SURE 静岡大学学術リポジトリ
Shizuoka University REpository

分裂酵母の減数分裂におけるオートファジーの機能解析

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2016-06-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 松原, 央達 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.14945/00009587

静岡大学　博士論文

分裂酵母の減数分裂における
オートファジーの機能解析

２０１５年１２月

大学院 自然科学系教育部
バイオサイエンス専攻

松原 央達

博 士 学 位 論 文 目 次

松 原　 央 達

分裂酵母の減数分裂におけるオートファジーの機能解析

目　　次

要旨 ―――――――――― 2 頁

序論 ―――――――――― 4 頁

実験材料と手法 ―――――――――― 10 頁

結果 ―――――――――― 28 頁

考察 ―――――――――― 76 頁

まとめ ―――――――――― 83 頁

参考文献 ―――――――――― 85 頁

謝辞 ―――――――――― 92 頁

要旨

オートファジーは細胞内の主要な分解機構の一つであり、酵母からマウスやヒトに至るまで真核生物において広く保存されている。オートファジーは不要なタンパク質やオルガネラの分解を行うことにより、分解産物を栄養源やエネルギー源として供給するほか、細胞のストレス応答、品質管理、アポトーシスといった機能を担っている。これらの働きによりオートファジーは、発生や分化に伴う細胞内の再構築や、細胞分裂をあまり行わない神経細胞などのメンテナンスに寄与していると考えられている。ヒトではオートファジーが神経疾患などの病気やがんに関与することが指摘されており、その働きを明らかにすることは医学的にも重要である。酵母においては、オートファジーは窒素源枯渇下における細胞分裂に必要であり、分裂の開始に栄養源の供給を行う働きを持つ。出芽酵母では、窒素源枯渇下においてオートファジーは体細胞分裂期を開始するために必要なアミノ酸を供給する。また、分裂酵母では、窒素源枯渇下で起こる減数分裂においてオートファジーは、その開始に必要な窒素源の供給を行っている。これらの事実は、分裂期の進行に必要となる栄養源を供給するためにオートファジーの働きが重要であることを想起させる。しかし、オートファジーの分裂期における働きや細胞分裂に伴って起こる染色体分配への寄与については全く知られていなかった。本研究では、オートファジーを欠いた分裂酵母の減数分裂を詳細に解析することにより、減数分裂におけるオートファジーの複数の働きを見出した。

分裂酵母は通常一倍体であり、窒素源豊富な環境では体細胞分裂によって増殖する。窒素源の少ない環境に移ると 2 つの細胞が接合し二倍体となり、その後直ちに減数分裂を開始する。そして 2 回の核分裂を経て 4 つの胞子を形成する。本研究では、減数分裂の染色体分配機構の解明するために、減数分裂期の染色体分配が異常になる分裂酵母変異株のスクリーニングを行い、4 株の染色体分配異常変異株を取得した。得られた変異株はオートファジーの働きに必須な因子をコードする*atg1*$^{+}$、*atg7*$^{+}$、*atg14*$^{+}$遺伝子のいずれかに変異を持ち、オートファジーの活性が失われていた。得られたオートファジー変異株は窒素源枯渇下では接合せず、少量の窒素源を与えると接合し減数分裂したが、このとき顕著な異常を示した。これらの変異株は、核膜、核小体、染色体の形態に異常を示し、減数分裂期の正常な核構造の形成にオートファジーが必要であると考えられた。また、減数分裂の進行に窒素源を必要とし、減数分裂の前期まで誘導した細胞を窒素源の無い培地に移すと、オートファジー変異株では減数分裂の進行が停止し、その後の核分裂が起こらなかった。このことは減数分裂の進行

にオートファジーによる窒素源供給が必要であることを示している。さらに、染色体分配にも異常が見られた。染色体の分配はスピンドルと呼ばれる構造体が伸びて染色体を細胞の両極に引き分けることで行われている。オートファジー変異株ではこのスピンドルが過剰に伸長し、さらに、減数第一分裂において染色体がスピンドルから脱落するという異常が見られた。分裂期に染色体と微小管との結合を解き、さらに、スピンドルの伸長を制御する因子としてAuroraキナーゼが知られているが、オートファジー変異株ではAuroraキナーゼが染色体とスピンドルとの結合部位およびスピンドル上において過剰に局在していた。そして、Auroraキナーゼの活性を低下させると、染色体の脱落、スピンドルの過剰伸長が解消された。これらの結果は、オートファジー変異株で見られた染色体分配の異常はオーロラキナーゼの働きが強まることで起きていることを示唆している。このことから、オートファジーはAuroraキナーゼの正常な制御に必要であると考えられた。

以上のように、本研究では新たに、オートファジーが減数分裂期において、核のタンパク質の制御に関与していること、窒素源の供給を行っていること、正しい染色体分配に必要であること、さらに、Aurora キナーゼの局所的な活性が過剰になることを防ぐことで染色体分配に寄与していることを見出した。これらの事実は、オートファジーが減数分裂における染色体分配の制御に重要な役割を果たしていることを示している。

序論

オートファジーは細胞内の主要な分解機構の一つである(Kroemer et al., 2010; Mariño et al., 2014; Mizushima & Komatsu, 2011)。この機構では、不要になった細胞質成分あるいは損傷を受けるなどにより異常となったタンパク質やオルガネラをリソソームもしくは液胞に導き、その分解を行っている（図 1)。これによりオートファジーは細胞構成成分を栄養源やエネルギー源として再利用し、古いタンパク質やオルガネラの更新を促す。こうした働きを持つことからオートファジーは細胞の修復や恒常性の維持において重要であり、また細胞内が大きく変化する発生や分化においても重要な働きを持つ。さらに、ヒトではオートファジーがアルツハイマー病やがんなどの様々な病気や障害に関わりを持つことが分かってきており、医学的にも重要な研究対象となっている(Guo et al., 2013; Liu & Ryan, 2012)。

オートファジーの働きは栄養源の限られた環境において重要である。例えば、酵母細胞は窒素源の少ない環境におかれると減数分裂を行い胞子を形成するが（図 2)、オートファジーが働かないと細胞は窒素源の枯渇した環境において減数分裂を開始できなくなる(Kohda et al., 2007; Mukaiyama et al., 2009; Tsukada & Ohsumi, 1993)。さらに分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* では、オートファジーに欠陥があっても窒素源を与えると減数分裂を行うことができるため、オートファジーは減数分裂の開始に必要な窒素源を供給する働きを持つと考えられる(Kohda et al., 2007; Mukaiyama et al., 2009)。加えて、オートファジー関連遺伝子 *atg1* の変異株が減数分裂期の染色体分配に異常のある変異株として同定されており(Kovacikova et al., 2013)、オートファジーが減数分裂期の染色体分配に寄与する可能性がある。しかし、オートファジーが減数分裂にどのように寄与しているかは未だ明らかになっていない。

減数分裂では 2 回の連続した染色体分配が行われている（図 3)。第一分裂では相同染色体が分離し、続く第二分裂では姉妹染色体の分離が起こる。これら 2 回の分裂はサイクリン依存性キナーゼ(Cyclin-dependent kinase: CDK)が 2 度の活性化をすることで引き起こされる。CDK の活性は CDK の活性に必要なサイクリンの蓄積と分解および CDK の活性を抑える CDK の可逆的なリン酸化修飾によって制御され、この制御によって CDK の活性化が 2 度行われている（図 4)(Kishimoto, 2003; Marston & Amon, 2004)。また、第一分裂と第二分裂で異なった染色体の分配が起こるのは、染色体と紡錘体(スピンドル)との結合が異なっていることによる。第一分裂では 1 対の相同染色体のそれぞれが異なる紡錘体極と微小管を介して結合し、続く第二分裂では姉妹染色分体のそれぞれが異なる紡

錘体極と結合し、両極へと分配される。こうした染色体と紡錘体極との結合はオーロラキナーゼによって制御されていると考えられている（図 5）(Carmena et al., 2012; Santaguida & Musacchio, 2009; Tanaka, 2010)。オーロラキナーゼの働きは体細胞分裂においてよく研究されており、染色体とスピンドルの間違った結合が生じると、スピンドルチェックポイント(Spindle assembly checkpoint: SAC)が活性化して anaphase の開始を遅らせる。このときセントロメアに局在するオーロラキナーゼが間違った結合を解消し正しい結合の形成を促す。すべての染色体が正しく結合すると SAC は不活性化して anaphase が開始され、オーロラキナーゼの局在はスピンドルへと移り今度はスピンドルの伸長を制御する(Kotwaliwale et al., 2007; Pereira & Schiebel, 2003)。減数分裂期においても同様なオーロラキナーゼによる染色体分配の制御が働いていると考えられている(Hauf et al., 2007)。

しかし、減数分裂の進行と染色体分配を制御する機構の全貌は体細胞分裂に比べて理解が遅れており、オートファジーと減数分裂の関わりについてはほとんど知られていない。本論文ではオートファジーが分裂酵母の減数分裂における正常な核構造の保持や十分な減数分裂の進行、正確な染色体の分配に必要であることを示す。さらに、オートファジーの欠陥がオーロラキナーゼの局在を変化させること、オーロラキナーゼの変化がオートファジーに欠陥のある細胞で見られる染色体分配異常の引き金となっていることを示すような事象を報告する。

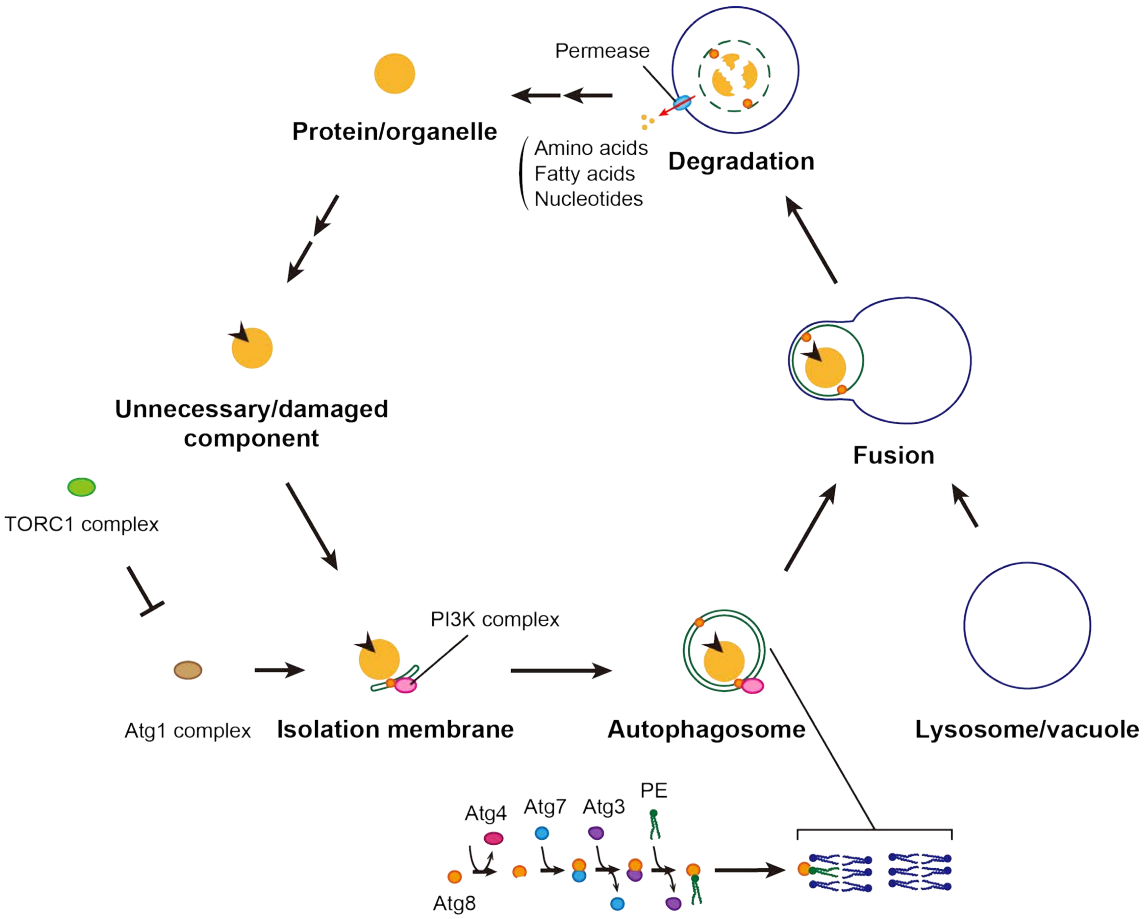


図 1　オートファジーの過程

オートファジーは栄養源豊富な条件では TORC1 複合体（栄養源を感知し活性化するキナーゼ複合体）によって活性が抑制されている。細胞内の窒素源が減少すると TORC1 の活性が低下し、それにより Atg1 キナーゼの活性が上昇してオートファジーが活性化する。タンパク質やオルガネラはオートファゴソーム前駆体によって膜に包まれ、オートファゴソームが形成される。オートファゴソームの膜には Atg8 が結合したリン脂質が含まれる。オートファゴソームはリソソームまたは液胞と結合し、リソソームまたは液胞内の分解酵素によって分解が行われる。分解産物はパーミアーゼによって細胞質基質へ送り出される。PE : phosphatidylethanolamine 、PI3K : PI3 キナーゼ (phosphatidylinositol 3-kinase) 複合体（Atg14 をサブユニットとして含む）。

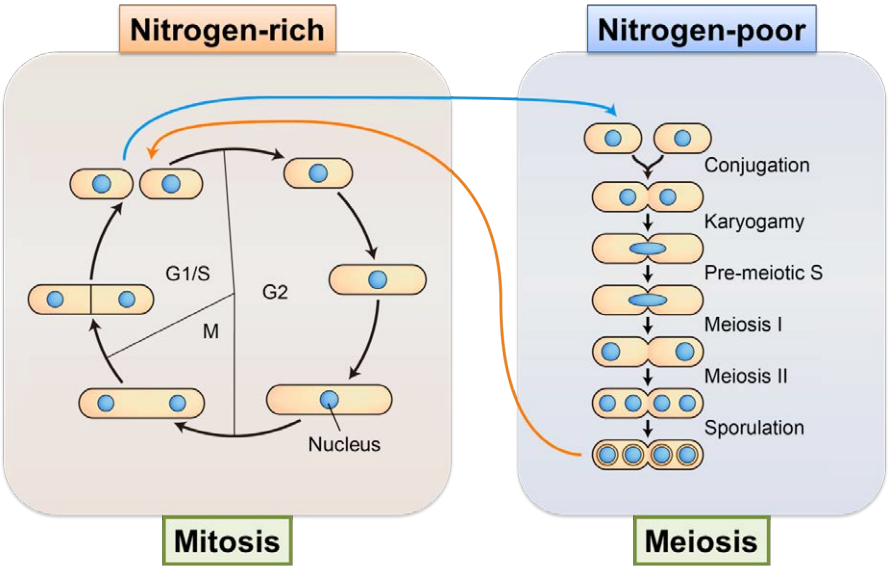


図 2　分裂酵母の生活環

分裂酵母は窒素源豊富な環境では DNA 複製と体細胞分裂を繰り返して増殖する。細胞が窒素源の少ない環境に移ると、細胞は接合し核融合を経て減数分裂を開始する。核融合した接合体は、DNA 複製後に第一分裂、第二分裂を経て染色体が 4 つの核に分配され、最終的に 4 つの胞子が形成される。胞子は増殖を行わないが、外部環境の変化に強くエタノールにも耐性を持つ。胞子は窒素源豊富な環境に移ると発芽して、体細胞分裂を行うようになる。G1: G1 期、S: S 期、G2: G2 期、M: M 期。

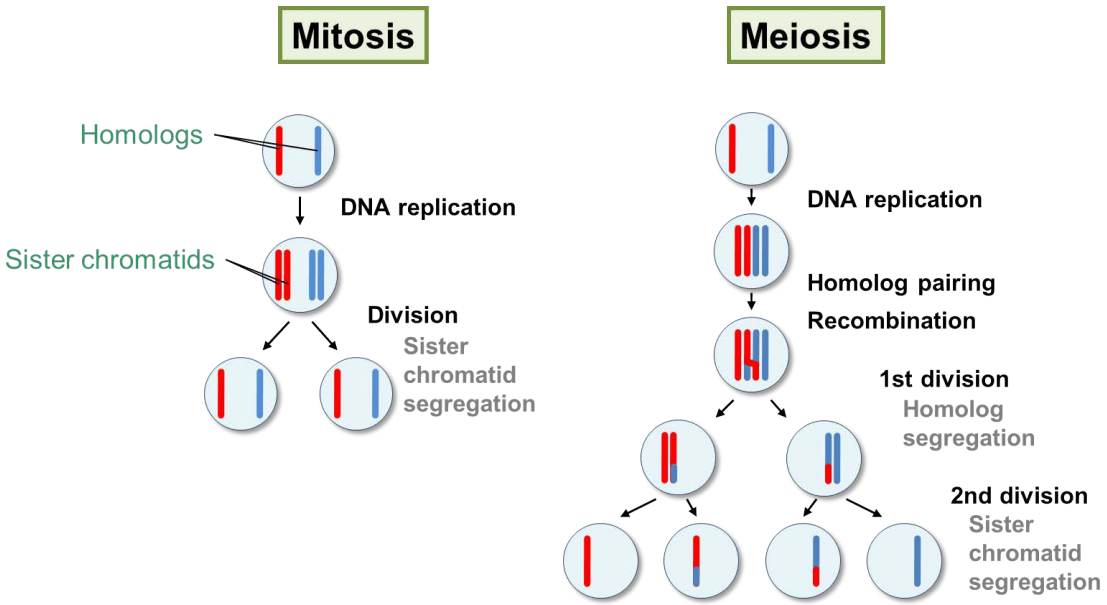


図 3　体細胞分裂と減数分裂における染色体分配

相同染色体を赤と青の棒で示した。分裂前に起こる DNA 複製によって姉妹染色分体ができ、体細胞分裂ではこの姉妹染色分体がそれぞれ 2 つの核に分配される。減数分裂では DNA 複製後、相同染色体間で組み換えが起こり、染色体の一部が交換される。その後、第一分裂で相同染色体が分配され、第二分裂で姉妹染色分体が分配され、4 つの核を形成する。

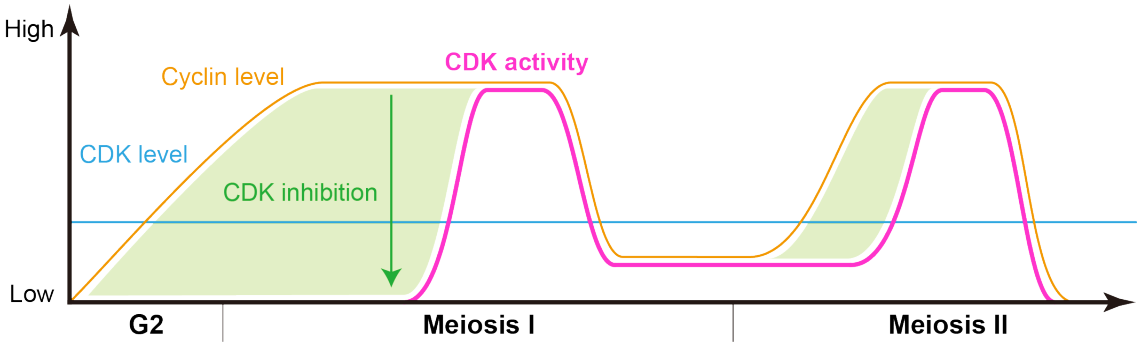


図 4　減数分裂における CDK の活性

CDK の活性はサイクリンの蓄積によって増加するが、分裂前までは CDK がリン酸化修飾を受けていることにより活性が抑制されている。また、第一分裂と第二分裂の間では CDK 活性が完全には失われない。

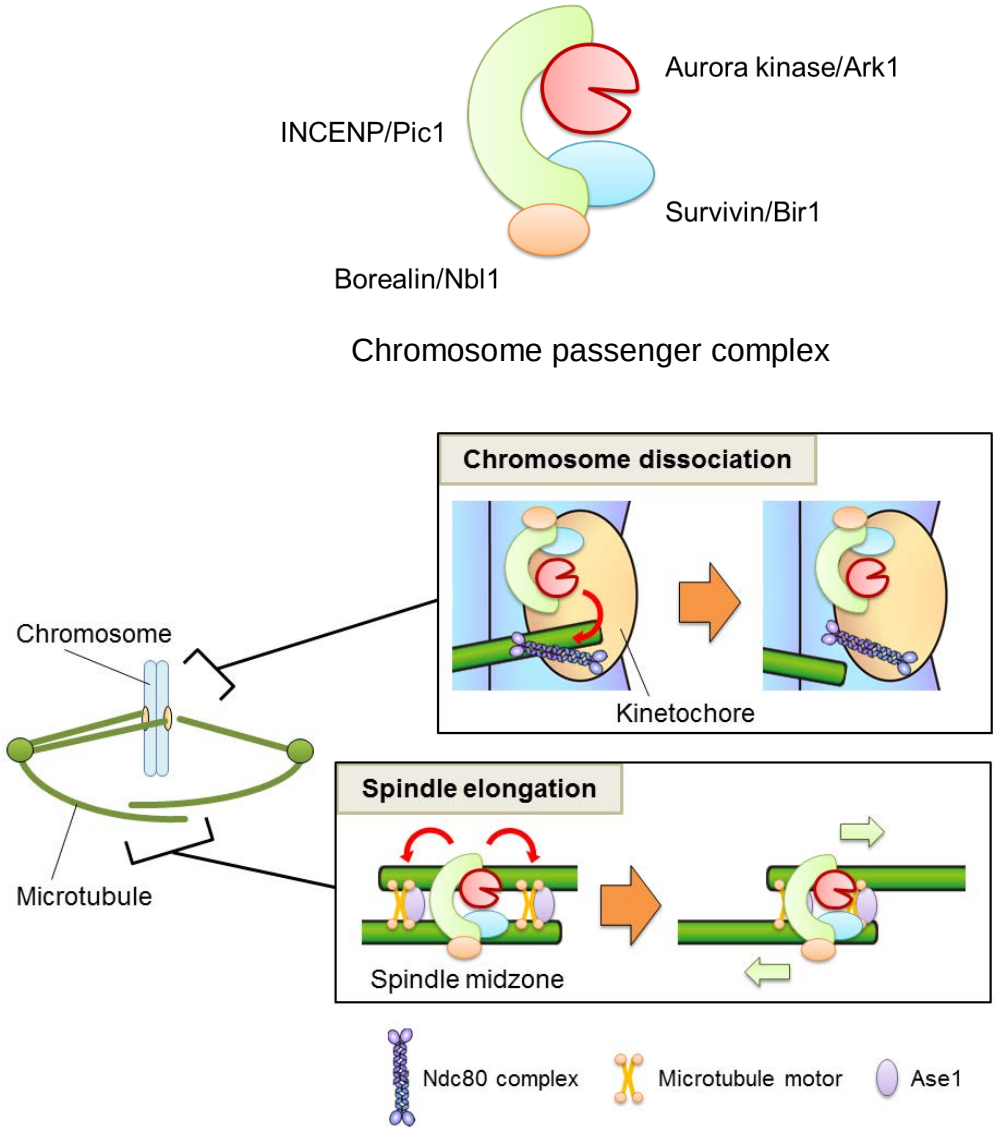


図 5　分裂期における Aurora キナーゼの働き

Aurora キナーゼ(Ark1)は、その局在に関わる 3 つの因子 INCENP(Pic1)、Borealin(Nbl1)、Survivin(Bir1)とともに複合体(Chromosome passenger complex: CPC)を形成して働く。Aurora キナーゼは、染色体のセントロメア領域に局在し、セントロメア上に構築されるキネトコアにある染色体と微小管を架橋する因子(Ndc80 complex)をリン酸化することで Ndc80 complex の微小管との結合を阻害し、染色体と微小管との結合を解除する。この働きにより、染色体が間違った紡錘体極(分配されるべき側の極とは異なる極)との結合が生じた際にその結合を修正していると考えられている。また、Aurora キナーゼは、微小管上にも局在し、逆並行な微小管を架橋する因子(Ase1)をリン酸化することで微小管モーターの働きを助け、微小管のスライディングを引き起こすことでスピンドルを伸長させる。

実験材料と手法

基本的な実験操作、酵母株、培地調整

大腸菌を用いた操作は”Molecular Cloning” (CSH Press)に従い行った。この研究で用いた分裂酵母株は表 1 に示した。

標準的な酵母の培養、減数分裂誘導、遺伝学的な操作は、報告されている論文に従った(Moreno et al., 1991)。

PCR による DNA の増幅には表 2 の合成オリゴ DNA プライマーを使用した。

抗生物質耐性の細胞を得る場合には、抗生物質としてnourseothricin(耐性遺伝子*nat*^{r}, 100μg/ml;Funakoshi Co.; Ltd)、hygromycin B (耐性遺伝子*hyg*^{r}, 100 μg/ml; Wako Pure Chem. Industries, Ltd.)、G418 (耐性遺伝子*kan*^{r}, 100 μg/ml; Funakoshi Co., Ltd.)、aureobasidin A (耐性遺伝子*aur1*^{r}, 0.5 μg/ml; Takara Bio, Inc.)をYES培地に添加して用いた。

