

分裂酵母 Ecl1 ファミリー遺伝子は、
亜鉛および鉄枯渇による性分化誘導に関わる

2017年3月
名古屋大学大学院創薬科学研究科

基盤創薬学専攻

[創薬生物科学講座]

分子微生物学
(教授：饗場浩文、助教：大塚北斗)

591401009 石田麻衣子

目次

序論

- 1, モデル生物・分裂酵母 (p4)
- 2, 経時寿命延長因子 Ecl1 ファミリー (p6)
- 3, 分裂酵母における性分化 (p8)
- 4, 性分化を誘導する 4つのシグナル伝達経路 (p10)
- 5, 本研究で明らかにした性分化と Ecl1 ファミリー遺伝子の関係性 (p12)

第一章 分裂酵母 Ecl1 ファミリーは、亜鉛または鉄枯渇下で性分化を引き起こす

①緒言 (p17)

②結果

- 1, Ecl1 ファミリー遺伝子は、*ste11*⁺-mRNA を最大値まで発現するのに必要である (p20)
- 2, 窒素源枯渇下で、 $\Delta ecl1/2/3$ 変異体は性分化を亢進する (p22)
- 3, $\Delta ecl1/2/3$ 変異体は、定常期において性分化誘導が起こらない (p24)
- 4, *S. pombe* は Ecl1 ファミリー遺伝子に依存して、亜鉛および鉄枯渇下で接合・孢子形成を誘導する (p26)
- 5, 各 Ecl1 ファミリー遺伝子は、定常期における性分化に重要である (p30)
- 6, EDTA の添加は、性分化誘導を引き起こす (p32)
- 7, 豊富なミネラルは、定常期移行後の接合を抑制する (p34)
- 8, 恒常的に *ste11*⁺ 発現量を上げても、 $\Delta ecl1/2/3$ 変異体の接合欠損は回復しない (p35)
- 9, Ecl1 ファミリータンパク質は、亜鉛に応答する遺伝子の適切な制御に必要である (p40)

③考察 (p41)

④実験材料と実験方法 (p44)

参考文献 (p47)

第二章 Ecl1 ファミリー遺伝子は、亜鉛枯渇下で G1 期停止に重要な役割を果たす

①緒言 (p52-)

②結果

- 1, Ecl1 ファミリー遺伝子は、亜鉛枯渇下で G1 期停止に重要な役割を果たす (p55-)
- 2, 亜鉛枯渇下で分裂酵母野生株、 $\Delta ecl1/2/3$ 変異体はおたまじゃくし細胞を形成する (p57-)

③考察 (p59)

④実験材料と実験方法 (p60)

参考文献 (p61-)

総合討論

- 1, 経時寿命延長因子、Ecl1 ファミリーの発見 (p62)
- 2, 性分化と経時寿命のつながり (p62-)
- 3, 亜鉛枯渇下と鉄枯渇下における性分化誘導の類似点、相違点 (p63-)
- 4, Ecl1 ファミリータンパク質と亜鉛濃度の関連性 (p64-)

参考文献(p66-)

謝辞 (p69)

報文目録 (p70)

序論

1, モデル生物・分裂酵母

現在、モデル生物には、ヒト、サル、マウス、線虫、ショウジョウバエ、酵母などが用いられている[Fontana L. *et al.* 2010]。当研究室は、その中で実験生物としてモデル生物・分裂酵母を選択している。

酵母は、単細胞の真核生物である。それと比べてヒトを含めた高等動植物は、多細胞生物である。加えて、ヒトを構成する1つ1つの細胞は複雑な構造をしており、二重の膜で囲まれた核の他に、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、液胞、細胞内の環境を整えるペルオキシソーム、タンパク質を運搬するベシクルなどの小器官、細胞骨格などを有している。分裂酵母でもこれらのオルガネラを有していることから、ヒトと類似した構造を単細胞生物である酵母も持っていることがわかる[吉川寛 他 1996]。

酵母にはたくさんの種類が存在する。中でも研究に用いられている代表的な酵母が、分裂酵母 *Shizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) と出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) である(図 1-1)。分裂酵母は均等分裂によって、出芽酵母は出芽によって娘細胞を生み出す。ヒトは染色体数 46 本に対して、分裂酵母は基本染色体数 3 本、出芽酵母は 16 本になる。本研究で用いている分裂酵母の 3 本の染色体は、1 番染色体が 5.7Mb、2 番目は 4.6Mb、3 番目が 3.5Mb の長さを持ち、全ゲノムサイズは 13.8Mb になる。加えて、分裂酵母のミトコンドリア DNA は全長 19,431bp である[大隅良典 他 2007]。

これら酵母は、分裂酵母、出芽酵母ともに有用なモデル生物である。分裂酵母、出芽酵母のライフサイクルは、一倍体の世代と二倍体の世代間を自由に行き来することができる。双方の酵母は世代時間が短い。使用する培地にもよるが、生育に適した環境で一世代あたり約 1.5~3 時間程度で分裂を行う[山本正幸 他 1994]。これらの 2 つ酵母は、それぞれ 2 つの異なる接合型を持つ。分裂酵母は h^+ 型と h 型、出芽酵母は a 型と α 型である。通常、分裂酵母では栄養豊富な条件下では一倍体、栄養が枯渇すると h^+ 型と h 型の 2 つの異なる接合型をもつ細胞同士が接合し、二倍体を形成する。しかし、出芽酵母においては、栄養が豊富な条件下でも 2 つの異なる接合型をもつ細胞があると接合し、二倍体を形成する。大部分の高等生物は二倍体生物である。出芽酵母は他の高等生物と同様に二倍体で安定しやすい。高等生物が二倍体生物である点を考えると、ライフサイクルにおいて出芽酵母の方が分裂酵母より高等な生物とみることできる。一方、分裂酵母は一倍体で安定しやすい。しかし、その分裂体系や染色体のエキソン、イントロンの割合など、これらの分子レベルの様々な情報を総合して考えると、出芽酵母より分裂酵母の方が動物に近い性質を示すとも考えられる[大隅良典 他 2007; 吉川寛 他 1996]。



分裂酵母
(*Schizosaccharomyces pombe*)



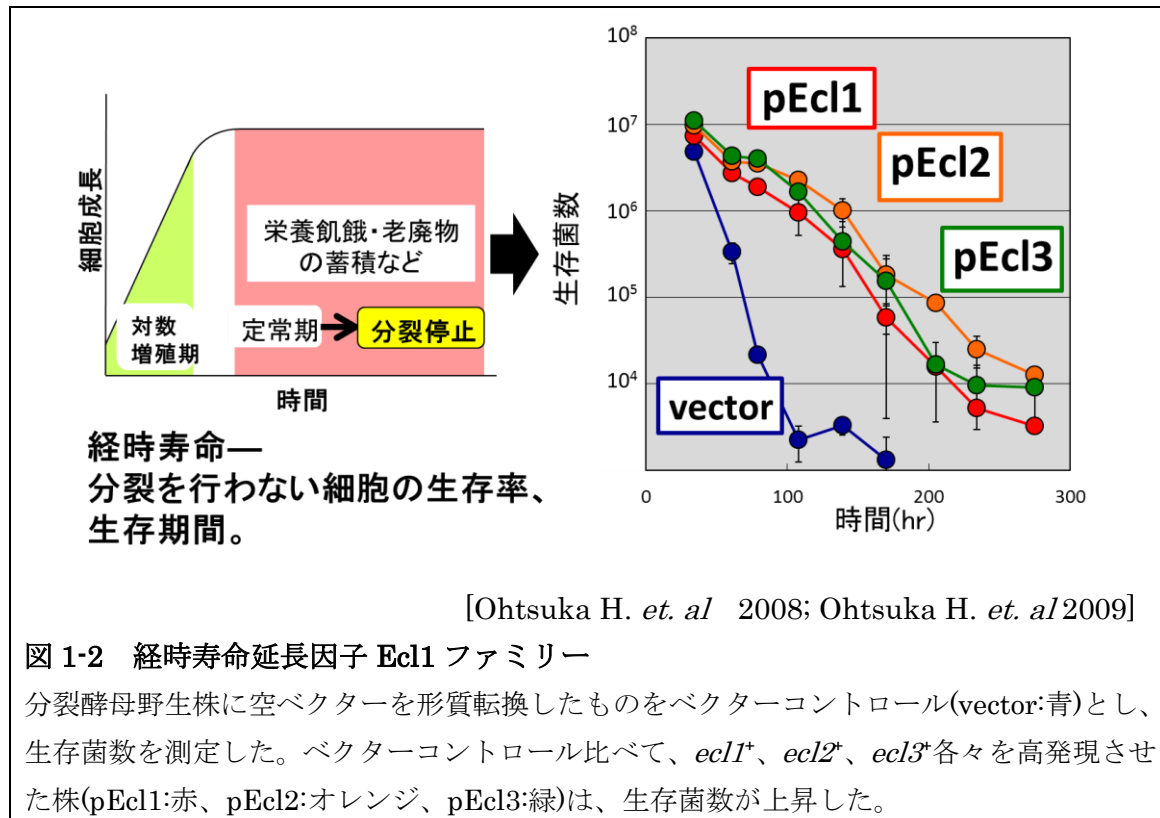
出芽酵母
(*Saccharomyces cerevisiae*)

図 1-1 代表的な 2 種の酵母

研究に用いられる主要な酵母に、分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)が存在する。分裂酵母は均等分裂によって、出芽酵母は出芽によって娘細胞を生み出す。

2, 経時寿命延長因子 Ecl1 ファミリー

高発現により経時寿命を延長する因子の探索から、分裂酵母のもつ遺伝子で *ecl1⁺* (Extender of Chronological Lifespan)が発見された。分裂酵母細胞は、定常期に移行すると、栄養の枯渇や代謝産物の蓄積により細胞分裂・増殖が停止し、見かけ上の細胞増殖が見られなくなる。経時寿命とは、定常期移行後に分裂を停止した細胞の生存率・生存期間を示す(図 1-2)。遺伝学的な機能を解析するために *ecl1⁺*の欠失変異株が当研究室で作製され、経時寿命が測定された。しかし、*ecl1⁺*が欠失しているにもかかわらず、*ecl1⁺*の欠失変異株は野生株の経時寿命とさほど変化がなかった。そのため、*ecl1⁺*以外にも *ecl1⁺*と機能が重複する因子が分裂酵母に存在し、それら因子が *ecl1⁺*欠失変異株の経時寿命の短縮化を相補している可能性があるかと予想され、相同因子の探索が行われた。その結果、*ecl1⁺*と類似したタンパク質をコードする 2 つの遺伝子を見出し、この 2 つは *ecl2⁺*、*ecl3⁺*と命名された。*ecl1⁺*が 80 アミノ酸、*ecl2⁺*、*ecl3⁺*は 84 アミノ酸、89 アミノ酸からなる小さなタンパク質をコードする。*ecl1⁺*と同様に、*ecl2⁺*、*ecl3⁺*も高発現すると分裂酵母の経時寿命が延長した。これら *ecl1⁺*、*ecl2⁺*、*ecl3⁺*からなる経時寿命延長因子は、構造的にも機能的にも多くの類似点をもつことから総称して Ecl1 ファミリーと呼ぶようになった[Ohtsuka H. *et al.* 2008; Ohtsuka H. *et al.* 2009; Ohtsuka H. *et al.* 2012] (図 1-2)。このような Ecl1 ファミリー遺伝子すべてを欠損した $\Delta ecl1/2/3$ 変異株は、野生株と比べて経時寿命が短いことがわかっている[Ohtsuka H. *et al.* 2011]。



これら Ecl1 ファミリー遺伝子は、4つのシステイン残基を保持しており [Ohtsuka H. *et al.* 2009]、これら 4つのシステイン残基は亜鉛の結合に関わることがわかっている [Shimasaki T. *et al.* in press](図 1-3)。

私たちは、Ecl1 ファミリー遺伝子のもつ表現型を探索する中で、Ecl1 ファミリー遺伝子の高発現は、経時寿命延長以外に性分化誘導を引き起こすことを見つけた。分裂酵母における性分化とは、窒素源もしくは炭素源制限下で異なる接合型をもつ細胞同士が接合し、減数分裂を経て胞子を形成する過程を言う。ecl1⁺、ecl2⁺、ecl3⁺各々の高発現は性分化マスター転写因子をコードする *ste11*⁺ mRNA の発現を上げ、性分化を誘導する。また、*ste11*⁺ 単独の発現上昇でも性分化を誘導することがわかっている [Ohtsuka H. *et al.* 2012]。以上のことから、Ecl1 ファミリー遺伝子が性分化誘導に関与し、かつ *ste11*⁺ の転写誘導を介した性分化の誘導で重要な役割を果たすのではないかと考えた。

Ecl1 ファミリー遺伝子は、性分化誘導を引き起こす枯渇条件も含めていくつかのシグナル条件下でその発現誘導が起こる。ecl1⁺ は、性分化誘導のシグナルの 1 つである窒素源枯渇下で発現誘導が起こる。さらに、硫黄枯渇下や過剰な酸化ストレスを受けると発現誘導が起こる。加えて、熱ショックストレス下では、ecl2⁺ の遺伝子発現誘導が引き起こされることが明らかになっている [Miwa Y. *et al.* 2011; Ohtsuka H. *et al.* 2011; Ohtsuka H. *et al.* unpublished; Shimasaki T. *et al.* 2014]。

	+ + + +	
Ecl1	1 MDLDFCTVCGATTQDGSLYCSSECHLLDFTKLDQTTSN--ISVSSEY	図 1-3 Ecl1 ファミリーのアミノ酸配列 Ecl1 ファミリーのアミノ酸配列を並べ、一致するアミノ酸を「*」で示した。共通して保存された4つのシステイン残基を「+」で示す。
Ecl2	1 MDLDYCIICGKPTTGN-LYCSRECHLQDCPGCGSTSEQC-SYSKSADL	
Ecl3	1 MDLNLCLLCGNSIDAEGLYCSNECRIQDKATTELFSDPLKSPSLNETI	
	*** * ** **** ** * *	
Ecl1	QFLVSEHLAHF-HRKSMTSADFPTPRFS--AYTKLHA----- 80	
Ecl2	HMLSSQYLDHFRRRSSMPSSTSSSLLNGFVASRLAVL----- 84	
Ecl3	DYLALNYFDLFSRRSSMCS-SSNSSIYSGIYYTELKNYSVEN 89	
	* * * * * * *	

3, 分裂酵母における性分化

分裂酵母は通常一倍体で存在しており、栄養豊富な条件下では一倍体のまま有糸分裂を行う。しかし、窒素源などの栄養源が枯渇すると有糸分裂(細胞周期)の進行が停止する。その後、細胞周期を2サイクル回した後、G0期に移行する細胞が存在する[Takeda K. *et al.* 2010]。もしくはその後、細胞周期がG1期で停止した後、周囲に異なる接合型(h^+/h^-)をもつ細胞があるとその細胞と接合をする。このとき一時的に二倍体になり、第一・第二減数分裂を経て孢子を形成する。このG1期停止後、細胞同士が接合し、孢子を形成する一連の過程を「性分化」と言う(図1-3)。一説では、栄養条件など生活環境が正常にもどるまでの期間、栄養飢餓下にあっても生命が生き残るための機構であると考えられている[吉川寛 他 1996]。

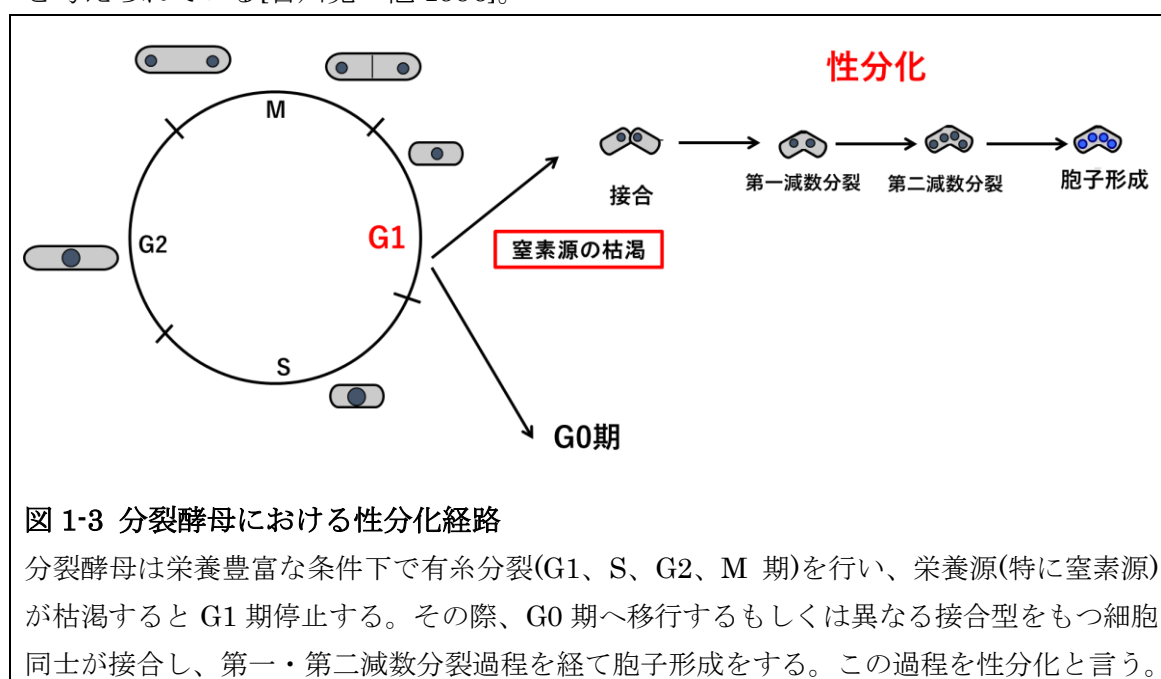


図1-3 分裂酵母における性分化経路

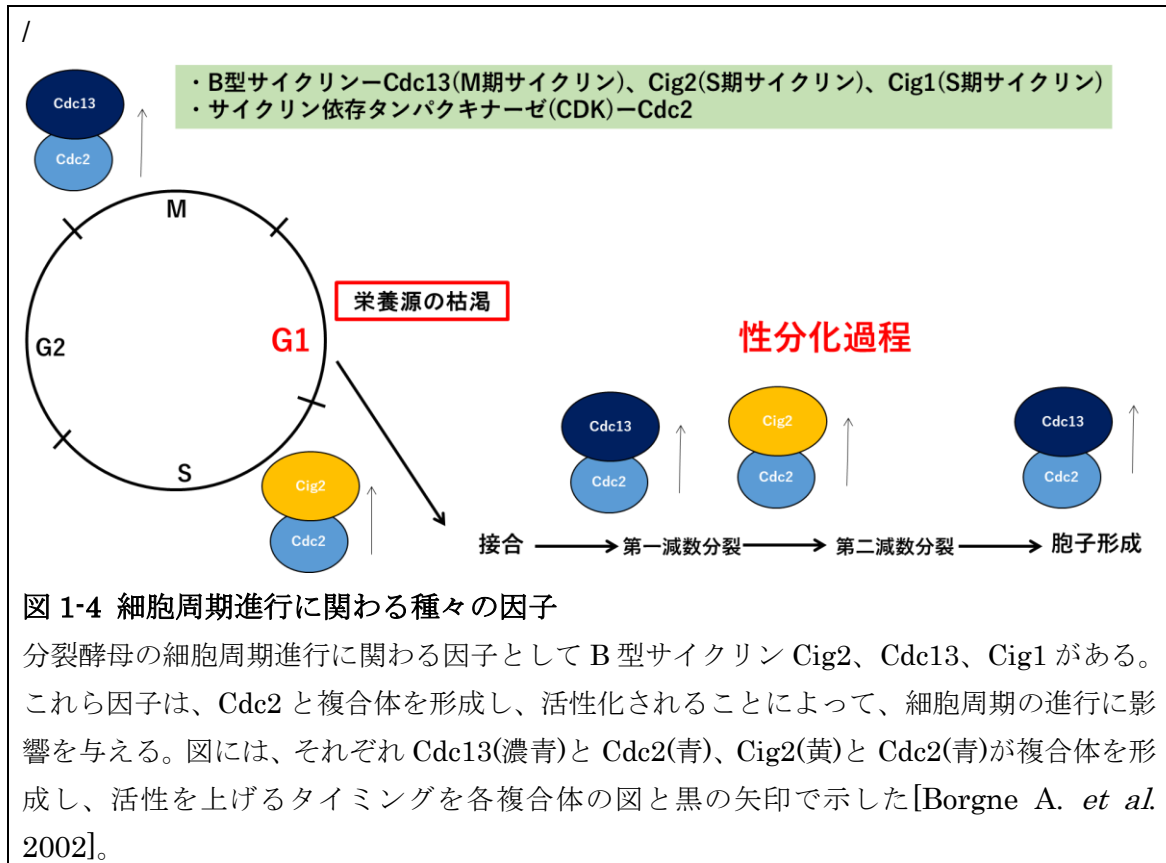
分裂酵母は栄養豊富な条件下で有糸分裂(G1、S、G2、M期)を行い、栄養源(特に窒素源)が枯渇するとG1期停止する。その際、G0期へ移行するもしくは異なる接合型をもつ細胞同士が接合し、第一・第二減数分裂過程を経て孢子形成をする。この過程を性分化と言う。

細胞周期の進行調節には、サイクリンとサイクリン依存タンパクキナーゼ(CDK)が関与する。栄養源枯渇下のG1期の停止にはいくつかの遺伝子が関与することが報告されてきた。体細胞分裂、減数分裂ともに存在する因子の1つとして、サイクリン依存タンパクキナーゼ Cdc2 がある。この Cdc2 と各サイクリンが複合体を形成することで、その活性をあげ、細胞周期進行のサイクルを調節する。

出芽酵母では、キナーゼとしては Cdc28 キナーゼ、G1/S 期に機能する G1 サイクリン、S 期と G2/M 期に機能する B 型サイクリンが見ついている[吉川寛 他 1996]。分裂酵母では B 型サイクリンである Cig2、Cig1、Cdc13 が知られており、このような B 型サイクリンは、ヒトやアフリカツメガエルなどでも発見された[Bueno A. and Russel P. 1993]。

