

細胞増殖研究部門（客員研究部門）

山 本 正 幸

本研究部門は、前任の安楽泰宏東京大学理学部教授（当時）のあとを受けて、平成4年11月に山本正幸が客員教授に着任し、新しいプロジェクトを開始した。これまでに、助手として今井義幸（現東京大学大学院理学系研究科）および後藤益生（現職）、非常勤研究員として後藤、小林（川岸）万紀子（現米国 NIH）および黒森崇（現職）が新規プロジェクトを支えてきた。また岡本五月をはじめとする数名の特別研究学生、特別協力研究員の協力を得てきている。新体制発足当初には、前期からの助手であった飯田秀利（現東京学芸大学）もプロジェクトの立ち上げに協力した。

平成4年以降に本研究部門が取り組んできた最も主要な研究課題は、減数分裂を制御する分子機構の解明である。減数分裂は有性生殖過程における重要なステップであり、有糸分裂とならんで、その分子機構の解明は細胞の増殖を理解する上で不可欠である。山本の本務地である東京大学大学院理学系研究科の飯野雄一講師および渡辺嘉典助手との個別共同研究をも含めて、これまでに以下のような研究を成し遂げてきた。

山本の本務地では、単細胞の真核微生物である分裂酵母から、減数分裂に関与する遺伝子をこれまでに数多く分離・同定している。例えば高温にさらすだけで通常の減数分裂開始の条件を無視して減数分裂を開始してしまう *pat1* 突然変異株が存在し、栄養成長時には減数分裂の開始を抑える負の制御機構が働いていることを明らかにしていた。また、Pat1 の不活化にともなって減数分裂が開始するためには *mei2* 遺伝子の機能が必須であり、*mei2* 遺伝子産物は有糸分裂周期から減数分裂経路への切り替えを最終的に決定する重要な正の因子であることも示された。その他、この制御系に直接、間接に関わる様々な遺伝子が同定され、その多くの塩基配列が決定されている。クローン化された遺伝子の産物には cAMP カスケードの酵素、転写調節因子、タンパク質リン酸化酵素、RNA 結合タンパク質、RNase など、生化学的性格が明らかになったものも含まれている。

このような研究背景と、全ての真核生物で減数分裂の基本骨格は極めて良く保存されているという観察を基盤にして、分裂酵母で得た減数分裂関連遺伝子のクローンあるいは突然変異株を利用しつつ、減数分裂過程で機能する高等動植物の遺伝子を同定・機能解析することを本部門の最大の目標として研究を進めてきた。この方針に沿って、マウスの精巣、アフリカツメガエルの卵巣および植物のシロイヌナズナから cDNA ライブラリーを調製し、それらの中から分裂酵母の減数分裂関連突然変異を抑圧する遺伝子を検索して多数の候補を単離した。またこのような高等動植物の遺伝子の解析から得られた知見を分裂酵母にフィードバックし、特に減数第二分裂の制御とタンパク質分解との関連について興味深い研究が進展しつつある。以下に、これまでに明らかになった個別的研究成果を要約する。

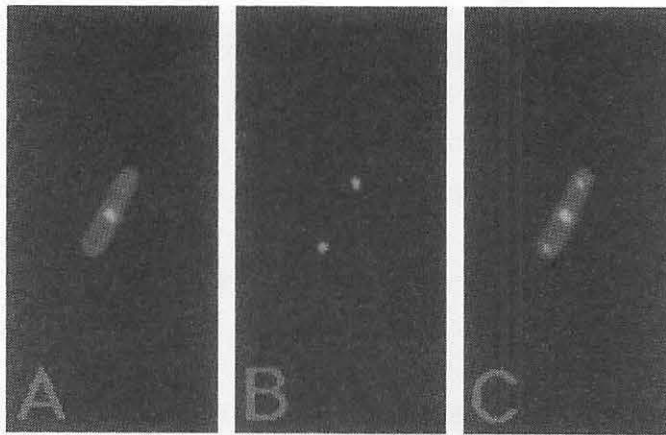
1) アフリカツメガエルのファルネシル-システイン-メチルトランスフェラーゼの単離

分裂酵母の減数分裂開始には接合フェロモンのシグナルにより活性化される MAP キナーゼカスケードの働きが必須である。分裂酵母 *mam4* 変異株は不完全な接合フェロモン M-ファクターしか産生せず、フェロモンシグナルに欠損がある。この遺伝子をクローン化して調べたところ、その産物は M-ファクターの C-末のファルネシル化されたシステインにメチル基をつけるトランスフェラーゼであることが分かった。さらに、*mam4* 変異を相補するアフリカツメガエルの遺伝子 *Xmam4* を単離し、その産物が同じ酵素活性を持つことを示した。ファルネシルシステインのメチル化は、ras タンパク質や G タンパク質の γ -サブユニットなどにもみられ、この酵素の同定は高等生物におけるこれらのタンパク質の機能解析にとって今後大いに役立つと考えられる。