減数分裂期染色体分配異常変異株のスクリーニング

GFP でタグ付けされたヒストン H2A を発現するホモ交配型の酵母株 SHM06-1C をアルキル化剤 ethyl methanesulfonate (Wako Pure Chem. Industries, Ltd.)で細胞生存率が 50%程度になるよう処理し、ランダムな遺伝子変異を誘発した。この変異誘発処理を別個に 11 回行い、11,924 株の変異株をプールした。このプールから、胞子形成が可能で、かつ、胞子の生存率が低下しており、さらに、減数分裂特異的に異常な染色体形状を示す株をスクリーニングした。このスクリーニングは、以下の手順で行った。変異株を YES 寒天培地上でコロニー形成させたのち、コロニーを ME 寒天培地上においたニトロセルロース膜(0.45-μm pore size)へ転写し、25℃で 2 日間培養し胞子形成を誘導した。次に、胞子を含んだコロニーを膜ごと 32%(v/v)エタノールを浸潤させた濾紙の上におき 25℃で 30min おいて増殖性の細胞(胞子でないもの)を殺した。この膜を新しい 32%(v/v)エタノールを浸潤させた濾紙に移し、さらに 30min おいた。膜に残った胞子を 2.5 μg/ml phloxine B(死細胞を染色できる色素)を含む YES 寒天培地に転写し、2 日間培養した。胞子生存率の低下は、胞子のコロニー形成能と phloxine B 染色をもとに判断した。胞子生存率の低下が見られた株は ME 寒天培地におき 25°C で 1 晩培養して減数分裂を誘導し、減数分裂期の染色体形状を蛍光顕微鏡によって観察した。最後に、得られた変異株のそれぞれを野生株と掛け合わせて数回の戻し交配を行い、表現型が単一の変異に由来することを確認した。

amb 遺伝子のクローニング、*amb* 遺伝子の確認を行うプラスミドの作成、*amb* 変異株の *atg* 遺伝子座の DNA シーケンシング

amb 遺伝子は、*leu1-32* アレルをもつ *amb* 変異株の窒素源枯渇条件での細胞致死性を相補する遺伝子を探索することでクローニングした。*leu1-32* アレルをもつ*amb*変異株に分裂酵母*S. pombe* ゲノムDNAライブラリー(Nakase et al., 2001)を導入し形質転換を行った。まず、形質転換体をYES寒天培地上に転写し30℃で6-9 hours培養した。次に、窒素源を除いたEMM(EMM-N)寒天培地上に細胞を移し、30℃で2日間培養した。この細胞をYES寒天培地上に転写し30℃で1日培養し、コロニーの形成能から細胞の生存率回復を判断した。これらの操作により、7つのプラスミド—pSUP1-a, pSUP1-b, pSUP1-c, pSUP2-a, pSUP2-b, pSUP2-c, pSUP3—は再現性良く *amb* 変異株の窒素源枯渇条件での細胞致死性を相補した。プラスミドpSUP1-aΔ1は*atg7*遺伝子のコード領域を含む *Pvu*II 切断断片を pSUP1-a から除くことで作成した。プラスミド pSUP3-aΔ1 および pSUP3-aΔ2 はそれぞれ *Bgl*II または *Pvu*II 切断断片を pSUP3-a から除くことにより作成した。

*amb*変異株に対する相補性解析は、以下に示す*atg* 遺伝子を含むプラスミドを作成し変異株に導入することで行った。*atg1*$^+$, *atg7*$^+$, または *atg14*$^+$遺伝子を含むゲノムDNA断片をそれぞれの遺伝子のプロモーター領域およびターミネーター領域を含めて、分裂酵母ゲノムDNAから合成オリゴDNAプライマー(primer 1およびprimer 2で*atg1*$^+$遺伝子に, primer 3およびprimer 4で*atg7*$^+$遺伝子, primer 5およびprimer 6で*atg14*$^+$遺伝子)を用いたPCRによって増幅した。*atg1*$^+$ または*atg7*$^+$ 遺伝子を含むPCR産物は*Xho*Iと*Bam*HIで切断し、*atg14*$^+$遺伝子を含むPCR産物は*Sal*I と *Bam*HIで切断した。切断産物を*aur1*^{r}遺伝子が選択マーカーとして入ったプラスミドpTO2(Yoshida et al., 2013)の*Sal*I と *Bam*HI 切断サイトの間に挿入した。*atg7*$^+$, *atg1*$^+$, または*atg14*$^+$ 遺伝子を挿入したプラスミドをそれぞれ*amb1, amb2,* または*amb3* 変異株に導入し、それぞれの*amb* 表現型について相補能を確認した。

*amb*変異株内の*atg*$^+$遺伝子のコード領域のシーケンシングは以下の手順で行った。*atg*$^+$遺伝子座を*atg*$^+$ 遺伝子を含むプラスミド作成と同じプライマーを用いてPCRによって増幅し、PCR産物を適当なプライマーを用いてシーケンシングした。

atg1$^+$, *atg7*$^+$ または *atg14*$^+$ 遺伝子欠損アレルの作成

ゲノム中の*atg1*$^+$ 遺伝子は以下の手順で欠損させた。*atg1*$^+$遺伝子とそのプロモーターおよびターミネーター領域を含むDNAを分裂酵母ゲノムDNAを鋳型としprimer 1 とprimer 7 を用いてPCRで増幅した。増幅した断片は*Xho*I と

*Sac*II で切断し、これを大腸菌ベクタープラスミドpBlueScript II-KS (Agilent Technologies Japan, Ltd) の *Sal*I と *Sac*II サイトの間に挿入しプラスミドpHM33-26 を得た。*nat*^{r} 遺伝子をTEFプロモーターおよびTEFターミネーターとともにpFA6a-*nat*MX (Hentges et al., 2005)を鋳型としてprimer 8 と primer 9 を用いてPCRによって増幅した。*nat*^{r}遺伝子をpHM33-26 中の*Hind*III と *Spe*I サイトの間に挿入し、*atg1*$^{+}$コード領域の一部を*nat*^{r}遺伝子に置き換えた。このプラスミドから*nat*^{r}遺伝子の挿入で二分された*atg1* 遺伝子をprimer 1 とprimer 2 を用いて増幅した。PCR産物を *atg*$^{+}$細胞に導入し、染色体の*atg1*$^{+}$遺伝子座に組み込まれた形質転換体を得た。*nat*^{r} 遺伝子の*atg1*$^{+}$遺伝子座への挿入はコロニーPCRによって確認した。

atg7^{+}遺伝子の欠損アレルの作成は、相補性解析で用いた*atg7*$^{+}$遺伝子を含むプラスミドをもとにして作成した。プラスミドの*Sma*I と *Spe*I サイトの間に *Pvu*II と *Spe*I で切断した*nat*^{r}遺伝子を含む断片(元となるDNAは*atg1* の場合と共通)を挿入し、*atg7*$^{+}$遺伝子のコード領域の一部を*nat*^{r}遺伝子に置き換えた。このプラスミドから*nat*^{r}遺伝子の挿入で二分された*atg7* 遺伝子をprimer 10 とprimer 11 を用いて増幅した。PCR産物を *atg*$^{+}$細胞に導入し、染色体の*atg7*$^{+}$遺伝子座に組み込まれた形質転換体を得た。*nat*^{r} 遺伝子の*atg7*$^{+}$遺伝子座への挿入は*atg1* の欠損と同様にして行った。

atg14^{+}遺伝子の欠損アレルはPCR-based method (Hentges et al., 2005; Krawchuk & Wahls, 1999)によって行った。*atg14*$^{+}$遺伝子のタンパク質コード領域の両外側のDNAをそれぞれprimer 12 とprimer 13 またはprimer 14 とprimer 15 を用いてPCRによって増幅した。これらの産物を新たなプライマーとして用いpFA6a-*nat*MXを鋳型として*nat*^{r}遺伝子をPCRで増幅し、*nat*^{r}遺伝子の両脇に*atg14* 遺伝子の両外側がそれぞれつながれたDNA断片を得た。PCR産物を *atg*$^{+}$細胞に導入し、染色体の*atg14*$^{+}$遺伝子座に組み込まれた形質転換体を得た。*nat*^{r} 遺伝子の*atg14*$^{+}$遺伝子座への挿入は*atg1* の欠損と同様にして行った

胞子生存率の定量

細胞を YES 寒天培地上において 30℃で培養し、その後、ME 寒天培地上におき 25℃で 5 日間培養して減数分裂を誘導し胞子形成させた。この細胞を 0.5%の β-glucuronidase (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)を含む 100 mM sodium acetate (pH 5.2)に懸濁し、30℃で 2 日間処理し、胞子を遊離させた。胞子は微小針を使って顕微鏡下で 50 個以上を無作為に選んで YES 寒天培地上におき、30℃で 4 日間培養した。培養後、胞子のコロニー形成率を計測し、胞子生存率とした。

GFP-Atg8 を用いたオートファジー活性の測定

GFPタグのついたAtg8 を発現するために、GFP融合Atg8 をコードする染色体組み込み型のプラスミドpHM43 を作成した。まず、*nmt41* プロモーター(チアミンで発現抑制される*nmt1* プロモーターの発現を弱めたもの(Maundrell, 1993))を、GFPをコードする染色体組み込み型ベクタープラスミドpMY12 (Yoshida et al., 2013)に導入した。*nmt41* プロモーターはpREP41 (Basi et al., 1993)を鋳型としてprimer 16 およびprimer 17 を用いてPCRで増幅した。PCR産物を*Xho*IおよびBamHIで切断しpMY12 の*Xho*IおよびBglIIサイトの間に挿入し、pHM40 を得た。次に、*atg8*$^{+}$をコードするcDNAをprimer 18 および primer 19 を用いて分裂酵母cDNAを鋳型としPCRで増幅した。PCR産物は*Sac*IIおよびBamHIで切断し、pHM40 の*Sac*IIおよびBamHIサイトの間に挿入しpHM43 を得た。pHM43 はリシン要求性を示す*lys1-131* アレルをもつ株に導入し、形質転換体を*lys*$^{+}$の表現型(リシン要求性なし)で選んだ。

オートファジー活性検定用の細胞は以下の方法で用意した。pHM43 を導入した株をYES液体培地に入れ 30℃で飽和濃度まで培養した。GFP融合Atg8 の発現を誘導するために、飽和した細胞培養液 20 µlを 20 ml EMM液体培地に加え、細胞濃度が 0.7-1.4 × 10^7 cells/ml になるまで 30℃で培養した。次に、培養液を 2 つに分け、片方はオートファジー非誘導条件のコントロールとして用い、もう片方はオートファジー誘導のサンプルに用いた。

オートファジー非誘導の培養液は、phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)を最終濃度 1 mMで加えて 30℃で 10 min培養しタンパク質分解酵素を失活させた。この細胞は 1 mM PMSF および protease inhibitor cocktail (Set IV; Merck Millipore)を添加したExtraction buffer (140 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1.0% Triton X-100; 0.1% sodium deoxycholate; および 50 mM HEPES-KOH, pH 7.5)で洗って使用するまで-80℃で保存した。オートファジー誘導のサンプルは、細胞を濃度 8 × 10^6 cells/ml になるようにEMM-N液体培地に移し、30℃で 6 hours 培養してオートファジーを誘導した。この細胞は、1 mM PMSF を加えて 10 min追加で培養した後、オートファジー非誘導のコントロールと同様に処理し、-80℃で保管した。

これら細胞のオートファジー活性は、以下のような手順で操作しウェスタンブロットによって調べた。保存した細胞を解凍し、細胞濃度 1.5-3.0 × 10^9 cells/ml となるように 1 mM PMSF, protease inhibitor cocktail, 60 mM β-glycerophosphate, 0.5 mM Na_3VO_4, 0.1 mM KF, 10 mM NEM, および 10 µM MG132 を含んだExtraction bufferに懸濁した。この懸濁液 50µlを同体積の酸洗浄ガラスビーズと混ぜ、細胞破砕装置 (Micro Smash^{TM} MS-100; Tomy Seiko Co., Ltd.)を用いて細胞の中身を抽出した。その後、遠心により細胞の残骸を除き、

細胞抽出液のタンパク質濃度をDC^{TM} Bio-Rad Protein Assay kit (Bio-Rad Labs)を用いて測定した。細胞抽出液に同体積のSDS sample buffer (3.0% sodium dodecyl sulfate (SDS); 30% glycerol; 0.002% bromophenol blue; および 200 mM Tris-HCl, pH 6.8)を加え、5 min 100℃で加熱した。それぞれのサンプルから 30 µgのタンパク質を 10% SDS-polyacrylamide gel にロードし電気泳動した(Laemmli, 1970)。泳動したたんぱく質はPVDF膜Immobilon^{TM}-P (Merck Millipore)にブロッティングし、GFPタグのついたAtg8 もしくはα-tubulinの検出は、それぞれマウスモノクローナル抗GFP抗体(1:3,000 希釈; Roche Diagnostics K. K.)もしくはマウスモノクローナル抗α-tubulin抗体(1:3,000,000 希釈; Sigma-Aldrich Corp.)を一次抗体として用いた。これをHRPの結合した二次抗体と化学発光試薬Luminata Forte Western HRP substrate (Merck Millipore)を使用してX線フィルムで検出した。バンドの濃さの解析には画像解析ソフトウェアImageJ (NIH)を用いた。

Nup44、Gar1、Clp1、Ark1 およびヒストン H2A の可視化

Nup44、Gar1 またはClp1 の可視化を行うために、それぞれにGFPあるいはmCherryを融合した遺伝子をプラスミドで作成した。Nup44-mCherryを作成するために、*nup44*$^{+}$遺伝子をプロモーターとともにprimer 20 およびprimer 21 を用いて分裂酵母ゲノムDNAからPCRで増幅した。PCR産物は*Kpn*Iおよび*Bgl*IIで切断し、mCherryをもつ染色体組み込み型プラスミドpHM4(Yoshida et al., 2013)の*Kpn*Iおよび*Bam*HIサイトの間に挿入した。Gar1-mCherryを作成するために、*gar1*$^{+}$遺伝子をプロモーターとともにprimer 22 およびprimer 23 を用いて分裂酵母ゲノムDNAからPCRで増幅した。PCR産物は*Xho*Iおよび*Bam*HIで切断し、mCherryをもつ染色体組み込み型プラスミドpHM4 の*Sal*Iおよび*Bam*HIサイトの間に挿入した。Clp1-mCherryを作成するために、*clp1*$^{+}$遺伝子をプロモーターとともにprimer 24 およびprimer 25 を用いて分裂酵母ゲノムDNAからPCRで増幅した。PCR産物は*Bgl*IIで切断し、mCherryをもつ染色体組み込み型プラスミドpHM4 の*Bam*HIサイトに挿入した。これらのプラスミドは細胞に導入し、aureobasidin A耐性により形質転換体を選択した。

Ark1 はPCR-based method (Krawchuk & Wahls, 1999)により*GFP*遺伝子を染色体上の*ark1*$^{+}$遺伝子に融合することで可視化した。まず、プラスミドpFA6a-GFP(S65T)-kanMX6 (Bähler et al., 1998)からGFPのコード領域を含む*Bgl*II-*Sal*I切断断片をプラスミドpFA6a-hphMX6 (Hentges et al., 2005)の*Bgl*II-*Sal*Iサイトの間に挿入し*GFP-hph*^{r}モジュールをもつプラスミドpHM45 を作成した。次に、*ark1*$^{+}$遺伝子の終止コドンの両脇を 2 つのプライマーセット(primer 26 およびprimer 27、もしくは、primer 28 およびprimer 29)を用いて分裂酵母ゲノムDNAからPCRで増幅した。得られたPCR産物をプライマーとして用いpHM45 を鋳型

にPCRを行い、*GFP-hph*^{r}モジュールを増幅した。増幅したモジュールは細胞に導入し相同組み換えによって染色体に組み込ませた。形質転換体はhygromycin B耐性によって選択し、*GFP*遺伝子と*ark1*$^{+}$遺伝子の融合はコロニーPCRによって確認した。

ヒストンH2A (遺伝子名:Hta1)はArk1 の可視化と同様の手法により遺伝子を染色体上の*hta1*$^{+}$遺伝子に*mCherry*遺伝子を融合することで可視化した。*hta1*$^{+}$遺伝子の終止コドンの両脇を 2 つのプライマーセット(primer 30 および primer 31、もしくは、primer 32 およびprimer 33)を用いて分裂酵母ゲノムDNAからPCRで増幅した。得られたPCR産物をプライマーとして用いpHM22 (Yoshida et al., 2013)を鋳型にPCRを行い、*mCherry-nat*^{r}モジュールを増幅した。増幅したモジュールは細胞に導入し相同組み換えによって染色体に組み込ませた。形質転換体はnourseothricin耐性によって選択し、*mCherry*遺伝子と*hta1*$^{+}$遺伝子の融合はコロニーPCRによって確認した。

接合を経た減数分裂における核形態の顕微鏡解析

適当な交配型の細胞を YES 寒天培地上におき 30℃で培養し、その後、細胞をME寒天培地上に移して25℃で14-18 hours培養し、減数分裂を誘導する。DNA を染色する場合は、細胞を 5 μg/ml Hoechst 33342 dye (Life Technologies Corp.)を含む蒸留水に懸濁して 5 min 室温においた。接合子は EMM-N に懸濁して、Hoechst 33342 で染色された DNA や GFP あるいは mCherry でタグ付けされた分子を観察した。観察には、60×/1.42 NA もしくは 100×/1.40 NA Plan Apochromat 油浸対物レンズを備えた倒立型蛍光顕微鏡(IX71; Olympus Corp.)と cooled charged-coupled device (CCD) camera (CoolSNAP-HQ2; Nippon Roper Co., Ltd.)を用いた。

同調的な減数分裂における減数分裂進行とタンパク質の解析

pat1-114 温度感受性アレルをもつ細胞をYES液体培地で細胞濃度 3-5 × 10^{6} cells/mlに至るまで 25℃で培養した。その後、細胞を同体積のEMM-N液体培地に移し、25℃でさらに 14 hours培養した。次に、細胞を同体積のEMM-N液体培地、もしくは、塩化アンモニウムを 1/10 量だけ含むEMM(EMM+1/10N)液体培地に移し、34℃で培養して減数分裂を誘導した。

減数分裂の進行をモニターするために、培養液を毎時間回収し、DNAの形態と量の解析に用いた。DNA形態の観察をするために、細胞を 2-5 μg/ml Hoechst 33342 を含む蒸留水に懸濁し室温で 5 min染色した。DNA量を測定するために、細胞を 70% ethanolで固定し、50 mM citric acid (pH 7.0)に再懸濁した。その後、RNase Aを最終濃度 0.1 mg/mlになるように加えて 37℃で 2 hoursおいた。

さらに、最終濃度 2 μMのSYTOX® Green (Life Technologies Corp.)でDNAを染色し、DNA含量をEPICS XL flow cytometer (Beckman Coulter, Inc.)によって定量した。

細胞周期制御因子のタンパク質の発現をウェスタンブロットで解析するために、培養液を毎時間 3 ml回収した。まず、最終濃度 2 mMでPMSFを添加して 34℃で 5 min培養し、タンパク質分解酵素を失活させた。次に、細胞をおよそ 4×10^8 cells/mlになるように氷冷した蒸留水に懸濁し、手早く 95℃で 5 min加熱してタンパク質分解酵素を完全に失活させた。この細胞は液体窒素で凍結し、使用するまで-80℃で保存した。解凍した 50 μlの細胞懸濁液を同体積のurea buffer (8 M urea; 4% SDS; 1 mM DTT; および 120 mM Tris-HCl, pH 7.4)を加え、ガラスビーズを加えて細胞破砕装置を用いて細胞を破砕した。破砕液を 100℃で 3 min加熱し、タンパク質を溶解させた。細胞抽出液から細胞の残骸を遠心分離して除き、その後、タンパク質濃度を測定し、20 μlのLoading buffer (60% glycerol; 0.06% bromophenol blue; および 60 mM Tris-HCl, pH 7.4)を加えた。それぞれの抽出液から 75 μgのタンパク質を 10% SDS-polyacrylamide gel にロードし電気泳動した。電気泳動後、タンパク質はGFP-Atg8 の検出同様に化学発光とX線フィルムを使用しウェスタンブロットで検出した。検出には以下の抗体を用いた:ウサギ抗phospho-Cdc2 (Tyr15)抗体(1:4,000; Cell Signaling Technology Japan, K. K.)、マウス抗Cdc13 抗体 6F11/2 (1:4,000, Abcam plc)、マウスモノクローナル抗PSTAIR抗体(1:200,000; Sigma-Aldrich Corp.)、および、マウスモノクローナル抗HA抗体 16B12 (1:4,000; BABCO, Inc.)。

Ark1 のタンパク質の発現をウェスタンブロットで解析するために、培養液を毎時間 5×10^7 cells回収した。まず、最終濃度 2 mMでPMSFを添加して 34℃で 5 min培養し、タンパク質分解酵素を失活させた。次に、細胞を氷冷した Extraction buffer 2 (1 mM PMSF; 140 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1.0% Triton X-100; 0.1% sodium deoxycholate; および 50 mM HEPES-KOH, pH 7.5)で洗浄し、その後、遠心分離して上澄みを除き、手早く 95℃で 3 min加熱してタンパク質分解酵素を完全に失活させた。この細胞は液体窒素で凍結し、使用するまで-80℃で保存した。解凍した細胞を 50 μlのExtraction buffer 3 (Extraction buffer 2 に以下を添加: 10 mM NEM; protease inhibitor cocktail (Set IV; Merck Millipore); および phosphatase inhibitor cocktail I (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.))を加え、ガラスビーズを加えて細胞破砕装置を用いて細胞を破砕した。破砕液にDenaturing buffer (4% SDS; 10 mM dithiothreitol; 20% glycerol; および 125mM Tris-HCl, pH 6.8)を加えて 95°C で 3 min加熱し、タンパク質を溶解させた。この細胞抽出液のタンパク質濃度を測定し、6.9 μlのBPB buffer (0.15% bromophenol blue; および 90 mM Tris-HCl, pH 6.8) を加えた。それぞれの抽出液から 50 μg のタンパク質を 10% SDS-polyacrylamide gel にロードし電気泳動した。電気泳動後、タンパク質は化

学発光とX線フィルムを使用しウェスタンブロットで検出した。検出には以下の抗体を用いた:マウスモノクローナル抗GFP抗体(1:8,000 希釈; Roche Diagnostics K. K.)、ウサギ抗phospho-Cdc2 (Tyr15)抗体(1:4,000; Cell Signaling Technology Japan, K. K.)、マウスモノクローナル抗PSTAIR抗体(1:500,000; Sigma-Aldrich Corp.)、および、マウスモノクローナル抗α-tubulin抗体(1:200,000 希釈; Sigma-Aldrich Corp.)。

生細胞における染色体、スピンドルおよび Aurora キナーゼの解析

蛍光でタンパク質を可視化した細胞を YES 寒天培地上におき 30℃で培養し、その後、細胞を ME 寒天培地上に移して 25℃で 14-18 hours 培養し、減数分裂を誘導する。減数分裂を誘導した細胞を EMM+1/10N 液体培地もしくは EMM-N 液体培地に懸濁し、懸濁液を 5 mg/ml lectin(Sigma-Aldrich Japan, Inc.)でコートした 35 mm ガラスボトムディッシュ(Matsunami Glass Ind., Ltd.)においた。

タイムラプス撮影は、GFP タグもしくは RFP タグで可視化した染色体、スピンドル、Aurora キナーゼを 60×/1.42 NA Plan Apochromat 油浸対物レンズ(Olympus Corp.)を備えた DeltaVision 顕微鏡システム(operated by SoftWoRx software; Applied Precision Inc.)で撮影した。画像は Z 軸方向に 0.4 μm 間隔で 8 つのセクションを 2 min もしくは 5 min ごとに cooled CCD camera (CoolSNAP-HQ2; Nippon Roper Co., Ltd.)で撮影し、デコンボリューション処理を行った。また、観察時間中、細胞をおく環境はチャンバーにより 25℃に保った。

スピンドルの伸長フェーズの時間は以下の方法で決定した。撮影したタイムラプス画像からスピンドルの長さを三次元で測定し、時間に対してプロットした。プロットから撮影時ごとに 3 つの連続するデータポイントをもとに傾きを求め、この傾きを時間に対してプロットした。傾きがゼロ程度に減少するタイミングをフェーズ 1 とフェーズ 2 の境界とし、また、傾きが再び増加し始めるタイミングをフェーズ 2 とフェーズ 3 の境界と判断し、各フェーズの時間を決定した。

セントロメア局在した Ark1 の撮影は、MetaMorph software (Molecular Devices, Japan)で制御した 60×/1.42 NA Plan Apochromat 油浸対物レンズを備えた倒立型蛍光顕微鏡(IX71; Olympus Corp.)を用いて行った。画像は Z 軸方向に 0.2 μm 間隔で 18 つのセクションを撮影し、画像は MetaMorph software を用いてデコンボリューションを行った。

GFP でタグ付けした Ark1 の蛍光輝度の定量

セントロメア局在した Ark1 の蛍光シグナルは以下の手順で測定した。デコンボリューションを行った Z 軸 18 セクションの画像を MetaMorph software によってシグナルを加算して重ね合わせた。各セントロメアを円形のエリアで

囲って選びエリア内の GFP の最高輝度を測定した。また、コントロールとして細胞質も円形エリアで囲いエリア内の平均輝度を測定した。

スピンドル局在した Ark1 の蛍光シグナルは以下の手順で測定した。デコンボリューションを行った GFP で可視化した Ark1 および mCherry で可視化したスピンドルのタイムラプス画像を、IVE/Priism software (available at the website of the University of California, San Francisco; http://msg.ucsf.edu/IVE/)を用いてシグナルを加算して重ね合わせた。このスピンドルの画像をもとに測定エリアを短辺 0.32 μm の長方形もしくは曲がった長方形で定義した。スピンドルエリアの GFP 輝度の総量および細胞質の平均 GFP 輝度を MetaMorph software で測定し、細胞質の GFP 輝度をバックグラウンドとしてスピンドルの GFP 蛍光量を決定した。

***ark1-so* アレルの作成**

減数分裂における*ark1* の発現抑制を行うために、*ark1* のプロモーターを*rad21* プロモーターに置き換えた(Hauf et al., 2007)。手順は以下に示す。*rad21* プロモーターをもつDNAを分裂酵母ゲノムDNAからprimer 34およびprimer 35を用いてPCRで増幅した。PCR産物は*Bam*HIで切断し、プラスミドpFA6a-kanMX6 (Bahler et al., 1998)の*Bgl*IIサイトに挿入し、プラスミドpDH1 を得た。このときPCR産物の*Eco*RIサイトがプラスミド中のTEFプロモーター近くなる向きに挿入した。次に、*ark1*$^{+}$遺伝子のタンパク質コード領域のN末端の両脇のDNAを分裂酵母ゲノムDNAを鋳型としてprimer 36 およびprimer 37、もしくは、primer 38 およびprimer 39 を用いてPCRで増幅した。得られたPCR産物をプライマーとして用いプラスミドpDH1 を鋳型として*rad21* promoter-*kan*^{r}モジュールをPCRで増幅した。増幅したモジュールを細胞に導入し、染色体上の*ark1*$^{+}$遺伝子座に相同組み換えによって組み込んだ。遺伝子組み込み体はG418 耐性によって選択し、、*ark1* プロモーターの*rad21* プロモーターへの置き換えはコロニーPCRによって行った。