Cig2 や Cdc13 のような B 型サイクリンは、時には Cdc2 と複合体を形成し、活性を

上げる。時にはユビキチン化されることによって Cig2 や Cdc13 が分解される。これらの機構によって適切なタイミングでの細胞周期進行を調節している[Yamano H. *et al.* 2000]。その中でも Cig2 は、G1 期から S 期、減数分裂前の G1 期から S 期、第一・第二減数分裂過程でも Cdc2 と複合体を形成してその活性を上げる。加えて、Cdc13 も増殖期ならびに性分化過程に働く因子として知られている (図 1-4)。



4, 性分化を誘導する 4つのシグナル伝達経路

分裂酵母の性分化には4つのシグナル伝達経路が存在する。各々の経路が、性分化のマスター転写因子である Ste11 を介して、性分化誘導に関わる。Ste11 は *mei2⁺* や *rgs1⁺* を始めとする性分化に必要な遺伝子の転写を正に制御し、また性分化には *ste11⁺* の発現が重要とされている。*mei2⁺* や *rgs1⁺* は、Ste11 のターゲット遺伝子であり、性分化過程の中で接合過程にも関与することが明らかになっている [Sugimoto A. *et al.* 1991; Pereira PS. And Jones NC. 2001]。

Ste11 を介した性分化誘導に関わる 4 つの性分化シグナル伝達経路は、炭素源制限、窒素源枯渇、接合フェロモンなどのシグナルに応答することにより、性分化へと誘導する。1 つ目の経路は cAMP-PKA 経路であり、グルコース応答に関与する [Higuchi T. *et al.* 2002]。2 つ目は TOR (target of rapamycin) 経路であり、窒素源枯渇に応答する [Matsuo T. *et al.* 2007]。3 つ目は Spk1-MAP キナーゼ経路であり、接合フェロモンに応答して *ste11⁺* 発現を高め、接合や減数分裂に必要な遺伝子発現を誘導する [Kjaeruff S. *et al.* 2005]。最後は Sty1 ストレス応答 MAP キナーゼ経路であり、窒素源枯渇下における細胞分裂停止に必要とされる [Shiozaki K. and Russel P. 1996]。これまでの知見において、これら 4 つの経路がメインとなる性分化誘導経路であり、性分化マスター転写因子 Ste11 が性分化誘導において必須の因子であると考えられてきた(図 1-5)。

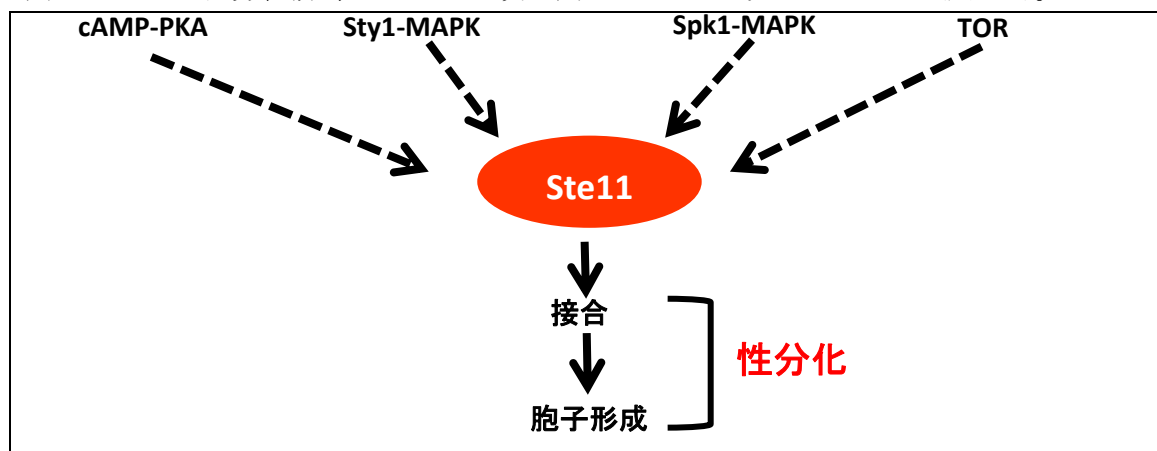


図 1-5 分裂酵母の主要な 4 つの性分化シグナル伝達経路

分裂酵母には、cAMP-PKA 経路、TOR(target of rapamycin)経路、Spk1 MAP キナーゼ経路、Sty1 ストレス応答 MAP キナーゼ経路の 4 つの性分化シグナル伝達経路が存在する。4 つのシグナル伝達経路は、炭素源制限、窒素源枯渇、接合フェロモンに応答することにより、性分化へと誘導する。

Ste11 や Mei2 はリン酸化の有無によってそれぞれの活性が調節される。キナーゼである Pat1 は、Ste11 や Mei2 の活性調節に関与する。Pat1 は、Mei2 や Ste11 のそれぞれの 2 ヶ所の領域をリン酸化することで、その活性を負に制御する。この Pat1 依存的なリン酸化が誘導されなくなると、Mei2 や Ste11 のリン酸化部位が脱リン酸化され、

それぞれのタンパク質の活性が上がる。Mei2 や Ste11 が活性化されると、接合や孢子形成などの性分化誘導を引き起こすことが知られている。このため、*pat1⁺* の温度感受性変異株は制限温度下で一倍体細胞、二倍体細胞に関わらず性分化誘導を引き起こす。この性質から人為的に簡便に性分化を引き起こすことが可能なので、性分化解析に *pat1⁺* の温度感受性変異株はよく使用されている [Kitamura K. *et al.* 2001; Tanabe K. *et al.* 2003]。

5, 本研究で明らかにした性分化と Ecl1 ファミリー遺伝子の関係性

分裂酵母最少培地では、野生株を定常期移行後まで培養すると性分化誘導(接合・孢子形成)が起こるが、Ecl1 ファミリー遺伝子欠損株($\Delta ecl1/2/3$ 株)では性分化誘導が起こらなかった。上記のような野生株の接合・孢子形成誘導は、定常期移行後の老廃物の蓄積などが原因で引き起こされている可能性があるかと推察できる。また、培養し続けることにより何らかの栄養源が枯渇し、性分化誘導が引き起こされたとも考えられる。

しかし、定常期移行後の $\Delta ecl1/2/3$ 株では接合誘導が起こらなかったが、窒素源枯渇および炭素源制限下では $\Delta ecl1/2/3$ 株でも野生株と同様に接合誘導が起こることがわかった。そのため、窒素源および炭素源制限下以外に Ecl1 ファミリー遺伝子が関与するシグナル条件があるのではないかと考えた。上記の后者の可能性、つまり培養し続けることにより何らかの栄養源が枯渇し、性分化誘導が引き起こされた可能性を検討するため、分裂酵母最少培地のビタミン類、塩類、ミネラル類などの各成分をそれぞれ枯渇させて培養した。その結果、野生株では微量金属類である亜鉛および鉄枯渇下で性分化誘導が引き起こされたが、 $\Delta ecl1/2/3$ 株では、その性分化誘導は起こらなかった。このことから亜鉛や鉄枯渇は分裂酵母の性分化誘導を引き起こし、それに Ecl1 ファミリー遺伝子が重要な役割を果たすことが明らかになった。

分裂酵母において、窒素源枯渇下での性分化誘導には多くの知見が得られている。例えば、窒素源枯渇下で G1 期停止後に性分化誘導が引き起こされることが挙げられる[大隅良典 他 2007]。さらに、窒素源枯渇のシグナルを受けると、性分化マスター転写因子 Ste11 を介して性分化誘導が促進される[Sugimoto A. *et al.* 1991]。本研究では、亜鉛枯渇下においても G1 期停止が起こること、それに Ecl1 ファミリー遺伝子が重要な役割を果たすことがわかった。さらに亜鉛枯渇条件下で Ecl1 ファミリー遺伝子は、亜鉛センサーとして働く可能性が高いことを示唆した。

参考文献

Borgne A, Murakami H, Ayté J, Nurse P: “The G1/S Cyclin Cig2p during Meiosis in fission yeast.” *Molecular Biology of the Cell*(Jun. 2002) 13:2080-2090

Bueno A, Russel P: “Two fission yeast B-type Cyclins, Cig2 and Cdc13, have different functions in mitosis” *Molecular and cellular biology*(Apr.1993)4:2286-2293

Fontana, L, Partridge L, Longo VD: “Extending healthy life span--from yeast to humans.” *Science*(Apr.2010)328:321-326.

Higuchi T, Watanabe Y, Yamamoto M: “Protein kinase A regulates sexual development and gluconeogenesis through phosphorylation of the Zn finger transcriptional activator Rst2p in fission yeast.” *Mol. Cell. Biol.* (Jan. 2002) 22:1-11

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

Kjaerulff S, Lautrup-Larsen I, Truelsen S, Pedersen M, Nielsen O.Kjaeruff: “Constitutive activation of the fission yeast pheromone-responsive pathway induces ectopic meiosis and reveals ste11 as a mitogen-activated protein kinase target.” *Mol. Cell. Biol.* (Mar. 2005) 25:2045-2059

Matsuo T, Otsubo Y, Urano J, Tamanoi F, Yamamoto M: “Loss of the TOR kinase Tor2 mimics nitrogen starvation and activates the sexual development pathway in fission yeast.” *Mol. Cell. Biol.* (Apr. 2007) 27:3154-3164

Miwa Y, Ohtsuka H, Naito C, Murakami H, Aiba H: “Ecl1, a regulator of the chronological lifespan of *Schizosaccharomyces pombe*, is induced upon nitrogen starvation.” *Biosci Biotechnol Biochem.* (Feb. 2011) 75:279-283

大隅良典、下田親 編集 「酵母のすべて ◎系統、細胞から分子まで」 シュプリンガー・ジャパン株式会社 (2007)

Ohtsuka H, Azuma K, Kubota S, Murakami H, Giga-Hama Y, Tohda H, Aiba H: “Chronological lifespan extension by Ecl1 family proteins depends on Prr1 response regulator in fission yeast.” *Genes Cells*. (Jan. 2012) 17:39-52.

Ohtsuka H, Azuma K, Murakami H, Aiba H: “*hsf1+* extends chronological lifespan through Ecl1 family genes in fission yeast.” *Mol Genet Genomics*. (Jan. 2011) 285:67–77

Ohtsuka H, Mita S, Ogawa Y, Azuma K, Ito H, Aiba H: “A novel gene, *ecl1(+)*, extends the chronological lifespan in fission yeast.” *FEMS Yeast Res*. (Jun. 2008) 8:520-530

Ohtsuka H, Ogawa Y, Mizuno H, Mita S, Aiba H: “Identification of *ec1* family genes that extend chronological lifespan in fission yeast.” *Biosci. Biotechnol. Biochem*. (Apr. 2009) 73:885-889.

Pereira PS, Jones NC: “The RGS domain-containing fission yeast protein, Rgs1p, regulates pheromone signalling and is required for mating.” *Genes to Cells*. (Sep. 2001) 6:789-802

Shimasaki T, Ohtsuka H, Naito C, Azuma K, Tenno T, Hiroaki H, Hiroshi Murakami H, Aiba H: “Ecl1 is a zinc-binding protein involved in the zinc-limitation-dependent extension of chronological lifespan in fission yeast.” *Mol Genet Genomics*. (Dec. 2016) in press

Shimasaki T, Ohtsuka H, Naito C, Murakami H, Aiba H: “Ecl1 is activated by the transcription factor Atf1 in response to H₂O₂ stress in *Schizosaccharomyces pombe*.” *Mol Genet Genomics*. (Aug. 2014) 289:685-693.

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*. (Sep. 2005) 10:2276-2288

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

Takeda K, Yoshida T, Kikuchi S, Nagao K, Kokubu A, Pluskal T, Villar-Briones A, Nakamura T, Yanagida M. “Synergistic roles of the proteasome and autophagy for mitochondrial maintenance and chronological lifespan in fission yeast.” *Proc Natl Acad Sci U S A.* (Feb. 2010) 107: 3540-3545

Tanabe K, Ito N, Wakuri T, Ozoe F, Umeda M, Katayama S, Tanaka K, Matsuda H, Kawamukai M: “Sla1, a *Schizosaccharomyces pombe* homolog of the human La protein, induces ectopic meiosis when its C terminus is truncated.” *Eukaryot Cell.* (Dec. 2003) 2:1274-1287.

吉川寛 監修、柳田充弘 編集 「ネオ生物学シリーズ—ゲノムから見た新しい生物像—第4巻 酵母」 共立出版株式会社 (1996)

Yamano H, Kitamura K, Kominami K, Lehmann A, Katayama S, Hunt T, Toda T: “The spike of S phase cyclin Cig2 expression at the G1-S border in fission yeast requires both APC and SCF ubiquitin ligases.” *Mol Cell.*(Dec. 2000) 6:1377–1387

山本正幸 編集 「実験医学別冊 バイオマニュアルシリーズ 10 酵母による遺伝子実験法」 株式会社 羊土社 (1994)

第 1 章

分裂酵母 Ecl1 ファミリー遺伝子は、
亜鉛および鉄枯渇下で性分化を引き起こす

① 緒言

1, 分裂酵母 *S. pombe* における性分化

分裂酵母 *S. pombe* の性分化には 4 つのシグナル伝達経路が存在する。4 つの経路は cAMP-PKA 経路、TOR (target of rapamycin) 経路、Spk1-MAP キナーゼ経路、Sty1 ストレス応答 MAP キナーゼ経路である。各々の経路が、性分化のマスター転写因子である Ste11 を介して、性分化誘導に関わる。上記の性分化シグナル伝達経路は、炭素源制限もしくは窒素源枯渇、および接合フェロモンに応答することにより誘導される(序論：4)。分裂酵母 *S. pombe* における性分化誘導のために、窒素源枯渇もしくは炭素源制限条件下にさらして酵母細胞を観察することが多く、実験系が確立されている。

本研究においてもいくつかのデータを得るために、分裂酵母株をこの二つの各枯渇下にさらして、細胞同士の接合や胞子形成を観察した。細胞同士の接合は一倍体細胞を、胞子形成は二倍体細胞を用いてその形態を観察した。胞子形成率の測定には、異なる栄養要求性をもつ一倍体の細胞同士を接合させ[山本正幸 他、1998]、栄養豊富な条件下で二倍体の状態で維持できる細胞(二倍体細胞)を用いた(図 1-3)。

2, 亜鉛もしくは鉄の濃度に依存した *S. pombe* 関連因子

S. pombe におけるミネラル(鉄および亜鉛)の恒常性や応答に関して、いくつかの報告がされている[Labbé S. *et al.* 2007; Dainty SJ. *et al.* 2008]。鉄恒常性に関して、GATA 型のレギュレーター Fep1 は、高濃度の鉄存在下で鉄取り込み遺伝子の発現を抑制する。反対に、低濃度の鉄存在下では、鉄の取り込みに関わる遺伝子の発現誘導が起こると同時に、鉄の利用に関わる遺伝子の発現は抑えられる。このような Fep1 によってその転写が制御される因子として *php4* が知られている。この *Php4* は鉄の利用に関わる遺伝子を負に制御する。亜鉛応答に関しては、亜鉛枯渇応答遺伝子の発見のためにマイクロアレイ解析が行われ、亜鉛トランスポーター Zrt1 が報告された。Zrt1 は、細胞内亜鉛レベルの主要なレギュレーターとして機能することが知られている。また、推定鉄・亜鉛イオン膜貫通トランスポーターである Fet4 は、低濃度の亜鉛存在下で亜鉛取り込みも行おうと考えられている[Brault A. *et al.* 2016; Dainty SJ. *et al.* 2008]。しかしながら、鉄および亜鉛が分裂酵母の性分化に影響を与える報告はこれまでされていなかった。

3, Ecl1 ファミリーは、性分化にも影響を及ぼす

これまでに、新規因子 *ecl1*⁺、*ecl2*⁺、*ecl3*⁺ (Extender of Chronological Lifespan)の高発現が、分裂酵母における経時寿命を延長することを発見した。分裂酵母における経時寿命とは、非分裂細胞の生存率・生存期間として定義され、液体培地を用いた回分培養における増殖定常期の生存率を計測することで解析できる。*ecl1*⁺、*ecl2*⁺、*ecl3*⁺は、

互いに相同性を持つタンパク質をコードしており、これらを総称して Ecl1 ファミリータンパク質と呼んでいる。Ecl1 と Ecl2 は主に核に局在している [Ohtsuka H. *et al.* 2008; Ohtsuka H. *et al.* 2009]。分裂酵母の経時寿命の延長における Ecl1 ファミリー遺伝子の機能は、Prr1 と、部分的に Hsr1 に依存している [Ohtsuka H. *et al.* 2012]。Prr1 は、活性酸素種 ROS の防御に働く、2 種類のタンパク質からなる二成分制御系レギュレーターである [Chen D. *et al.* 2008]。Hsr1 はジンクフィンガー転写因子であり、Ecl1 ファミリー遺伝子と同様に、その高発現により経時寿命を延長する [Ohtsuka H. *et al.* 2012]。ecl1⁺、ecl2⁺、ecl3⁺ 高発現による興味深い表現型は得られている。しかし、根底にある分子メカニズムは不明瞭なままである。

Ecl1 ファミリー遺伝子の高発現下では、経時寿命の延長だけではなく性分化誘導も起こる [Ohtsuka H. *et al.* 2012]。Ecl1 ファミリー遺伝子が高発現するとき、ste11⁺ mRNA は、Prr1 転写因子を介して正に制御される。Prr1 タンパク質は *in vitro* において ste11⁺ DNA の上流に結合し、ste11⁺ 転写量を制御することが報告されている [Ohmiya R. *et al.* 2000]。これらのことから、Ecl1 ファミリー遺伝子は Prr1 転写因子を介し、ste11⁺ mRNA 発現を制御し、分裂酵母の性分化に影響を与えていると考えられる。

4, 亜鉛および鉄と Ecl1 ファミリーの関わり-本章の主題

私たちは ecl1⁺、ecl2⁺、ecl3⁺ の表現型の解析を行うために、それらを欠失させて変異体を作った。分裂酵母野生株では、分裂酵母最少培地 EMM で培養し続け、定常期へ移行後、接合や胞子形成などの性分化誘導を引き起こした。しかし、Ecl1 ファミリー遺伝子を欠損させた $\Delta ecl1/2/3$ 株では、定常期移行後の性分化誘導は起こらなかった。

定常期移行後の野生株における性分化誘導の原因は、いくつか考えられる。分裂酵母は、栄養源の枯渇や代謝産物の蓄積により細胞分裂・増殖が停止し、見かけ上の細胞増殖が見られなくなると定常期へと移行する。定常期移行後に性分化誘導が引き起こされることから、定常期移行後におこる代謝産物の蓄積が性分化誘導の原因とも考えられた。最も代表的な性分化誘導条件は、炭素源制限および窒素源の枯渇であり、分裂酵母において実験系が確立されている。そのため野生株では、培養し続けることにより、窒素源が枯渇もしくは炭素源が制限されることで、定常期移行後に性分化誘導が引き起こされる可能性があると考えた。

窒素源の枯渇および炭素源制限下で、分裂酵母野生株では接合や胞子形成の誘導が見られた。同様に、 $\Delta ecl1/2/3$ 株は定常期移行後と異なり、窒素源枯渇および炭素源制限下では正常に接合や胞子形成を誘導した。これらの結果は、窒素源枯渇、炭素源制限に加えて、他の外的要因が定常期における性分化誘導に関わるのではないかと考えさせた。本章では、鉄および亜鉛の枯渇下で性分化が誘導されること、その過程で Ecl1 ファミリー遺伝子が重要な役割を果たすことを示した。また、Ecl1 ファミリー遺伝子がメタ

ルセンシングに関わる可能性も議論した。

② 結果

1, Ecl1 ファミリー遺伝子は、*ste11*⁺-mRNA を最大値まで発現するのに必要である

序論で示したように、*ecl1*⁺、*ecl2*⁺、*ecl3*⁺の過剰な発現は *ste11*⁺ mRNA の発現を上昇させ、接合や胞子形成誘導を引き起こした[Ohtsuka H. *et al.* 2012]。EMM 液体培地で定常期移行後まで(細胞濁度 OD₆₀₀ で 4 になるまで)培養したとき、*ste11*⁺ 発現誘導が引き起こされた(図 2-1:A)。この発現誘導は、 $\Delta ecl1/2/3$ 変異体でも見られたが、 $\Delta ecl1/2/3$ 変異体における *ste11*⁺ mRNA 量は野生株に比べていくぶんか低かった。*Ste11* のターゲット因子の 1 つである *mei2*⁺ も観察し、定常期移行後の野生株、 $\Delta ecl1/2/3$ 株の双方で誘導されることを見つけた。しかし、 $\Delta ecl1/2/3$ 株の *mei2*⁺ 転写レベルは野生株と比べて低かった [Harigaya Y. and Yamamoto M. 2007]。次に、私たちは窒素源枯渇下で *ste11*⁺ mRNA 量を解析した。*ste11*⁺ mRNA 量は、窒素源枯渇下で発現は誘導された。しかしながら、窒素源枯渇下における $\Delta ecl1/2/3$ 変異体での *ste11*⁺ mRNA 発現量は、野生株より低かった(図 2-1:B)。私たちは、窒素源枯渇下で野生株と $\Delta ecl1/2/3$ 変異体は *mei2*⁺ 発現が誘導されることを見つけた。これらの結果は、*ste11*⁺ mRNA 発現を最大値まで上げるためには Ecl1 ファミリー遺伝子が必要であることを示唆した。