2) シロイヌナズナの有性生殖関連遺伝子の探索

シロイヌナズナの cDNA ライブラリーより、分裂酵母の突然変異株の機能回復を目安にして、RNA 結合タンパク質やプロテインキナーゼ、さらに 14-3-3 などの遺伝子を単離した。特に我々が得た RNA 結合タンパク質は分裂酵母の Mei2 (後述) と相同性を有しており、トランスジェニック植物を作製してその機能解析を進めている。

3) 減数第二分裂が不能な分裂酵母変異株を抑圧するマウス遺伝子として、微小管構成タンパク質、ダイニン、およびプロテアソームの構成因子をコードするものが得られた。一方分裂酵母自身からは微小管構成タンパク質の遺伝子および出芽酵母の *CDC20* 遺伝子に類似したものが得られた。後者の遺伝子産物を詳しく解析した結果、減数第二分裂と、微小管の組織化ならびにタンパク質分解による制御との密接な関係が浮かび上がってきている (下図; 口絵 2 参照)。



出芽酵母 *CDC20* 遺伝子に類似した分裂酵母遺伝子の産物の細胞内局在。前記の分裂酵母遺伝子にクラゲの緑色蛍光タンパク質の遺伝子を繋ぎ、融合タンパク質を分裂酵母細胞内で発現させた。A は DAPI 染色による核の位置を、B は緑色の蛍光による融合タンパク質の位置を示している。C はそれらを重ねあわせたもの。分裂酵母の *CDC20* 類似遺伝子の産物は核をはさむ 2 点として観察され、分裂装置の構築に関わっている可能性が示唆されている (Goto, M. and Yamamoto, M. ; 投稿準備中)。

4) RNA 結合タンパク質による減数分裂周期の制御

mei2 遺伝子産物 (Mei2) は分裂酵母の減数分裂開始に不可欠な機能を果たす因子である。Mei2 は RNA 結合能をもち、その機能は減数分裂前 DNA 合成の誘導と第一分裂の誘導の両者に必須であって、第一分裂を誘導する際には *meiRNA* とよぶ RNA と結合して働く。Mei2 は減数分裂への移行を抑制しているプロテインキナーゼ Pat1 の直接の基質であることが分かったため、Pat1 によりリン酸化される Mei2 のアミノ酸残基の特定を進めたところ、438 番目のセリンと527 番目のスレオニンの2箇所であった。さらに、両者をアラニンに置換した変異型 Mei2 を分裂酵母細胞内で弱く発現させるだけで、細胞は体細胞分裂周期を停止し、減数分裂過程に入ることが観察された。これらの結果は、減数分裂を抑制するために Pat1 キナーゼが標的とする基質のうちで Mei2 が最重要なものであること、そして脱リン酸化型 Mei2 自身に減数分裂を誘導する十分な能力があることを指し示している。

主要発表論文

1. Imai, Y., and Yamamoto, M. (1994). The fission yeast mating pheromone P-factor: Its molecular structure, gene structure, and ability to induce gene expression and G1 arrest in the mating partner. *Genes & Dev.* 8, 328-338.
2. Kuromori, T. and Yamamoto, M. (1994). Cloning of cDNAs from *Arabidopsis thaliana* that encode putative protein phosphatase 2C and a human Dr1-like protein by transformation of a fission yeast mutant. *Nucl. Acids Res.* 22, 5296-5301.
3. Watanabe, Y. and Yamamoto, M. (1994). *S. pombe mei2⁺* encodes an RNA-binding protein essential for premeiotic DNA synthesis and meiosis I, which cooperates with a novel RNA species *meiRNA*. *Cell* 78, 487-498.
4. Iino, Y., Hiramane, Y. and Yamamoto, M. (1995). The role of *cdc2* and other genes in meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 140, 1235-1245.
5. Watanabe, Y., Shinozaki-Yabana, S., Chikashige, Y., Hiraoka, Y. and Yamamoto, M. (1997). Phosphorylation of RNA-binding protein controls cell cycle switch from mitotic to meiotic in fission yeast. *Nature* 386, 187-190.
6. Imai, Y., Davey, J., Kawagishi-Kobayashi, M. and Yamamoto, M. (1997). Genes encoding farnesyl cysteine carboxyl methyltransferase in *Schizosaccharomyces pombe* and *Xenopus laevis*. *Mol. Cell. Biol.* 17, 1543-1551.