***ark1-GFP* 過剰発現株の作成**

spo5^{+}遺伝子のプロモーターおよび減数分裂特異的な発現に必要なDNA配列[the determinant of selective removal (DSR) (Harigaya et al., 2006)]を、それぞれprimer 40およびprimer 41、もしくは、primer 42およびprimer 43を用いて分裂酵母ゲノムDNAを鋳型としてPCRで増幅した。PCR産物をプラスミドpTO2のマルチクローニングサイトに挿入し、プラスミドpKI2を得た。さらに、*ark1-GFP*融合遺伝子をprimer 44およびprimer 45を用いて*ark1-GFP*遺伝子を持つ分裂酵母のゲノムDNAを鋳型としてPCRで増幅した。この増幅産物をpKI2の*spo5*$^{+}$プロモータ

ーとDSR配列の間に挿入し、プラスミドpHM77を得た。pHM77を*ark1-GFP*遺伝子を持つ分裂酵母細胞に導入し、形質転換体をaureobasidin A耐性により選択した。

表 1　使用した株のリスト

図番号	株名	遺伝子型
3	SHM06-1C	*h^{90} ade6-M210 his7 leu1-32 lys1-131 ura4-D18 hta1^{+}::GFP-kan^{r}*[(a)]
	X01T57#1	*h^{90} hta1^{+}::GFP-kan^{r} atg7-m1*[(b)]
7	SHM03-K2	*h^{90} ade6-M210 leu1-32 lys1-131 ura4-D18 hta1^{+}::GFP-kan^{r}*
	X01h9-2D4	*h^{90} ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 hta1^{+}::GFP-kan^{r} atg7-m1*
	108X14-3D	*h^{90} ade6-M210 hta1^{+}::GFP-kan^{r} atg1-m14*[(c)]
	X22h9-2A3	*h^{90} ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 hta1^{+}::GFP-kan^{r} atg14-m22*[(d)]
	SHM06-C1	*h^{90} ade6-M210 his7 leu1-32 lys1-131 ura4-D18 hta1^{+}::GFP-kan^{r}*
	X01h9A3	*h^{90} ade6-M210 his7 leu1-32 ura4-D18 hta1^{+}::GFP-kan^{r} atg7-m1*
	SHM325-6D	*h^{90} his7 leu1-32 lys1-131 atg1-m14*
	X22h9A2	*h^{90} ade6-M210 his7 leu1-32 ura4-D18 hta1^{+}::GFP-kan^{r} atg14-m22*
	SHM114-4B	*h^{-} his3-D1*
	SY07-81	*h^{+} his3-D1 leu1-32*
	X01c5hB4	*h^{90} ade6-M216 leu1-32 lys1-131 ura4-D18 his3-D1 atg7-m1*
	X22c6hG3	*h^{90} ade6-M216 leu1-32 lys1-131 ura4-D18 his3-D1 atg14-m22*
	SY04-24	*h^{+} leu1-32 his2*
	SHM115-6D	*h^{-} his2*
	X01c5-2A4	*h^{-} ade6-M210 his2 atg7-m1*
	X01c6-2A1	*h^{+} his2 lys1-131 atg7-m1*
	X22c5-2D2	*h^{+} his2 atg14-m22*
	X22c6-4E2	*h^{-} ade6-M210 his2 atg14-m22*
8	SHM34-6D	*h^{-}*
	X01c6-3B2	*h^{-} atg7-m1*
	127X14-1A	*h^{-} atg1-m14*
	X22c6-3B4	*h^{-} atg14-m22*

	SHM114-6D	*h^{+} leu1-32*
	114X01-4D	*h^{+} leu1-32 atg7-m1*
	137X14-6B	*h^{+} leu1-32 atg1-m14*
	103X22-6D	*h^{+} leu1-32 atg14-m22*
12	SHMT80#1	*h^{-} lys1^{+}::Pnmt41-GFP-atg8^{+}*(e)
	X01T92#1	*h^{-} lys1^{+}::Pnmt41-GFP-atg8^{+} atg7-m1*
	X14T93#1	*h^{-} lys1^{+}::Pnmt41-GFP-atg8^{+} atg1-m14*
	X22T94#1	*h^{-} lys1^{+}::Pnmt41-GFP-atg8^{+} atg14-m22*
13,14,15	SHMT49#1	*h^{90} aur1^{+}::aur1^{r}-nup44^{+}-mCherry* (f) *hta1^{+}::GFP-kan^{r}*
	X01T62#1	*h^{90} aur1^{+}::aur1^{r}-nup44^{+}-mCherry hta1^{+}::GFP-kan^{r} atg7-m1*
	SHMT166#1	*h^{90} aur1^{+}::aur1^{r}-nup44^{+}-mCherry hta1^{+}::GFP-kan^{r} ark1::kan^{r}-Prad21-ark1^{+}*(g) *atg7-d1::nat^{r}*(h)
16	SHMT144#1	*h^{90} aur1^{+}::aur1^{r}-gar1^{+}-mCherry* (i) *hta1^{+}::GFP-kan^{r}*
	X01T103#1	*h^{90} aur1^{+}::aur1^{r}-gar1^{+}-mCherry hta1^{+}::GFP-kan^{r} atg7-m1*
	X14T100#1	*h^{90} aur1^{+}::aur1^{r}-gar1^{+}-mCherry hta1^{+}::GFP-kan^{r} atg1-m14*
	X22T102#1	*h^{90} aur1^{+}::aur1^{r}-gar1^{+}-mCherry hta1^{+}::GFP-kan^{r} atg14-m22*
17	SHMT48#1	*h^{90} aur1^{+}::aur1^{r}-clp1^{+}-mCherry*(j) *hta1^{+}::GFP-kan^{r}*
	X01T61#1	*h^{90} aur1^{+}::aur1^{r}-clp1^{+}-mCherry hta1^{+}::GFP-kan^{r} atg7-m1*
	X14T99#1	*h^{90} aur1^{+}::aur1^{r}-clp1^{+}-mCherry hta1^{+}::GFP-kan^{r} atg1-m14*
	X22T101#1	*h^{90} aur1^{+}::aur1^{r}-clp1^{+}-mCherry hta1^{+}::GFP-kan^{r} atg14-m22*
18	SHMT46#1	*h^{90} hta1^{+}::GFP-kan^{r}*
	X01T57#1	*h^{90} hta1^{+}::GFP-kan^{r} atg7-m1*
	134X14-1A	*h^{90} hta1^{+}::GFP-kan^{r} atg1-m14*
	130X22-4C	*h^{90} hta1^{+}::GFP-kan^{r} atg14-m22*
20,21	SY12-59	*h^{+} pat1-114*
22,23	X01c5E1	*h^{-} pat1-114 atg7-m1*
24	SHM152-3D	*h^{-} ura4-D18 cdc25^{+}-6HA(ura4^{+})*(k) *pat1-114*
	SHM269-6A	*h^{-} ura4-D18 atg7-d1::nat^{r} cdc25^{+}-6HA(ura4^{+}) pat1-114*
26,35,36	SHMT47#1	*h^{90} lys1^{+}::Pnda3-mCherry-atb2^{+}*(l) *hta1^{+}::GFP-kan^{r}*

27,35,36,41	X01T58#1	*h^{90} lys1^{+}::Pnda3-mCherry-atb2^{+} hta1^{+}::GFP-kan^{r} atg7-m1*
28,30,31,32,33,34,40,42	SHMT67#1	*h^{90} lys1^{+}::Pnda3-GFP-atb2* (m)
	X01T85#1	*h^{90} lys1^{+}::Pnda3-GFP-atb2 atg7-m1*
30,31,32,33,34,40,42	SY17-58	*h^{90} ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 mad2::ura4^{+}* (n) *lys1^{+}::Pnda3-GFP-atb2^{+}*
	214X01-6A	*h^{90} lys1^{+}::Pnda3-GFP-atb2 ura4-D18 mad2::ura4^{+} atg7-m1*
35,36	X14T73#1	*h^{90} lys1^{+}::Pnda3-mCherry-atb2^{+} hta1^{+}::GFP-kan^{r} atg1-m14*
	X22T74#1	*h^{90} lys1^{+}::Pnda3-mCherry-atb2^{+} hta1^{+}::GFP-kan^{r} atg14-m22*
	SHMT180#1	*h^{90} aur1^{+}:: aur1^{r}- Pnda3-mCherry-atb2*(o) *hta1^{+}::GFP-kan^{r} ura4-D18 mad2::ura4^{+}*
	SHMT181#1	*h^{90} aur1^{+}:: aur1^{r}- Pnda3-mCherry-atb2 hta1^{+}::GFP-kan^{r} ura4-D18 mad2::ura4^{+} atg7-d1::nat^{r}*
37	SYH19-4C	*h^{+} lys1-131 leu1-32 ura4-D18 cen2(D107)::kan^{r}-ura4-lacOp*(p) *his7^{+}::Pdis1-GFP-lacI-NLS*(q)
	SYH19-2-9A	*h^{-} lys1-131 leu1-32 ura4-D18 cen2::kan^{r}-ura4-lacOp his7^{+}::Pdis1-GFP-lacI-NLS*
	X01c8F3	*h^{-} his7^{+}::Pdis1-GFP-lacI-NLS leu1-32 lys1-131 ura4-D18 cen2(D107)::kan^{r}-ura4^{+}-lacOp atg7-m1*
	X01c6D4	*h^{+} his7^{+}::Pdis1-GFP-lacI-NLS leu1-32 lys1-131 ura4-D18 cen2(D107)::kan^{r}-ura4^{+}-lacOp atg7-m1*
	SYH19-6A	*h^{-} lys1-131 leu1-32 ura4-D18 his7^{+}::Pdis1-GFP-lacI-NLS*
	X01c8E1	*h^{+} ade6-M216 his7^{+}::Pdis1-GFP-lacI-NLS lys1-131 ura4-D18 atg7-m1*
38	X01c7D2	*h^{-} ade6-216 his7 lys1^{+}::taz1^{+}-GFP ura4-D18 atg7-m1*
	X01c7E4	*h^{+} ade6-216 his7 leu1-32 lys1^{+}::taz1^{+}-GFP ura4-D18 atg7-m1*
39	X01c7-2I2	*h^{+} his2 leu1-32 atg7-m1*

	SHM128-7A	*h+ lys3 ura1*
	126X01-8B	*h+ leu1-32 lys3 ura1 atg7-m1*
	SHM136-5B	*h+ ade6-M210*
	SY06-32	*h- ade6-M26 ura4-D18*
	136X01-7D	*h- ade6-M210 atg7-m1*
	X01T79#1	*h+ ade6-M26 atg7-m1*
	SY05-74	*h- ade6-M375 ura4-D18*
	X01a375E4	*h+ ade6-M375 atg7-m1*
42,56,57,58,60,61	SHM243-3D	*h90 lys1+::Pnda3-GFP-atb2 ark1::kanr-Prad21-ark1+*
	SHMT110#1	*h90 lys1+::Pnda3-GFP-atb2 ark1::kanr-Prad21-ark1+ atg7-d1::natr*
43,45,47,49,50,51,52 53,54,63,64,66,67,68	SHM193-2C	*h90 lys1+::Pnda3-mCherry-atb2+ ark1+::GFP-hygr* (r)
44,45,47,48,49,50,51, 52,53,54	SHM193-7D	*h90 lys1+::Pnda3-mCherry-atb2+ atg7-d1::natr ark1+::GFP-hygr*
46	SHM213-1D	*h- ark1+::GFP-hygr pat1-114*
	SHM213-2B	*h- ark1+::GFP-hygr pat1-114 atg7-d1::natr*
55,59	SHM270-13B	*h90 lys1+::Pnda3-mCherry-atb2+ hta1+::GFP-kanr ark1::kanr-Prad21-ark1+ atg7-d1::natr*
	SHM306-11D	*h90 lys1+::Pnda3-mCherry-atb2+ hta1+::GFP-kanr ark1-as3:: hygr* (s) *atg7-d1::natr*
62	SHMT167#1	*h90 aur1+::aur1r-gar1+-mCherry hta1+::GFP-kanr ark1::kanr-Prad21-ark1+ atg7-d1::natr*
	SHMT165#1	*h90 aur1+::aur1r-clp1+-mCherry hta1+::GFP-kanr ark1::kanr-Prad21-ark1+ atg7-d1::natr*
63,64,66,67,68	SHMT179#1	*h90 lys1+::Pnda3-mCherry-atb2+ ark1+::GFP-hygr aur1+::aur1r-Pspo5-ark1+- GFP-DSR(spo5)* (t)
65,69	SHMR2-1	*h90 lys1+::Pnda3-GFP-atb2+ ark1+::GFP-hygr hta1+::mCherry-natr*(u)
	SHMR4-1	*h90 lys1+::Pnda3-GFP-atb2+ ark1+::GFP-hygr aur1+::aur1r-Pspo5-ark1+-GFP-DSR(spo5) hta1+::mCherry-natr*

[a] 登田 隆 博士からのギフト(Cancer Research UK, London Research Institute, UK)
[b] 本研究
[c] 本研究
[d] 本研究
[e] 本研究
[f] 本研究
[g] 本研究
[h] 本研究
[i] 本研究
[j] 本研究
[k] (Tamai & Shimoda, 2002)
[l] (Yoshida et al., 2013)
[m] (Masuda et al., 2006)
[n] (Kim et al., 1998)
[o] (Yoshida et al., 2013)
[p] (Yamamoto & Hiraoka, 2003)
[q] (Nabeshima et al., 1998)
[r] 本研究
[s] (Hauf et al., 2007)
[t] 本研究
[u] 本研究

表 2　使用した合成オリゴ DNA のリスト

プライマー番号	オリゴ DNA 配列	用途
Primer 1	5′-CCGCTCGAGTGGCATGAAACTGGTACAGTGG-3′	*atg1*$^{+}$ cloning
Primer 2	5′-CGGGATCCCAGTCATCAGCTCTAGGCCG-3′	*atg1*$^{+}$ cloning
Primer 3	5′-CCGCTCGAGATCTGAAACCCAATTGTAAGCTACGC-3′	*atg7*$^{+}$ cloning
Primer 4	5′-CGGGATCCATAGGGCTATCTTCTAGTCCGCC-3′	*atg7*$^{+}$ cloning
Primer 5	5′-ACGCGTCGACTATATTATGGCAGCGTACCACG-3′	*atg14*$^{+}$ cloning
Primer 6	5′-CGGGATCCCCAAAGCTCTTAACCTTTCAGG-3′	*atg14*$^{+}$ cloning
Primer 7	5′-TCCCCGCGGCAGTCATCAGCTCTAGGCCG-3′	*atg1* gene disruption
Primer 8	5′-GAACGCGGCCGCCAGCTG-3′	*atg1* gene disruption
Primer 9	5′-GCTCTAGACGACTCACTATAGGGAGACCGGC-3′	*atg1* gene disruption
Primer 10	5′-CCGCTCGAGATCTGAAACCCAATTGTAAGCTACGC-3′	*atg7* gene disruption
Primer 11	5′-CGGGATCCATAGGGCTATCTTCTAGTCCGCC-3′	*atg7* gene disruption
Primer 12	5′-ACTTCGGGGATTTGAAGAAATAGAAGTCC-3′	*atg14* gene disruption
Primer 13	5′-ACATGGGGATGTATGGGCTACACACCTTCAGTTTAGATCCAACAATGC-3′	*atg14* gene disruption
Primer 14	5′-TTTTCGCCTCGACATCATCTCGATCACGTTCCTCGTCTAAACCA-3′	*atg14* gene disruption
Primer 15	5′-AATTGGTTGAGGAAATGGAAACTCGG-3′	*atg14* gene disruption
Primer 16	5′-TTCCATAGTTTGAAAGAAAAACCC-3′	Atg8 tagging with GFP
Primer 17	5′-CCGCTCGAGCCATAAAAGACAGAATAAGTCAT-3′	Atg8 tagging with GFP

Primer 18	5′-TCCCCCGGGGGATCCCGTTCTCAATTCAAGGACGAC-3′	Atg8 tagging with GFP
Primer 19	5′-TCCCCGCGGAGATCTCTAAAAAGGAAACACTGTTCCAAA-3′	Atg8 tagging with GFP
Primer 20	5′-GGGGTACCTACGCTTACTTCGTCTGGTGC-3′	Nup44 tagging with mCherry
Primer 21	5′-GAAGATCTTTTTTTGTGATTGAGGAACGTGCT-3′	Nup44 tagging with mCherry
Primer 22	5′-ACCGCTCGAGTGCATTATGCTGCGGTGAGTC-3′	Gar1 tagging with mCherry
Primer 23	5′-CGGGATCCTGAATCTGCCACGGAAACCACC-3′	Gar1 tagging with mCherry
Primer 24	5′-AGAGATCTGGTATATCGCTGTAACAGCG-3′	Clp1 tagging with mCherry
Primer 25	5′-AGAGATCTTAGAAATTAGCCGGCTTTTAGAAG-3′	Clp1 tagging with mCherry
Primer 26	5′-TGATGGAGAAATCAAGCTTTCTG-3′	Ark1 tagging with GFP
Primer 27	5′-TTAATTAACCCGGGGATCCGGGAAGATTCAGAACTTTTGCGAG-3′	Ark1 tagging with GFP
Primer 28	5′-TTTTCGCCTCGACATCATCTCCGCCATCTTGGTACTTTTTAT-3′	Ark1 tagging with GFP
Primer 29	5′-GAAGCATACTTCTCACTTGTTATGC-3′	Ark1 tagging with GFP
Primer 30	5′-CAGTATTTTTCGTCATGTCTGG-3′	Hta1 tagging with mCherry
Primer 31	5′-TTATCCTCCTCGCCCTTGCTCATCCCGGGCAGCTCCTGACTAGGCTTTC-3′	Hta1 tagging with mCherry
Primer 32	5′-TTTTCGCCTCGACATCATCTAGTCAGTCGTCAAGTAAAACAT-3′	Hta1 tagging with mCherry
Primer 33	5′-TATTTATTCATTTGATACATACTCTC-3′	Hta1 tagging with mCherry
Primer 34	5′-CGGGATCCGGCATTGAAGATGCAATTAATGAA-3′	*ark1* shut-off
Primer 35	5′-CGGGATCCAAAGAAGCTTAATATGATTAGGAGAA-3′	*ark1* shut-off
Primer 36	5′-CATTTGTAGAATCGAAGTGGGTTCG-3′	*ark1* shut-off
Primer 37	5′-GTTTAAACGAGCTCGAATTCCGCTGATGTTGGCTTTTGACAAGTTCGTC-3′	*ark1* shut-off

Primer 38	5′-TAATTAACCCGGGGATCCGATGTCAGATTCAAAGTTGGCAGATTCTTTG-3′	*ark1* shut-off
Primer 39	5′-CTCGCCATTGAGGACCAGCTGATGA-3′	*ark1* shut-off
Primer 40	5'-CGAGCTCGAAGATACCTGGTAAGTTTGGAA-3'	*ark1-GFP* overexpression
Primer 41	5'-CGGGATCCTCGCTCTTATATGCTTTAAGTAAATA-3'	*ark1-GFP* overexpression
Primer 42	5'-GGGGTACCACTACGCCATATCATGCCCATC-3'	*ark1-GFP* overexpression
Primer 43	5'-ACCGGGCCCGCTTTGTCTAACAGGTTTTATGT-3'	*ark1-GFP* overexpression
Primer 44	5'-GAAGATCTATGTCAGATTCAAAGTTGGCAGA-3'	*ark1-GFP* overexpression
Primer 45	5'-CCGCTCGAGCTATTTGTATAGTTCATCCATGCC-3'	*ark1-GFP* overexpression

結果

胞子生存率の低下と減数分裂特異的な染色体形状異常を示す変異株の取得

減数分裂における染色体分配の機構を解明するために、分裂酵母をモデル生物として用い減数分裂において染色体分配に異常のある変異株の取得を試みた。分裂酵母は減数分裂を行うと最終的に胞子を形成するが、減数分裂において染色体分配に異常のある変異株では胞子の生存率が低下する。さらにそれら変異株はしばしば減数分裂期に染色体の形状異常を示すことが報告されている(Ding et al., 2006; Molnar et al., 2001)。本研究ではこれらの知見をもとに、胞子生存率の低下と減数分裂期の染色体形状異常を指標として減数分裂期染色体分配異常変異株の取得を試みた。11,924 株の変異株から減数分裂期に特徴的なアメーバ様の染色体形状を示す 4 つの変異株を取得した(図 6)。これら 4 株は相補性試験の結果、3 つの相補グループに分けられた。これら変異株を*amb* (amoeba-like chromosome morphology) 変異株と名付け、各々の変異アレルを*amb1-m1, amb1-m54, amb2-m14, amb3-22* と呼ぶこととした。得られた変異株は最初のスクリーニングでは著しく低い胞子生存率を示したが、後に、この表現型は*amb*変異株がヒスチジン生合成系の遺伝子変異を同時に持つ場合にのみ見られることが分かった。実際に、ヒスチジン生合成遺伝子に変異を持たない場合には胞子生存率は野生株と同程度だった(図 7)。また、*amb*変異株は窒素源を含まない培地で 7 日以上の培養を行うと細胞が伸び偽菌糸様の形状になることも見出した。

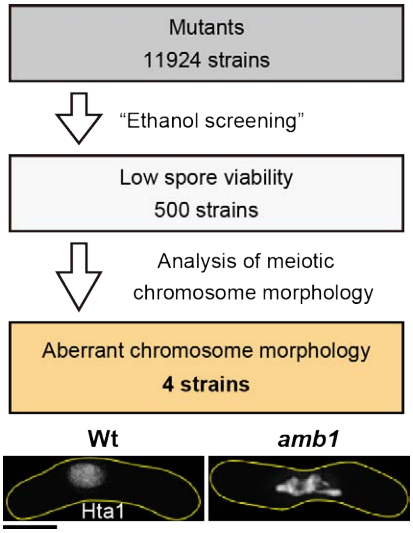


図 6　*amb* 変異株の取得手順

amb 変異株のスクリーニングは 2 つのスクリーニングを組み合わせることによって行った。最初のサブスクリーニングでは胞子生存率の低下した株を選択し、次のスクリーニングでは減数分裂期の染色体の動態制御に欠陥があることが期待されるような異常な染色体形状を示した変異株を取得した。写真は野生株(Wt)と取得された *amb1-m1* 変異株(*amb1*)の減数分裂中の染色体形状を示す。染色体は GFP タグを融合したヒストン H2A (Hta1)によって可視化した。黄色い線は細胞輪郭を示す。スケールバー:5μm。

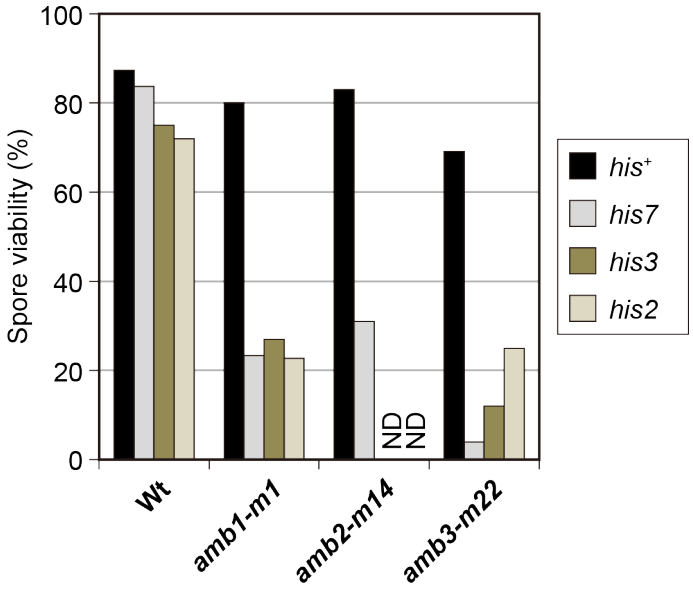


図 7　ヒスチジン要求性変異が野生株と *amb* 変異株における胞子生存率に及ぼす影響

各株において 50 個以上の胞子を用いてコロニー形成率を判定し胞子生存率とした。*his*$^{+}$はヒスチジン生合成系遺伝子に変異がないことを表し、*his2*, *his3*, *his7* はそれぞれ異なるヒスチジン生合成系の遺伝子に変異があることを表す。ND: 未検証(Not-determined)。

***amb* 変異株の変異遺伝子の同定**

ロイシン生合成遺伝子の一つである*leu1*$^+$遺伝子に変異のある*leu1-32* アレルを有する*amb*変異株は、窒素源を含まない培地で細胞生存率が急激に低下し、ほとんどの細胞が 1 日で死ぬ(図 8)。この表現型を利用して、*amb*表現型を抑制する分裂酵母のゲノム断片を探索し*amb*変異株の原因遺伝子の同定を試みた。取得されたゲノム断片のサブクローニングを行うと*amb1, amb2, amb3* 変異はそれぞれ*atg7*$^+$, *atg1*$^+$, *atg14*$^+$遺伝子の変異であることが示唆された(図 9)。これら 3 つの遺伝子はオートファジーの中心的な因子をコードしていた。オートファジーでは生体膜で構成されるオートファゴソーム(autophagosome)が細胞質基質やオルガネラを内包しリソソームや液胞と融合することで内容物を分解するが、いずれの遺伝子もオートファゴソームの形成に必須な因子をコードしていた（図 1）(Mukaiyama et al., 2009; Sun et al., 2013) [reviewed in (Klionsky et al., 2003; Mizushima & Komatsu, 2011)]。Atg7 はオートファゴソーム形成に必要なユビキチン様分子の結合に必要な因子であり、またAtg1 はオートファゴソームの形成を制御するプロテインキナーゼであった。さらに、Atg14 はオートファゴソームの形成にかかわるオートファジー特異的なPI3 キナーゼ (phosphatidylinositol 3-kinase) 複合体のサブユニットであった。