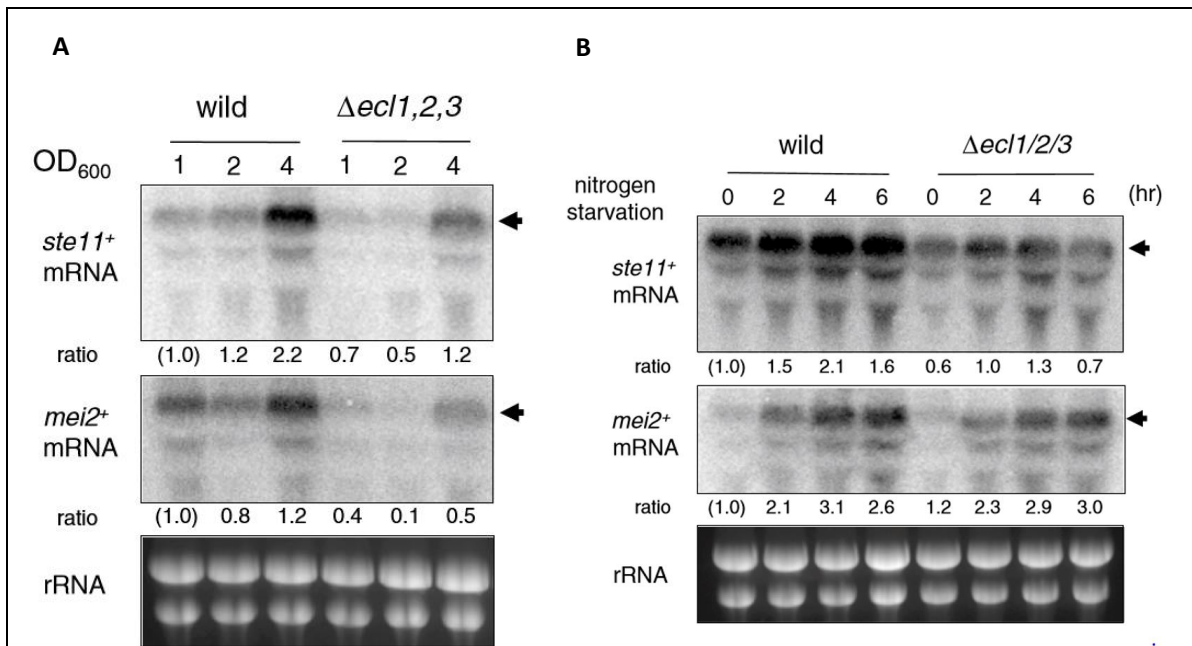
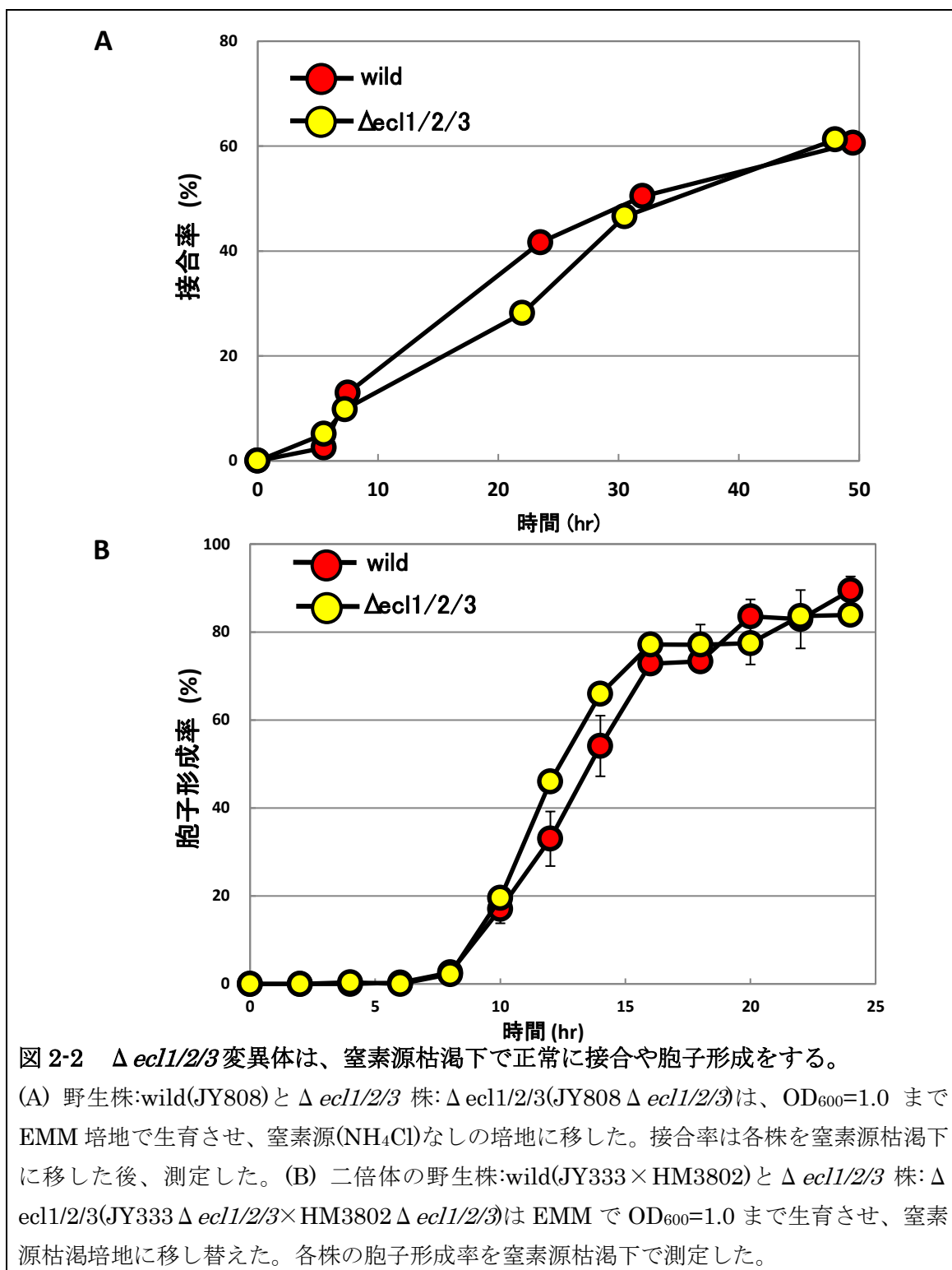


図 2-1 Ecl1 ファミリー遺伝子は、*ste11⁺* が最大値まで発現するのに必要である。

ノーザンブロット解析(RNA 検出)の結果を示した。黒矢印は、主要な *ste11⁺* と *mei2⁺* の転写量を示す。ローディングコントロールとして rRNA を双方の下方パネルに表示する。(A)野生株:wild(JY333)、 $\Delta ecl1/2/3$ 株: $\Delta ecl1,2,3$ (JY333 $\Delta ecl1/2/3$)、を分裂酵母最少培地 EMM で生育し、細胞は各生育点(OD₆₀₀)で集菌した。(B)野生株:wild(JY333×HM3802)と $\Delta ecl1/2/3$ 株: $\Delta ecl1/2/3$ (JY333 $\Delta ecl1/2/3$ ×HM3802 $\Delta ecl1/2/3$) の二倍体株は、EMM で OD₆₀₀=1.0 まで生育させ、窒素源(NH₄Cl)枯渇培地に移し替えた。株を、窒素源枯渇後の各時間点で集菌した。mRNA レベルを定量するために各バンドの強度をスキャンし、rRNA によって規準化し、比率は各写真下に示した。標準値(比率=1)は、各写真下の括弧で示されている。

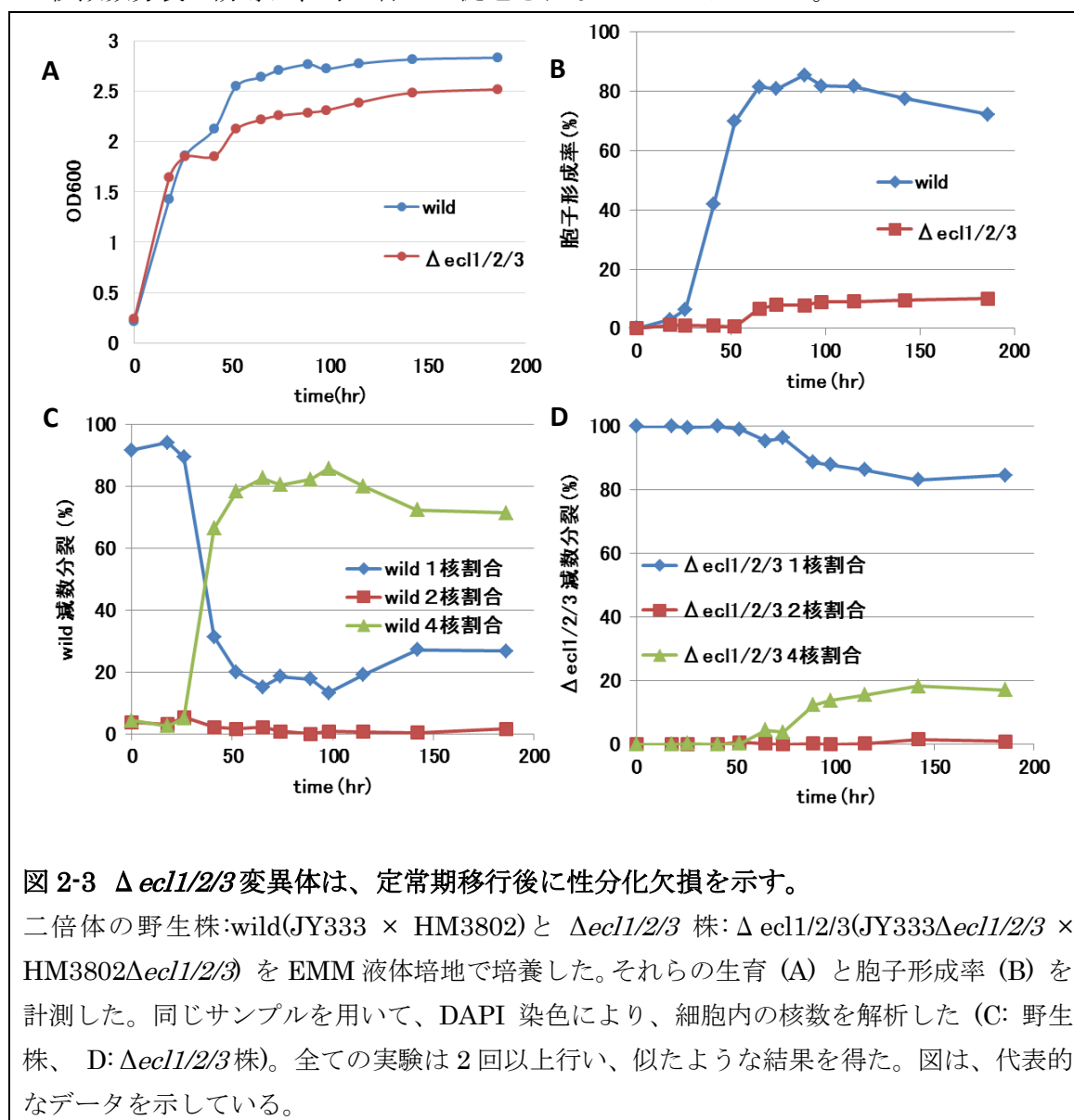
2, 窒素源枯渇下で、 $\Delta ecl1/2/3$ 変異体は性分化を亢進する

図 2-1 で示したように、野生株と比較すると、 $\Delta ecl1/2/3$ 変異体で *ste11*⁺ mRNA 発現誘導レベルの減少が見られた。これまでの知見において、窒素源枯渇下における性分化誘導は、Ste11 を介して行われると報告されてきた(序論：4)。そのため、性分化マスター転写因子である *ste11*⁺ mRNA 量の減少に伴って、 $\Delta ecl1/2/3$ 株における接合や孢子形成率も減少すると考えていた。しかし、窒素源枯渇下における $\Delta ecl1/2/3$ 株は、*ste11*⁺ mRNA 量が減少した培養条件と同じであるにもかかわらず、野生株と同様に接合率や孢子形成率を上昇させた(図 2-2)。



3, $\Delta ecl1/2/3$ 変異体は、定常期において性分化誘導が起こらない

性分化の表現型を明らかにするために、二倍体の野生株と二倍体の $\Delta ecl1/2/3$ 株を EMM 液体培地で培養し、生育に伴って孢子形成率を測定した。図 2-3:B で示したように、野生株ではおだやかに孢子形成率が上昇した。それに比べて $\Delta ecl1/2/3$ 株では、孢子形成率はあまり上昇しなかった。性分化誘導における減数分裂核分裂を観察するために、 $\Delta ecl1/2/3$ 株に DAPI による細胞染色を行い、1つの細胞あたりの核数を観察した。1つの細胞あたり 1核の細胞(青)、2核の細胞(赤)、4核の細胞(緑)の数をそれぞれ計測し、その増殖傾向を観察することで減数分裂の進行度合いを観察した。図 2-3:C では経時的培養するにつれて 4核形成率が上昇した。しかし、図 2-3:D で示したように、 $\Delta ecl1/2/3$ 株では野生株に比べて 4核形成率が上昇しなかった。そのため、 $\Delta ecl1/2/3$ 株で核減数分裂の誘導は、野生株ほど促進されないことがわかった。



次に一倍体の *S. pombe* 株を用いて、野生株、 $\Delta ecl1/2/3$ 株の接合率を解析した。この解析からも野生株では接合誘導が起こるが、 $\Delta ecl1/2/3$ 株では接合誘導が起こらなかった(図 2-4:A)。これらの結果から、EMM 液体培地で定常期移行後まで培養した際に何らかのシグナルを感知して、性分化誘導が引き起こされることがわかった。加えて、これら経路で Ecl1 ファミリー遺伝子が重要な役割を果たすことが示唆された。

4, *S. pombe* は Ecl1 ファミリー遺伝子に依存して、亜鉛および鉄枯渇下で接合・孢子形成を誘導する

$\Delta ecl1/2/3$ 株の性分化は、野生株と比較すると、窒素源枯渇下では正常に誘導されるが、EMM で培養した定常期移行後では大きく誘導されなかった(図 2-2、2-3)。定常期移行後と比べて窒素源枯渇下における $\Delta ecl1/2/3$ 株の性分化誘導が異なる挙動を示した。そのため、窒素源枯渇以外の外的要因が、定常期移行後の性分化誘導に関係することが示唆された。既存の性分化誘導シグナルには、炭素源濃度の制限も知られている [Yamamoto M. *et al.* 1996; Kunitomo H. *et al.* 2000]。そのため以上のデータも踏まえ、次に窒素源ではなく炭素源の制限が、Ecl1 ファミリー遺伝子が関与する性分化誘導の原因ではないかと考えた。そして窒素源ならびに炭素源制限培地でも接合率の測定を行った。図 2-4:A に示したように、野生株では、窒素源枯渇だけではなく炭素源制限下でも接合誘導が見られた。一方で $\Delta ecl1/2/3$ 株でも、窒素源枯渇および炭素源制限下において接合誘導が見られた(図 2-4:A)。それに比べて、定常期移行後の $\Delta ecl1/2/3$ 株は、細胞同士の接合がほとんど観察できなかつた。窒素源および炭素源制限下では定常期移行後と比べて、*ecl1*⁺、*ecl2*⁺、*ecl3*⁺ の有無に関わらず、接合率が上昇した。そのため、定常期移行後の $\Delta ecl1/2/3$ 株の接合誘導が起こらなかったのは、EMM 培地中の窒素源や炭素源以外の成分が継続培養中に現象したためであると 1 つの仮説を立てた。

そのような成分を特定するために、私は分裂酵母生育培地 EMM から各成分をそれぞれ除いた培地で、接合率の計測を行った。分裂酵母の EMM 培地には、主にフタル酸水素カリウム (C₈H₅KO₄)、リン酸ナトリウム (Na₂HPO₄)、塩類 (MgCl₂、CaCl₂、KCl、Na₂SO₄)、ミネラル類 (H₃BO₃、MnSO₄、ZnSO₄、FeCl₃、MoO₄、KI、CuSO₄、(クエン酸))、ビタミン類 (ニコチン酸、ミオイノシトール、ビオチン、パントテン酸) の成分が含まれている。図 2-4:B のようにフタル酸水素カリウム、リン酸ナトリウム、塩類、微量金属類、ビタミン類 (ニコチン酸、ミオイノシトール、ビオチン、パントテン酸) の各成分をそれぞれ除いた EMM 液体培地を作成した。作成した各培地で接合率を観察したところ、ミネラル類枯渇培地(図 2-4:B、-mineral)でのみ野生株は接合し、三重欠損株はほとんど接合しなかつた。この結果から、ミネラル類の枯渇が定常期以降後の接合誘導の原因であること、その経路に Ecl1 ファミリー遺伝子が必要だということを結論づけた。

前述したように、EMM に含まれるミネラル類のストックには、ホウ素 (H₃BO₃)、マンガン (MnSO₄)、亜鉛 (ZnSO₄)、鉄 (FeCl₃)、モリブデン (MoO₄)、ヨウ素 (KI)、銅 (CuSO₄)、(クエン酸) の 8 つの成分が含まれる [Moreno S. *et al.* 1991]。そのため、さらにミネラル類のどの成分を除くと野生株では接合を誘導し、 $\Delta ecl1/2/3$ 株では接合誘導が起こらないかに興味を持ち、実験を試みた。

最初に大まかに成分を探索するために、モリブデン、ヨウ素、銅、(クエン酸) の 4 つを除いた培地もしくはホウ素、マンガン、亜鉛、鉄の 4 つを除いた培地に各酵母株を移

し、接合率を測定した(図 2-4:C)。野生株の接合は、ホウ素、マンガン、亜鉛、鉄を除いた培地で誘導され、モリブデン、ヨウ素、銅を除いた培地では誘導されなかった。 $\Delta ecl1/2/3$ 株はこれらの条件下では接合誘導が起こらなかった。さらに成分を絞り込むために、鉄、亜鉛を除いた培地とホウ素、マンガンを除いた培地で接合率を比較した。解析の結果、野生株は亜鉛と鉄枯渇に応答して接合を誘導することがわかった(図 2-4:D)。最後に、亜鉛もしくは鉄を除いた培地各々で接合率を測定した(図 2-4:E)。その結果、野生株の接合が誘導され、 $\Delta ecl1/2/3$ 株は誘導されないのは、亜鉛と鉄のいずれかが枯渇した条件下であることがわかった。

これらの結果は、亜鉛および鉄枯渇下で、Ecl1 ファミリー遺伝子依存的な接合誘導が起こることを示している。さらに孢子形成を解析するために、二倍体の野生株と $\Delta ecl1/2/3$ 株を、亜鉛枯渇下、鉄枯渇下にそれぞれに移して実験を行った。図 2-4 の E に示したように、亜鉛および鉄枯渇下で野生株は孢子形成が誘導され、 $\Delta ecl1/2/3$ 変異体では孢子形成は誘導されなかった。

以上のことから、*S. pombe* の性分化は、窒素源枯渇および炭素源制限だけではなく、鉄および亜鉛の枯渇下でも誘導されること、それに Ecl1 ファミリー遺伝子が重要な役割を果たすことを発見した。

