁殖学研究室の皆様感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、大阪大学の平岡泰先生から *nuf2-2* 変異体を、元東京大学の渡辺嘉典先生と作野剛士先生（現大阪大学）から *cnt1-GFP* 株を、National BioResource Project から *rad21-K1* 変異体を、英国フランシスクリック研究所の角井康貴博士から *swi6* 破壊株をいただきました。この場をお借りして感謝申し上げます。

最後に研究生活を全面的に支援し、常に励まし支えて下さった家族と多くの友人に心から感謝いたします。

研究業績

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	<p>○<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</p>
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. ○<u>白杉豊</u>、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. ○<u>白杉豊</u>、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. ○<u>白杉豊</u>、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>