以下の 4 つの根拠から*amb1, amb2, amb3* 変異株で見られる表現型がそれぞれ*atg7*$^+$, *atg1*$^+$, *atg14*$^+$遺伝子の変異に由来するものであると結論した。第一に、*atg7*$^+$, *atg1*$^+$, *atg14*$^+$遺伝子いずれかを破壊すると*amb*変異株と同じ染色体の表現型を示したことである。第二に、*atg*遺伝子を対応する*amb*変異株にそれぞれ導入すると変異株の表現型が抑制されたことである。第三に、*amb*変異株のゲノム中の*atg*遺伝子のタンパク質コード領域の塩基配列を調べると、この遺伝子に変異が見られたことである(図 10)。第四に、*amb*変異株の細胞内にGFP-Atg8 融合タンパク質を発現し、オートファジーを誘導する条件にしてもGFP-Atg8 の切断が起こらなかったことである(図 11) (Mukaiyama et al., 2009; Shintani & Klionsky, 2004)。これはオートファジーに必要なAtg8 のプロセシングが起きていないことを示しており、オートファジーの機能に欠損があることを示している。これらの結果から*amb1, amb2, amb3* 変異株の変異遺伝子がそれぞれ*atg7*$^+$, *atg1*$^+$, *atg14*$^+$遺伝子であると結論した。また、*amb1* の表現型を抑えるゲノム断片として*atg7*$^+$遺伝子を含まないものも得られたが、これらは相補能が弱かったため本研究ではこれ以上の解析は行わなかった。これらの結果に基づき、以降においては*amb*変異株の各変異*amb1-m1, amb1-m54, amb2-m14, amb3-22* をそれぞれ*atg7-m1, atg7-m54, atg1-m14, atg14-m22* と呼ぶこととした。また、*amb*変異株の表現型と同じ表現型を*atg*遺伝子の欠損株が示したので以降のいくつかの実験では*amb*変異の代わりに遺伝子欠損株を用いた。さらに以下の実験では細胞や胞子の生存

率に影響を及ぼすロイシン合成系遺伝子やヒスチジン合成系遺伝子の変異を含まない株を用いた。

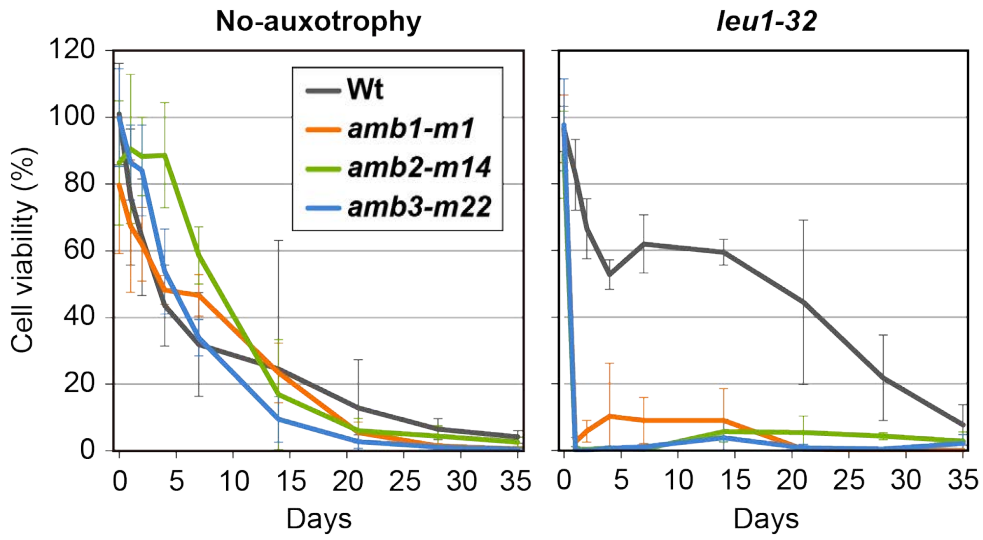


図 8　窒素源枯渇条件下での細胞生存率

野生株と *amb* 変異株を窒素源枯渇培地で任意の日数培養し、細胞のコロニー形成能から細胞生存率を判定した。エラーバーは標準偏差を示す。

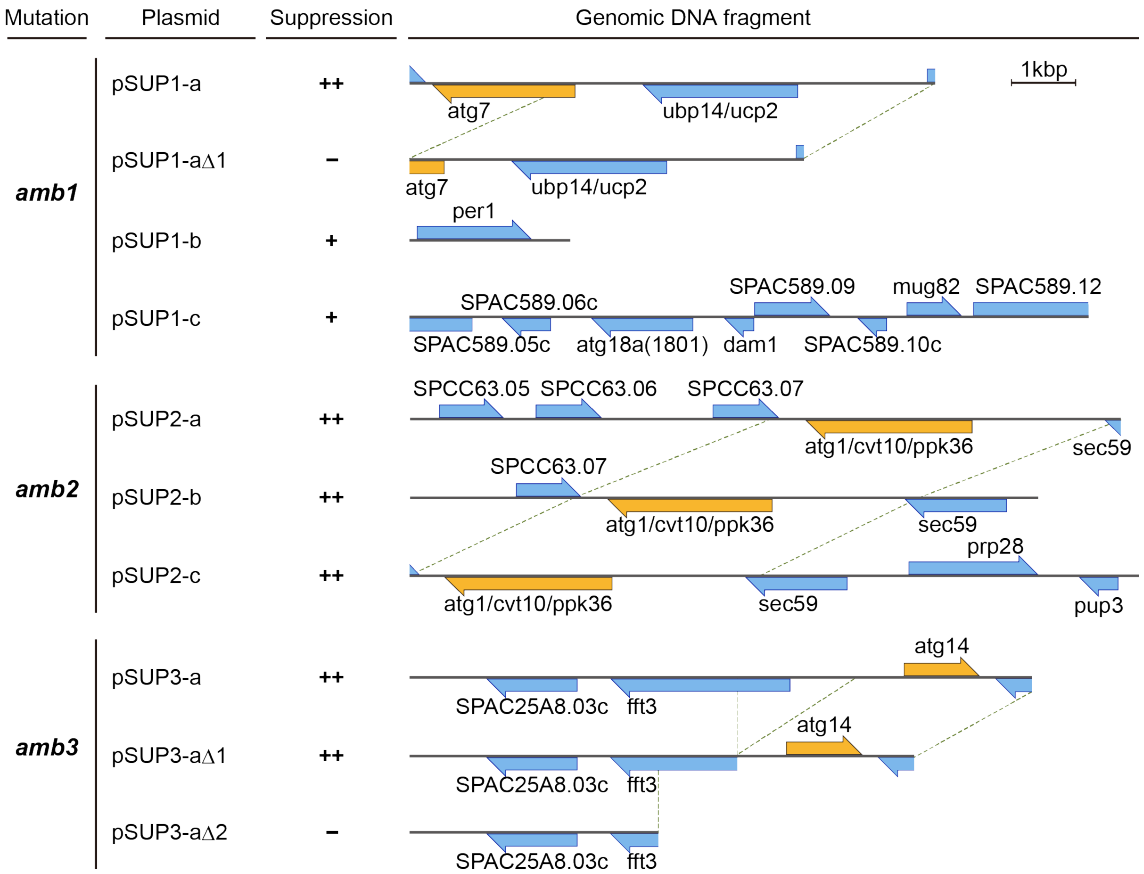


図 9　*amb* 変異の表現型を抑制した分裂酵母のゲノム DNA 断片

amb1 変異(pSUP1-a、pSUP1-b、pSUP1-cを取得)、*amb2* 変異(pSUP2-a、pSUP2-b、pSUP2-cを取得)、*amb3* 変異(pSUP3-aを取得)を抑制したプラスミドと、プラスミドpSUP1-a(pSUP1-aΔを作成)、pSUP3-a(pSUP3-aΔ1、pSUP3-aΔ2 を作成)からサブクローンして得られたプラスミドに含まれる遺伝子マップを示した。遺伝子のコード領域は分裂酵母データベース(Pombase; http://www.pombase.org/)で同定し、矢印で表示した。黄色矢印は*atg*遺伝子を示す。各プラスミドの共通DNA領域を点線で示した。++:強く相補、+:弱く相補、-:相補能なし。

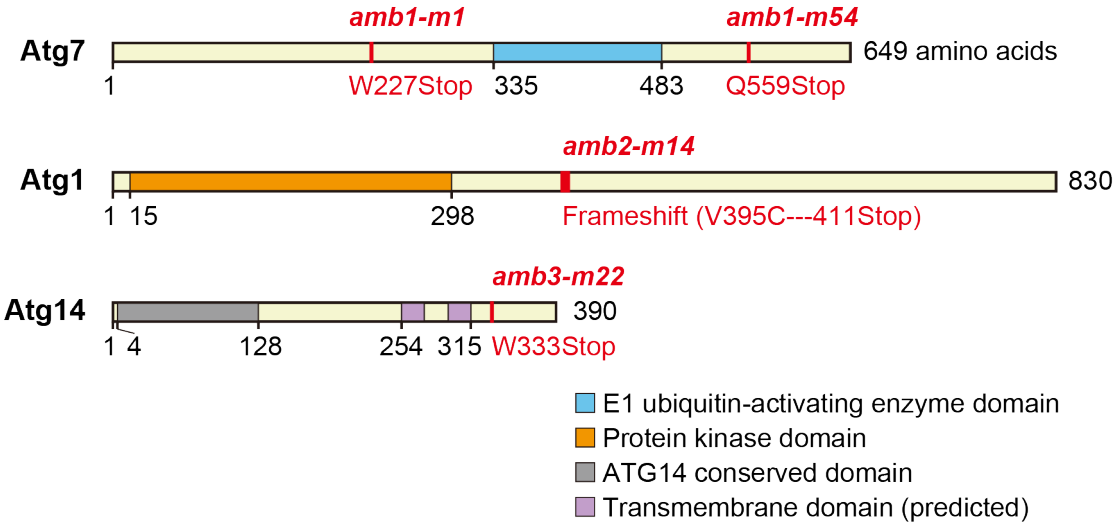


図 10　Atg7、Atg1、Atg14 タンパク質の一次構造と遺伝子変異箇所

*amb*変異株で変異のあった箇所と機能性ドメインについてアミノ酸残基番号を付して示した。*amb1-m1* は*atg7*$^{+}$遺伝子の 227 番目のコドンがTGG(Trp)からTAG(Stop)に置き換わっていた。*amb1-m54* は*atg7*$^{+}$遺伝子の 559 番目のコドンがCAA(Gln)からTAA(Stop)に置き換わっていた。*amb2-m14* では*atg1*$^{+}$遺伝子の 394 番目のコドンからフレームシフトがあり、411 番目がStopコドンとなっていた。*amb3-m22* では*atg14*$^{+}$遺伝子の 333 番目のコドンがTGG(Trp)からTAG(Stop)に置き換わっていた。

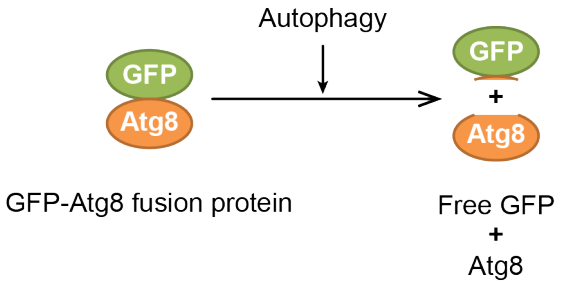


図 11　オートファジー活性の判定法

オートファジーの機構が正常に働いている場合、Atg8 タンパク質はアミノ末端側で切断される。細胞にオートファジー活性がある場合、GFP-Atg8 融合タンパク質の Atg8 が切断され、フリーな GFP タンパク質を生じる。このフリーな GFP タンパク質の量によってオートファジー活性の有無が判別できる。

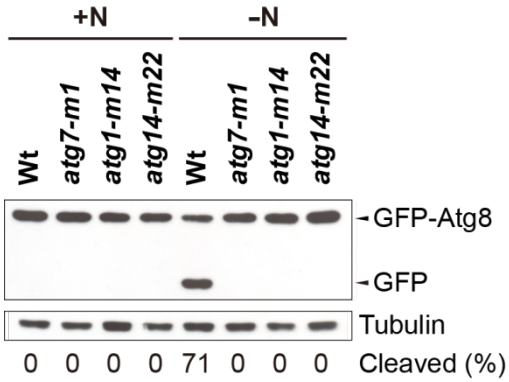


図 12　野生株とオートファジー変異株のオートファジー活性

窒素源存在下(+N)で培養した細胞と、窒素源枯渇下(-N)で培養しオートファジーを誘導した細胞で GFP-Atg8 切断活性をウェスタンブロットにより調べた。GFP-Atg8 および GFP は抗 GFP 抗体で、tubulin は抗 α-tubulin 抗体でそれぞれ検出した。

オートファジー変異株では核の構造に様々な異常が見られる

始めに、オートファジー変異株の異常な核構造について詳細に解析した。染色体、核膜、核小体をそれぞれ適当なマーカー遺伝子に蛍光タンパク質を融合させて可視化し、その形態を評価した。染色体はヒストン H2A (Hta1)を可視化して解析した。野生株では、窒素源枯渇下に移すと 2 つの細胞が接合し、その後、2 つの核が融合する。融合した核は細長く伸びて細胞中を往復するホーステール運動を行い、運動が終わると丸い核になる。続いて、減数第一分裂が起きて核が 2 つに分かれ、さらに減数第二分裂が起こり 4 つの核が形成され、最終的に 4 つの核の周りに胞子膜が形成されて減数分裂は終了する。オートファジー変異株では、ホーステール核運動の後に染色体が著しく変形しアメーバ様の染色体形状が観察され、2 核、4 核では変形もしくは過凝集した染色体が観察された(図 13)。また、ホーステール核運動の時期には糸状に伸びた染色体が多く見られた(図 14)。次に、核膜を核膜孔複合体のサブユニット Nup44 を可視化し解析した。野生株では核膜は染色体の集まりの表面を一様に縁取るように局在していたが(図 13,Wt)、変異株では染色体周囲に途切れ途切れに局在が見られたり、染色体から離れたところに局在したりしていた(図 13,*atg7*,矢頭, 図 15)。染色体分配の際には分かれた染色体同士を結ぶように Nup44 のブリッジができるが、変異株ではこのブリッジが途切れ途切れとなる、もしくは、やや散逸した状態となっていた(図 13,図 15, AnaI, Ana II)。さらに、核小体を rRNA 結合タンパク質 Gar1 とプロテインフォスファターゼ Clp1/Flp1 を可視化し解析したところ、野生株ではホールテール核運動の時期にこれらの因子はたいてい 1 つの塊状の局在を示す、あるいは目立った局在が見られない(Cueille et al., 2001; Girard et al., 1993; Trautmann et al., 2001)。しかし、変異株では複数の点として局在していた(図 16,図 17)。これらの結果からオートファジー変異株は、減数分裂中の染色体の形状や核膜の統合性、核小体因子の局在に異常が見られることが分かった。

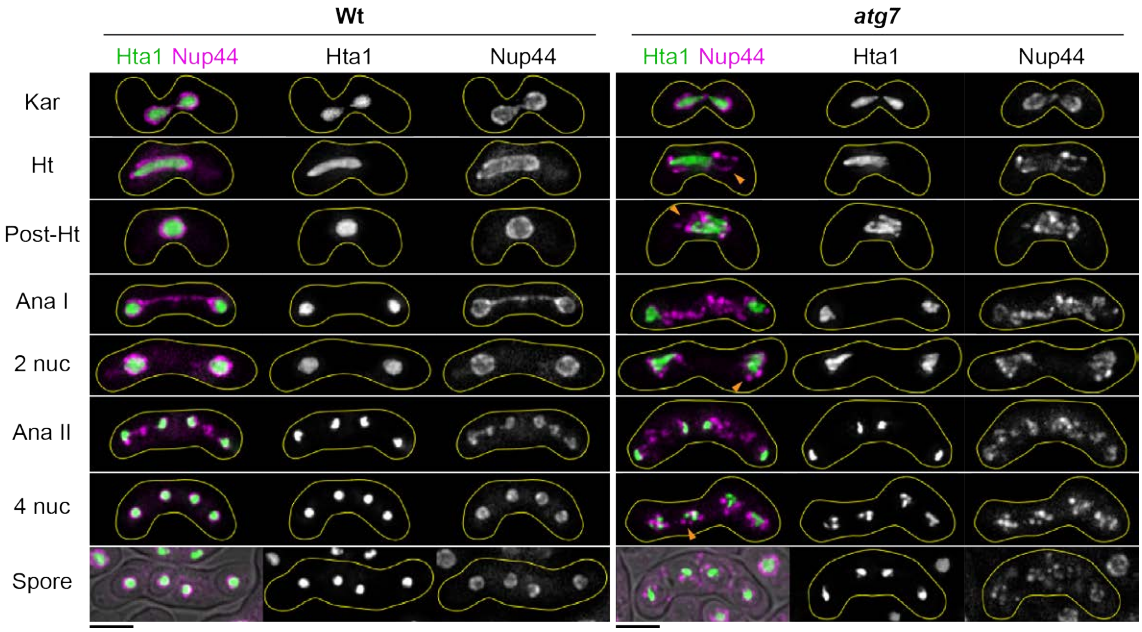


図 13　野生株とオートファジー変異株における染色体と核膜の形状

染色体は GFP タグを融合した Hta1、核膜は mCherry タグを融合した核膜孔因子 Nup44 でそれぞれ可視化した。写真は減数分裂の進行順に、Kar:核融合、Ht:ホーステール核運動、Post-Ht:ホーステール後、Ana I:第一分裂 anaphase、2 nuc:第一分裂後、Ana II:第二分裂 anaphase、4 nuc:第二分裂後、Spore:胞子形成、の各時期に分けて表示した。橙色の矢頭は染色体から離れた核膜を示す。スケールバー:5μm。

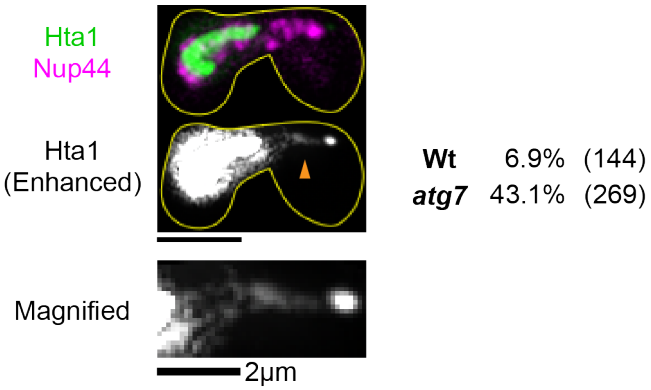


図 14　糸状に伸びた染色体

橙色の矢頭は糸状に伸びた染色体を示す。写真の矢頭が指す部分は拡大して下に表示した。百分率はホーステール核運動期における糸状染色体の出現割合を表す。()内は解析に用いた細胞の数。スケールバー:特記のないものは 5μm。

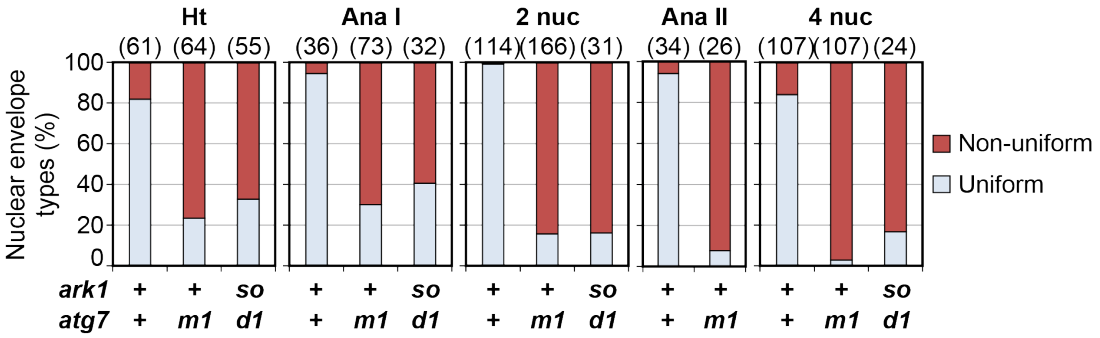


図 15　オートファジー変異株の核膜形態

減数分裂中の各時期(グラフの上に表記)において、核膜が染色体の周囲を均一に囲っている細胞(均一)と、核膜が均一に囲っていないか、もしくは染色体から離れている細胞(不均一)の割合を示した。+:当該遺伝子に変異なし、*m1*:*atg7-m1*、*d1*:*atg7-d1*、*so*:*ark1-so*。()内は解析に用いた細胞の数。

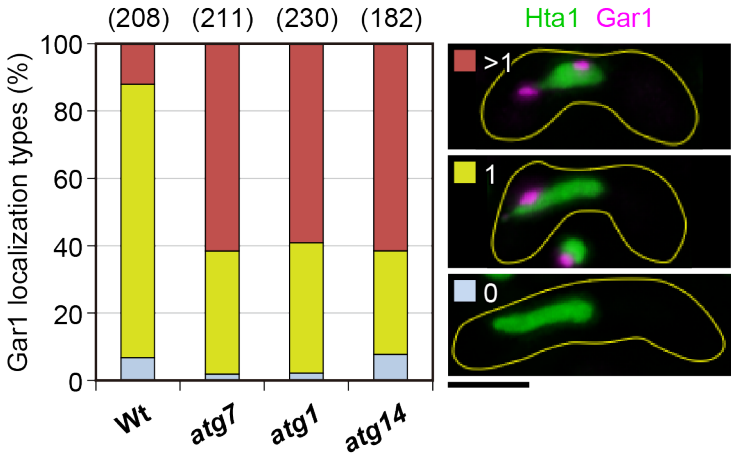


図 16　ホーステール核運動期における Gar1 の局在

Hta1-GFP を発現する細胞に mCherry を融合した Gar1 を導入し、ME 寒天培地で減数分裂を誘導した。この細胞のホーステール核運動期において、Gar1 局在点の数に応じて細胞を分類した。()内は解析に用いた細胞の数。スケールバー: 5μm。

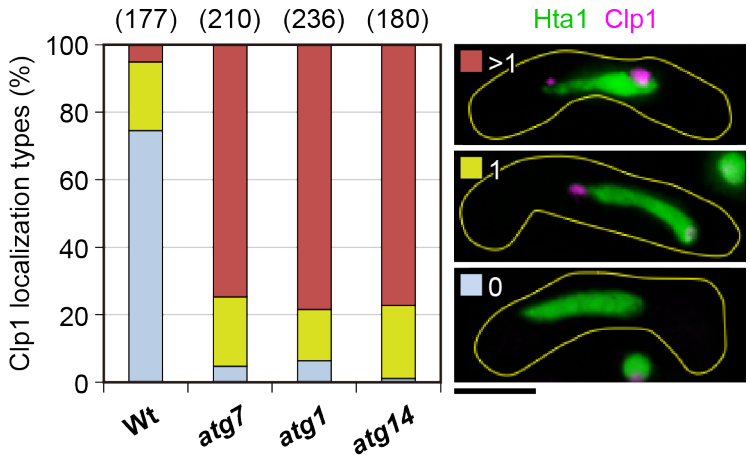


図 17　ホーステール核運動期における Clp1 の局在

Hta1-GFP を発現する細胞に mCherry を融合した Clp1 を導入し、ME 寒天培地で減数分裂を誘導した。この細胞のホーステール核運動期において Clp1 の局在点の数に応じて細胞を分類した。()内は解析に用いた細胞の数。スケールバー: 5μm。

オートファジー変異株は減数分裂の進行に窒素源を必要とする

オートファジー変異株は減数分裂の開始に窒素源が必要であることが報告されている(Mukaiyama et al., 2009)。しかし、窒素源が減数分裂の開始に加え進行中にも必要なのかは不明であった。そこでオートファジー変異株が減数分裂の進行中にも窒素源を必要とするのかを検証した。分裂酵母では接合型の異なる 2 つの一倍体細胞が接合し減数分裂が開始する。オートファジー欠損株は窒素源枯渇下では接合ができないためオートファジー変異株が接合した後に窒素源枯渇下に移し、減数分裂進行中の窒素源の必要性を評価した。窒素源枯渇下に移すと、野生株では 2 回の減数分裂が起きたが、変異株では分裂が起こらなかった(図 18)。この結果はオートファジー変異株が減数分裂の開始だけでなく、進行にも窒素源を必要とすることを示している。

さらに減数分裂のどの過程において窒素源が必要であるかを調べるために、減数分裂を同調的に誘導し、解析を行った。細胞は窒素源枯渇条件に移すと G1 期で停止し、細胞周期の同調ができる。また *pat1-114* 変異アレルを持つ温度感受性株は制限温度に近い高温条件（34℃）で培養すると減数分裂が誘導される(Iino & Yamamoto, 1985)。これらを利用し、*pat1-114* 変異株の一倍体細胞を許容温度（25℃）で窒素源枯渇下におき培養して G1 期に同調し、その後、窒素源存在下において高温で培養することによって減数分裂を同調的に誘導した。減数分裂が進行した後、適当な時間において窒素源枯渇条件に移して培養を続け減数分裂の進行を解析した(図 19)。オートファジーに変異のない *pat1-114* 変異株は窒素源の有無にかかわらず減数分裂は進行した(図 20,図 21)。*atg7-m1 pat1-114* 二重変異株は窒素源存在下において高温で培養すると減数分裂が進行したが(図 22)、窒素源枯渇下においてほとんどの細胞は G1 期で停止せず、G2 期で停止した(図 23)(Kohda et al., 2007)。一方で、窒素源枯渇下で高温に移した場合、もしくは、DNA 複製の終わったタイミングで窒素源枯渇条件に移した場合には減数分裂が進行しなかった(図 22, −N and −N at 2 h)。一方、第一分裂または第二分裂の直前で窒素源を枯渇させた場合には、いくらかの細胞で枯渇直後の分裂は進行した(図 22, −N at 3 h and −N at 4 h)。これらの結果から *atg7* 変異株では第一分裂および第二分裂のそれぞれの進行には、それぞれの分裂前の特定の時期に窒素源が必要であることが示唆された。

分裂期の進行はサイクリン依存性キナーゼ (cyclin-dependent kinase: CDK) の活性により制御されている。分裂酵母の CDK である Cdc2 の活性化には M 期サイクリンである Cdc13 の蓄積や、Cdc25 フォスファターゼによる Cdc2 の 15 番目のチロシン残基の脱リン酸化が重要である。オートファジー変異株において減数分裂の進行が停止する原因を明らかにするために、これら Cdc2 や Cdc2 の制御因子の状態や量の変化をウェスタンブロットで調べた。オートファジーに

変異のない株では核の分裂前に Cdc13 が次第に蓄積し、核の分裂時には Cdc25 が一時的に蓄積するとともにリン酸化型の Cdc2 が消失した(図 24)。*atg7* 変異株でも窒素源存在下では同様の変化が見られた。しかし、減数分裂進行中に窒素源枯渇下に移し減数分裂の進行が停止する場合には、Cdc25 が蓄積せず Cdc2 のリン酸化は維持されていた(図 24, *atg7-d1 pat1-114*, −N at 3 h)。これらの結果から、Cdc25 の蓄積が起こらないことが、*atg7* 変異株で見られた減数分裂の進行停止の一因である可能性が示唆された。