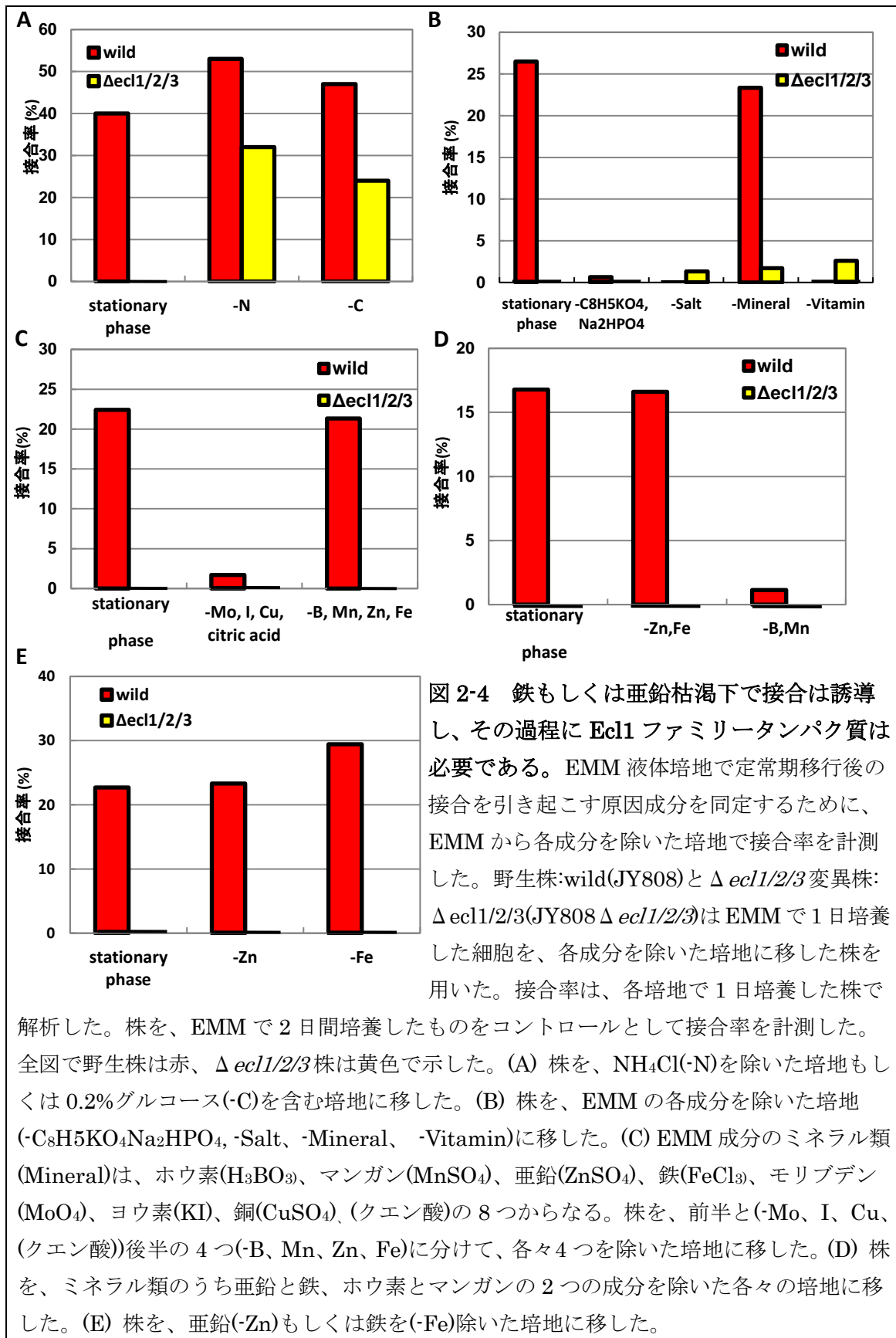
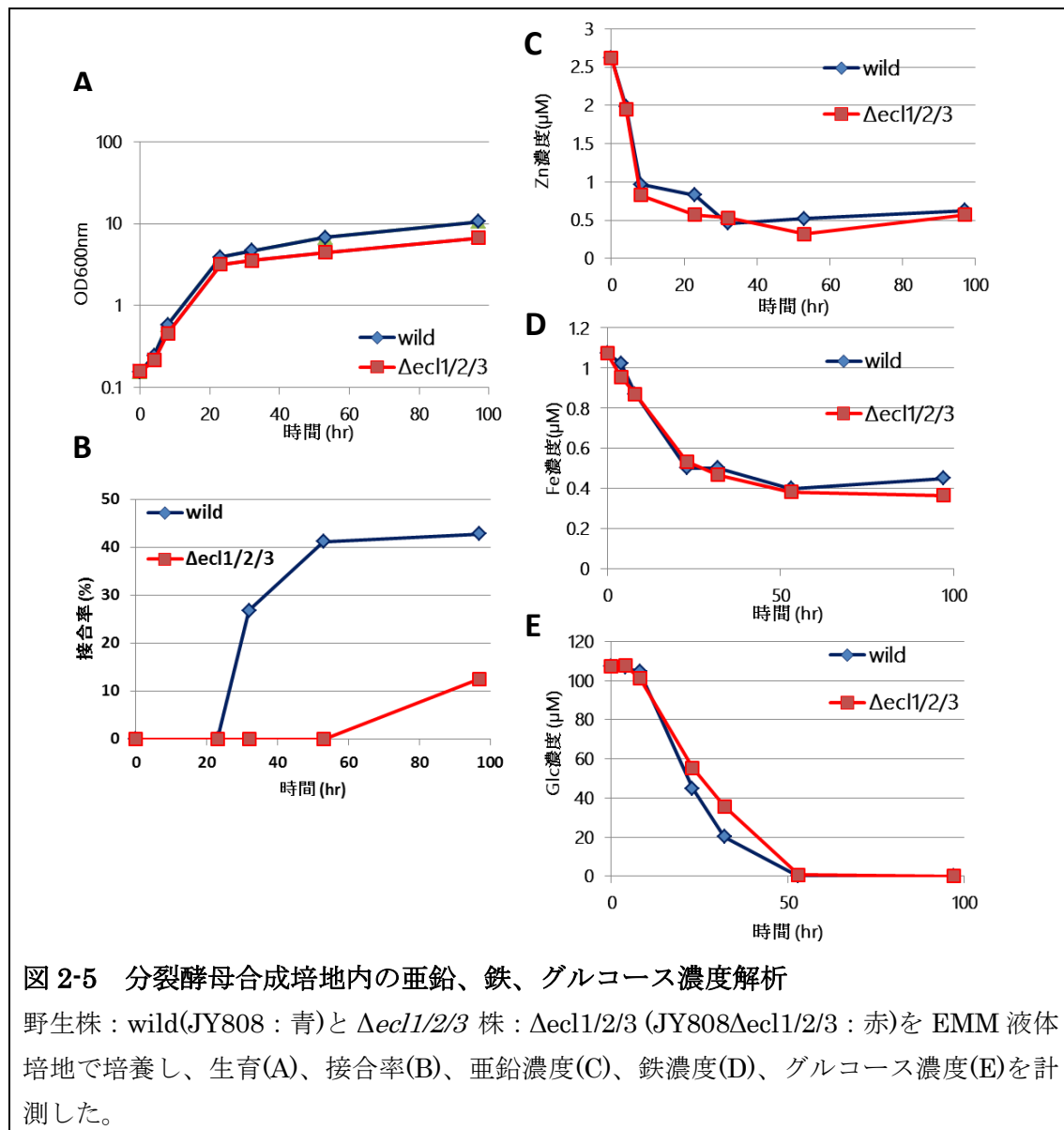


図 2-4 鉄もしくは亜鉛枯渇下で接合は誘導し、その過程に *Ec11* ファミリータンパク質は必要である。EMM 液体培地で定常期移行後の接合を引き起こす原因成分を同定するために、EMM から各成分を除いた培地で接合率を計測した。野生株:wild(JY808)と $\Delta ec11/2/3$ 変異株: $\Delta ec11/2/3$ (JY808 $\Delta ec11/2/3$)は EMM で 1 日培養した細胞を、各成分を除いた培地に移した株を用いた。接合率は、各培地で 1 日培養した株で

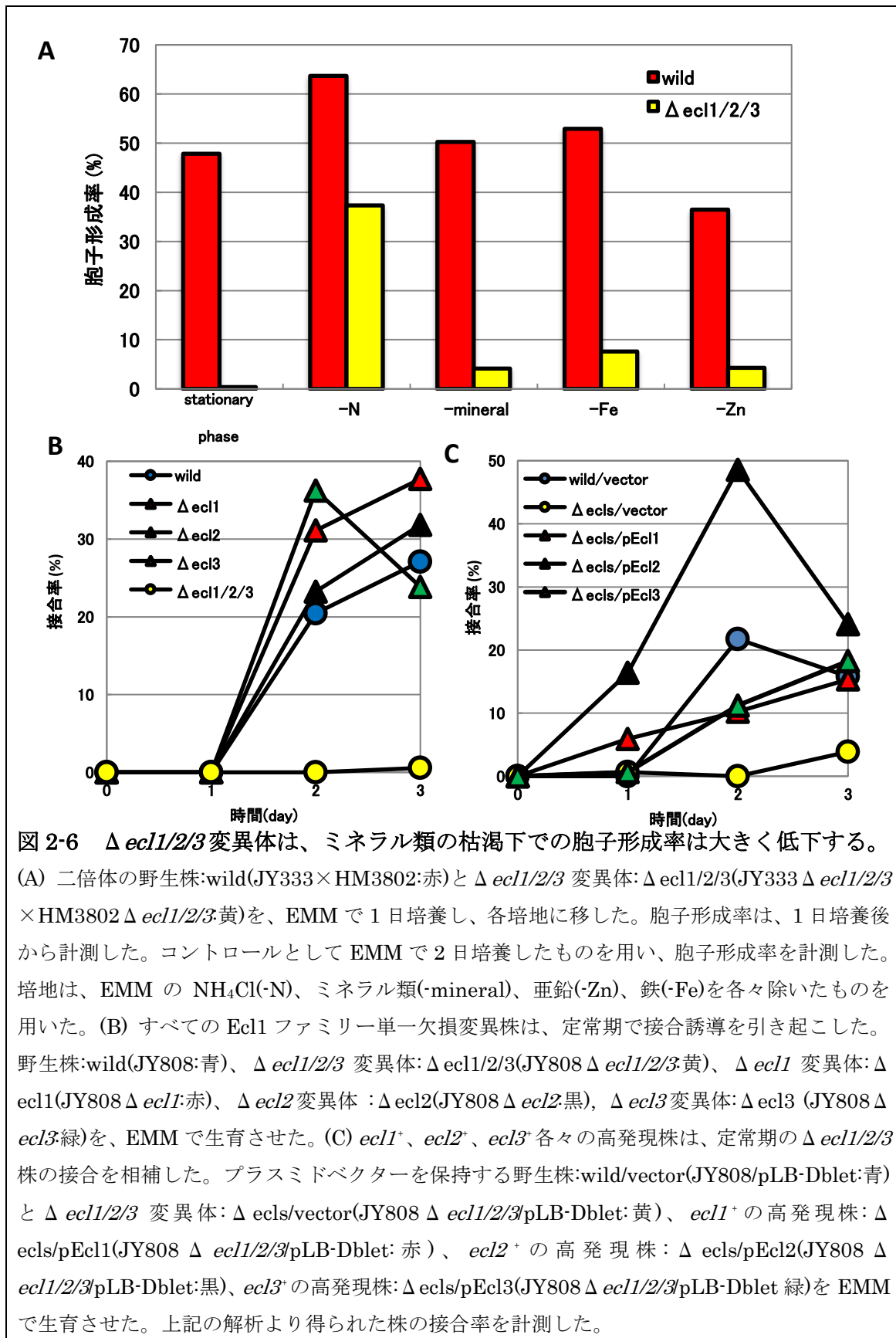
解析した。株を、EMM で 2 日間培養したものをコントロールとして接合率を計測した。全図で野生株は赤、 $\Delta ec11/2/3$ 株は黄色で示した。(A) 株を、 NH_4Cl (-N)を除いた培地もしくは 0.2%グルコース(-C)を含む培地に移した。(B) 株を、EMM の各成分を除いた培地(- $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4\text{Na}_2\text{HPO}_4$, -Salt, -Mineral, -Vitamin)に移した。(C) EMM 成分のミネラル類(Mineral)は、ホウ素(H_3BO_3)、マンガン(MnSO_4)、亜鉛(ZnSO_4)、鉄(FeCl_3)、モリブデン(MoO_4)、ヨウ素(KI)、銅(CuSO_4)、(クエン酸)の 8 つからなる。株を、前半と(-Mo, I, Cu, (クエン酸))後半の 4 つ(-B, Mn, Zn, Fe)に分けて、各々 4 つを除いた培地に移した。(D) 株を、ミネラル類のうち亜鉛と鉄、ホウ素とマンガンの 2 つの成分を除いた各々の培地に移した。(E) 株を、亜鉛(-Zn)もしくは鉄を(-Fe)除いた培地に移した。

加えて、私たちは、分裂酵母合成培地 EMM の生育過程において、細胞外の亜鉛、鉄、グルコースの濃度を計測した。それぞれの濃度は、培養するにしたがって減少していき、野生株と $\Delta ecl1/2/3$ 株ではその減少濃度の差に変化が見られなかった。このデータは、私たちが用いた生育条件下で、亜鉛が鉄やグルコースより急速にその濃度を減少したことを示した(図 2-5)。



5, 各 Ecl1 ファミリー遺伝子は、定常期における性分化に重要である

前述したように、野生株、 $\Delta ecl1/2/3$ 変異体を用いて接合や孢子形成率を測定した。図 2-6:B に示したように、EMM 生育培地で生育したときの *ste11⁺* mRNA 発現は、野生株と比べて、 $\Delta ecl1/2/3$ 変異体、 $\Delta ecl1$ 、 $\Delta ecl2$ 、 $\Delta ecl3$ 各々の単一変異株で減少した。次に、 $\Delta ecl1/2/3$ 変異体、 $\Delta ecl1$ 、 $\Delta ecl2$ 、 $\Delta ecl3$ 単一変異体において定常期の接合率が大きく低下するかを調べるために、定常期での接合率を計測した。結果としては、 $\Delta ecl1/2/3$ 変異体のみ接合率が大きく低下し、 $\Delta ecl1$ 、 $\Delta ecl2$ あるいは $\Delta ecl3$ 単一変異体では野生株と同様に接合誘導が引き起こされた(図 2-6:B)。単一変異株における接合測定を行った次に、各々 Ecl1 ファミリー遺伝子のうち 2 つの発現が行われない条件下の接合率測定も行おうと考えた。そのために、pEcl1、pEcl2、pEcl3 (*ecl1⁺*、*ecl2⁺*、*ecl3⁺* 遺伝子を各々クローン化したプラスミド) が、 $\Delta ecl1/2/3$ 変異体での接合率欠損を相補するかどうかを調べた。結果は、コントロールのプラスミドベクターと比べて、 $\Delta ecl1/2/3$ 変異体の接合率の大きな低下を、pEcl1、pEcl2、pEcl3 で各々度合いは異なるが相補したことが観察できた(図 2-6:C)。これらの結果は、各 Ecl1 ファミリー遺伝子が性分化の上昇に必要であることと、3 つの遺伝子が類似した機能をもつことを示唆した。しかしながら、*ste11⁺* mRNA の発現が、 $\Delta ecl1/2/3$ 変異体と類似して Δecl 単一変異体でも減少するにもかかわらず(図 2-1:A)、接合の表現型は著しく異なった。この観察は、Ecl1 ファミリー遺伝子が *ste11⁺* mRNA 発現誘導に加え、代表的な 4 つの性分化経路以外に関わるかもしれないと考えさせた[Ohtsuka H. *et al.* 2012]。



6, EDTA の添加は、性分化誘導を引き起こす

EDTA は金属キレート剤として機能し、EMM 液体培地への EDTA の添加は、分裂酵母における様々な細胞応答を誘導できる[Dainty SJ. *et al.* 2008]。前述したように、窒素源枯渇および炭素源制限下で培養したときと同様に、微量金属類の枯渇下でも性分化は誘導された。次に、接合誘導において、EMM に EDTA を添加したときの効果を観察しようとした。そのために、私たちは EMM+60 μ M EDTA 培地に野生株、 $\Delta ecl1/2/3$ 株を移し、接合率を測定した。野生株の接合率は、EMM+60 μ M EDTA に移したときに上昇した(図 2-7:A)。それに比べて $\Delta ecl1/2/3$ 株は上記の条件下で接合率の上昇が見られなかった。私は EDTA を添加することで、金属枯渇条件を培地中に作ることができると考えている。加えて、EDTA 含有培地に鉄もしくは亜鉛を各々添加した結果、それぞれの接合率が大いに低下した。

前述したように、野生株に比べて $\Delta ecl1/2/3$ 株においてミネラル類の枯渇下での性分化は誘導されない。それゆえ、Ecl1 ファミリー遺伝子がミネラル類の恒常性やミネラル類の応答に関与するかもしれないと考えた。そこで EDTA 含有培地上で $\Delta ecl1/2/3$ 株の生育能を解析した。その結果、三重欠損株は野生株より生育能が低いこと(EDTA 感受性を示すこと)がわかった(図 2-7:B)。この結果は、Ecl1 ファミリー遺伝子が、微量金属類の恒常性もしくは微量金属類応答に関与することを強く示唆した。

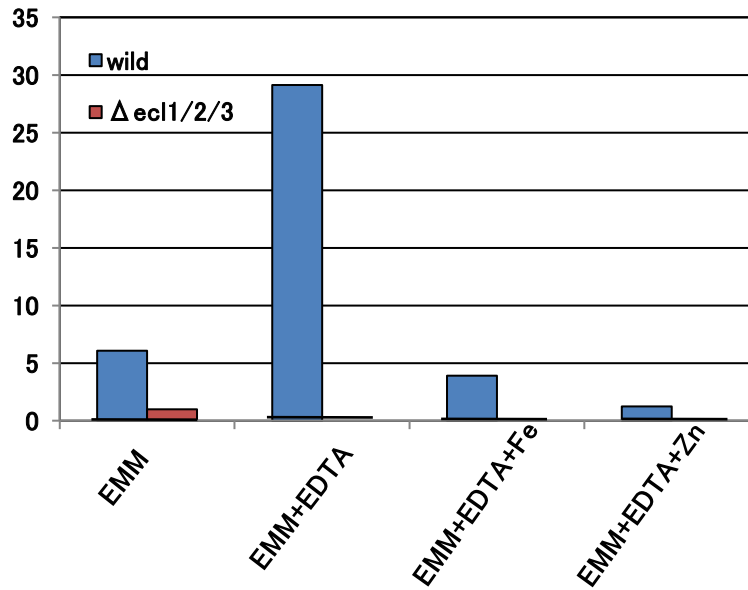
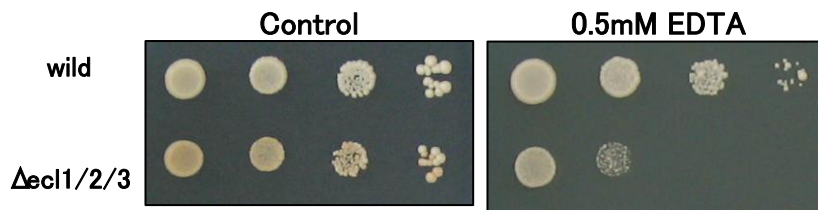
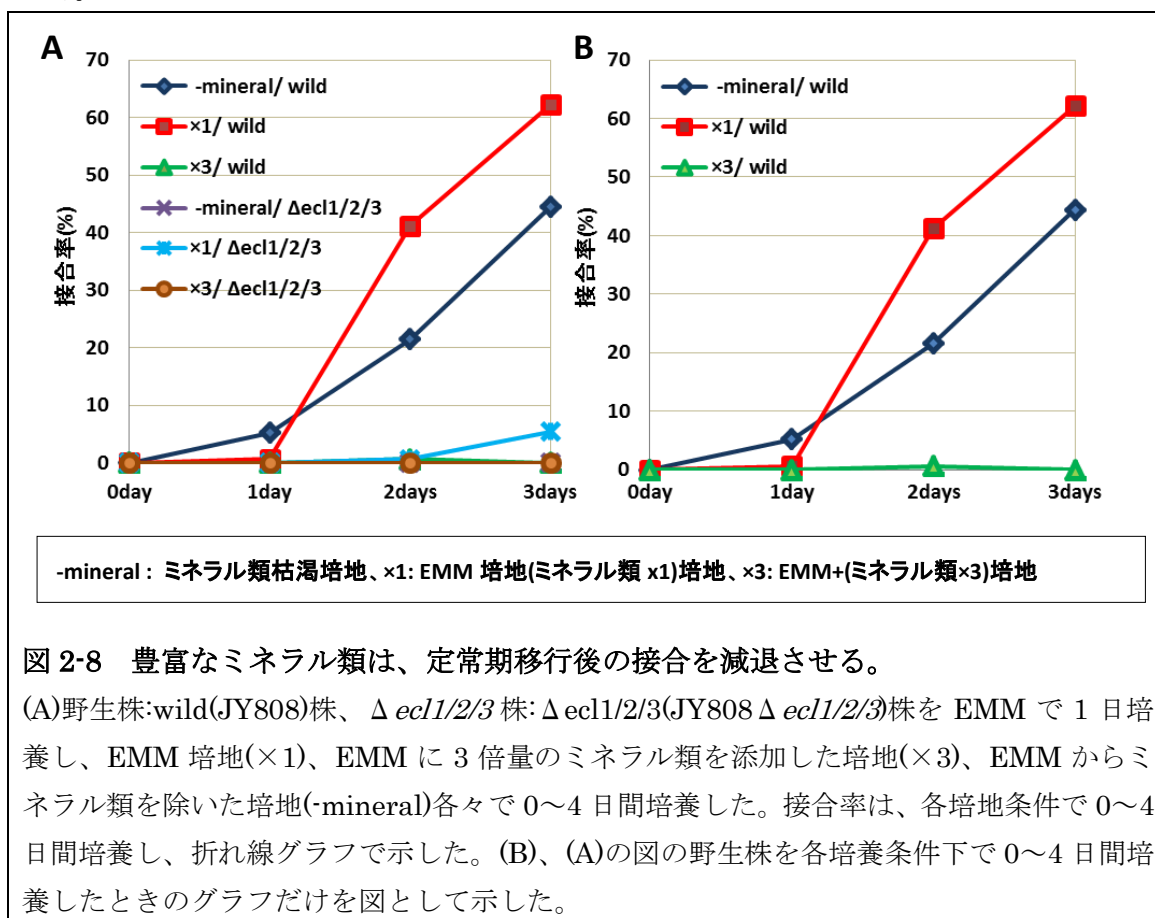
A**B**

図 2-7 $\Delta ecl1/2/3$ 変異体は、EDTA に感受性を示す。

(A) EMM 培地への EDTA の添加は接合誘導を起こす。野生株:wild(JY808:青)と $\Delta ecl1/2/3$ 変異株: $\Delta ecl1/2/3$ (JY808 $\Delta ecl1/2/3$:赤)を EMM 液体培地で 1 日培養し、EMM、EMM+60 μ M EDTA、EMM+60 μ M EDTA+Fe、EMM+60 μ M EDTA+Zn 液体培地に各々移した。接合率は 2 日間培養後、測定した。(B) 野生株:wild(JY808)と $\Delta ecl1/2/3$ 株: $\Delta ecl1/2/3$ (JY808 $\Delta ecl1/2/3$)は YE 培地で 1 日培養した。一連の希釈は 10 倍おきに希釈し、各懸濁液を YE(コントロール)、YE+0.5mM EDTA 寒天培地にスポットした。株を寒天培地上で 30 $^{\circ}$ C、4 日間培養した。

7, 豊富なミネラルは、定常期移行後の接合を抑制する

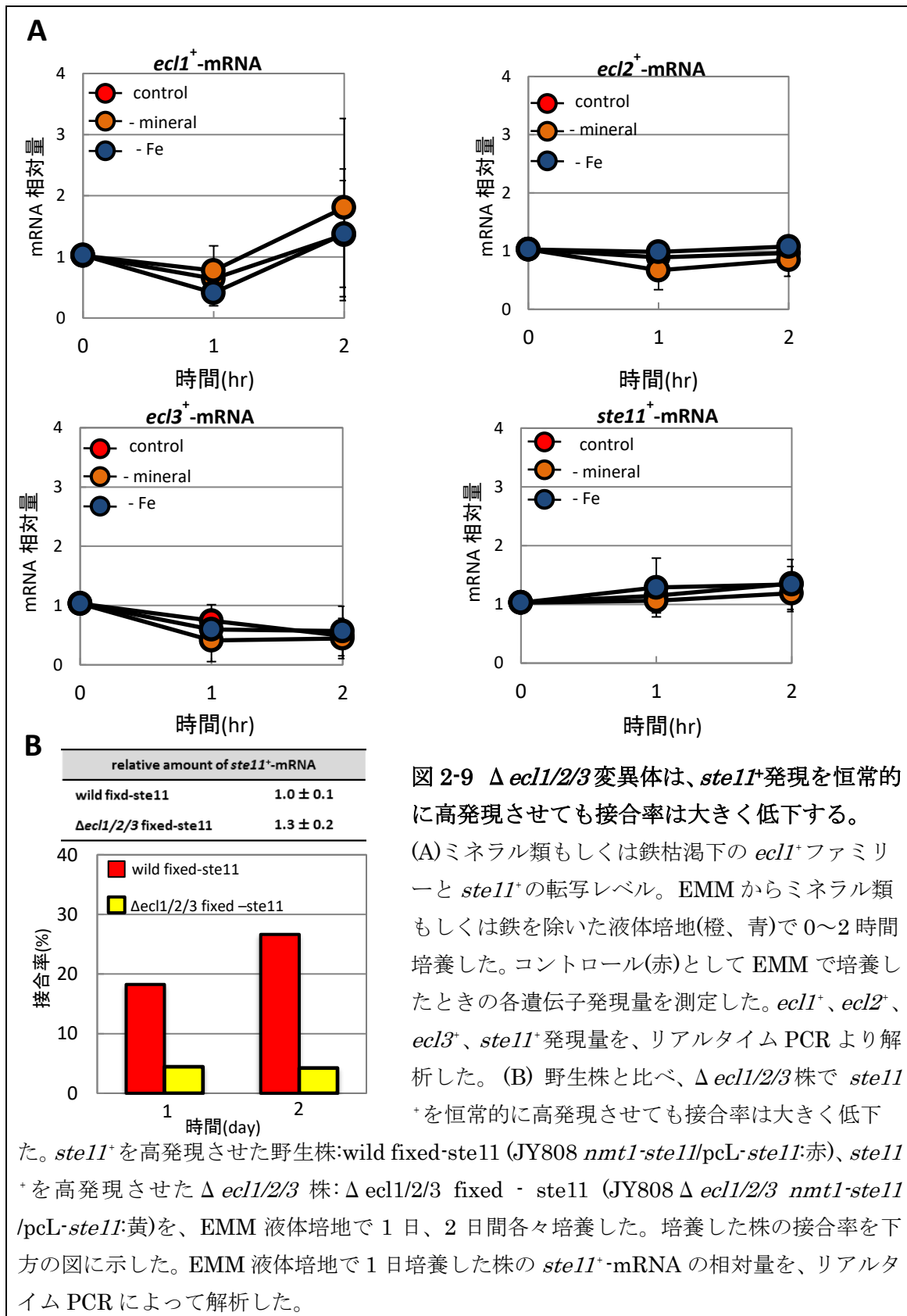
これまでは、分裂酵母の性分化は、定常期移行後の EMM 培地やミネラル類の枯渇培地で誘導されること、その過程は *Ecl1* ファミリー遺伝子依存的に行われていることを示した。これらの発見から、ミネラル類の枯渇が性分化誘導の主要な原因シグナルであると考えている。したがって、性分化誘導はミネラル類を過剰に添加すると性分化誘導は減退すべきである。この考えを確認するために、多様な濃度のミネラル類の添加培地で細胞の接合率を解析した。予測したように、野生株の接合率は、ミネラル類の枯渇下 (-mineral) と比べて豊富なミネラル類を加える (×3) と接合誘導がおこらなかった (図 2-8)。



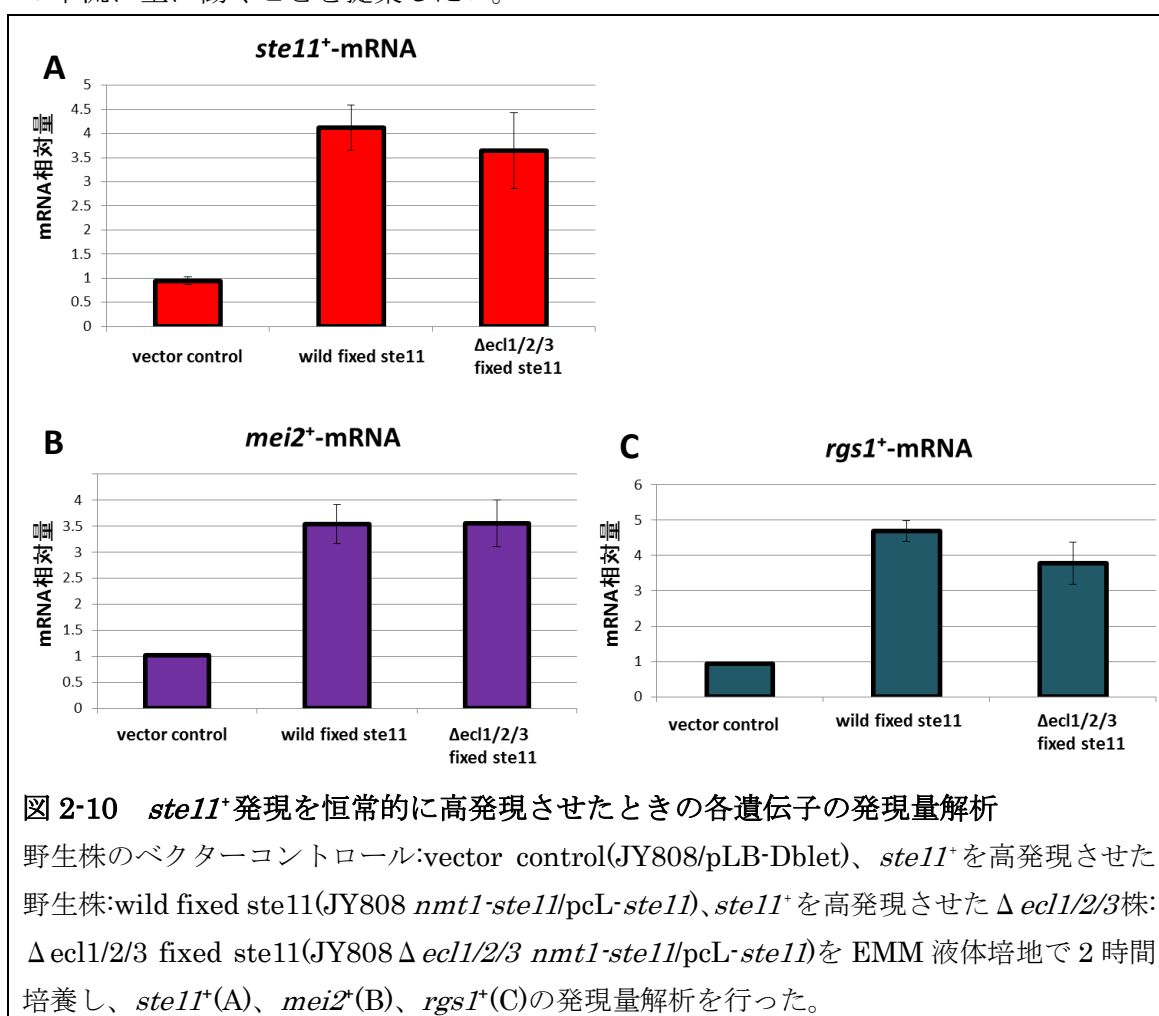
8, 恒常的に *ste11*⁺発現量を上げても、 $\Delta ecl1/2/3$ 変異体の接合欠損は回復しない

Ecl1 ファミリー遺伝子の高発現は、*ste11*⁺ mRNA 発現を誘導する [Ohtsuka H. *et al.* 2012]。1, で説明したように、野生株と比べて $\Delta ecl1/2/3$ 変異体において窒素源枯渇下でも、EMM 培地で定常期移行後まで培養した際でも *ste11*⁺ mRNA レベルが減少した。しかし、 $\Delta ecl1/2/3$ 変異体における接合率と孢子形成率の双方は、定常期移行後の EMM 培地では誘導されなかったが、窒素源枯渇下では誘導した(図 2-1、2-2、2-3、2-4)。つまり、*ste11*⁺ mRNA 発現レベルと性分化の表現型の間では、はっきりした関係性が認められなかった。このことは、Ecl1 ファミリー遺伝子が関与するまだ知らない性分化過程があるのではないかと考えさせた。

この問題に取り組むにあたって、私はミネラル類の枯渇下での Ecl1 ファミリー遺伝子と *ste11*⁺発現量を解析した。野生株を、すべてのミネラル類を除いた EMM もしくは鉄枯渇培地に移し、Ecl1 ファミリー遺伝子と *ste11*⁺の発現量をリアルタイム PCR によって解析した。その結果、*ecl1*⁺、*ecl2*⁺、*ecl3*⁺遺伝子も *ste11*⁺も、EMM からミネラル類もしくは鉄を除いた培地で 2 時間培養してもコントロール(EMM 培地)より大きく発現は誘導されなかった(図 2-9:A)。このことは、ミネラル類の枯渇が *ste11*⁺ mRNA 発現を誘導しないにも関わらず、Ecl1 ファミリー遺伝子依存的に性分化が誘導されると考えさせた。私は 1 つの可能性として、Ecl1 ファミリー遺伝子は、性分化で *ste11*⁺発現の下流に働くかもしれないと考えている。もしそうなら、どのように *ste11*⁺の高発現は $\Delta ecl1/2/3$ 変異株において性分化に影響を与えるのだろうか。この疑問を解決するために、私たちは恒常的に *ste11*⁺発現を上昇させた株を作製した。初めに、ホモタリック株 JY808 *nmt1-ste11* ならびに JY808 $\Delta ecl1/2/3$ *nmt1-ste11* 株を構築した。これらの株で、*ste11*⁺は染色体上の *P41-nmt1* プロモーターから恒常的に発現した。次に、これらの株に *ste11*⁺をクローン化した多コピープラスミド *pcL-ste11*⁺を形質転換した。*pcL-ste11*⁺は、*ste11*⁺を高発現するために SV40 early プロモーター制御下にある [Shimada M. *et al.* 2008]。これらの株を用いて、定常期移行後の接合率を測定した。*ste11*⁺を高発現させた $\Delta ecl1/2/3$ 株は、野生株と比べて著しく接合率を低下させた。各株の結果を比較するに当たり重要なのは、両株において同じように *ste11*⁺ mRNA が高発現していることを確認することである。この点についてはリアルタイム PCR により、各株で *ste11*⁺ mRNA 発現量に差がないことを確認した(図 2-9:B)。



加えて、JY808 *nmt1-ste11* ならびに *ste11*⁺ が恒常的に高発現しているときに、Ste11 から直接制御を受ける *mei2*⁺ や *rgs1*⁺ 遺伝子発現量の解析を行った。その結果、野生株、 $\Delta ecl1/2/3$ 株の双方で同程度に発現量が上昇していることから、これらの株の Ste11 タンパク質は高発現しており、かつ高発現したタンパク質は野生株と同様に機能していることが証明できた(図 2-10)。加えて、EMM で定常期移行後の $\Delta ecl1/2/3$ 株の *ste11*⁺ 高発現株は、*ste11*⁺ を高発現した野生株が接合誘導を引き起こすのに比べて、接合誘導が起こらなかった。この結果は、Ecl1 ファミリー遺伝子が、*ste11*⁺ mRNA が恒常的に高発現しても、定常期移行後の性分化に必要であることを示した。これらの結果を基に、私は Ecl1 ファミリー遺伝子が、微量元素類の枯渇に応答した性分化において、*ste11*⁺ の下流に主に働くことを提案したい。

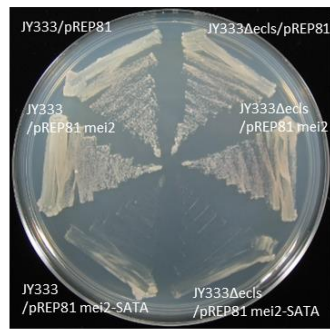


Mei2 タンパク質は性分化誘導のために活性化される必要があり、2カ所のリン酸化部位が脱リン酸化されることにより活性化される[Kitamura K. *et al.* 2001]。このことは、キナーゼ Pat1 のターゲットリン酸化部位 2カ所に変異導入されることで活性化された Mei2 タンパク質の異所的な発現により達成できる[Watanabe *et al.* 1997]。そのため、私たちは pREP81-me₂-SATA を用いて活性化された Mei2 の異所的な発現により引き起こされた表現型を確認した。私は、Mei2-SATA の異所的な発現をした Δ *ec11/2/3* 変異体は、異所的な発現をした野生株と同様に感受性を示すことを確認した(図 2-11)。このことは、性分化過程において、Mei2 タンパク質を強制的に活性化させた Δ *ec11/2/3* 変異体で Mei2 が機能していること、すなわち Mei2 の下流は正常に機能することを示唆した。

2days

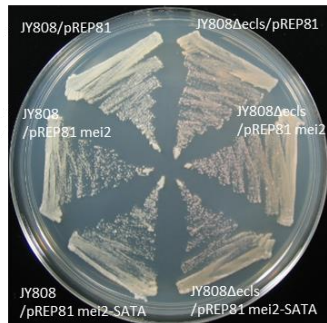


EMMA+5µg/ml Thiamin

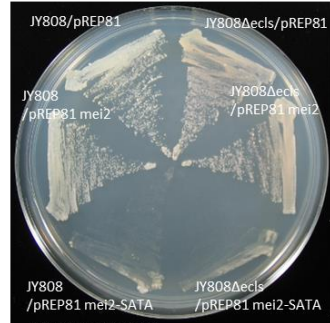


EMMA

2days

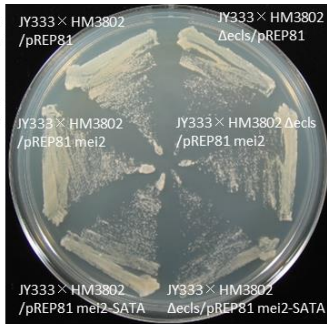


EMMA+5µg/ml Thiamin



EMMA

2days



EMM+5µg/ml Thiamin



EMM

図 2-11 活性化された *Mei2* の恒常的な発現は、*Ecl1* ファミリー遺伝子の存在に無関係に成長阻害を引き起こした 野生株:JY333(JY333)と $\Delta ecl1/2/3$ 株:JY333 $\Delta ecls$ (JY333 $\Delta ecl1/2/3$)に pREP81、pREP81 mei2、pREP81 mei2-SATA プラスミドを各々形質転換した。それぞれの株は、EMM にアデニンもしくはアデニン+チアミン(5 µg/mL)を加えた寒天培地で 30 度で 2 日間培養し、写真を撮った。同様の結果を、ホモタリックな h^{90} 株 (JY808)と二倍体株(JY333 × HM3802)でも観察した。JY333 株とは異なり、 h^{90} 株では EMM 寒天培地にアデニンとロイシンを添加したものを、二倍体株では EMM 寒天培地を用いた。

9, Ecl1 ファミリータンパク質は、亜鉛に応答する遺伝子の適切な制御に必要である

前述したように、Ecl1 ファミリー遺伝子は鉄もしくは亜鉛枯渇下での性分化に必要である。金属センシングにおいて、Ecl1 ファミリータンパク質の関わる機構を明らかにするために、金属濃度により制御される遺伝子発現制御を解析した。

最初に、鉄枯渇下で誘導される鉄応答遺伝子 *frp1⁺*、*php4⁺* の発現解析をリアルタイム PCR で行った [Labbé S. *et al.* 2007]。その結果 $\Delta ecl1/2/3$ 変異株で、これら遺伝子の発現は正常に行われることがわかった (data not shown)。

次に、亜鉛応答遺伝子 *zrt1⁺*、*SPBC1348.06c* を選択して解析を行った。これら遺伝子は、亜鉛枯渇に反応して発現誘導が上昇することがわかっている [Dainty SJ. *et al.* 2008; Boch A. *et al.* 2008]。*zrt1⁺* は、亜鉛トランスポーターをコードする [Dainty SJ. *et al.* 2008]。図 2-12 で示したように、野生株における亜鉛枯渇条件下で、双方の亜鉛応答遺伝子は発現が上昇した [Boch A. *et al.* 2008]。しかしながら、そのような応答は $\Delta ecl1/2/3$ 変異体で減退したため、私は Ecl1 ファミリータンパク質が亜鉛濃度(亜鉛枯渇)のセンシングに関与するのではないかと考えた。

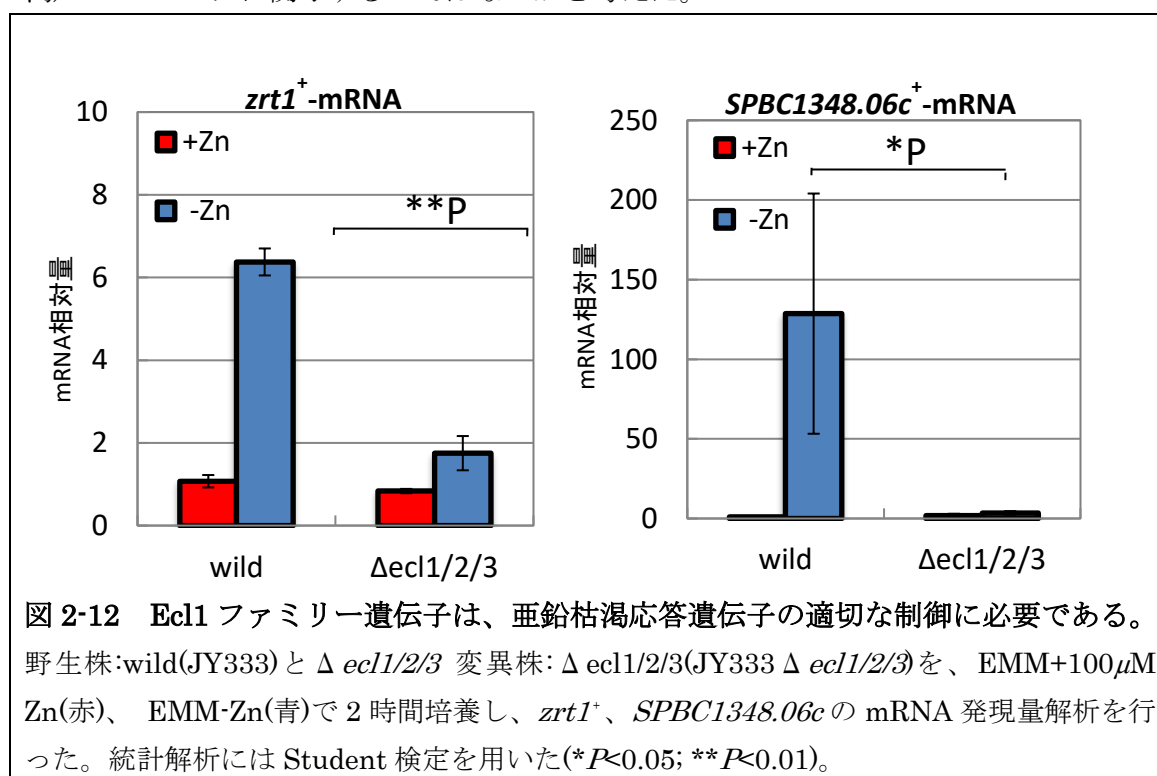


図 2-12 Ecl1 ファミリー遺伝子は、亜鉛枯渇応答遺伝子の適切な制御に必要である。野生株:wild(JY333)と $\Delta ecl1/2/3$ 変異株: $\Delta ecl1/2/3$ (JY333 $\Delta ecl1/2/3$)を、EMM+100 μ M Zn(赤)、EMM-Zn(青)で2時間培養し、*zrt1⁺*、*SPBC1348.06c* の mRNA 発現量解析を行った。統計解析には Student 検定を用いた(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)。

③ 考察

本研究より、分裂酵母 *S. pombe* においてミネラル類（鉄や亜鉛）枯渇下で性分化が誘導されることを見つけた。現在、分裂酵母の性分化には cAMP-PKA 経路、TOR 経路、Spk1-MAP キナーゼ経路、Sty1 ストレス応答 MAP キナーゼ経路の 4 つの経路が知られている [Yamamoto M. 2010]。

野生株では、窒素源枯渇もしくは炭素源制限下にさらすと、性分化誘導が引き起こされる。Δ*ec11/2/3* 株でも野生株と同様に、窒素源枯渇もしくは炭素源制限下にさらすと性分化誘導が引き起こされた。ミネラル類の枯渇下では、野生株では性分化誘導が引き起こされたが、Δ*ec11/2/3* 株では性分化誘導が見られなかった(図 2-4)。そのため、Ecl1 ファミリー遺伝子が関与する性分化は、少なくとも炭素源制限下や窒素源枯渇下のシグナル経路とは異なる経路であろうと考えた。

性分化過程は、マスター転写因子である Ste11 によって制御を受けている。それ自身の転写制御も行う Ste11 は、翻訳後修飾、細胞内局在など多様なステップで制御される。Ste11 タンパク質は、*mei2*⁺ や *rgs1*⁺ など性分化誘導に関わる因子を直接制御する [Kjaeruff S. *et al.* 2005; Kunitomo H. *et al.* 2000; Okazaki N. *et al.* 1998; Kim L. *et al.* 2012; Mata J. and Bähler J. 2006; Sukegawa H. *et al.* 2011; Valbuena N. and Moreno S. 2010]。 *mei2*⁺ や *rgs1*⁺ は性分化過程において接合誘導にも関わるということがわかっている [Sugimoto A. *et al.* 1991; Pereira PS. And Jones NC. 2001]。

分裂酵母最少培地 EMM 中で野生株に *ste11*⁺ を恒常的に高発現すると、接合率の上昇が見られた。しかしながら、*ste11*⁺ を恒常的に高発現させた Δ*ec11/2/3* 株では、同条件下の野生株より明らかに接合率が低かった(図 2-9)。*ste11*⁺ を恒常的に高発現させた野生株、Δ*ec11/2/3* 株で、その下流にある *mei2*⁺ や *rgs1*⁺ の発現量解析を行った。その結果、*mei2*⁺、*rgs1*⁺ の発現量が野生株、Δ*ec11/2/3* 株で等しく発現した。よって、上記の *ste11*⁺ 高発現株における Ste11 タンパク質は、Δ*ec11/2/3* 株でも機能していると言える。これらの結果から、Ecl1 ファミリー遺伝子が、鉄や亜鉛の枯渇に应答した性分化において、*ste11*⁺ 発現より下流に働く可能性が高いことがわかった(図 2-13)。