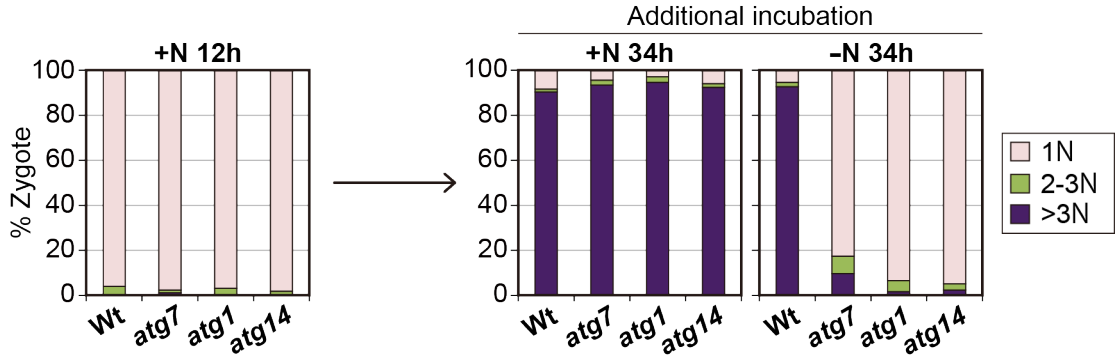


図 18　通常の減数分裂における窒素源枯渇の影響

接合した細胞(zygote)を ME 寒天培地(窒素源存在条件に該当する、図中:+N)で 12 時間培養し、その後、この細胞の一部を EMM-N 寒天培地(窒素源枯渇条件に該当する、図中:-N)に移し、追加で 34 時間の培養を行った。これらの細胞をグラフ上に表記した経過時間で観察し、細胞内の核の数を Hta1-GFP により測定した。1N:減数分裂前期/核分裂前、2-3N:第一分裂後、>3N:第二分裂後。

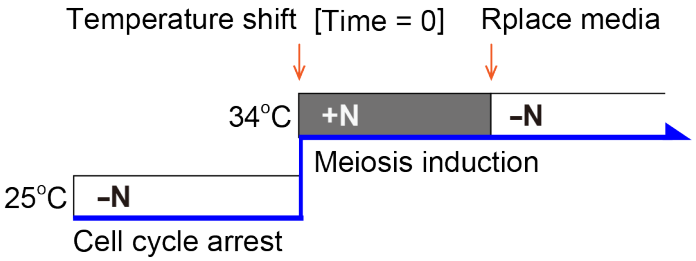


図 19　減数分裂の進行中における窒素源枯渇の影響を評価する実験のスキーム

一倍体の *pat1-114* 温度感受性変異を持つ細胞を 25℃の EMM-N 培地で培養して細胞周期を同調し、その後、細胞を 34℃に移して減数分裂を誘導する。この温度シフト時に細胞を少量の窒素源(塩化アンモニウム)を添加した EMM+1/10N 培地に交換し、減数分裂をある程度進行させた後、細胞を EMM-N 培地に移して窒素源枯渇の影響を調べる。

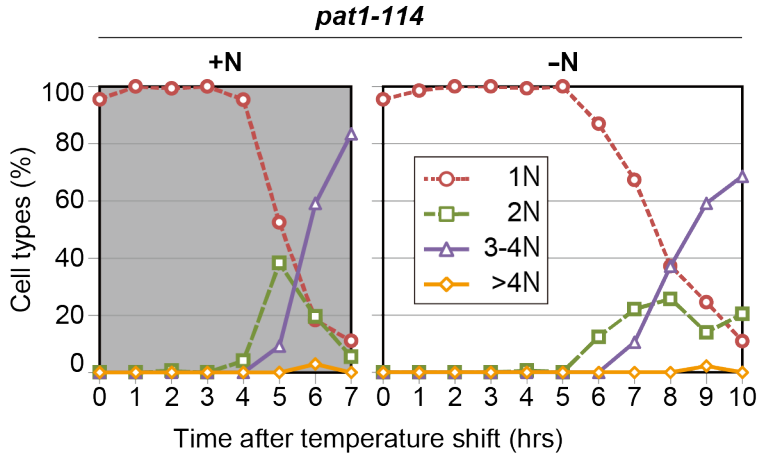


図 20　*pat1-114* 変異株の減数分裂進行

グラフ中の灰色領域は窒素源の存在を示す。1N:減数分裂前減数分裂前期、2N:第一分裂後、3-4N:第二分裂後、>4N:多数核化。

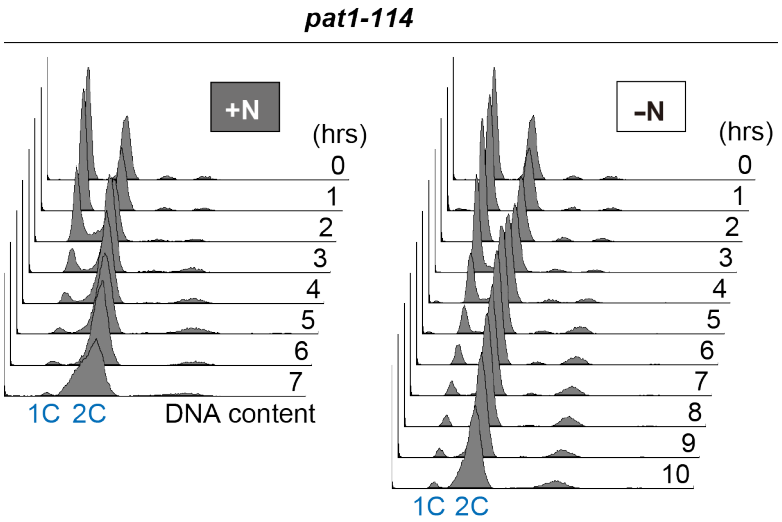


図 21　*pat1-114* 変異株の減数分裂進行中の DNA 含量

フローサイトメトリー解析により減数分裂誘導後の細胞の DNA 含量を測定し、ヒストグラムで表示した。1C:一倍体相当の DNA 量(G1 期)、2C:二倍体相当の DNA 量(減数分裂前 S 期完了/減数分裂中)。

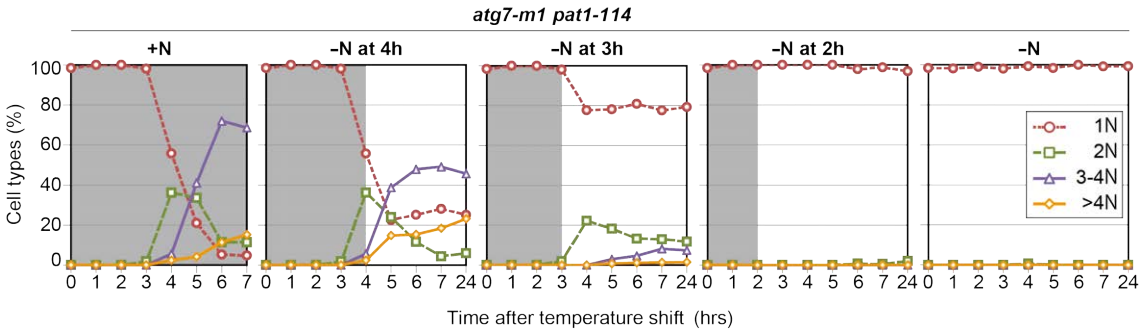


図 22　*atg7-m1 pat1-114* 変異株の減数分裂進行

グラフ中の灰色領域は窒素源の存在を示す。1N:減数分裂前減数分裂前期、2N:第一分裂後、3-4N:第二分裂後、>4N:多数核化。

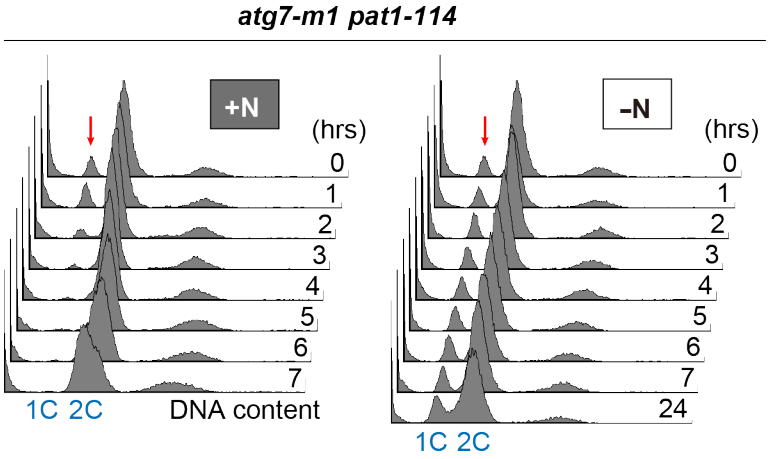


図 23　*atg7-m1 pat1-114* 変異株の減数分裂進行中の DNA 含量

フローサイトメトリー解析により減数分裂誘導後の細胞の DNA 含量を測定し、ヒストグラムで表示した。1C:一倍体相当の DNA 量(G1 期)、2C:二倍体相当の DNA 量(減数分裂前 S 期完了/減数分裂中)。赤矢印は G1 期に同調された細胞を示す。

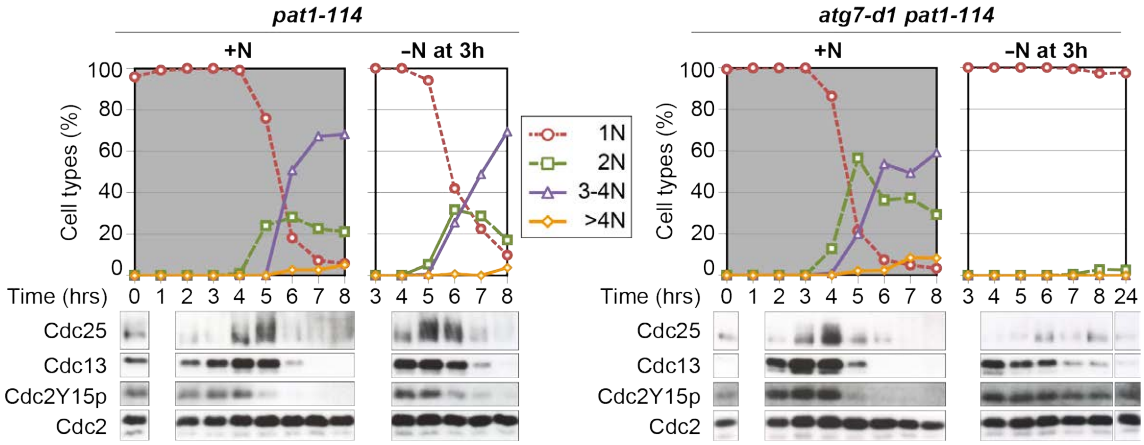


図 24　減数分裂における細胞周期制御因子のタンパク質量とリン酸化修飾度合

HA タグを融合した Cdc25 を発現する *pat1-114* 変異細胞を減数分裂に誘導し、細胞周期制御因子のタンパク質量やリン酸化修飾度合をウェスタンブロットにより解析した。Cdc2Y15p:15 番目のチロシンがリン酸化された Cdc2。Cdc25 は抗 HA 抗体、Cdc13 は抗 Cdc13 抗体、Cdc2Y15p は抗 phospho-cdc2(Tyr15)抗体、Cdc2 は抗 PSTAIR 抗体でそれぞれ検出した。グラフ中の灰色領域は窒素源の存在を示す。1N:減数分裂前減数分裂前期、2N:第一分裂後、3-4N:第二分裂後、>4N:多数核化。

オートファジー変異株は減数分裂の進行に遅れが見られる

窒素源存在下および窒素源枯渇下におけるオートファジー変異株の減数分裂の進行をより詳細に解析するために、微小管と染色体の動態を生細胞で解析した(図 25)。野生株では減数第一分裂の核分裂前に、ホーステール核運動が起こり、その後の核が細胞の中心にとどまる(図 26)。ホーステール核運動は核の先端にあるスピンドル極体（Spindle pole body : SPB）が引っ張られて起こる。*atg7* 変異株ではホーステール核運動時に糸状に伸びた染色体が見られた(図 14)が、核の先端の形状には野生株との違いが見られなかったため、少なくともこの伸びた染色体は SPB が染色体を引っ張ることによって起きているのではないと考えられた。また、*atg7* 変異株では野生株と比較してホーステール運動後の核が分裂せずに細胞の中心に留まっている時期が長かった(図 27,図 28)。このことは *atg7* 変異株では、第一分裂の開始に遅れが生じていることを示している。

さらに第一分裂の進行にも遅れが見られた。分裂酵母では核分裂時のスピンドルの伸長は 3 つのフェーズに分けられる。フェーズ 1 ではスピンドルが形成され、フェーズ 2 でスピンドルの長さが一定になり、フェーズ 3 で伸長する(図 26, 図 29) (Nabeshima et al., 1998; Yamamoto et al., 2008)。フェーズ 2 とフェーズ 3 はそれぞれ高等真核生物の分裂中期(prometaphase/metaphase)と分裂後期(anaphase)に相当する。*atg7* 変異株では第一分裂のフェーズ 2 とフェーズ 3 の時間が延びており、第一分裂の anaphase の開始と終了が遅れていた(図 30,図 31,+N)。さらに、フェーズ 2 とフェーズ 3 の時間は窒素源枯渇下ではさらに長くなり、anaphase の開始を終了はさらに遅れていた(図 30,図 31,-N)。これらの結果から、オートファジーの欠損があると窒素源存在下でも減数第一分裂の開始と進行が遅れ、窒素源枯渇下ではさらに大きな遅れが生じることがわかった。一方で第二分裂では、*atg7* 変異株は窒素源枯渇下で第一分裂と第二分裂の間の時間（スピンドル崩壊からスピンドル形成までの時間）が延びており、第二分裂の開始にも遅れがみられた(図 32)。さらに、*atg7* 変異株の第二分裂では anaphase の開始と終了にも遅れが見られたが、第二分裂の anaphase の終了の遅れは窒素源枯渇下でのみ認められた(図 33,図 34)。これらすべての結果は、オートファジーが減数分裂の進行に関与することを示している。

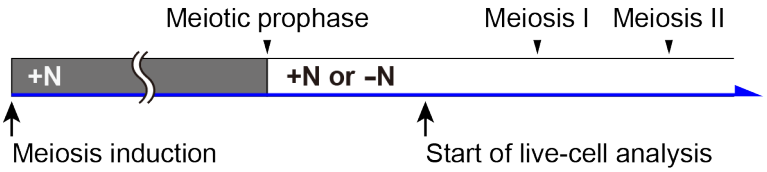


図 25　染色体とスピンドルの動態を解析する実験のスキーム

細胞を ME 寒天培地で培養して減数分裂に誘導し、減数分裂前期の細胞を EMM+1/10N 液体培地(+N)または EMM-N 液体培地(-N)に移し、染色体(Hta1)と微小管/スピンドル(Atb2)の動態を生細胞中で観察した。また、この論文における生細胞観察はすべて同様の手法で行っている。

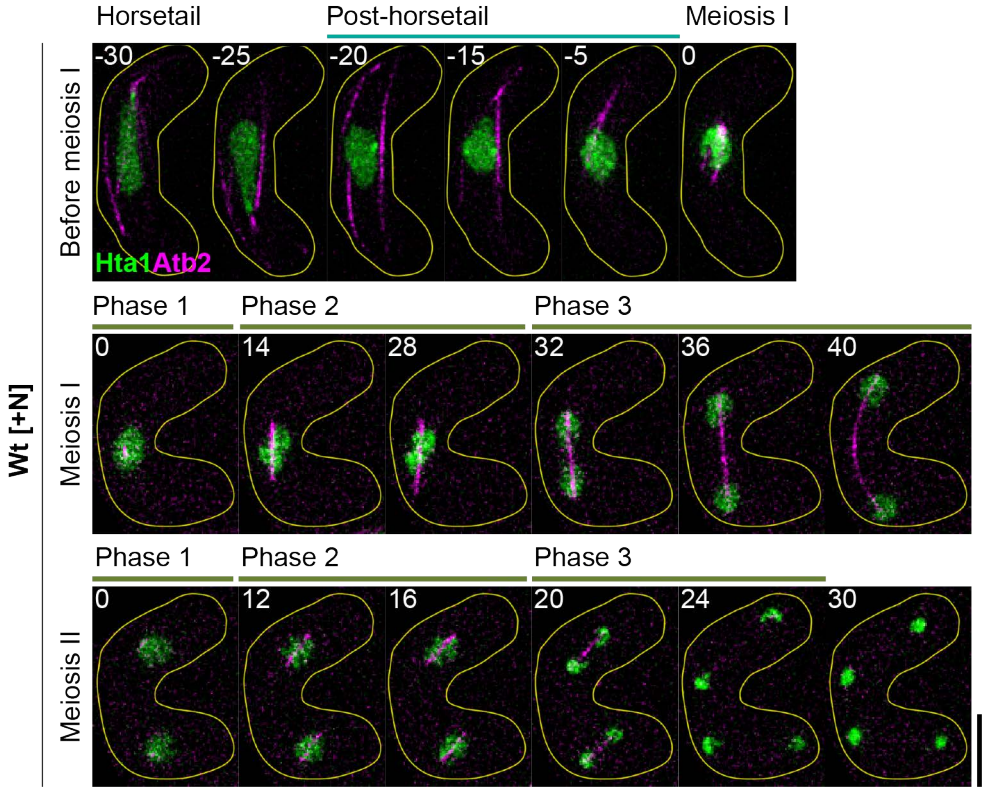


図 26　野生株の減数分裂における染色体とスピンドルの動態

Hta1-GFP と mCherry-Atb2 を発現する細胞を減数分裂に誘導し、生細胞中で染色体とスピンドルの動態を解析した。写真中の数字はスピンドル形成からの時間(min)を表す。スケールバー: 5μm。

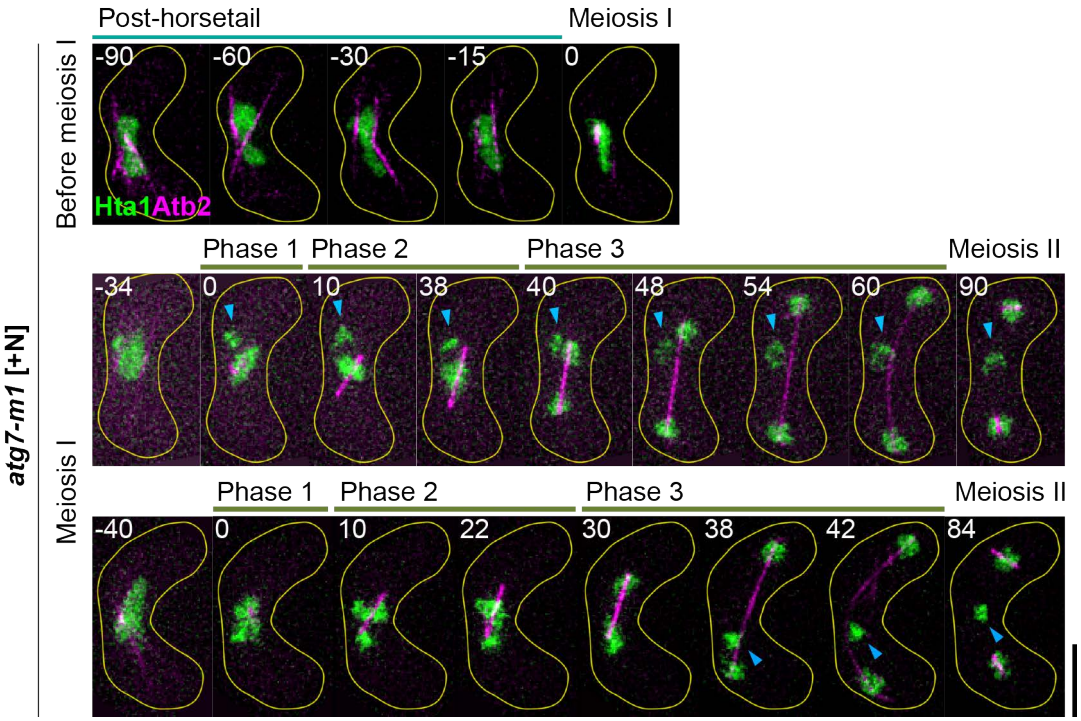


図 27　*atg7-m1* 変異株の減数分裂における染色体とスピンドルの動態

Hta1-GFP と mCherry-Atb2 を発現する細胞を減数分裂に誘導し、生細胞中で染色体とスピンドルの動態を解析した。写真中の数字はスピンドル形成からの時間(min)を表す。第一分裂の写真は 2 つの異なる細胞で、上の写真では anaphase の前に、下の写真では anaphase の後に、スピンドルから脱落した染色体(青色の矢頭)が見られた。スケールバー: 5μm。

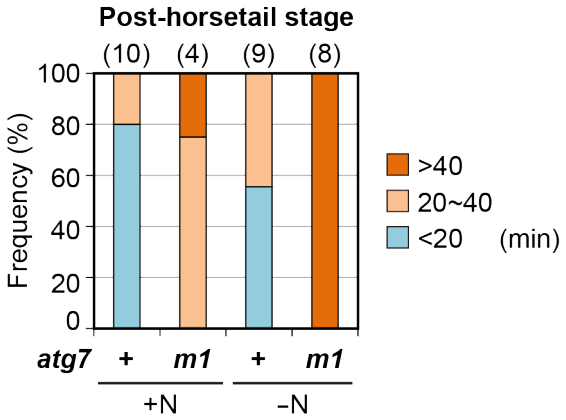


図 28　ホーステール後の時間

GFP-Atb2 を発現する細胞を減数分裂に誘導し、生細胞中でホーステール核運動の終了からスピンドル形成の開始までの時間を計測した。+:当該遺伝子に変異なし、*m1*:*atg7-m1*、+N:窒素源添加培地(EMM+1/10N)で計測、-N:窒素源枯渇培地(EMM-N)で計測。()内は解析に用いた細胞の数。

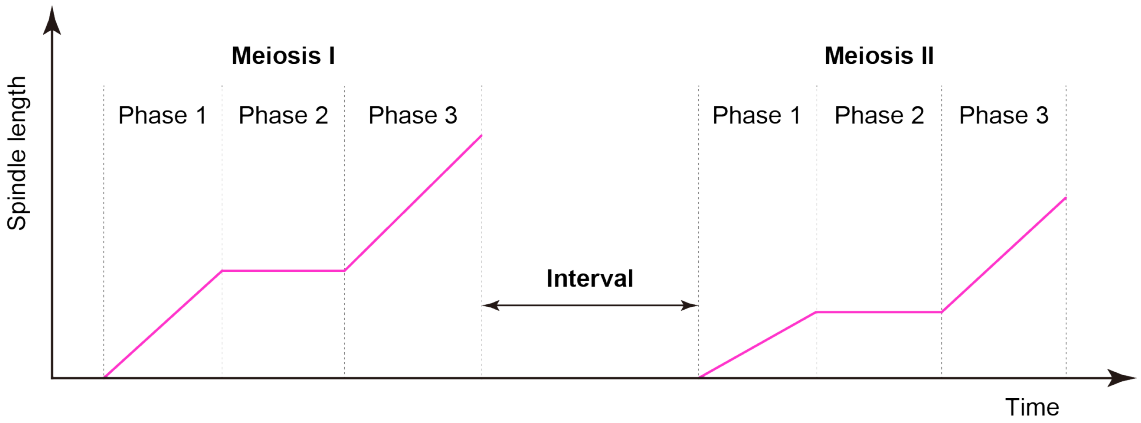


図 29　減数分裂におけるスピンドル長の変化の模式図

紫色の線はスピンドル長を表す。

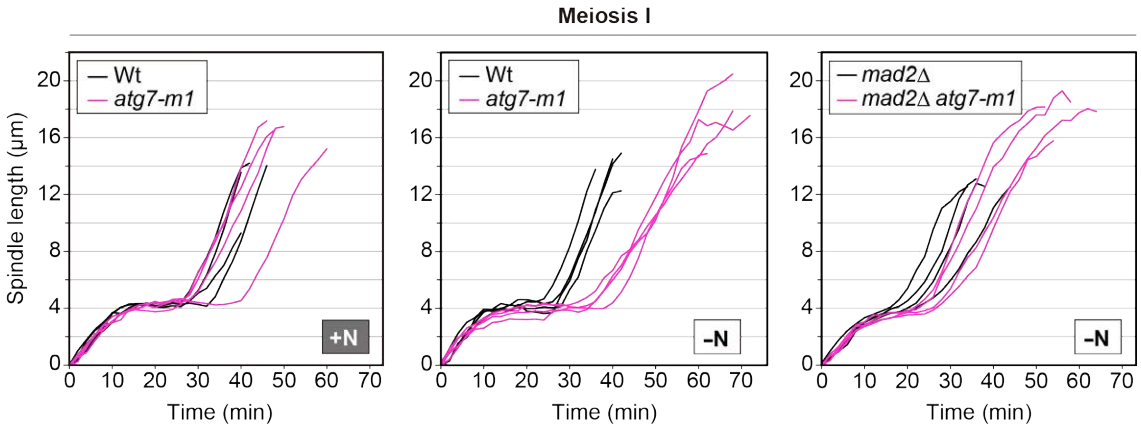


図 30　減数第一分裂におけるスピンドル長の変化

GFP-Atb2 を発現する細胞を減数分裂に誘導し、生細胞中で減数第一分裂のスピンドル長の変化を解析した。+N:窒素源添加培地(EMM+1/10N)で解析、-N:窒素源枯渇培地(EMM-N)で解析。

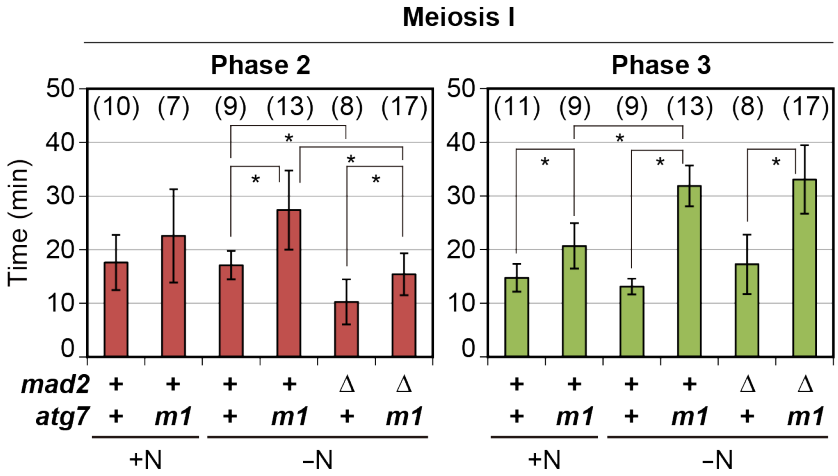


図 31　減数第一分裂のフェーズ 2 およびフェーズ 3 の時間

GFP-Atb2 を発現する細胞を減数分裂に誘導し、生細胞中でスピンドルの動態を解析し、減数分裂の進行を調べた。+:当該遺伝子に変異なし、*m1*:*atg7-m1*、Δ:*mad2*Δ、+N:窒素源添加培地(EMM+1/10N)で解析、-N:窒素源枯渇培地(EMM-N)で解析。()内は解析に用いた細胞の数。*は、1 つの変異を導入または窒素源枯渇条件へ変更した場合に平均値に有意な差が生じた(*Student*'s t-test による比較で *p* 値が 0.05 より小さい)ことを示す。

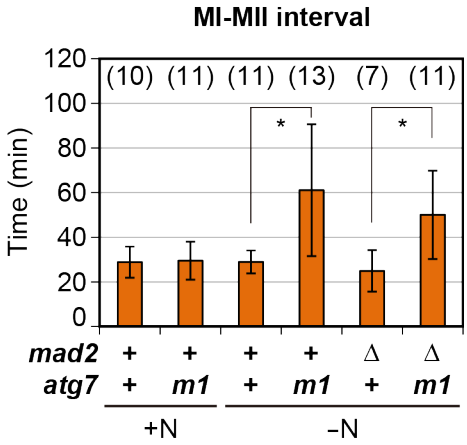


図 32　減数第一分裂と第二分裂の間の時間（インターバル）

GFP-Atb2 を発現する細胞を減数分裂に誘導し、生細胞中でスピンドルの動態を解析し、減数第一分裂と第二分裂のインターバルを調べた。+:当該遺伝子に変異なし、*m1*:*atg7-m1*、Δ:*mad2*Δ、+N:窒素源添加培地(EMM+1/10N)で解析、-N:窒素源枯渇培地(EMM-N)で解析。()内は解析に用いた細胞の数。*は、1 つの変異を導入または窒素源枯渇条件へ変更した場合に平均値に有意な差が生じた(*Student*'s t-test による比較で *p* 値が 0.05 より小さい)ことを示す。

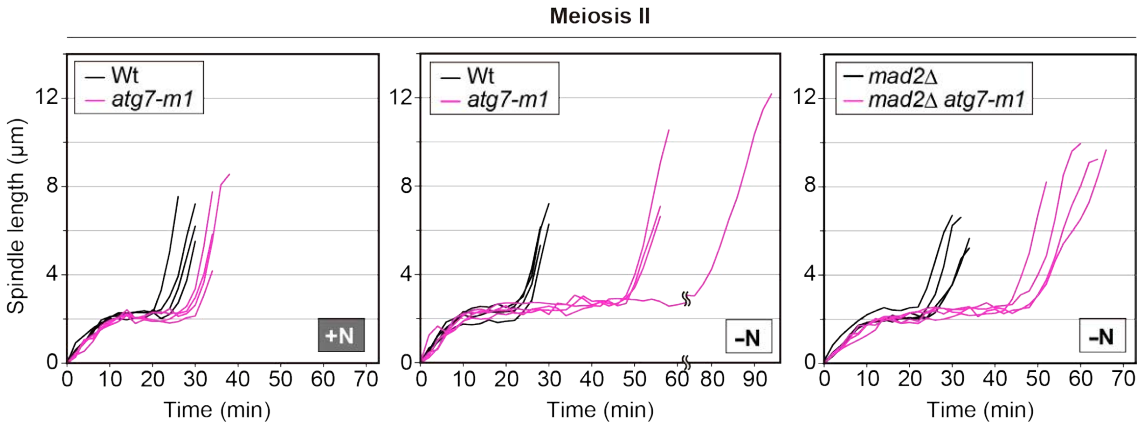


図 33　減数第二分裂におけるスピンドル長の変化

GFP-Atb2 を発現する細胞を減数分裂に誘導し、生細胞中で減数第二分裂のスピンドル長の変化を解析した。+N:窒素源添加培地(EMM+1/10N)で解析、-N:窒素源枯渇培地(EMM-N)で解析。

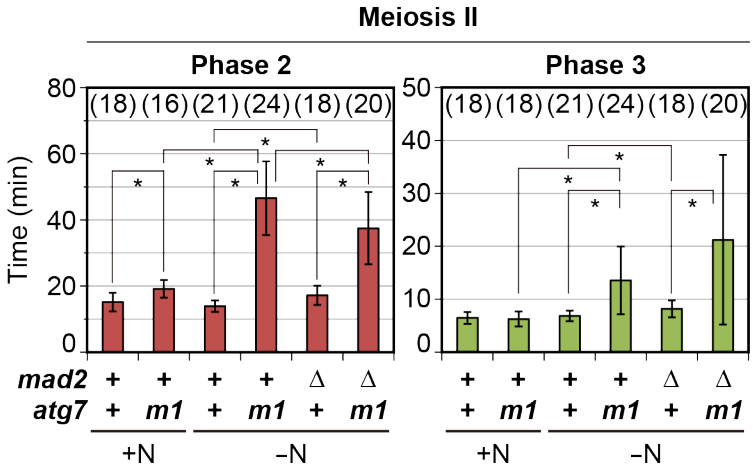


図 34　減数第二分裂のフェーズ 2 およびフェーズ 3 の時間

GFP-Atb2 を発現する細胞を減数分裂に誘導し、生細胞中でスピンドルの動態を解析し、減数分裂の進行を調べた。+:当該遺伝子に変異なし、*m1*:*atg7-m1*、Δ:*mad2*Δ、+N:窒素源添加培地(EMM+1/10N)で解析、-N:窒素源枯渇培地(EMM-N)で解析。()内は解析に用いた細胞の数。*は、1 つの変異を導入または窒素源枯渇条件へ変更した場合に平均値に有意な差が生じた(*Student*'s t-test による比較で *p* 値が 0.05 より小さい)ことを示す。

オートファジー変異株は減数分裂において染色体分配異常を起こす

得られた全ての変異株は減数分裂期の核分裂の進行の遅れに加えて、減数第一分裂において染色体分配異常を示した。変異株では、減数第一分裂において染色体の一部がある頻度でスピンドルから遊離し、anaphase においてスピンドルから脱落する異常が見られ(図 27,図 35)、減数分裂完了時には通常よりも多数の核が形成された(図 36)。このことは、変異株では減数第一分裂において染色体とスピンドルとの結合に異常が生じていることを示している。一方、第一分裂では相同染色体が分配され、第二分裂では姉妹染色体分配が分配されるが、変異株ではこれらの分配は正常で(図 37)、染色体の脱落以外には異常がなかった。このことから、変異株ではおそらく減数第一分裂において染色体が脱落することにより減数分裂完了時に多数の核が形成されると考えられた。

減数分裂では相同組換えによってキアズマと呼ばれる相同染色体の交差構造が形成され、このキアズマ形成が阻害されると第一分裂において染色体とスピンドルとの結合に異常が生じる。キアズマ形成はテロメア集合によって相同染色体が対合することによって起こるが、オートファジー変異株ではこのテロメア集合に異常は見られなかった(図 38)。また、キアズマを生み出す減数分裂期の相同組換えが野生株と同等の頻度で起きていた(図 39)。これらの結果はオートファジー変異株ではキアズマの形成に異常がないことを示している。そのため、オートファジー変異株における減数分裂期での染色体の脱落は、キアズマ形成の異常によるものではないと考えられた。

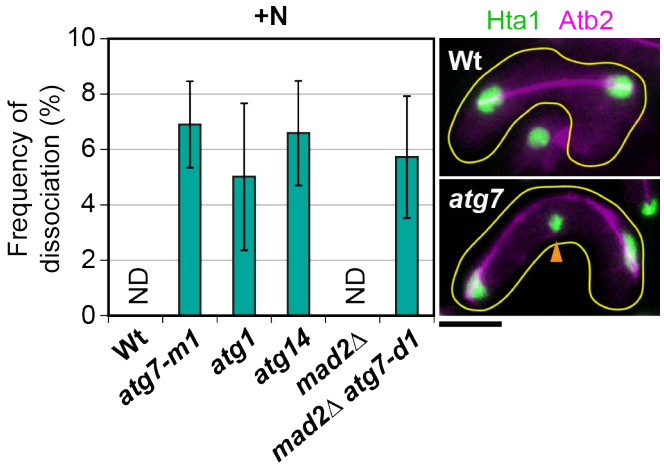


図 35　減数第一分裂 anaphase における染色体の脱落頻度

Hta1-GFP と mCherry-Atb2 を発現する細胞を ME 寒天培地(窒素源源存在下:+N)上で減数分裂に誘導し、第一分裂 anaphase においてスピンドルから離れた染色体が見られた細胞の割合を示した。写真は第一分裂 anaphase の細胞中の染色体(Hta1-GFP)とスピンドル(mCherry-Atb2)を示し、橙色の矢頭はスピンドルから脱落した染色体を示す。ND:not detected。

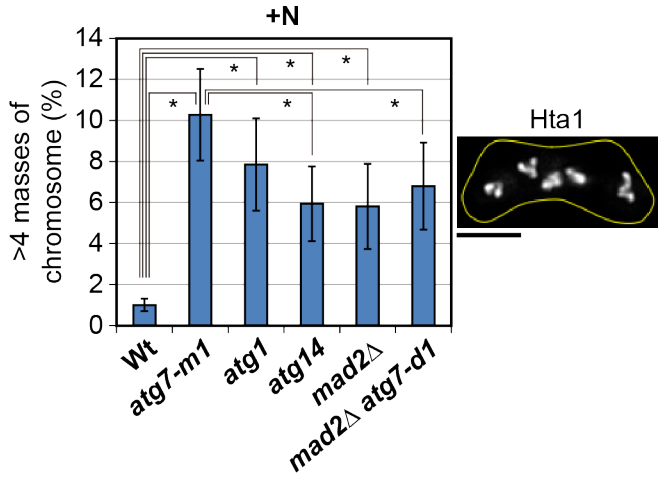


図 36　減数分裂完了後に通常よりも多数の核を持つ細胞の割合

Hta1-GFP と mCherry-Atb2 を発現する細胞を ME 寒天培地上で胞子形成させ、4 よりも多くの核を持つ細胞の割合を示した。写真は 5 つの核が見られた細胞。* は、平均値に有意な差がある(*Student*'s t-test による比較で *p* 値が 0.05 より小さい)ことを示す。

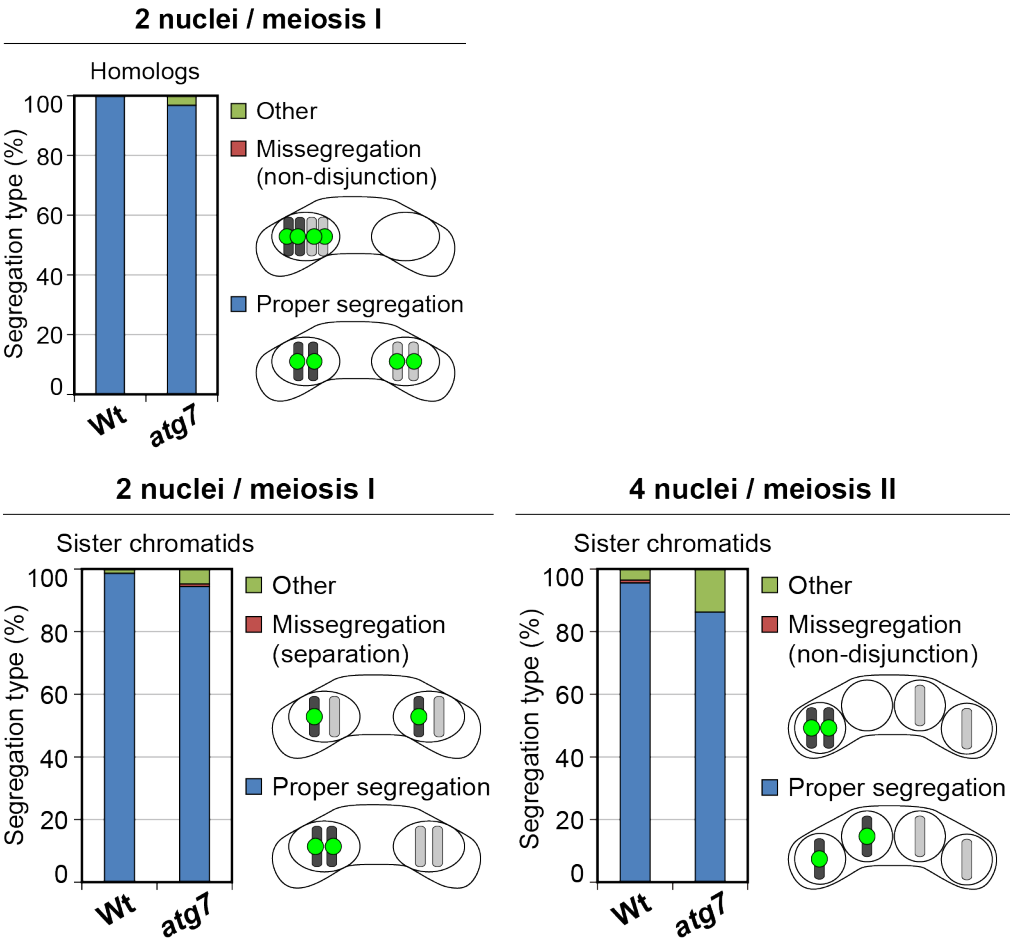
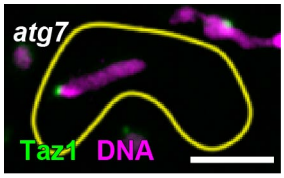


図 37　野生株とオートファジー変異株の減数分裂における染色体分配パターン

第二染色体セントロメアの近傍を可視化し、減数分裂における染色体の分配パターンを解析した。相同染色体の分配パターンは相同染色体の両方を可視化し、姉妹染色分体の分配パターンは相同染色体の片方を可視化して分配を解析した。解析にはそれぞれ 100 以上の細胞を用いた。



100% (50)

図 38　*atg7* 変異株の減数分裂におけるテロメアの集合頻度

テロメア DNA 結合タンパク質である Taz1 を GFP で可視化しホーステール核運動期におけるテロメアの集合頻度を解析した。DNA は Hoechst33342 で染色した。百分率は、Taz1 が 1 か所に局在していた細胞の割合、()内は解析に用いた細胞数。

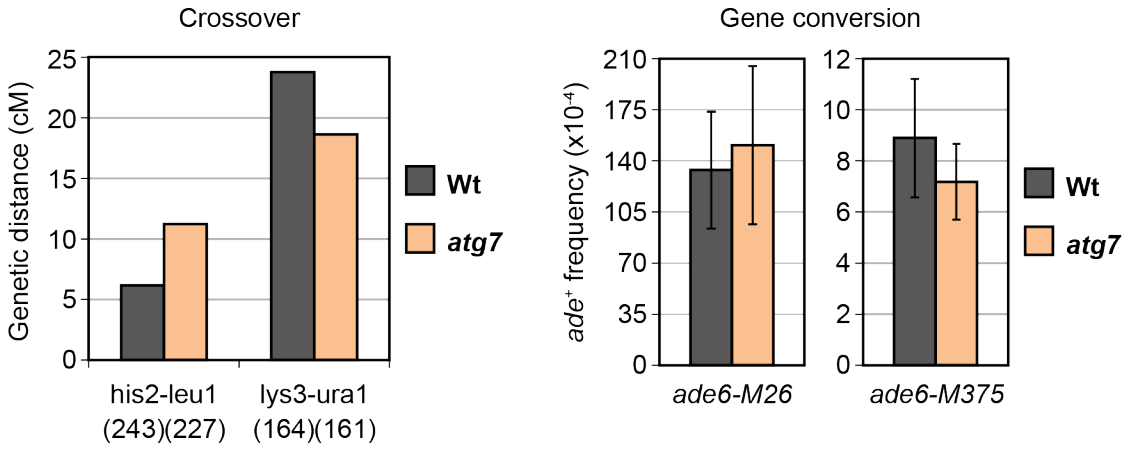


図 39　野生株と *atg7* 変異株の減数分裂における相同染色体の組換え頻度

相同染色体の組換え頻度を 2 つの異なる組換え過程であるCrossoverおよびGene conversionについて調べた。Crossoverは 2 つの遺伝子座の間で起こる相同組換えで、相同染色体間で遺伝子の乗換えが起こる頻度で組換え頻度を評価する。この組換え頻度は遺伝学的距離で表され、単位にはM(モルガン)が使われる。1Mは、1 回の減数分裂につき 2 つの遺伝子座の間において 1 回の組換えが期待される遺伝子座の距離である。ここでは第二染色体の*his2*$^{+}$遺伝子と*leu1*$^{+}$遺伝子、および第一染色体の*lys3*$^{+}$遺伝子と*ura1*$^{+}$遺伝子の乗換えを調べた。()内の数字は、組換え頻度の評価に用いた接合子(二倍体細胞)の数を表す。Gene conversionは相同染色体の片側の遺伝子座にあるDNAを鋳型として同一遺伝子座にある他方のDNAを修復するもので、遺伝子の修復頻度で組換え頻度を評価する。*ade6-M26* 変異および*ade6-M375* 変異はどちらも*ade6*$^{+}$遺伝子に 1 箇所の変異があり、*ade6-M26* は特に組換えの起こりやすいDNA配列を有する。エラーバーは標準偏差を示す。

オートファジー変異株はスピンドルの動態に異常が見られる

生細胞観察を行い詳細な解析を行うと、オートファジーの欠損によってスピンドルの伸長や形成の制御にも影響が表れることが明らかになった。*atg7* 変異株では anaphase にスピンドルの過剰な伸長が起こり(図 40)、スピンドルの最大長に顕著な増加が見られ、第二分裂では 2 本のスピンドルが交差することもあった(図 41)。さらに、第二分裂後にはスピンドル様の構造体が形成されることがしばしば見られ(図 42)、この表現型は減数分裂の anaphase の制御に異常のある変異株で報告されている第三分裂のようなスピンドル形成とよく似ていた(Aoi et al., 2013)。これらの観察結果は、オートファジーの機能が正常なスピンドルの制御に必要であることを示している。

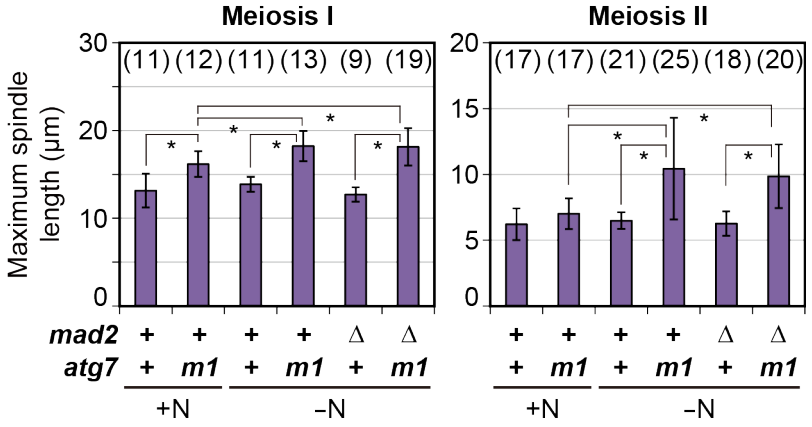


図 40　減数第一分裂および第二分裂におけるスピンドルの最大長

GFP-Atb2 を発現する細胞を減数分裂に誘導し、第一分裂および第二分裂におけるスピンドルの最大長を計測した。()内は計測したスピンドルの数を、エラーバーは標準偏差を表す。*は、1 つの変異を導入または窒素源枯渇条件へ変更した場合に平均値に有意な差が生じた(*Student*'s t-test による比較で *p* 値が 0.05 より小さい)ことを示す。+: 当該遺伝子に変異なし、*m1*:*atg7-m1*、Δ:*mad2*Δ、+N: EMM+1/10N で解析、-N: EMM-N で解析。

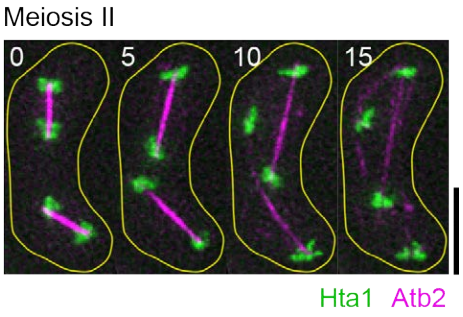
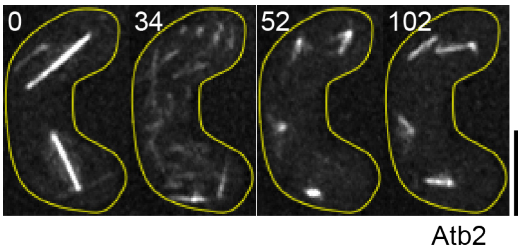


図 41　*atg7* 変異株の第二分裂で見られたスピンドルの交差

Hta1-GFP と mCherry-Atb2 を発現する細胞を減数分裂に誘導し、生細胞中で染色体とスピンドルの動態を解析した。写真中の数字は時間(min)を表す。



Strain	3rd spindle formation (%)	
Wt	0.0	(10)
atg7-m1	23.1	(13)
Wt [+N]	0.0	(9)
***atg7-m1* [+N]**	0.0	(8)
***mad2*Δ**	0.0	(9)
mad2*Δ *atg7-m1	30.0	(10)
ark1-so	11.1	(9)
ark1-so atg7-d1	23.1	(13)

図 42　第三分裂様のスピンドル形成

GFP-Atb2 を発現する細胞を減数分裂に誘導し、第二分裂の終了後にスピンドル様の構造体を形成した細胞の割合を測定した。写真は第二分裂後にスピンドル様の構造が形成される様子を示した。写真中の数字は時間(min)を表す。()内は解析に用いた細胞の数。

スピンドルチェックポイントがオートファジー変異株における anaphase 開始を遅らせている

染色体とスピンドルとの結合に異常が生じると SAC がこれを感知し anaphase の開始を遅延させることが知られている。オートファジー変異株では第一分裂で染色体がスピンドルから脱落する異常が見られたことから、変異株における第一分裂の anaphase の開始の遅れが SAC の働きによるものかどうかを調べた。SAC の因子である Mad2 を欠損させて SAC の働きをなくすと、第一分裂のフェーズ 2 が大きく短縮された(図 30,図 31)。このことは、オートファジー変異株における第一分裂の anaphase の開始遅延は SAC の働きに大きく依存していることを示している。通常、SAC は anaphase 開始を遅らせて染色体とスピンドルとの間の誤った結合を修正する機会を増やすことによって、誤った結合を減らす働きをしている。実際に、Mad2 を欠損すると多数の核が形成される頻度が増加しており(図 36)、染色体とスピンドルとの結合異常が増加していることが示唆された。しかし、*atg7* 変異株では Mad2 を欠損させても染色体の脱落頻度や多数核の形成頻度は変化しなかった(図 35,図 36)。この結果は、*atg7* 変異によって引き起こされる染色体とスピンドルとの結合異常は、SAC による anaphase の開始遅延では十分に抑制できないことを示している。また、*atg7* 変異株では Mad2 の欠損により第二分裂の anaphase の開始遅延も若干軽減された(図 33,図 34,-N)。このことから、*atg7* 変異株では第二分裂において染色体分配異常は見られないものの、この株で見られる第二分裂の anaphase の開始遅延にも SAC がある程度寄与していることを示唆している。一方で、*atg7* 変異によって引き起こされた anaphase 終了の遅れや第二分裂の開始の遅れ(図 31,図 32,図 34)、スピンドルの過剰な伸長(図 40)は Mad2 の欠損では軽減されなかった。このことから、SAC はこれらの異常には関わっていないと考えられた。

オートファジー変異株ではセントロメア局在の Aurora キナーゼが増加する

分裂期には、Aurora キナーゼが染色体とスピンドルとの結合やスピンドルの伸長を制御している(図 5) (Carmena et al., 2012; Santaguida & Musacchio, 2009; Tanaka, 2010)。このことから、オートファジー変異株で見られた染色体のスピンドルからの脱落やスピンドルの過剰な伸長は Aurora キナーゼの異常によっておこる可能性が考えられた。この仮説を検証するために、分裂酵母の Aurora キナーゼである Ark1 の細胞内局在を解析した。以前に報告のある通り(Kawashima et al., 2007)、GFP を融合した Ark1 は減数第一分裂において prometa/metaphase の間はセントロメアに局在し、anaphase にはスピンドル全長もしくはスピンドルの中央領域(midzone)に局在した(図 43)。*atg7* 変異株でも Ark1 はほぼ同様の局在を示した(図 44)。しかし、セントロメアに局在する Ark1-GFP の最大蛍光強度が顕著に高くなっていた(図 45, 点局在)。このとき、細胞中のセントロメア局在を示す Ark1-GFP の点の数は野生株で 3.33 ± 1.12 点 (n = 9)、*atg7* 変異株では 3.88 ± 1.13 点 (n = 8)で目立った差異はなかった。このことは、Ark1 の蛍光強度の増加が、セントロメアの集合によるものではなく、セントロメアにおける Ark1 の局在量が増加したことによることを示している。一方で、*atg7* 変異株では細胞質における Ark1-GFP の蛍光強度は減少していた(図 45, 細胞質)。加えて、*pat1-114* 変異株で誘導した減数分裂において、オートファジーに変異のない *pat1-114* 変異株と *atg7-d1 pat1-114* 二重変異株には Ark1 の発現時期やタンパク質量に大きな差はみられなかった(図 46)。これらのことから、セントロメアにおける Ark1 の増加は、細胞内の Ark1 タンパク質量が増加したためではなく、本来細胞質に局在している Ark1 がセントロメアへと移行したことによると考えられた。