Mei2 は、Pat1 によりリン酸化される部位を 2 カ所もつ。これら 2 カ所の部位が脱リン酸化されると Mei2 は活性化される。野生株においては、Mei2 が活性化されると生育遅延ならびに性分化誘導が引き起こされる [Kitamura K. *et al.* 2001; Watanabe *et al.* 1997]。私は次に、この Mei2 を恒常的に活性化させた Mei2-SATA を用いた研究を行った。その結果、Δ*ec11/2/3* 株で Mei2-SATA タンパク質を高発現すると、野生株で Mei2-SATA タンパク質を高発現した株と同程度に致死を示した。それゆえ、Mei2 活性化の下流の性分化過程は、野生株と同様に正常に行われたと考えられる(図 2-9、2-10、2-11)。すなわち、これらの結果は、Ecl1 ファミリー遺伝子が金属(亜鉛)利用能や性分化と協調して Mei2 の活性化過程(リン酸化など)に機能することを示唆するのかもしれない。もしくはまだ知られていない経路に Ecl1 ファミリー遺伝子が機能するかもしれ

ないと考えさせた。

Ecl1 ファミリー遺伝子は、*ste11*⁺誘導に関わる。なぜなら、Ecl1 ファミリー遺伝子の高発現は、*ste11*⁺転写を増加させ、Ecl1 ファミリー遺伝子すべてを欠損すると *ste11*⁺発現は減少するからである [Ohtsuka H. *et al* 2012] (図 2-1、2-13)。その上、Ecl1 ファミリー遺伝子は性分化の様々な側面で機能する。しかしながら、私たちは未だ性分化のメカニズムを十分に理解していない。Ecl1 ファミリー遺伝子依存的な性分化のさらなる性質決定は、性分化を行う複雑なメカニズムを理解するヒントを与えてくれるはずである。

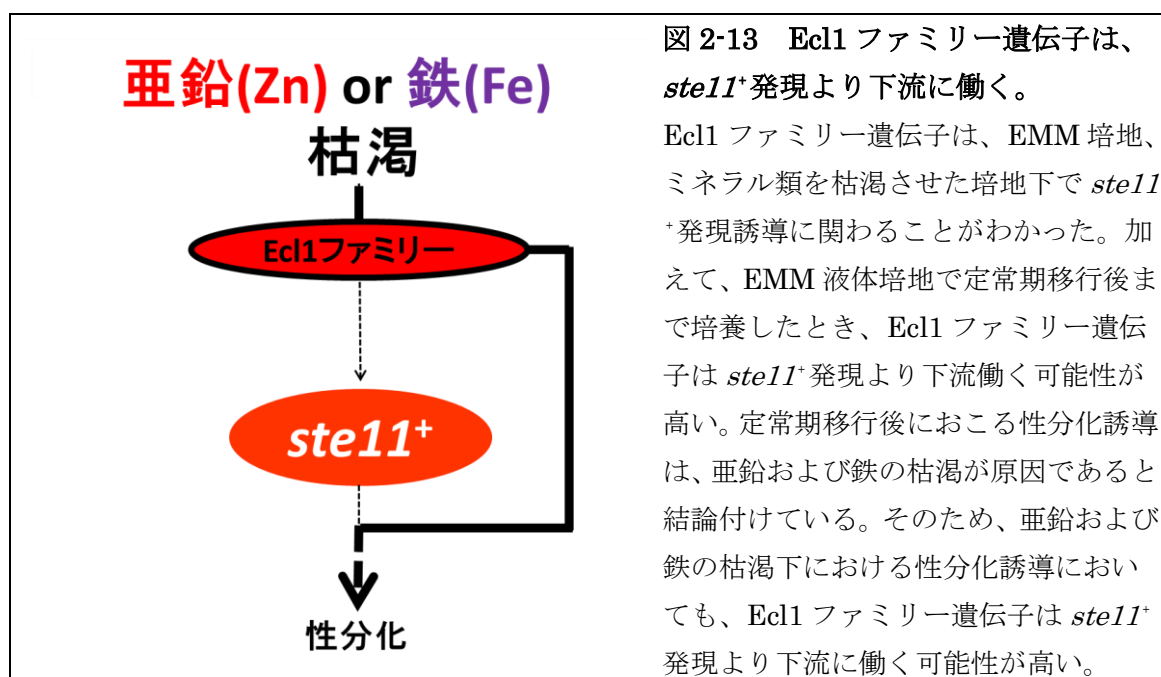


図 2-13 Ecl1 ファミリー遺伝子は、*ste11*⁺発現より下流に働く。

Ecl1 ファミリー遺伝子は、EMM 培地、ミネラル類を枯渴させた培地下で *ste11*⁺発現誘導に関わることがわかった。加えて、EMM 液体培地で定常期移行後まで培養したとき、Ecl1 ファミリー遺伝子は *ste11*⁺発現より下流働く可能性が高い。定常期移行後におこる性分化誘導は、亜鉛および鉄の枯渴が原因であると結論付けている。そのため、亜鉛および鉄の枯渴下における性分化誘導においても、Ecl1 ファミリー遺伝子は *ste11*⁺発現より下流に働く可能性が高い。

当初、*ecl1*⁺、*ecl2*⁺、*ecl3*⁺は、高発現により経時寿命を延長する因子として同定された [Ohtsuka H. *et al.* 2008; Ohtsuka H. *et al.* 2009]。しかし、根底となる分子メカニズムは不明瞭なままである。この研究を通して、私は分裂酵母の新規な生理的な役割であるミネラル類の枯渴に依存した性分化過程を発見した。出芽酵母 Ecl1 ファミリー遺伝子 *ECL1* は、鉄枯渴への応答に関与すると思われる鉄恒常性転写因子 *Aft2* によって誘導される [Azuma K. *et al.* 2009]。Ecl1 ファミリー遺伝子とミネラル類の関連性を明らかにするためにミネラル類もしくは鉄枯渴下での各 Ecl1 ファミリー遺伝子の発現解析を行った。しかしながら、ミネラル類や鉄を枯渴させることによる著しい Ecl1 ファミリー遺伝子の発現量の差は見られなかった。

一方、亜鉛枯渴下における亜鉛応答遺伝子 *zrt1*⁺、*SPBC1348.06c* の発現は、野生株と比較すると $\Delta ecl1/2/3$ 変異株で大きく損なわれた。このことは Ecl1 ファミリータンパク質が亜鉛応答に重要であり、また亜鉛センサーとして機能する可能性を示している。

Ecl1 ファミリー遺伝子はそれぞれ4つのシステイン残基を保持している[Ohtsuka H. *et al.* 2009]。これらの残基によって構成されるドメインは、亜鉛濃度のセンシングにも関与する可能性をもつ。*Ecl1* ファミリータンパク質が亜鉛に結合すること、ならびにシステイン残基がこの亜鉛結合に重要なことがわかっている。今後システイン残基が *Ecl1* ファミリータンパク質の機能、特に亜鉛の濃度感知においてどのような役割を果たすのかを解析する必要がある[Shimasaki T. *et al.* in press]。亜鉛枯渇応答遺伝子と比べて、鉄枯渇下の $\Delta ecl1/2/3$ 変異体で、鉄枯渇応答遺伝子は正常に鉄枯渇に応答した。現在、この鉄枯渇下の現象の理由を解明できておらず、将来的に取り組む必要があると考えている。

EMM 液体培地で定常期まで培養した $\Delta ecl1/2/3$ 変異体は、野生株と比べて接合や孢子形成などの性分化誘導が起こらなかった。この結果から、ミネラル類(鉄および亜鉛)の枯渇が性分化を誘導する一つのシグナルであることを導き出した。これまでは、窒素源もしくは炭素源制限下が主要な性分化誘導をするシグナルだった。本研究成果を基に、EMM への金属キレート剤 EDTA の添加も性分化誘導の一つの方法として示したい。この方法は簡単であり、金属キレート剤である EDTA の添加は、ミネラル類の枯渇条件を作り出すのに役立つ。加えて、EDTA 添加による接合誘導は、過剰な鉄もしくは亜鉛の添加により大きく損なわれた(図 2-7)。よって、EDTA の添加による接合誘導は、亜鉛や鉄の枯渇が原因と考えられた。

Ecl1 ファミリー遺伝子が定常期移行後の性分化に必要であるため、EMM 液体培地の回分培養下でのミネラル類の枯渇は、炭素源や窒素源より早く引き起こされたと考えた。加えて、過剰なミネラル類の添加が、野生株における接合誘導を大いに低下させた。私たちは、EMM 液体での継続的な培養下で亜鉛、鉄、炭素源の濃度を測定したが、亜鉛の細胞外濃度が炭素源や鉄より素早く減少した(図 2-5)。これらの結果を基に考えると、私たちは定常期移行後に起こる。性分化誘導は亜鉛の枯渇が主要なシグナルであることを提唱できる。しかし、生育に伴って多様な要素が並行して増減するため、この過程に他の要素が関わる可能性を否定することは難しい。

当研究室では、*Ecl1* ファミリー遺伝子が経時寿命の延長、 H_2O_2 耐性、性分化誘導の表現型をもつことを明らかにした[Ohtsuka H. *et al.* 2012]。加えて、亜鉛および鉄枯渇下で性分化誘導が起こること、それに *Ecl1* ファミリー遺伝子が重要であることを明らかにした。しかしながら、亜鉛および鉄枯渇下における性分化誘導の分子メカニズムは不明瞭なままである。ただ、私たちの発見が分裂酵母の性分化誘導における新たな側面を見出すきっかけになると確信している。*Ecl1* ファミリー遺伝子によって与えられた興味深い表現型と *S. pombe* の経時寿命における亜鉛および鉄の効果の特性との関連性は、現在解明中である。このような解析は、分裂酵母の生理学的な理解に貢献すると考えている。

④実験材料と実験方法

○使用した菌株と培地

菌株名	遺伝子型
JY333	<i>h leu1-32 ade6-M216</i>
HM3802	<i>h⁺ leu1-32 ade6-M210</i>
JY808	<i>h⁹⁰ leu1-32 ade6-M210</i>
JY333 $\Delta ecl1$	<i>h leu1-32 ade6-M216 ecl1:: kan^r</i>
JY333 $\Delta ecl2$	<i>h leu1-32 ade6-M216 ecl2:: kan^r</i>
JY333 $\Delta ecl3$	<i>h leu1-32 ade6-M216 ecl3:: kan^r</i>
JY808 $\Delta ecl1$	<i>h⁹⁰ leu1-32 ade6-M216 ecl1:: kan^r</i>
JY808 $\Delta ecl2$	<i>h⁹⁰ leu1-32 ade6-M216 ecl2:: kan^r</i>
JY808 $\Delta ecl3$	<i>h⁹⁰ leu1-32 ade6-M216 ecl3:: kan^r</i>
JY333 $\Delta ecl1/2/3$	<i>h leu1-32 ade6-M216 ecl1:: kan^r ecl2:: kan^r ecl3:: kan^r</i>
JY808 $\Delta ecl1/2/3$	<i>h⁹⁰ leu1-32 ade6-M216 ecl1:: kan^r ecl2:: kan^r ecl3:: kan^r</i>
HM3802 $\Delta ecl1/2/3$	<i>h⁺ leu1-32 ade6-M210 ecl1:: kan^r ecl2:: kan^r ecl3:: kan^r</i>
HM2310	<i>h leu1-32 ste11:: kan^r-p41-nmt1-ste11⁺</i>
JY333 <i>nmt1-ste11</i>	<i>h leu1-32 ade6-M216 ste11:: kan^r-p41-nmt1-ste11⁺</i>
JY808 <i>nmt1-ste11</i>	<i>h⁹⁰ leu1-32 ade6-M216 ste11:: kan^r-p41-nmt1-ste11⁺</i>
JY808 $\Delta ecl1/2/3$ <i>nmt1-ste11</i>	<i>h⁹⁰ leu1-32 ade6-M216 ecl1:: kan^r ecl2:: kan^r ecl3:: kan^r ste11:: kan^r-p41-nmt1-ste11⁺</i>

株は、YE 培地(0.5% yeast extract, 3% glucose)もしくは EMM 培地(0.3% Potassium Hydrogen Phthalate, 0.22% NaH₂HPO₄, 2% glucose, 0.5% NH₄Cl₂, 21.32mg/l MgCl₂·6H₂O, 0.294mg/l CaCl₂·2H₂O, 20mg/l KCl, 0.8mg/l Na₂SO₄, 1.0mg/l Pantothenic acid, 10mg/l Nicotinic acid, 10ug/l myo-inositol, 10mg/l Biotin, 5 g/l H₃BO₃, 4 g/l MnSO₄, 4 g/l ZnSO₄, 2 g/l FeCl₃, 1.6 g/l MoO₄, 1 g/l KI, 0.4 g/l CuSO₄, 10 g/l クエン酸)で培養された[Moreno S. *et al.* 1991]。ロイシンとアデニンは各々 60 mg/l、40 mg/l 添加した。

○プラスミド構成

プラスミド pEcl1 は *ecl1*⁺高発現のために用いた[Ohtsuka H. *et al.* 2008]。pEcl2, pEcl3 は、各々 *ecl2*⁺、*ecl3*⁺を高発現させるために利用した[Ohtsuka H. *et al.* 2009]。プラスミド pcL-*ste11*⁺は、SV40 early プロモーターの制御下での *ste11*⁺を恒常的に高発現するために用いた[Shimada M. *et al.* 2008]。

○*ecl1*、*ecl2*、*ecl3*欠損変異体の構築

Ecl1、Ecl2、Ecl3 タンパク質の ORF(open reading frame)を、*ecl1*⁺、*ecl2*⁺、*ecl3*⁺を個々にもしくは組み合わせて破壊し、kan^R カセットに置き換えた(JY333Δ*ecl1*、JY333Δ*ecl2*、JY333Δ*ecl3*、JY333Δ*ecl1*Δ*ecl2*Δ*ecl3* 変異体)[Ohtsuka H. *et al.* 2011]。これらの株を用いて、各 *h*⁹⁰ 株と二倍体株を作製した。

○接合率・孢子形成率の測定

すべてのデータは 300 以上の酵母細胞を数えることで計測した。すべての実験は 2 回以上行った。

「接合率」- 接合していない一倍体細胞を H、接合体を Z、子嚢胞子を A、胞子を S とし、接合率 F_m を以下の式で求めた。

$$F_m = 2Z + 2A + 0.5S / H + 2Z + 2A + 0.5S$$

「孢子形成率」- 二倍体細胞を D、子嚢胞子を A、胞子を S とした場合の接合率 F_s を以下の式で求めた。

$$F_s = A + 0.25S / D + A + 0.25S$$

○ノーザンハイブリダイゼーション法とリアルタイム PCR 解析

ste11⁺や *mei2*⁺のノーザンブロットハイブリダイゼーションは過去の論文で記載された通り行った[Ohtsuka H. *et al.* 2008]。亜鉛応答遺伝子[*zrt1*⁺と SPBC1348.06c; Dainty SJ. *et al.* 2008; Boch A. *et al.* 2008]の発現は次のように解析した。EMM 液体培地から亜鉛を枯渇させた培地(EMM-Zn)で各細胞菌株を 13 時間培養し、EMM-Zn 培地もしくは EMM 液体培地に 100μM ZnSO₄を加えた液体培地に移した。2 時間培養後、過去の論文で記載されたように RNeasy Mini Kit(QIAGEN)を用いて全体の RNA 量を

準備した[Ohtsuka H. *et al.* 2013]。遺伝子発現は、AGCTCTGCTACTGTGACTTG と CGTTGGGTCTGTTTTTGGTG (for *zrt1⁺*)、TGATGCATGGGCGTATACAG と ATCCGGGAGTACATGTTGCT (for SPBC1348.06c)、CCGCCAGTTATGAAGCTGT と TACCATCGTCGAGAAGAGCT (for *rgs1⁺*)、CTGCTTACCGCCGAAAATA と TCAACATTTGCTTGCAGTTGGAG (for *mei2⁺*)のプライマーを用いてリアルタイムPCR(Eco Illumina)で解析した[Ohtsuka H. *et al.* 2013]。

○亜鉛、鉄、グルコース濃度定量法

培養培地中における亜鉛や鉄の濃度は、提供者(MG Metallogenics)に推奨されたように、それぞれ Zinc Assay Kit や Iron Assay Kit を用いて定量した。グルコース濃度は、過去の論文に記載されたように定量した[Ito H. *et al.* 2010]。

参考文献

- Azuma K, Ohtsuka H, Mita S, Murakami H, Aiba H: "Identification and characterization of an Ecl1-family gene in *Saccharomyces cerevisiae*." Biosci. Biotechnol. Biochem. (Dec. 2009) 73:2787-2789.
- Boch A, Tramczynska A, Simm C, Taudte N, Krämer U, Clemens S: "Loss of Zhf and the tightly regulated zinc-uptake system SpZrt1 in *Schizosaccharomyces pombe* reveals the delicacy of cellular zinc balance." FEMS Yeast Res. (Sep. 2008) 8: 883-896.
- Braut A, Rallis C, Normant V, Garant JM, Bähler J, Labbé S: "Php4 is a key player for iron economy in meiotic and sporulating cells." G3. (Oct. 2016) 6:3077-3095.
- Chen BR, Li Y, Eisenstatt JR, Runge KW: "Identification of a lifespan extending mutation in the *Schizosaccharomyces pombe* cyclin gene *clg1⁺* by direct selection of long-lived mutants." PLoS ONE. (Jul. 2013) 8:e69084
- Chen D, Wilkinson CRM, Watt S, Penkett CJ, Toone WM, Jones N, Bähler J: "Multiple pathways differentially regulate global oxidative stress responses in fission yeast." Mol. Biol. Cell. (Jan. 2008) 19:308-317.
- Dainty SJ, Kennedy CA, Watt S, Bähler J, Whitehall SK: "Response of *Schizosaccharomyces pombe* to zinc deficiency." Eukaryot Cell. (Mar. 2008) 7:454-464
- Fabrizio P, Longo VD: "The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*." Aging Cell. (Apr. 2003) 2:73-81
- Harigaya Y, Yamamoto M: "Molecular mechanisms underlying the mitosis-meiosis decision." Chromosome Res. (Jul. 2007) 15:523-537
- Higuchi T, Watanabe Y, Yamamoto M: "Protein kinase A regulates sexual development and gluconeogenesis through phosphorylation of the Zn finger transcriptional activator Rst2p in fission yeast." Mol. Cell. Biol. (Jan. 2002) 22:1-11

Ito H, Oshiro T, Fujita Y, Kubota S, Naito C, Ohtsuka H, Murakami H, Aiba H: Pma1, a P-type proton ATPase, is a determinant of chronological lifespan in fission yeast. *J Biol Chem* (Nov. 2010)285:34616–34620

Kim L, Hoe KL, Yu YM, Yeon JH, Maeng PJ: “The fission yeast GATA factor, Gaf1, modulates sexual development via direct down-regulation of *ste11*⁺ expression in response to nitrogen starvation.” *PLoS One*. (Aug. 2012) 7:e42409.

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

Kjaerulff S, Lautrup-Larsen I, Truelsen S, Pedersen M, Nielsen O.Kjaeruff: “Constitutive activation of the fission yeast pheromone-responsive pathway induces ectopic meiosis and reveals ste11 as a mitogen-activated protein kinase target.” *Mol. Cell. Biol.* (Mar. 2005) 25:2045-2059

Kunitomo H, Higuchi T, Iino Y, Yamamoto M: “A zinc-finger protein, Rst2p, regulates transcription of the fission yeast *ste11*(+) gene, which encodes a pivotal transcription factor for sexual development.” *Mol Biol Cell.* (Sep. 2000) 11:3205-3217

Labbé S, Pelletier B, Mercier A: “Iron homeostasis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.” *Biometals*. (Jun. 2007) 20:523-537

Longo VD, Fabrizio P: “Regulation of longevity and stress resistance: a molecular strategy conserved from yeast to humans?” *Cell Mol Life Sci.* (Jun. 2002) 59:903-908

Mata J, Bähler J: “Global roles of Ste11p, cell type, and pheromone in the control of gene expression during early sexual differentiation in fission yeast.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (Oct. 2006) 103:15517-15522.

Matsuo T, Otsubo Y, Urano J, Tamanoi F, Yamamoto M: “Loss of the TOR kinase Tor2 mimics nitrogen starvation and activates the sexual development pathway in fission yeast.” *Mol. Cell. Biol.* (Apr. 2007) 27:3154-3164

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

Ohmiya R, Yamada H, Kato C, Aiba H, Mizuno T: "The Prr1 response regulator is essential for transcription of *ste11+* and for sexual development in fission yeast." Mol. Gen. Genet. (Nov. 2000) 264:441-451.

Ohtsuka H, Azuma K, Kubota S, Murakami H, Giga-Hama Y, Tohda H, Aiba H: Chronological lifespan extension by Ecl1 family proteins depends on Prr1 response regulator in fission yeast. Genes Cells. (Jan. 2012) 17:39-52.

Ohtsuka H, Azuma K, Murakami H, Aiba H: "*hsf1+* extends chronological lifespan through Ecl1 family genes in fission yeast." Mol. Genet. Genomics. (Jan. 2011) 285:67-77.

Ohtsuka H, Mita S, Ogawa Y, Azuma K, Ito H, Aiba H: "A novel gene, *ec1(+)*, extends the chronological lifespan in fission yeast." FEMS Yeast Res. (Jun. 2008) 8:520-530

Ohtsuka H, Ogawa S, Kawamura H, Sakai E, Ichinose K, Murakami H, Aiba H: "Screening for long-lived genes identifies Oga1, a guanine-quadruplex associated protein that affects the chronological lifespan of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." Mol Genet Genomics. (Jun. 2013) 288:285-295.

Ohtsuka H, Ogawa Y, Mizuno H, Mita S, Aiba H: "Identification of *ec1* family genes that extend chronological lifespan in fission yeast." Biosci. Biotechnol. Biochem. (Apr. 2009) 73:885-889.

Okazaki N, Okazaki K, Watanabe Y, Kato-Hayashi M, Yamamoto M, Okayama H: "Novel factor highly conserved among eukaryotes controls sexual development in fission yeast." Mol. Cell. Biol. (Feb. 1998) 18:887-895.