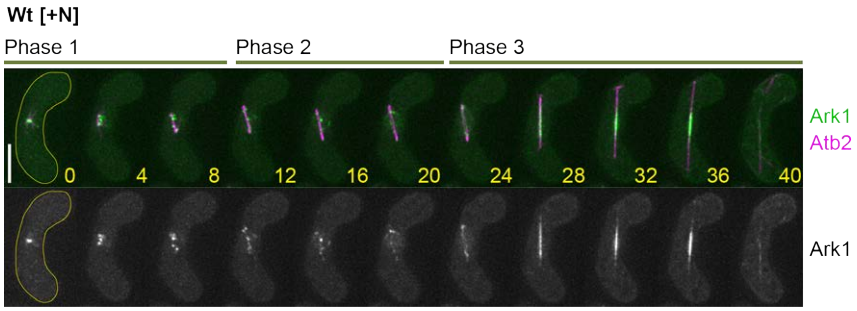


図 43　野生株の減数第一分裂におけるオーロラキナーゼと微小管の動態

GFP を融合した Ark1(Ark1-GFP)と mCherry を融合した Atb2(mCherry-Atb2)を同時に発現する細胞を減数分裂に誘導し、第一分裂におけるスピンドルおよび Ark1 の動態を生細胞で解析した。写真中の数字はスピンドル形成開始からの経過時間を表す。スケールバー:5μm。

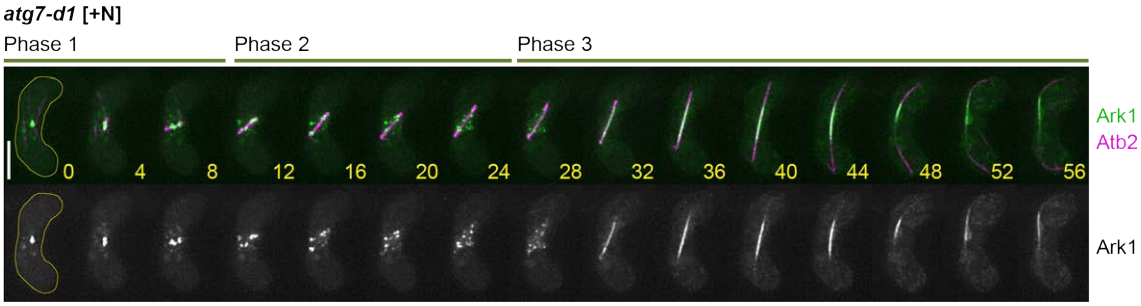


図 44　*atg7* 変異株の減数第一分裂におけるオーロラキナーゼと微小管の動態

Ark1-GFP と mCherry-Atb2 を同時に発現する *atg7* 変異株を減数分裂に誘導し、第一分裂におけるスピンドルおよび Ark1 の動態を生細胞で解析した。写真中の数字はスピンドル形成開始からの経過時間を表す。スケールバー:5μm。

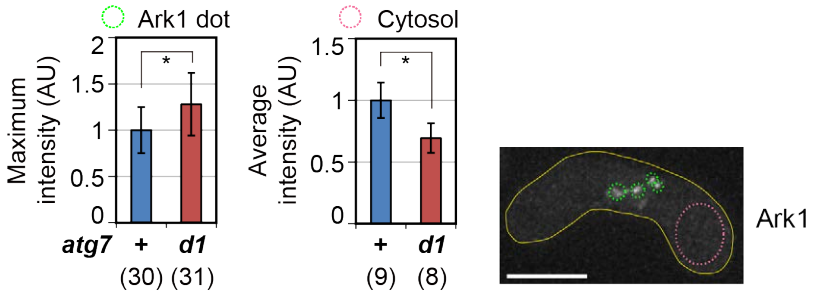


図 45　減数第一分裂におけるセントロメアおよび細胞質の Ark1 の局在量

Ark1-GFP と mCherry-Atb2 を発現する細胞を減数分裂に誘導し、減数第一分裂におけるセントロメアおよび細胞質の Ark1-GFP の蛍光輝度を測定した。蛍光輝度は野生株の平均値を 1 とする単位(AU)で示した。*は、*Student*'s t-test による比較を行い有意水準 0.1%で平均値に差があることを示す。+:当該遺伝子に変異なし、*d1*:*atg7-d1*。左のグラフの()内は解析に用いた点局在の数、右のグラフの()内は解析に用いた細胞の数を表す。スケールバー:5μm。

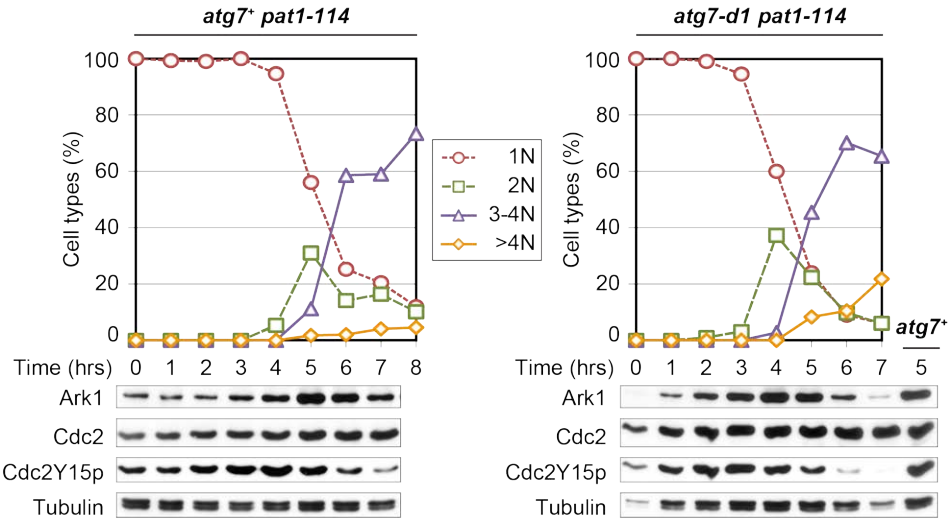


図 46　減数分裂における Ark1 のタンパク質量

GFPタグを融合したArk1 を発現する*pat1-114* 変異細胞をEMM+1/10N培地中で減数分裂に誘導し、タンパク質量やCdc2 のリン酸化修飾をウェスタンブロットにより解析した。*atg7-d1* 変異細胞のタンパク質を検出する際には、*atg7*⁺細胞の 5 時間目のサンプルを比較用に泳動し検出した(最右端のレーン)。Ark1 は抗GFP 抗体、Cdc2Y15pは抗phospho-cdc2(Tyr15)抗体、Cdc2 は抗PSTAIR抗体、tubulinは抗α-tubulin抗体でそれぞれ検出した。1N:減数分裂前減数分裂前期、2N:第一分裂後、3-4N:第二分裂後、>4N:多数核化。*atg7*⁺細胞と*atg7-d1* 変異細胞はともに、Ark1 の量が最大になるのは、第一分裂のピーク時で、リン酸化されたCdc2 が減少し始めるのと同時期だった。

オートファジー変異株では Aurora キナーゼのスピンドル局在が変化する

さらに *atg7* 変異株ではスピンドルに局在する Ark1 の総量にも顕著な増加が見られ(図 47)、また、スピンドルの midzone により長い期間局在し続けた。野生株では Ark1 はたいていスピンドルが崩壊するより直前に局在が消失し、その消失はスピンドル崩壊の平均 1.3 ± 1.3 min (n = 12)前に起きていた。一方、*atg7* 変異株では Ark1 のスピンドルからの消失が遅れ、多くの場合、スピンドル崩壊と同時に局在消失し（平均でスピンドル崩壊から 0.0 ± 1.2 min (n = 12)で消失）、また、スピンドルが崩壊した後の微小管断片に Ark1 が局在し続けている細胞も存在した(16.7% (n = 12)) (図 48)。

スピンドルの伸長に伴う Ark1 のスピンドル上での局在変化にも野生株と *atg7* 変異株に違いが見られた。野生株では Ark1 は anaphase の初期にはスピンドル全長に局在したが、その後、スピンドルが伸長するとともに midzone へと局在が集中していった(図 43, 図 49, 図 50 ,図 51)。スピンドル上における Ark1 の局在領域はスピンドルの伸長に従って次第に狭くなり、スピンドル長と局在領域幅との間に負の相関が見られた(図 52)。また、局在領域が狭くなるにつれて最大蛍光強度は増加し(図 50)、局在領域幅と最大蛍光強度との間には負の相関が見られた(図 53)。*atg7* 変異株でも、Ark1 の最大蛍光強度と局在領域幅との間には野生株と同様に負の相関が見られた(図 50)。しかし、*atg7* 変異株ではスピンドルが伸長しても、Ark1 の局在領域はほとんど狭くならないか、もしくは、わずかに狭くなるにとどまり(図 51)、Ark1 の最大蛍光強度もあまり変化しなかった(図 54)。そのため、スピンドル長と局在領域幅との間には野生株のような相関性は見出せなかった(図 52)。この結果は、野生株ではスピンドルの伸長に伴って Ark1 の局在領域が縮小し Ark1 の分子濃度が局所的に増加するが、オートファジーの変異株ではこの Ark1 の局在領域の縮小と Ark1 の局所的な濃度の増加が正常に起こらないことを示している。以上の Ark1 の局在解析の結果から、オートファジーの欠損は、減数第一分裂における Ark1 のセントロメア局在、および、スピンドル局在に著しい変化を引き起こすことが明らかになった。第二分裂における Ark1 の局在変化については、その局在領域の狭さと局在時間の短さによりオートファジー欠損の影響を検証することができなかった。

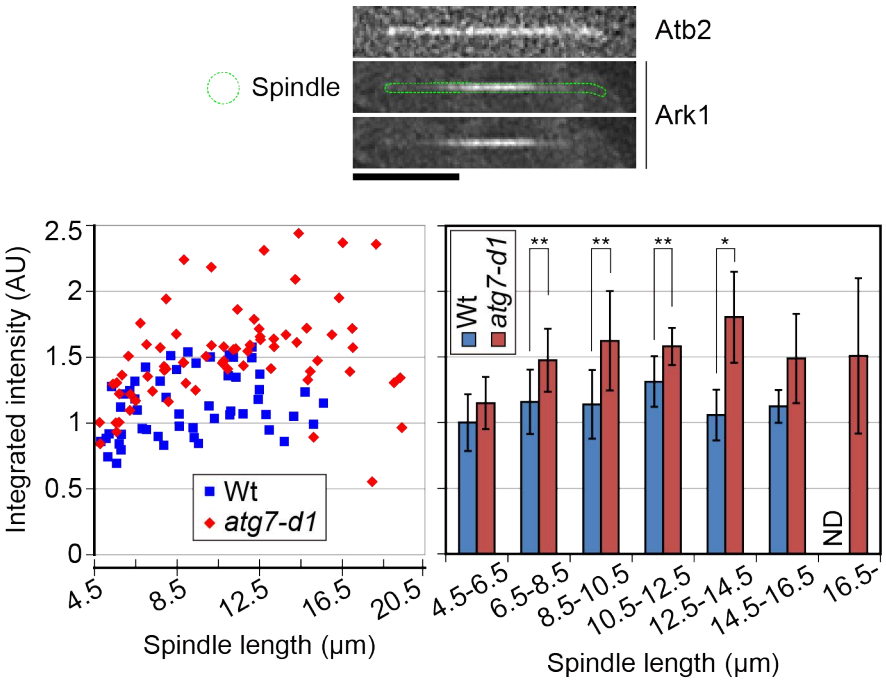


図 47　スピンドルに局在する Ark1 の総量

Ark1-GFP と mCherry-Atb2 を発現する細胞を減数分裂に誘導し、減数第一分裂における mCherry-Atb2 で可視化したスピンドルの領域における GFP の蛍光輝度の総量を測定した。左のグラフではプロットした。*と**はそれぞれ、*Student*'s t-test によって比較し有意水準 0.1%または 5%で平均値に差があることを示す。スケールバー:5μm。

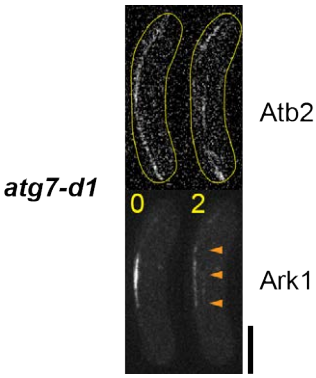


図 48　*atg7* 変異株で見られた減数第一分裂のスピンドル崩壊後に残り続ける Ark1

Ark1-GFP と mCherry-Atb2 を発現する細胞を減数分裂に誘導し、減数第一分裂における Ark1 とスピンドルの動態を生細胞で観察した。数字は経過時間を表す。橙色の矢頭はスピンドルが崩壊した後にも局在が見られた Ark1 を示す。スケールバー:5μm。

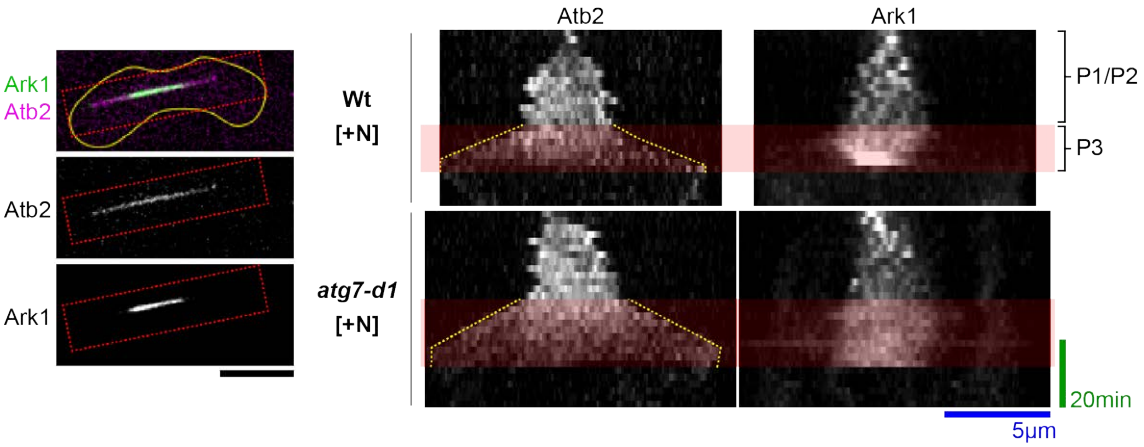


図 49　減数第一分裂におけるスピンドルと Ark1 のカイモグラフ

Ark1-GFP と mCherry-Atb2 を発現する細胞を減数分裂に誘導し、減数第一分裂における Ark1 とスピンドルの動態を生細胞で観察した。カイモグラフは画像内の赤い点線で囲ったエリアを用いて作成した。黄色の実線は細胞外形、黄色の点線はスピンドル端の位置、赤の網掛け部分はフェーズ 3 を示す。P1:フェーズ 1、P2:フェーズ 2、P3:フェーズ 3、スケールバー:5μm。

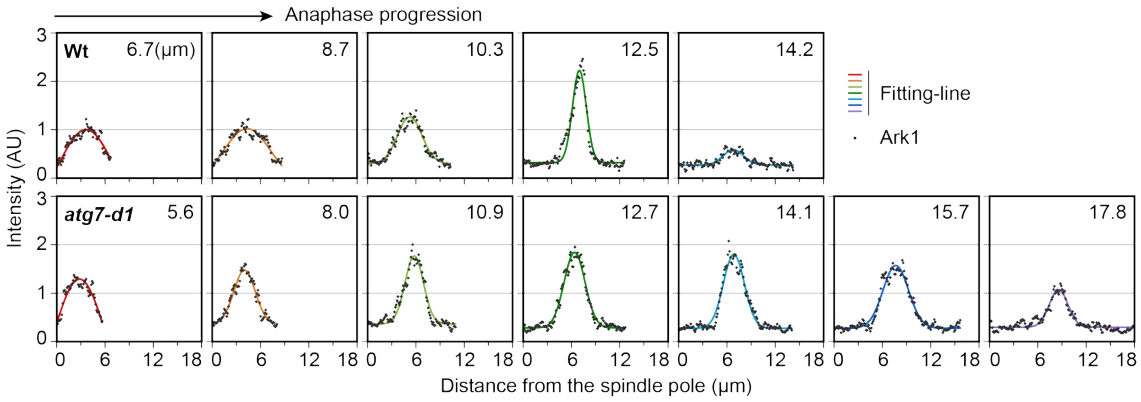


図 50　減数第一分裂のフェーズ 3 における Ark1 のスピンドル上の分布

Ark1-GFP と mCherry-Atb2 を発現する細胞を減数分裂に誘導し、減数第一分裂における Ark1 とスピンドルの動態を生細胞で観察した。スピンドルに沿って Ark1 の輝度を測定しプロットし(黒点)、これをガウス曲線にフィッティングした(色のついた曲線)。上段のグラフが野生株、下段のグラフが *atg7-d1* 変異株における Ark1-GFP の輝度分布を表す。それぞれの株の右端のグラフはスピンドル崩壊の直前の時点にあたる。蛍光輝度は野生株の測定開始時点のフィッティングラインの最大値を 1 とした単位(AU)で示した。

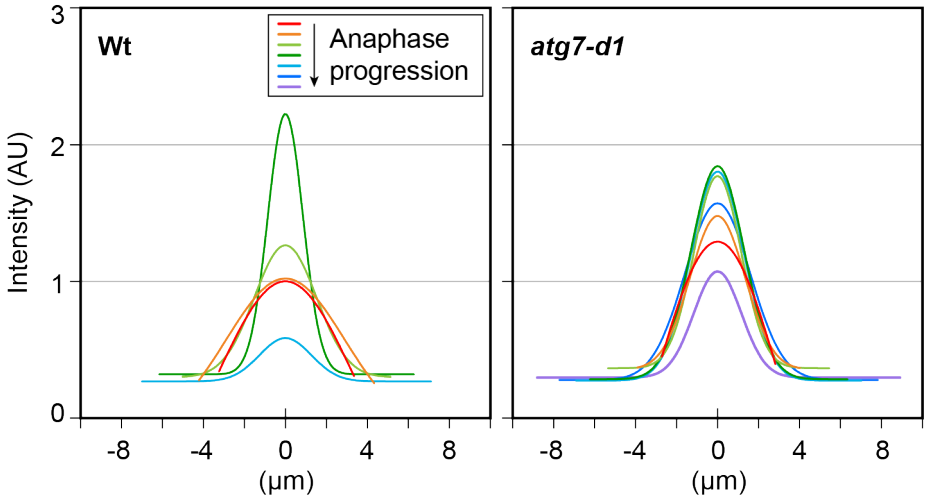


図 51　減数第一分裂のフェーズ 3 における Ark1 のスピンドル上の分布の変遷
図 50 のフィッティングラインを輝度の最大値の位置を 0 に合わせて重ね合わせた。

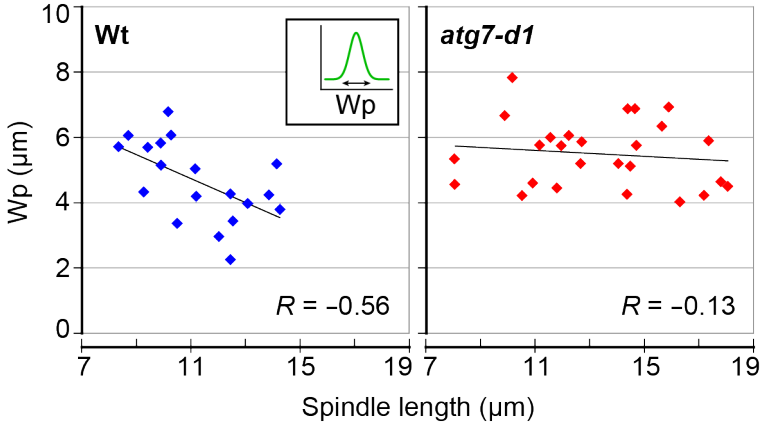


図 52　Ark1 の輝度分布ピーク幅とスピンドル長との相関分析
Ark1 輝度分布のフィッティングカーブからピーク幅 Wp を求め、スピンドルとの相関分析を行った。黒の線はフィッティングライン(直線近似)、*R* は相関係数を表す。測定値はそれぞれ 6 以上の細胞の継時的観察により得た。

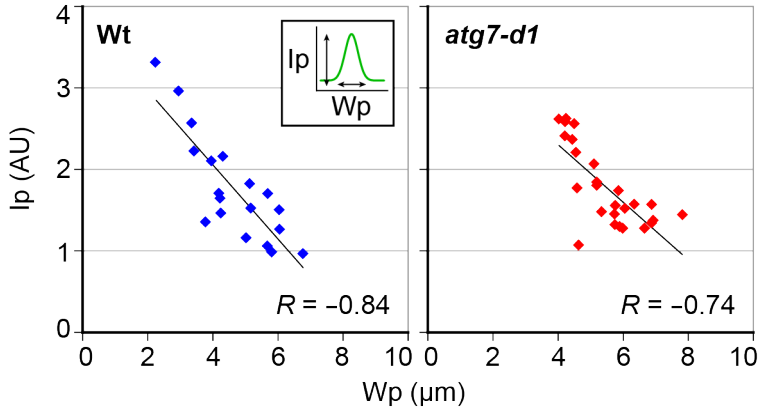


図 53　Ark1 の輝度分布ピーク幅とピーク最高輝度

Ark1 輝度分布のフィッティングカーブから求めたピーク幅 Wp とピーク最高輝度 Ip の相関分析を行った。黒の線はフィッティングライン(直線近似)、*R* は相関係数を表す。測定値はそれぞれ 6 以上の細胞の継時的観察により得た。

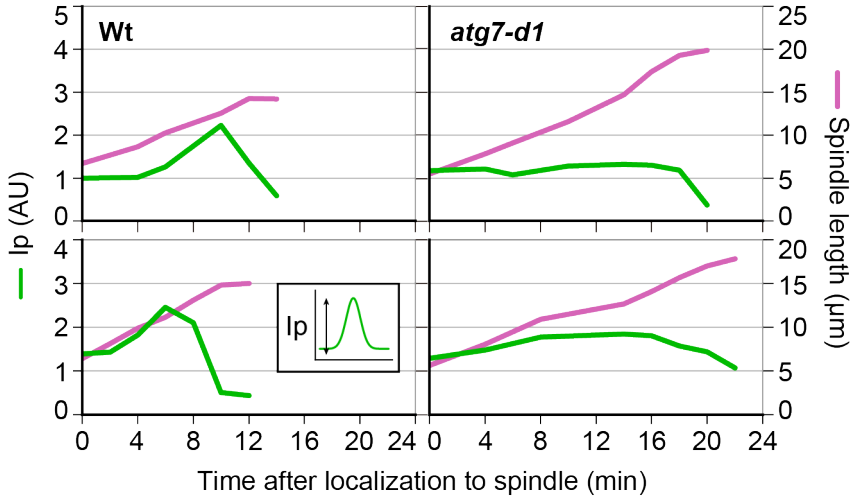


図 54　Ark1 のピーク最高輝度とスピンドル長の継時的変化

Ark1 輝度分布のフィッティングカーブからピーク最高輝度 Ip を求め、スピンドル長とともに継時的な変化を調べた。左のグラフは野生株、右のグラフは *atg7-d1* 変異株を示し、上下のグラフはそれぞれ別の細胞から得られた測定値である。

Aurora キナーゼの下方調節によりオートファジー変異株の染色体とスピンドルの表現型は抑制できる

減数第一分裂においてセントロメアとスピンドルにおける Ark1 局在量の増加が見られたことから、オートファジー変異株で見られた表現型が Ark1 局在量の増加によって引き起こされたものである可能性が考えられた。この可能性を検証するために、体細胞分裂特異的な発現が起こるプロモーターによって Ark1 の発現が制御される *ark1-so* アレルを導入し、減数分裂における Ark1 の発現を抑制した。*ark1-so* アレルを導入すると *atg7* 変異株では、染色体のスピンドルからの脱落が減少し(図 55)、フェーズ 2 の時間が短くなり(図 56,図 57)、さらにスピンドルの最大長も短くなった(図 58)。一方で、多数の核が形成される頻度は反対に増加したが(図 59)、これは *ark1-so* アレルの導入により染色体の凝集異常やスピンドルの伸長異常が生じるためかもしれない(Hauf et al., 2007)。これとは別に、点変異によって活性の低下した Ark1 をコードする *ark1-as3* アレルを導入した *atg7* 変異株では、染色体の脱落頻度に加えて多数核の形成頻度も低下した(図 55,図 59, *ark1-as*)。これらの結果は、セントロメアやスピンドルでの Aurora キナーゼの過剰な蓄積がフェーズ 2 の時間の延長やスピンドルの過剰な伸長、染色体の脱落、多数核の形成を引き起こしているという予想を支持している。また、*atg7* 変異株ではホーステール核運動後の減数分裂開始までの時間が伸びていたが、*ark1-so* アレルの導入によってこの時間も短縮された(図 60)。このことから、Aurora キナーゼの活性の増加が減数第一分裂の開始を遅らせていると考えられた。さらに、*ark1-so* アレルの導入により第一分裂と第二分裂との間の時間や第二分裂のフェーズ 2 が短縮されたことから(図 57,図 61)、Aurora キナーゼは *atg7* 変異株における第二分裂の開始や第二分裂の anaphase の開始も遅延させている可能性が示唆された。しかし、第二分裂の anaphase におけるスピンドルの過剰伸長は *ark1-so* アレルの導入では抑制されなかった(図 58)。そのため、減数第二分裂では Aurora キナーゼの働きが体細胞分裂や第一分裂と同一では無いか、もしくは、Aurora キナーゼ以外の何らかの因子が関与している可能性が考えられた。

一方で、第一分裂の anaphase 終了の遅延は *ark1-so* アレルの導入によってさらに大きくなり(図 57)、染色体形状や核膜、核小体因子の局在の異常は *ark1-so* アレルによって抑制されなかった(図 15,図 62)。また、*ark1-so* アレルを導入すると、*atg7* 変異と同じ様に、第二分裂後にスピンドル様の構造が形成された(図 42)。これらの結果は、*atg7* 変異株の表現型の一部だけが Aurora キナーゼに依存していることを示している。

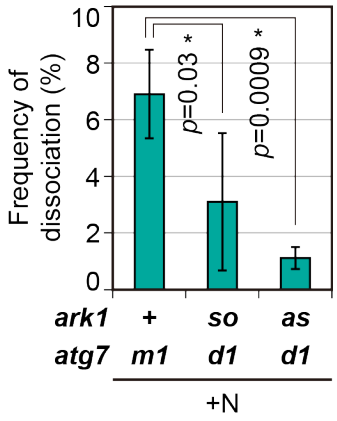


図 55　Ark1 の下方調節による *atg7* 変異株の染色体脱落異常の軽減

Hta1-GFP と mCherry-Atb2 を発現する細胞を ME 寒天培地(窒素源存在下:+N)上で減数分裂に誘導し、第一分裂 anaphase においてスピンドルから離れた染色体が見られた細胞の割合を示した。エラーバーは標準偏差を示す。*は、*Student*'s t-test による比較で平均値に有意な差が生じたことを示し、*p* 値を併記した。+:当該遺伝子に変異なし、*m1*:*atg7-m1*、*d1*:*atg7-d1*、*so*:*ark1-so*、*as*:*ark1-as3*。