Pereira PS, Jones NC: "The RGS domain-containing fission yeast protein, Rgs1p, regulates pheromone signalling and is required for mating." Genes to Cells. (Sep. 2001) 6:789-802

Rutherford JC, Jaron S, Winge DR: “Aft1p and Aft2p mediate iron-responsive gene expression in yeast through related promoter elements.” J. Biol. Chem. (Jul. 2003) 278:27636-27643.

Shimada M, Yamada-Namikawa C, Murakami-Tonami Y, Yoshida T, Nakanishi M, Urano T, Murakami H: “Cdc2p controls the forkhead transcription factor Fkh2p by phosphorylation during sexual differentiation in fission yeast.” EMBO J. (Jan. 2008) 27: 132-142

Shimasaki T, Ohtsuka H, Naito C, Azuma K, Tenno T, Hiroaki H, Hiroshi Murakami H, Aiba H: “Ecl1 is a zinc-binding protein involved in the zinc-limitation-dependent extension of chronological lifespan in fission yeast.” Mol Genet Genomics. (Dec. 2016) in press

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. (Sep. 2005) 10:2276-2288

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

Sukegawa Y, Yamashita A, Yamamoto M: “The fission yeast stress-responsive MAPK pathway promotes meiosis via the phosphorylation of Pol II CTD in response to environmental and feedback cues.” PLoS Genet. (Dec. 2011) 7:e1002387.

Valbuena N, Moreno S: “TOR and PKA pathways synergize at the level of the Ste11 transcription factor to prevent mating and meiosis in fission yeast.” PLoS One. (Jul. 2010) 5:e11514.

Yamamoto M: “Regulation of meiosis in fission yeast.” Cell Struct Funct. (Oct. 1996) 21:431-436

山本正幸、大矢禎一 編集 「酵母ラボマニュアル 酵母分子細胞生物学実験法」 シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社 (1998)

第 2 章

Ecl1 ファミリー遺伝子は、亜鉛枯渇下で G1 期
停止に重要な役割を果たす

① 緒言

1, ヒトにおける細胞周期

ヒトにおける細胞周期は、G1、S、G2、M期の順に細胞周期のサイクルを回している。細胞周期の進行に従って個々の細胞が細胞成長、細胞増殖を行う。このように細胞周期を適切なタイミングで進行させるために、サイクリンとサイクリン依存タンパクキナーゼが必要である。サイクリンとサイクリン依存タンパクキナーゼは複合体を形成する。複合体を形成することで、活性化され、細胞周期進行の調節を行っている。脊椎動物のサイクリンには、サイクリンA、B、D、Eまでの種類がある。[Bruce A.他 2010]。

分裂酵母や出芽酵母でも同様にサイクリンとサイクリン依存タンパクキナーゼの働きにより細胞周期進行を調節している。出芽酵母では、キナーゼとしてCdc28キナーゼ、G1/S期に機能するG1サイクリン、S期とG2/M期に機能するB型サイクリンが見つかっている[吉川寛 他 1996]。分裂酵母では、B型サイクリンとしてCig1、Cig2、Cdc13があることが知られており、サイクリン依存タンパクキナーゼであるCdc2と複合体を形成する[Bueno A. and Russel P. 1993](図 1-3:図 1-4)。

2, 分裂酵母 *S. pombe* と出芽酵母 *S. cerevisiae* の生活環

分裂酵母は通常一倍体で、出芽酵母は二倍体で安定している。双方の酵母は、それぞれ2つの異なる接合型を保持している。分裂酵母は h^+ と h^- 、出芽酵母は a と α の接合型をそれぞれ持つ。分裂酵母は窒素源枯渇下にさらされると、 h^+ 細胞はP因子を分泌し、 h^- 細胞はM因子を分泌する。それぞれ h^+ 細胞が発現しているM因子受容体、 h^- 細胞が発現しているP因子受容体を通してシグナル伝達が行われる。分裂酵母細胞はP因子もしくはM因子を受け取ると、細胞から突起が伸び、異なる接合型をもつ細胞まで伸長し、接触する。この突起のような部分をシュームという。異なる接合型をもつ細胞のシューム同士が接触すると細胞が融合し、核融合が引き起こされる。このような段階を経て分裂酵母野生株は接合し、胞子形成を行う[Merlini L. *et al.* 2013](図 3-1)。分裂酵母野生株は通常ホモタリクな株(h^+ と h^- の接合型をもつ)であり、細胞同士の接合を観察する際に用いられる。しかし、今回の研究では性分化誘導下でも接合を引き起こさない、接合型特異的接合不能変異株である h^- のヘテロタリクな株を用いた[大隅良典 他 2007]。

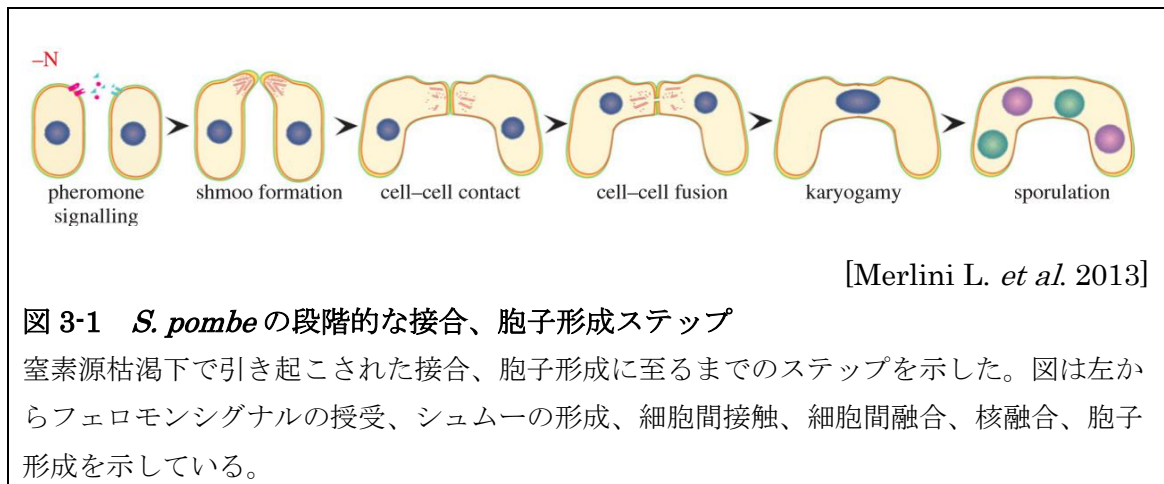


図 3-1 *S. pombe* の段階的な接合、胞子形成ステップ

窒素源枯渇下で引き起こされた接合、胞子形成に至るまでのステップを示した。図は左からフェロモンシグナルの授受、シュムーの形成、細胞間接触、細胞間融合、核融合、胞子形成を示している。

3, 分裂酵母 *S. pombe* における細胞周期制御と性分化誘導

窒素源や炭素源は、分裂酵母における代表的な栄養源である。分裂酵母は、通常、栄養豊富な条件下では、G2、M、G1、S 期の順に細胞周期のサイクルを進行し、細胞増殖、細胞成長を行っている。しかし、窒素源が枯渇すると、細胞周期の進行が G1 期で停止し、接合や胞子形成などの性分化過程への誘導が行われる。出芽酵母においては、窒素源枯渇下および炭素源制限下においても G1 期で細胞周期が停止することが知られている。一方で、分裂酵母において、炭素源制限下では G2 期で細胞周期が停止する[大隅良典 他 2007]。

4, 微量金属類の枯渇と細胞周期制御の関わり-本章の主題

本研究では、亜鉛もしくは鉄枯渇下で性分化誘導が引き起こされることを新たに発見した。加えて、この経路に Ecl1 ファミリー遺伝子が重要な役割を果たすことも明らかにした。第 1 章では、EMM 最少培地で継続的に培養した際のグルコース、亜鉛、鉄の細胞外濃度の測定結果を示した。細胞外の亜鉛濃度が、グルコースや鉄濃度と比べて培養初期に急激に減少した。このことは、亜鉛枯渇のシグナルを初めに細胞が受け取ったと推測できる。しかし、生育に伴って多様な要素が並行して増減するため、この過程に他の要素に関わる可能性を否定することは難しい。

私は、種々の研究結果から、亜鉛枯渇下で顕著な結果が得られたため、亜鉛枯渇に絞って研究を行っていきたい。窒素源枯渇時と同様に、亜鉛枯渇下でも G1 期停止が起こると初めに仮説を立てた[大隅良典 他 2007]。そしてそれに Ecl1 ファミリー遺伝子が重要な役割を果たすと考えた。これまでに亜鉛枯渇下で発現が上昇する *zrt1⁺*、*SPBC1348.06c* 発現量が同条件下の Ecl1 ファミリー遺伝子欠損株では減退した。このことは、*zrt1⁺*、*SPBC1348.06c* が Ecl1 ファミリー遺伝子依存的な発現誘導を引き起こしていることを示す。このような結果から、Ecl1 ファミリー遺伝子が亜鉛枯渇をセンシングする可能性を見出した(第 1 章)。上記のように亜鉛枯渇下において種々の解析を

進めている。本章では、亜鉛枯渇条件下にさらすと G1 期で細胞周期が停止すること、G1 期停止に Ecl1 ファミリー遺伝子が重要な役割を果たすことを明らかにした。加えて、亜鉛が枯渇している環境条件下で異常な細胞形態を観察した。

② 結果

1, Ecl1 ファミリー遺伝子は、亜鉛枯渇下で G1 期停止に重要な役割を果たす

本研究では、第 1 章で述べたように亜鉛もしくは鉄枯渇下で性分化が誘導すること、それに Ecl1 ファミリー遺伝子が重要な役割を果たすことを明らかにした。

緒言で述べたように、分裂酵母は、通常栄養豊富な条件下で G2、M、G1、S 期の順に細胞周期サイクルを進行している。しかし、窒素源などの栄養源が枯渇すると、細胞周期の進行が G1 期で停止し、性分化過程へと移行する[大隅良典 他 2007]。そのため、亜鉛枯渇下においても G1 期で細胞周期が停止し、性分化誘導が行われる、そしてその経路に Ecl1 ファミリー遺伝子が重要な役割を果たすのではないかと推察した。以後、亜鉛枯渇下における結果を示す。

私は、Ecl1 ファミリー遺伝子が G1 期停止に関与するかを解明するために、EMMAL-Zn 液体培地で野生株、 $\Delta ecl1/2/3$ 株を 30 時間まで培養し、フローサイトメトリー解析を行った。基本的に分裂酵母は栄養豊富な条件下で G2 期の細胞が多い。そのため、培養 0 時間の細胞を G2 期の細胞のコントロールとして用いている。G2 期のピークから左側に見えるピークを G1 期の細胞として示した。実験の結果、野生株では継時培養後 24、30 時間後に、G2 期から G1 期へ細胞周期のピークが移行することが観察できた。一方で、亜鉛枯渇下における $\Delta ecl1/2/3$ 株で G1 期にピークを観察することができなかった(図 3-1)。そのため、亜鉛枯渇下において G1 期停止後、性分化誘導が起こることがわかった。加えて、Ecl1 ファミリー遺伝子は、細胞周期が G1 期で停止するまでの機構に重要な機能を果たしていることがわかった。

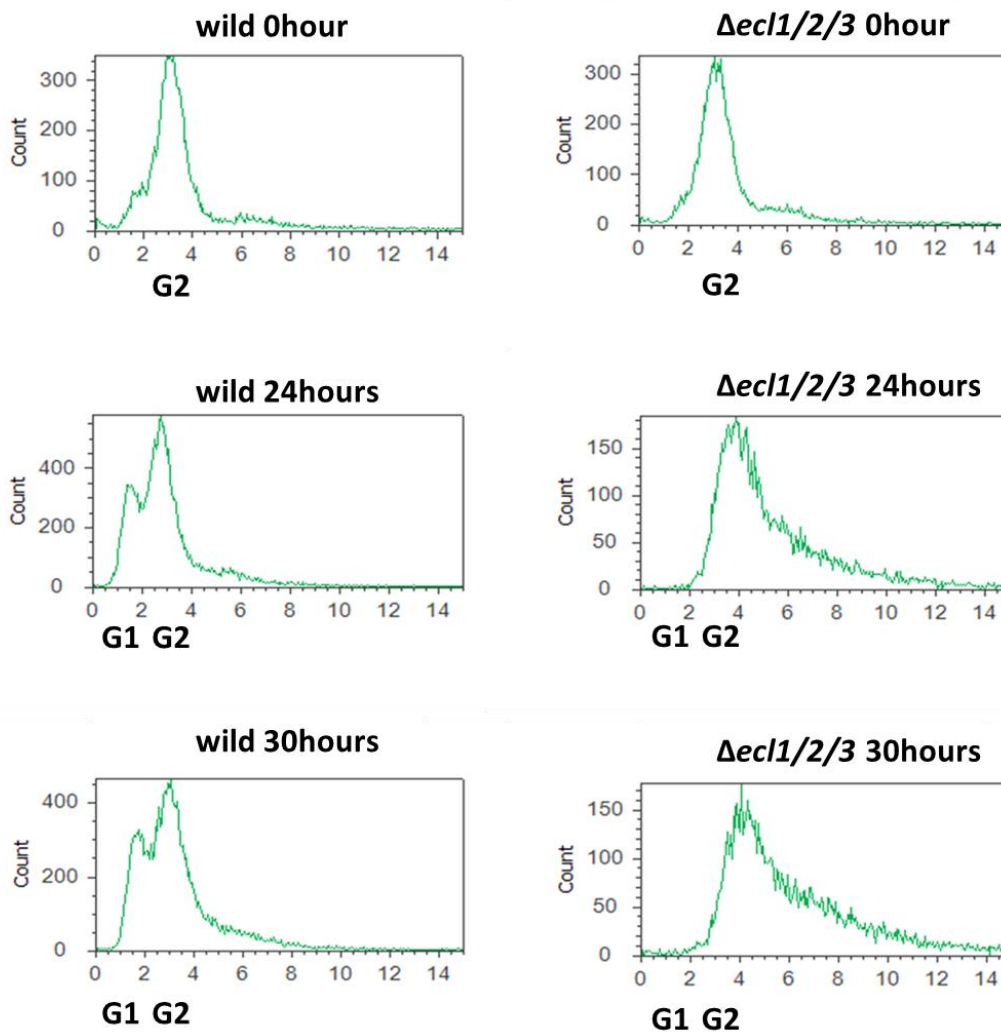


図 3-1 *Ecl1* ファミリー遺伝子は、分裂酵母細胞周期において G1 期停止に重要な役割を果たす。

分裂酵母野生株:wild(JY333)と $\Delta ec11/2/3$ 変異株: $\Delta ec11/2/3$ (JY333 $\Delta ec11/2/3$)を各々 EMM-Zn 液体培地で 0、24、30 時間培養し、サンプリングした。このサンプルを用いてフローサイトメトリー解析を行った。横軸に示された「G2」は G2 期の細胞、「G1」は G1 期の細胞があることを示す。

2, 亜鉛枯渇下で分裂酵母野生株、 $\Delta ec11/2/3$ 変異体は異常な細胞を形成する

亜鉛枯渇培地で7日間培養したところ、野生株、 $\Delta ec11/2/3$ 株の双方で異常な細胞形態を観察することに成功した。一方、高濃度亜鉛下では双方の株でこのような異常な細胞形態を観察することができなかった。このように、亜鉛濃度によって細胞形態が変化することから、野生株、 $\Delta ec11/2/3$ 株共に、細胞外の亜鉛濃度依存的に異常な細胞形態が形成されたと考えられる。しかし、EMMで経時的に培養し続けると、野生株とは異なり、 $\Delta ec11/2/3$ 株は異常な細胞形態が観察された(図3-2:赤の矢印で示した細胞)。これらのことから、細胞外の亜鉛濃度や、Ecl1ファミリー遺伝子がこのような異常な細胞形態の形成に関与する可能性があると考えた。私は、このような異常な細胞形態を「オタマジクシ細胞」と名付けた。

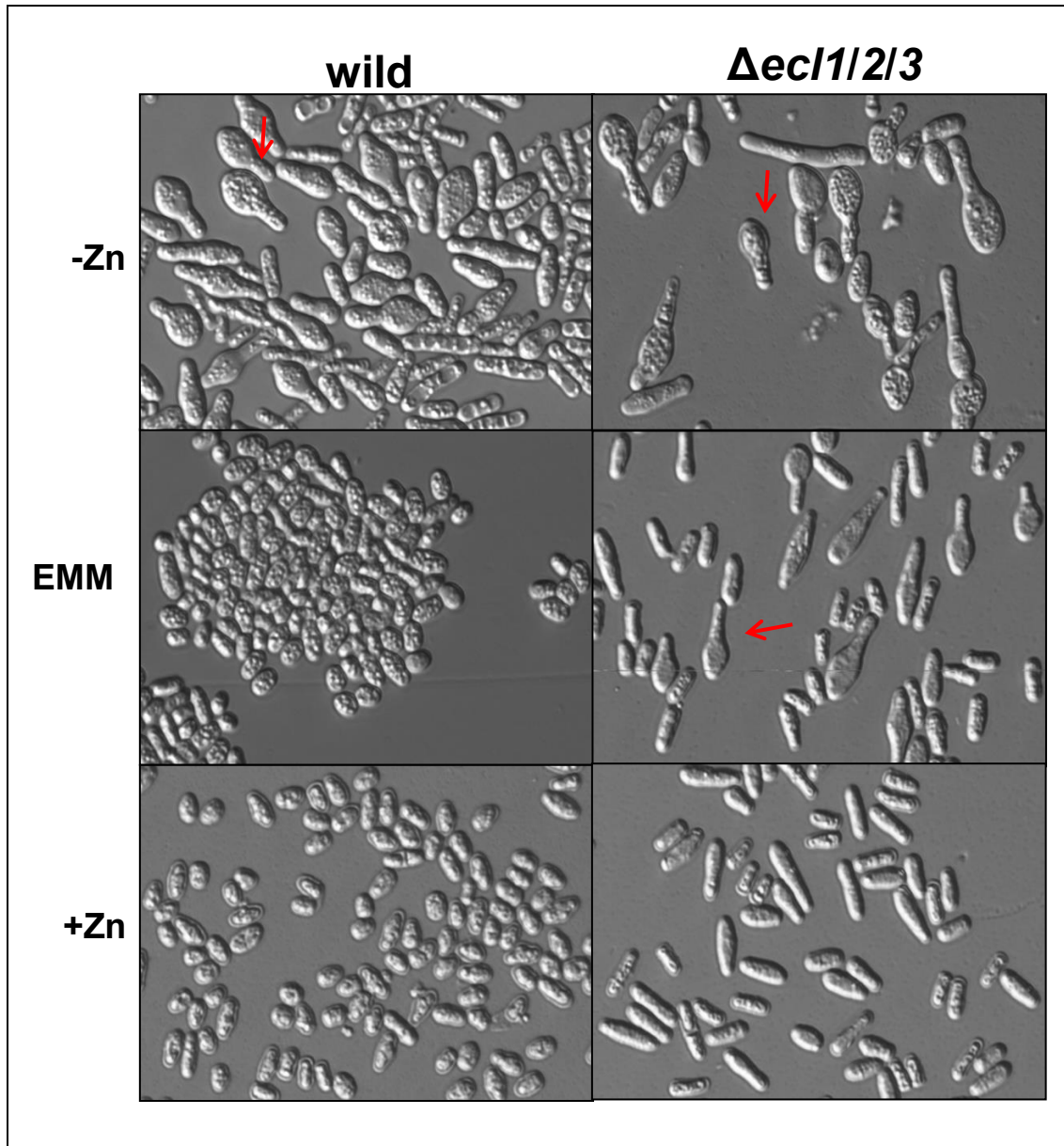


図 3-2 : Zn 枯渇下では、オタマジヤクシの様な細胞が見られた。

野生株:wild(JY333)、 $\Delta ec11/2/3$ 変異株: $\Delta ec11/2/3$ (JY333 $\Delta ec11/2/3$)を EMM、EMM-Zn、EMM+Zn 液体培地で各々7日間培養した。各液体培地で培養した株の細胞形態を観察した。赤矢印で示した細胞をオタマジヤクシ細胞と命名した。

③ 考察

1, Ecl1 ファミリー遺伝子は、亜鉛枯渇下で G1 期停止に重要な役割を果たす。

第 3 章の冒頭で説明したように、分裂酵母において、窒素源枯渇下では G1 期で停止後、性分化誘導が起こる [大隅良典 他 2007]。分裂酵母野生株は、亜鉛枯渇下にさらすと G1 期で細胞周期が停止する。そして亜鉛枯渇下における G1 期停止に Ecl1 ファミリー遺伝子は関与することがわかった(図 3-1)。

2, 亜鉛枯渇下でオタマジヤクシ細胞が観察された。

オタマジヤクシ細胞は、私や他の研究者にとって非常にシュムーと類似した形態をしているように見えた。しかし、本研究では接合型特異的接合不能変異株である h のヘテロタリックな細胞を用いている。シュムーを形成するためには、 h 細胞は h^+ 細胞からフェロモンシグナル(h^+ から発現される M 因子)を授受する必要がある。フェロモンシグナルを授受するためには h^+ の細胞が必要である。加えてシュムーを形成するためには、 h 細胞から P 因子を授受するための h^+ 細胞が必要である。そのため、本実験で用いた h 細胞で観察されたオタマジヤクシ細胞が、シュムーを形成しているとは考えづらい [大隅良典 他 2007; Merlini L. *et al.* 2013]。オタマジヤクシ細胞は、亜鉛枯渇下で観察でき、高濃度亜鉛下では観察できなかった。加えて、EMM 継続培養下では $\Delta ec11/2/3$ 株では観察できたが、野生株では観察できなかった(図 3-2)。そのため、細胞外亜鉛濃度や Ecl1 ファミリー遺伝子の有無がオタマジヤクシ細胞の形成に関与すると考えている。

④実験材料と実験方法

○使用した菌株と培地

菌株名	遺伝子型
JY333	<i>h leu1-32 ade6-M216</i>
JY333 $\Delta ecl1/2/3$	<i>h leu1-32 ade6-M216 ecl1::kan^r ecl2::kan^r ecl3::kan^r</i>

株は、YE 培地(0.5% yeast extract, 3% glucose)もしくは EMM 培地(0.3% Potassium Hydrogen Phthalate, 0.22% NaH_2HPO_4 , 2% glucose, 0.5% NH_4Cl_2 , 21.32mg/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.294mg/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20mg/l KCl, 0.8mg/l Na_2SO_4 , 1.0mg/l Pantothenic acid, 10mg/l Nicotinic acid, 10ug/l myo-inositol, 10mg/l Biotin, 5 g/l H_3BO_3 , 4 g/l MnSO_4 , 4 g/l ZnSO_4 , 2 g/l FeCl_3 , 1.6 g/l MoO_4 , 1 g/l KI, 0.4 g/l CuSO_4 , 10 g/l クエン酸)で培養された[Moreno S. *et al.* 1991]。ロイシンとアデニンは各々 60 mg/l, 40 mg/l 添加した。

○フローサイトメトリー解析

分裂酵母合成培地(EMMAL)にそれぞれ JY333、JY333 $\Delta ecl1/2/3$ 株を植菌し、30 度で $\text{OD}_{600}=1.0$ (BACTOONITOR BACT-550)まで培養した。培養後、1ml の滅菌水で 3 回 wash し、EMMAL-Zn 培地に移した。各々の株を 0、24、30 時間培養したものを集菌後、上清を除去し、70%エタノール 1ml を加えた。エタノールを除去した適量のサンプルに、20mg/ml RNase を 10ul 入れ、37 度で 5 分間処理したサンプルに lysis buffer(1M Tris-HCl pH8.0 10ml, NaCl 1.75g, 0.5M EDTA pH8.0 2ml, NP40 200ml) を 1ml を加え、4mg/ml の propidium iodide で染色した。その後、Attune (acoustic focusing cytometer)でフローサイトメトリー解析を行った。

○分裂酵母の異常な細胞形態の観察

EMM に JY333、JY333 $\Delta ecl1/2/3$ 株を植菌し、1 日培養した。その後、滅菌水で wash し、EMM、EMM-Zn、EMM+Zn 液体培地に各々移した。データは、各培養条件下で 7 日間培養した細胞を示した。

参考文献

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P 著者： 中村桂子、松原謙一 監訳 「Molecular biology of the Cell Fifth Edition. 細胞の分子生物学 第5版」(2010)

大隅良典、下田親 編集 「酵母のすべて ◎系統、細胞から分子まで」 シュプリンガー・ジャパン株式会社 (2007)

Bueno A, Russel P: “Two fission yeast B-type Cyclins, Cig2 and Cdc13, have different functions in mitosis” *Molecular and cellular biology*(Apr.1993)4:2286-2293

Merlini L, Dudin O, Martin SG, “Mate and fuse: how yeast cells do it.” *Open Biol*(Mar. 2013) 3:130008

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

吉川寛 監修、柳田充弘 編集 「ネオ生物学シリーズゲノムから見た新しい生物像—第4巻 酵母」 共立出版株式会社 (1996)

総合討論

1, 経時寿命延長因子、Ecl1 ファミリーの発見

寿命解析のために、当研究室では *ecf1*⁺ 遺伝子欠損株を作製し、 Δ *ecf1* 株の経時寿命を野生株と比較した。しかし、*ecf1*⁺ 遺伝子が欠損しているにもかかわらず Δ *ecf1* 株は、野生株と変わらず経時寿命を延長したため、*ecf1*⁺ の他にも *ecf1*⁺ に類似した機能を果たす経時寿命延長因子があるのではないかと考えられた。その他の因子を探索した結果、発見したのが *ecf2*⁺、*ecf3*⁺ である。加えて、これら遺伝子の各々の高発現下で経時寿命が延長されることから、*ecf1*⁺、*ecf2*⁺、*ecf3*⁺ 類似遺伝子群を総称して Ecl1 ファミリー遺伝子と呼んでいる。Ecl1 ファミリー遺伝子は、発見時まで遺伝子として認識されておらず、網羅的な解析データがなかった [Ohtsuka H. *et al.* 2008; Ohtsuka H. *et al.* 2009]。しかし近年では、マイクロアレイ解析により、鉄枯渇下で *ecf2*⁺ の mRNA 発現量が上昇することがわかっている [Brault A. *et al.* 2016]。

私たちは、分裂酵母の Ecl1 ファミリー遺伝子を経時寿命延長因子として重要であると考えている。今現在、これら遺伝子に対する機能既知の類似遺伝子はないが、類似遺伝子は、真菌類に存在することが報告されている。出芽酵母 *S. cerevisiae* においても *S. pombe* の *ecf1*⁺ 遺伝子と 26% アミノ酸配列が一致する *ECL1* が発見されている [Azuma K. *et al.* 2009]。

Ecl1 ファミリー遺伝子は、経時寿命の延長の他に、酸化ストレス耐性、性分化誘導の表現型をもつ [Ohtsuka H. *et al.* 2012]。私は、Ecl1 ファミリー遺伝子が性分化誘導に関わることを発端として、Ecl1 ファミリータンパク質の機能を性分化から解明することにした。

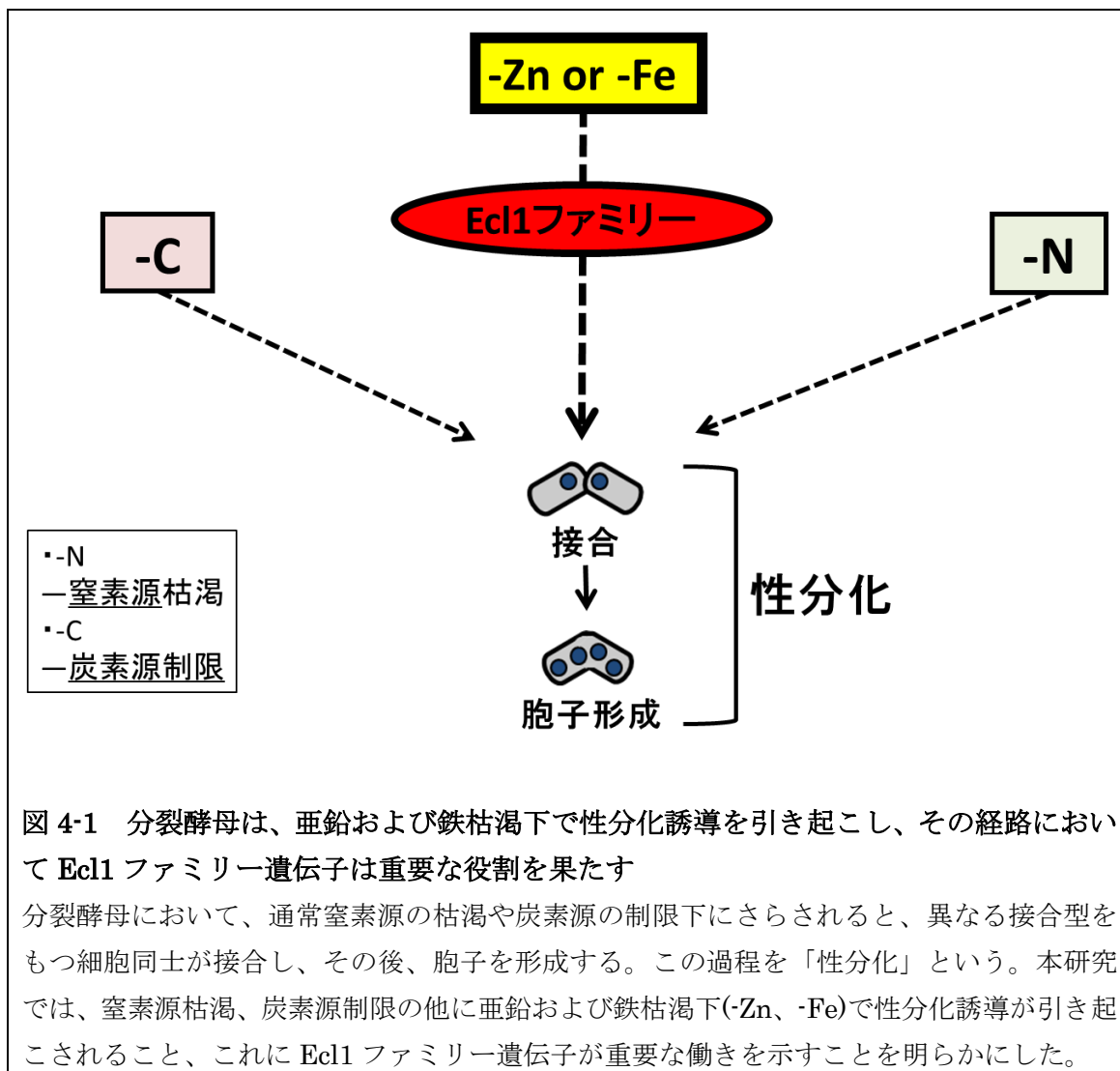
2, 性分化と経時寿命のつながり

多様な生物では、無性生殖があるから性分化が起こる、性分化が起こった後、また無性生殖が行われる。一説には性分化の表現型をもつ生物は寿命をもつとまで言われている [高木由臣 他 2014]。

Ecl1 ファミリー遺伝子が経時寿命の延長と性分化誘導の表現型をもつことが当研究室で明らかになった。これら 2 つの表現型の詳細な因果関係がわかっていないが、Sty1、TOR、PKA 経路に関わる因子が共通して機能することがわかっている [Roux AE *et al.* 2010; Shimasaki T. *et al.* 2013]。

本研究では、分裂酵母において、亜鉛もしくは鉄の枯渇下で性分化誘導が引き起こされること、これに Ecl1 ファミリー遺伝子が重要な役割を果たすことを明らかにした (図 4-1)。加えて、亜鉛制限下で経時寿命が延長することがわかっており、これに Ecl1 ファミリー遺伝子が関与する [Shimasaki T. *et al.* in press]。これらのことから、Ecl1

ファミリー遺伝子が性分化と寿命の双方に重要な役割を果たすことが説明できる。本研究は寿命メカニズム解明の礎となるであろう、経時寿命延長因子 Ecl1 ファミリータンパク質の機能解析を目指して行ってきた。結果として、分裂酵母の亜鉛、鉄枯渇という新たな環境応答機構を見出し、今度はそれが経時寿命にも関わることが明らかになった。ゆえに、このような新たな現象の解明やそもそもの目的であった寿命メカニズムへの新たな知見をもたらす可能性を大いにもっていると考えている。今後も Ecl1 ファミリータンパク質の機能解析を性分化から解析することは、意義のあることに感じる。



3、亜鉛枯渇下と鉄枯渇下における性分化誘導の類似点、相違点

亜鉛や鉄の欠乏症の克服は国際的な課題であり、ヒトの亜鉛の欠乏により腸性先端皮膚炎、味覚障害、下痢、舌炎などが、鉄欠乏により、鉄欠乏性貧血、低色素性貧血が引き起こされると考えられている。鉄欠乏性貧血を患っている患者に関しては、血漿亜鉛濃度が低いことが報告されている。これらの症状を引き起こさず、健康でいるためにも

亜鉛や鉄は生体にとって必要なミネラル類である[Konami A. and Yokoi K. 2007; Prasad AS. *et al* 1961; Yanagida H. *et al.* 2016]。

亜鉛は、膨大なタンパク質のための構造的なコファクターや触媒コファクターとして重要である。ヒトゲノムによってコードされた多くのタンパク質が、亜鉛を必要とする[Simm C *et al.* 2007]。また、ヒトやアカゲザルにおける性分化機構では、亜鉛や鉄の重要性が認められている。そのため、多様な生物においてこれらミネラル類は有用であると考えられる[Inderbitzin P. and Turgeon BG. 2015; Golub MS. *et al.* 1999; 高木由臣 他 2014]。

分裂酵母において、亜鉛や鉄の取り込みに関わる遺伝子がいくつかある。上で示したように、亜鉛枯渇下で発現が上昇する遺伝子として *zrt1⁺*、*SPBC1348.06c* などが知られている。亜鉛トランスポーター *zrt1⁺* は、亜鉛濃度に依存してその発現量を調節し、細胞内への亜鉛の取り込みをすることで細胞内の亜鉛量の調節をしている[Dainty SJ. *et al.* 2008; Boch A. *et al.* 2008]。 *zrt1⁺* の発現制御をする因子には、ER(小胞)への亜鉛の貯蔵に関連する *zhf1⁺* や *loz1⁺* がある[Boch A. *et al.* 2008; Ehrensberger KM. *et al.* 2014]。出芽酵母においても *Zrt1* および液胞への亜鉛の貯蔵に関係する *Zrc1* がある[Milon B. *et al.* 2006; Simm C *et al.* 2007]。これら遺伝子は亜鉛恒常性に関与する遺伝子であり、*zrt1⁺*、*SPBC1348.06c* に関しては *Ecl1* ファミリータンパク質との関連性が第1章の研究によって明らかになった。

鉄においては、鉄枯渇下で発現誘導される鉄応答遺伝子 *frp1⁺*、*php4⁺* が存在する。これら遺伝子は *Ecl1* ファミリータンパク質との関連性は証明されなかったが、鉄の恒常性に関与する遺伝子として認識されている。その他にも鉄の恒常性に関連する遺伝子として *str1⁺*、*str2⁺*、*str3⁺* などがある。これら遺伝子は鉄枯渇下で発現誘導が起こり、高濃度鉄下では不活性化が起こる。*str1⁺*、*str2⁺*、*str3⁺* と *Ecl1* ファミリータンパク質との関連性についてはまだ明らかにされていない[Brault A *et al.* 2016; Labbé S. *et al.* 2007]。

4, *Ecl1* ファミリータンパク質と亜鉛濃度の関連性

本研究においても上記で示した *zrt1⁺*、*SPBC1348.06c* は亜鉛枯渇下でその発現量が上昇した。しかし、この発現上昇は、 $\Delta ecl1/2/3$ 株では見られなかった(図 2-12)。このような結果から、亜鉛枯渇下での *zrt1⁺*、*SPBC1348.06c* の発現制御に *Ecl1* ファミリータンパク質が関わることがわかり、*Ecl1* ファミリータンパク質は、亜鉛の枯渇を感知する、亜鉛センサーとして働く可能性が高いと結論付けた。加えて、*zrt1⁺* が亜鉛トランスポーターとして働くことから、*Ecl1* ファミリータンパク質の有無が細胞内の亜鉛恒常性の調節に影響を与えていると考えられる。上記に示したように亜鉛恒常性に関連した遺伝子として *zhf1⁺* や *loz1⁺* がある。 $\Delta ecl1/2/3$ 変異体において、*zrt1⁺* 遺伝子の他にもこのような亜鉛恒常性に関わる遺伝子の発現や機能に異常が出ている可能性が考

えられうる [Boch A *et al.* 2008; Ehrensberger KM. *et al.* 2014]。鉄枯渴のセンシングに関しては未解明だが、3, で述べたような *str1*⁺、*str2*⁺、*str3*⁺ などの多様な恒常性に関連する遺伝子発現を解析することでその可能性が模索できると考えている。

参考文献

Azuma K, Ohtsuka H, Mita S, Murakami H, Aiba H: "Identification and characterization of an Ecl1-family gene in *Saccharomyces cerevisiae*." *Biosci Biotechnol Biochem*(Dec. 2009)73:2787-2789

Boch A, Trampczynska A, Simm C, Taudte N, Krämer U, Clemens S: "Loss of Zhf and the tightly regulated zinc-uptake system SpZrt1 in *Schizosaccharomyces pombe* reveals the delicacy of cellular zinc balance." *FEMS Yeast Res.* (Sep. 2008) 8: 883-896.

Brault A, Rallis C, Normant V, Garant JM, Bähler J, Labbé S: "Php4 is a key player for iron economy in meiotic and sporulating cells." *G3* (Bethesda). (Oct. 2016) 6:3077-3095.

Csikász-Nagy A, Gyorffy B, Alt W, Tyson JJ, Novák B: "Spatial controls for growth zone formation during the fission yeast cell cycle" *Wiley InterScience*(Octo.2008)25:59-69

Dainty SJ, Kennedy CA, Watt S, Bähler J, Whitehall SK: "Response of *Schizosaccharomyces pombe* to zinc deficiency." *Eukaryot Cell.* (Mar. 2008) 7:454-464

Ehrensberger KM, Corkins ME, Choi S, Bird AJ: "The double zinc finger domain and adjacent accessory domain from the transcription factor loss of zinc sensing 1 (*loz1*) are necessary for DNA binding and zinc sensing." *J Biol Chem.* (Jun. 2014) 289:18087-18096

Gitan RS, Luo H, Rodgers J, Broderius M, Eide D: "Zinc-induced Inactivation of the Yeast ZRT1 Zinc Transporter Occurs through Endocytosis and Vacuolar Degradation." *The Journal of Biological Chemistry*(Octo. 1998) 273:28617–28624.

Golub MS, Keen CL, Gershwin ME: "Behavioral and hematologic consequences of marginal iron-zinc nutrition in adolescent monkeys and the effect of a powdered beef supplement." *Am J Clin Nutr.* (Dec. 1999)70:1059-1068.

Labbé S, Pelletier B, Mercier A: “Iron homeostasis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.” *Biometals*. (Jun. 2007) 20:523-537

Inderbitzin P, Turgeon BG: “Pondering Mating: *Pneumocystis jirovecii*, the Human Lung Pathogen, Selfs without Mating Type Switching, in Contrast to Its Close Relative *Schizosaccharomyces pombe*.” *MBio*. (May.2015) 6:e00583-00515.

Konomi A, Yokoi K: “Effect of iron and/or zinc deficiency in Rats” *Trace Nutrients Research* (2007) 24:82-89

Milon B, Wu Q, Zou J, Costello LC, Franklin RB; “Histidine residues in the region between transmembrane domains III and IV of hZip1 are required for zinc transport across the plasma membrane in PC-3 cells.” *Biochim Biophys Acta*. (Oct. 2006) 1758:1696-1701

Ohtsuka H, Azuma K, Kubota S, Murakami H, Giga-Hama Y, Tohda H, Aiba H: “Chronological lifespan extension by Ecl1 family proteins depends on Prr1 response regulator in fission yeast.” *Genes Cells*.(Jan. 2012) 17:39-52.

Ohtsuka H, Mita S, Ogawa Y, Azuma K, Ito H, Aiba H: “A novel gene, *ec11⁺*, extend the chronological lifespan in fission yeast.” *FEMS Yeast Res*(Apr. 2008) 8:520-530

Ohtsuka H, Ogawa Y, Mizuno H, Mita S, Aiba H: “Identification of ecl family genes that extend chronological lifespan in fission yeast.” *Biosci. Biotechnol. Biochem*. (Apr. 2009) 73:885-889.

Prasad AS, Halsted JA, Nadimi M: “Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia.” *Am J Med*.(Oct. 1961) 31:532-546.

Roux AE, Chartrand P, Ferbeyre G, Rokeach LA: “Fission yeast and other yeasts as emergent models to unravel cellular aging in eukaryotes.” *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. (Jan. 2010) 65:1-8.

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.* (Sep. 1996) 10:2276-2288

Simm C, Lahner B, Salt D, LeFurgey A, Ingram P, Yandell B, Eide DJ: “*Saccharomyces cerevisiae* vacuole in zinc storage and intracellular zinc distribution.” *Eukaryot Cell.* (Jul. 2007) 6:1166-1177.

Mourer T, Jacques JF, Brault A, Bisailon M, Labbé S: “Shu1 is a cell-surface protein involved in iron acquisition from heme in *Schizosaccharomyces pombe*.” *The journal of biological chemistry*(Apr. 2015) 290:10176-10190

Niccoli T, Nurse P: “Different mechanisms of cell polarisation in vegetative and shmooing growth in fission yeast.” *Journal of cell science*(Janu. 2002) 115:1651-1662

Shimasaki T, Ohtsuka H, Naito C, Azuma K, Tenno T, Hiroaki H, Hiroshi Murakami H, Aiba H: “Ecl1 is a zinc-binding protein involved in the zinc-limitation-dependent extension of chronological lifespan in fission yeast.” *Mol Genet Genomics.* (Dec. 2016) in press

Shimasaki T, Ohtsuka H, Naito C, Murakami H, Aiba H: “Ecl1 is activated by the transcription factor Atf1 in response to H₂O₂ stress in *Schizosaccharomyces pombe*.” *Mol Genet Genomics*(Aug. 2013) 289:685-693

高木由臣 著者、溝口明秀 発行者「有性生殖論 「性」と「死」はなぜ生まれたのか」NHK 出版 (2014)

Takeda K, Yoshida T, Kikuchi S, Nagao K, Kokubu A, Pluskal T, Villar-Briones A, Nakamura T, Yanagida M. “Synergistic roles of the proteasome and autophagy for mitochondrial maintenance and chronological lifespan in fission yeast.” *Proc Natl Acad Sci U S A.* (Feb. 2010) 107: 3540-3545

吉川寛 監修、柳田充弘 編集「ネオ生物学シリーズゲノムから見た新しい生物像—第4巻 酵母」共立出版株式会社 (1996)

謝辞

本博論を作成するにあたり、名古屋大学大学院創薬科学研究科 教授 饗場浩文先生、助教 大塚北斗先生に謹んで感謝の意を表します。

中央大学 理工学部 教授 村上浩士先生、研究に関するアドバイス、株の提供などをしていただき、感謝しています。島根大学 生物資源科学部 生命工学科 教授 川向誠先生、助教 松尾安浩先生 島根大学在学時には研究指導なら卒業後には研究に関するアドバイスをいただきありがとうございます。自然科学研究機構 基礎生物学研究所 山下朗先生 性分化に関連した研究のアドバイスをいただき、感謝をしています。

研究室の学生のみなさん、研究補助、株の共有、研究内容の共有などに協力していただきありがとうございました。

報文目錄

Ohtsuka H, Ishida M, Naito C, Murakami H, Aiba H: “Sexual development of *Schizosaccharomyces pombe* is induced by zinc or iron limitation through Ecl1 family genes.” Mol Genet Genomics(Feb. 2015) 290:173–185