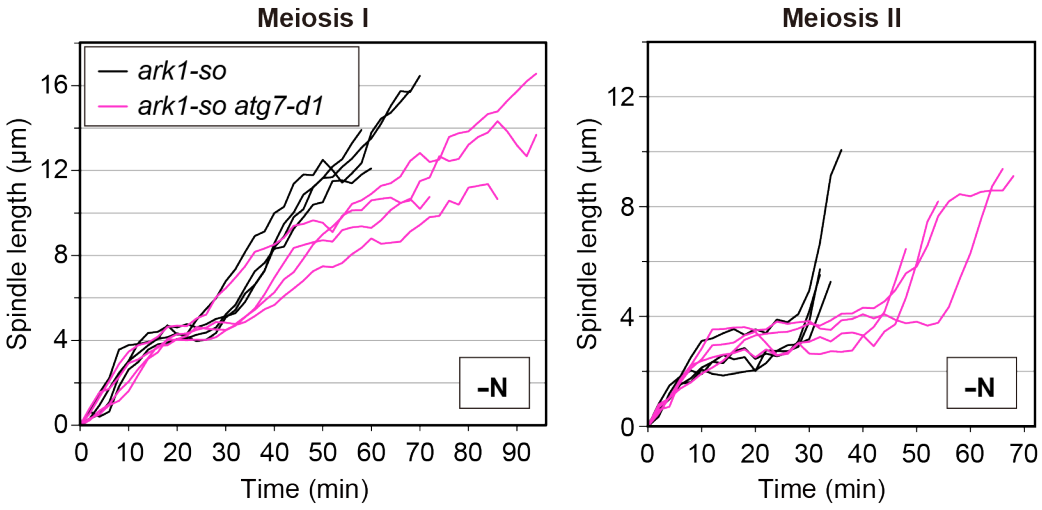


図 56　Ark1 発現抑制株の減数第一分裂または第二分裂におけるスピンドル長の変化

GFP-Atb2 を発現する細胞を減数分裂に誘導し、生細胞中で減数第一分裂および第二分裂におけるスピンドル長の変化を解析した。-N:窒素源枯渇条件で解析。

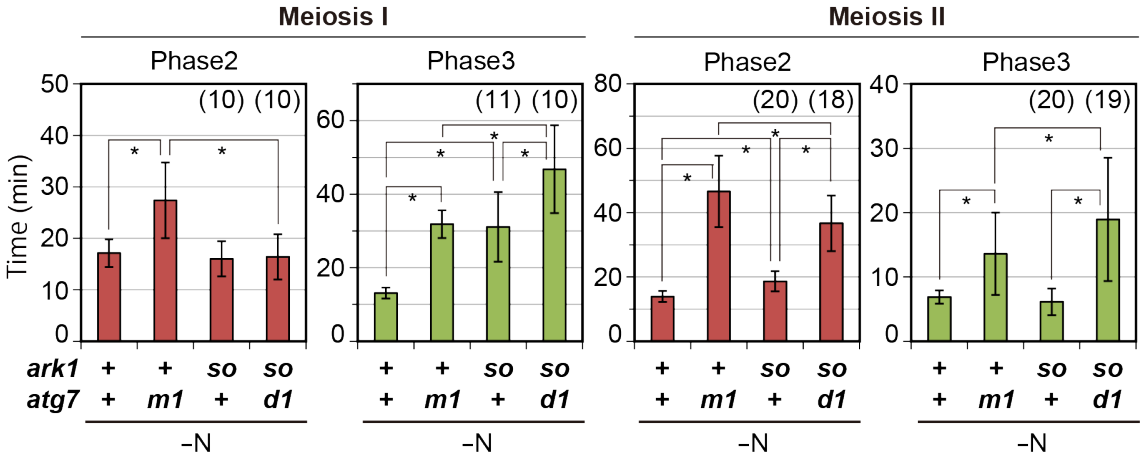


図 57　Ark1 発現抑制による減数第一分裂または第二分裂のフェーズ 2 およびフェーズ 3 の時間の変化

GFP-Atb2 を発現する細胞を減数分裂に誘導し、生細胞中でスピンドルの動態を解析し、減数分裂の進行を調べた。+:当該遺伝子に変異なし、*m1*:*atg7-m1*、*d1*:*atg7-d1*、*so*:*ark1-so*、-N:窒素源枯渇条件で解析。*は、1 つの変異を導入した場合に平均値に有意な差が生じた(*Student*'s t-test による比較で *p* 値が 0.05 より小さい)ことを示す。

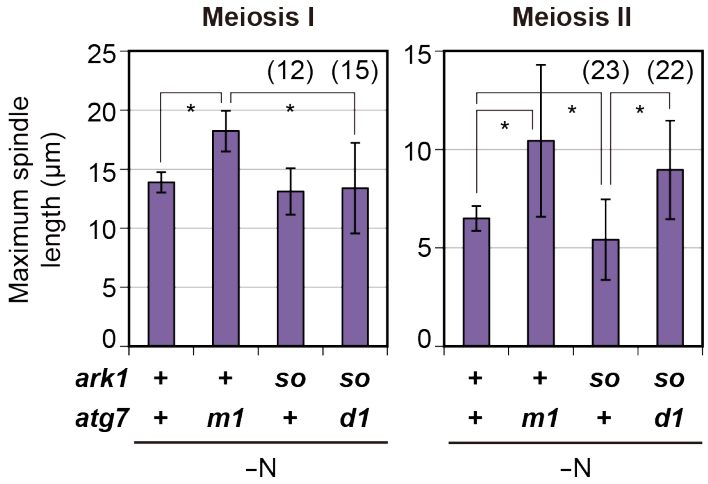


図 58　Ark1 発現抑制による減数第一分裂または第二分裂のスピンドル最大長の変化

GFP-Atb2 を発現する細胞を減数分裂に誘導し、生細胞観察によりスピンドルの最大長を計測した。+:当該遺伝子に変異なし、*m1*:*atg7-m1*、*d1*:*atg7-d1*、*so*:*ark1-so*、-N:窒素源枯渇条件で解析。*は、1 つの変異を導入した場合に平均値に有意な差が生じた(*Student*'s t-test による比較で *p* 値が 0.05 より小さい)ことを示す。

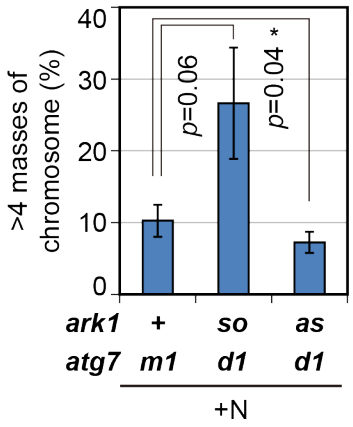


図 59　Ark1 の下方調節による *atg7* 変異株の多数核細胞形成の抑制

Hta1-GFP と mCherry-Atb2 を発現する細胞を ME 寒天培地上で胞子形成させ、4 よりも多くの核を持つ細胞の割合を示した。+:当該遺伝子に変異なし、*m1*:*atg7-m1*、*d1*:*atg7-d1*、*so*:*ark1-so*。平均値は *Student*'s t-test によって比較し、有意水準 5%で差がある場合に*を付記した。

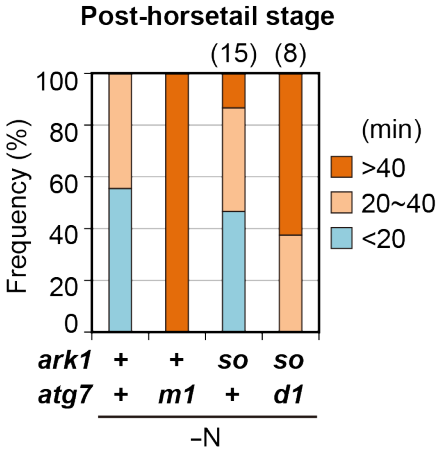


図 60　Ark1 の発現抑制によるホーステール後の時間の短縮

GFP-Atb2 を発現する株を減数分裂に誘導し、ホーステール核運動の終了からスピンドル形成の開始までの時間を生細胞中で計測した。()内は実験に用いた細胞数。+:当該遺伝子に変異なし、*m1*:*atg7-m1*、*d1*:*atg7-d1*、*so*:*ark1-so*、-N:窒素源枯渇培地(EMM-N)で計測。

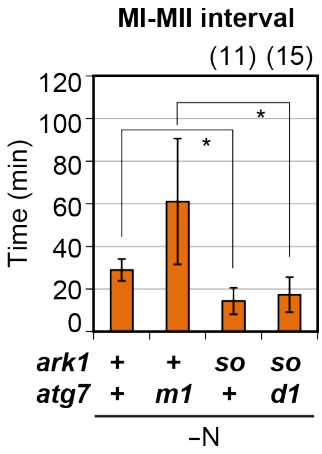


図 61　Ark1 の発現抑制による減数第一分裂と第二分裂のインターバルの短縮

GFP-Atb2 を発現する細胞を減数分裂に誘導し、生細胞中でスピンドルの動態を解析し、減数第一分裂と第二分裂のインターバルを調べた。+:当該遺伝子に変異なし、*m1*:*atg7-m1*、*d1*:*atg7-d1*、*so*:*ark1-so*、-N:窒素源枯渇培地(EMM-N)で解析。()内は解析に用いた細胞の数。*は、1 つの変異を導入した場合に平均値に有意な差が生じた(*Student*'s t-test による比較で *p* 値が 0.05 より小さい)ことを示す。

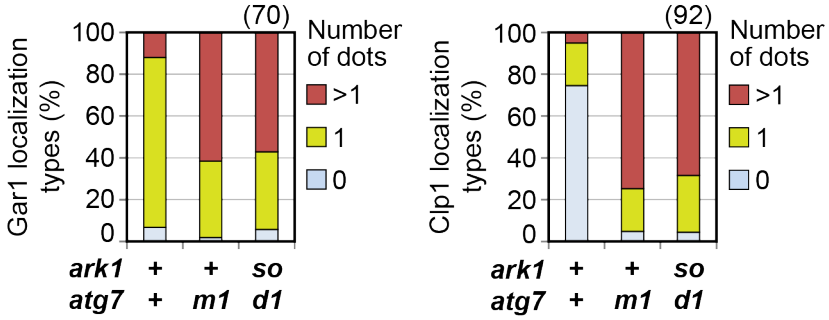


図 62　Ark1 の発現抑制下でのホーステール核運動期における Gar1 および Clp1 の局在

Hta1-GFP を発現する細胞に mCherry を融合した Gar1 もしくは Clp1 を導入し、ME 寒天培地で減数分裂を誘導した。この細胞のホーステール核運動期において、Gar1 もしくは Clp1 の局在点の数に応じて細胞を分類した。()内は解析に用いた細胞の数。一部のデータは図 16 および図 17 のものを利用した。スケールバー:5μm。

Aurora キナーゼ単独の過剰発現ではオートファジー変異株の表現型を模倣できない

オートファジー変異株ではAuroraキナーゼがセントロメアやスピンドルで過剰に蓄積していたことから、Auroraキナーゼを過剰に発現させた細胞ではオートファジー欠損株と同様の表現型が見られる可能性が考えられた。この可能性を検証するために、Ark1 を減数分裂において過剰に発現する株を作成し、その表現型の解析を行った。Ark1 過剰発現株は、本来の*ark1*$^{+}$プロモーターの制御下でArk1-GFPを発現する株に、減数分裂期特異的に強い発現を示す*spo5* プロモーターの制御下で*ark1-GFP*融合遺伝子を発現するプラスミドを導入して作成した。この株では減数分裂期に細胞質中でArk1-GFPによる強い蛍光シグナルが観察されたことから、期待通りに減数分裂期にArk1-GFPが過剰に発現していることが確認された(図 63, 図 64)。しかし、過剰に発現したArk1-GFPはセントロメアやスピンドルに特異的な局在を示さす、細胞内に均一に存在した。また、多数核の形成頻度が上昇したが(図 65)、オートファジー欠損株で見られた減数分裂の進行の変化(図 66, 図 67)や染色体形状の異常、スピンドル最大長の増加(図 68)、頻繁な染色体の脱落は見られなかった(図 69)。多数核の形成頻度が増加しているにもかかわらず染色体の脱落はほとんど見られなかったことから、Ark1 を過剰に発現した株で観察される多数核は染色体脱落以外の異常によって引き起こされていると考えられた。このようにArk1 のみを過剰発現させてもオートファジー変異株の表現型を誘発しなかったため、Ark1 がセントロメアやスピンドルに特異的に蓄積する、または、Ark1 の活性が変化することがオートファジー変異株の表現型を示すことに必要であると考えられた。

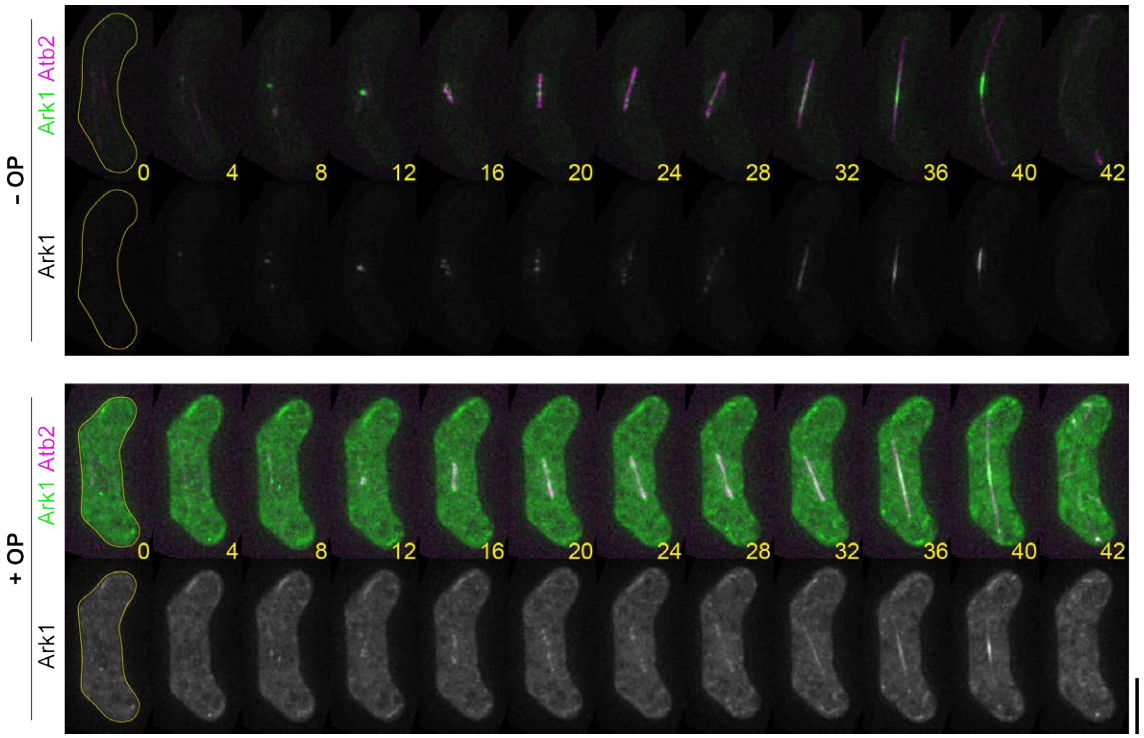


図 63　過剰発現した Ark1 の細胞内局在

Ark1-GFP と mCherry-Atb2 を発現する細胞に Ark1-GFP 過剰発現プラスミドを導入し、もしくは導入せずに、減数分裂に誘導し、減数第一分裂における Ark1 とスピンドルの動態を生細胞で観察した。+OP:過剰発現あり、-OP 過剰発現無し。写真の数字は経過時間を表す。

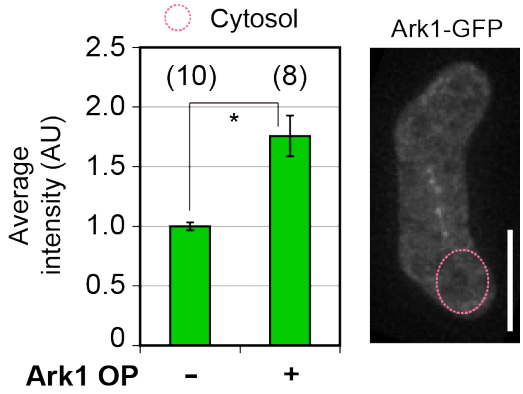


図 64　Ark1 の過剰発現レベル

Ark1-GFP と mCherry-Atb2 を発現する細胞に Ark1-GFP 過剰発現プラスミドを導入し、もしくは導入せずに、減数第一分裂のフェーズ 2 における Ark1-GFP の細胞質局在を解析した。+OP:過剰発現あり、-OP 過剰発現無し。()内は解析に用いた細胞の数。

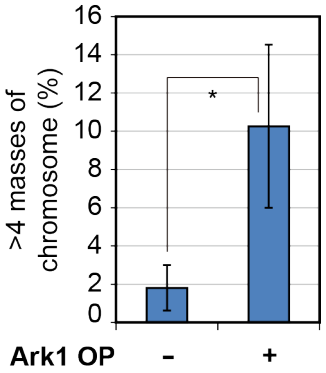


図 65　Ark1 過剰発現による多数核細胞の形成への影響

Ark1-GFP と GFP-Atb2 と Hta1-mCherry を同時に発現する細胞に Ark1-GFP 過剰発現プラスミドを導入し、もしくは導入せずに、ME 寒天培地上で減数分裂に誘導した。減数分裂を完了し胞子を形成した細胞のうち、4 よりも多くの核を持つ細胞の割合を示した。+OP:過剰発現あり、-OP 過剰発現無し。平均値は *Student*'s t-test によって比較し、有意水準 5%で差がある場合に*を付記した。

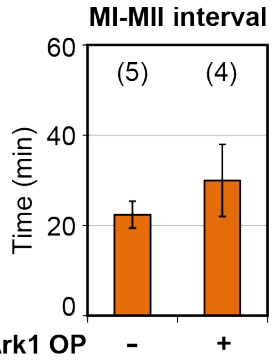


図 66　Ark1 過剰発現による減数第一分裂と第二分裂のインターバルへの影響

Ark1-GFP と mCherry-Atb2 を発現する細胞に Ark1-GFP 過剰発現プラスミドを導入し、もしくは導入せずに、減数分裂に誘導し、生細胞中でスピンドルの動態を解析し、減数第一分裂と第二分裂のインターバルを調べた。+OP:過剰発現あり、-OP 過剰発現無し。平均値は *Student*'s t-test によって比較したが、有意水準 5%で差が無かった。()内は解析に用いた細胞の数。

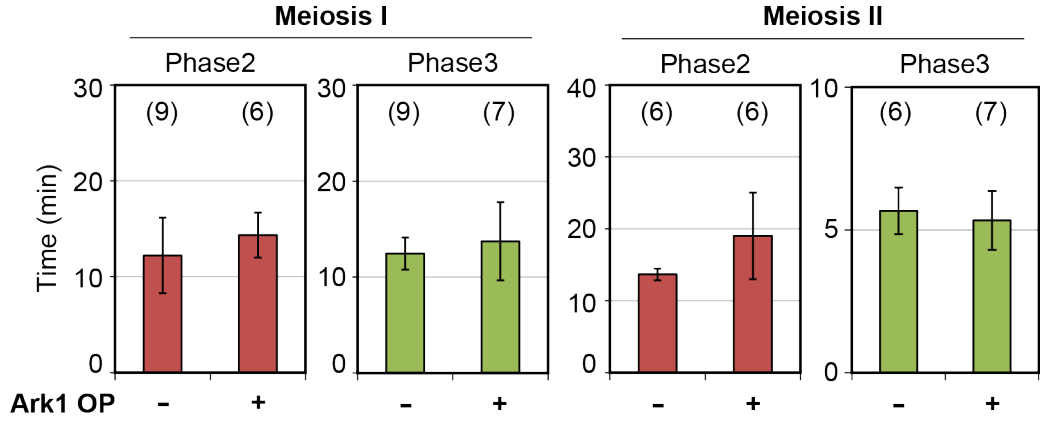


図 67　Ark1 過剰発現による減数第一分裂と第二分裂の進行への影響

Ark1-GFP と mCherry-Atb2 を発現する細胞に Ark1-GFP 過剰発現プラスミドを導入し、もしくは導入せずに、減数分裂に誘導し、生細胞中でスピンドルの動態を解析し、減数第一分裂と第二分裂のフェーズ 2 およびフェーズ 3 の時間を調べた。+OP:過剰発現あり、-OP 過剰発現無し。()内は解析に用いたスピンドルの数。平均値は *Student*'s t-test によって比較したが、有意水準 5%で差が無かった。

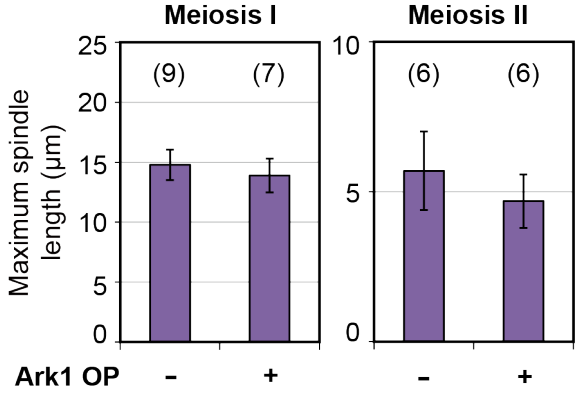


図 68　Ark1 過剰発現による減数第一分裂と第二分裂のスピンドル最大長への影響

Ark1-GFP と mCherry-Atb2 を発現する細胞に Ark1-GFP 過剰発現プラスミドを導入し、もしくは導入せずに、減数分裂に誘導し、生細胞中でスピンドルの動態を解析し、減数第一分裂と第二分裂のスピンドル最大長を調べた。+OP:過剰発現あり、-OP 過剰発現無し。()内は解析に用いたスピンドルの数。平均値は *Student*'s t-test によって比較したが、有意水準 5%で差が無かった。

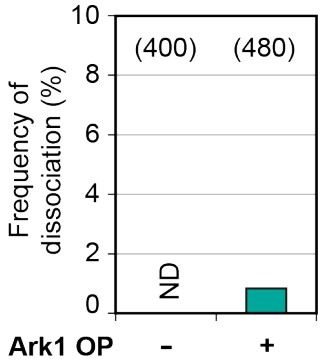


図 69　Ark1 過剰発現による染色体脱落頻度への影響

Ark1-GFP と GFP-Atb2 と Hta1-mCherry を同時に発現する細胞に Ark1-GFP 過剰発現プラスミドを導入し、もしくは導入せずに、ME 寒天培地上で減数分裂に誘導し、減数第一分裂での染色体の脱落頻度を計測した。+OP:過剰発現あり、-OP 過剰発現無し。100 以上の減数分裂細胞について計測する実験を 3 回ずつ行い、合算した。()内は合算した細胞数を表す。

考察

本論文では、新たに減数分裂期の染色体分配異常を示す変異株として *atg1*、*atg7*、*atg14* オートファジー変異株を同定した。得られたオートファジー変異株はこれまでに報告のない特徴的な表現型を示した。これらの株は減数分裂期において、染色体の形状や核膜、核小体の異常を示した。また、これらの変異株は減数分裂の進行のあいだ窒素源を必要とし、染色体のスピンドルからの脱落や、スピンドルの過剰伸長を示した。変異を有するオートファジー遺伝子はオートファジーにおいてそれぞれ異なるプロセスに関わっていることから、これらの表現型はオートファジーの欠損によって共通に引き起こされるものだと考えられた。これらの発見は、オートファジーが減数分裂の進行や染色体分配に関与することを示している。

核構造の異常

今回得られたオートファジー変異株では減数分裂期の染色体形状や核膜、核小体に異常が見られた。また、これらの表現型が Ark1 の発現を抑制することによっては軽減されなかったことから、少なくとも Aurora キナーゼがこれらの表現型の原因ではないと考えられた。オートファジーは核膜や核小体成分を含む不必要な核の成分の分解も行っており、出芽酵母ではオートファジーに依存した核の分解に欠損があると核の変形が引き起こされることが見出されている (Mijaljica et al., 2010)。そのため今回の変異株でもオートファジーに依存した核の分解が欠損したことにより核膜の統合性や核小体が異常になっていると考えられる。また、核膜の異常が染色体制御因子の核輸送を妨げ、染色体の構造に影響を与えている可能性も考えられる。

オートファジーと減数分裂進行

本研究において、オートファジー変異株では減数分裂の進行に窒素源の供給が必要であることが明らかとなった。このことから、オートファジー依存的な細胞内成分の分解により窒素源が供給されることで、減数分裂の進行が起こると考えられた。この窒素源の供給は減数分裂の進行に必須な分子の合成に必要なのかもしれない。しかし、塩化アンモニウムのような分子的に単純な窒素源を与えただけでは、減数分裂は進行するもののその進行には明らかな遅延が生じていた。このことから、オートファジーはアミノ酸などの分子的により複雑な物質を供給することによって、減数分裂の進行に必須な分子を効率的に合成できるようにしている、または、エネルギー生産に利用しているのかもしれな

い。

オートファジーの欠損によってどのように減数分裂の停止や遅延が引き起こされているのか、その詳細は現在のところはっきりしていない。変異株では窒素源を枯渇するとリン酸化型の Cdc2 が蓄積し、Cdc25 フォスファターゼは蓄積しなかった。このことは、Cdc25 依存的な脱リン酸化が起こらず Cdc2 が活性化しないために減数分裂の進行が停止、あるいは、遅延するという可能性を示している。また、Ark1 の発現を抑制することによってオートファジー変異株の減数第一分裂および第二分裂の開始の遅延が消失する、あるいは、減少したこと(Kim et al., 2013; Newnham et al., 2013)から、Aurora キナーゼも減数分裂の進行を妨げている可能性がある。出芽酵母では、減数第一分裂のスピンドル形成を Aurora キナーゼが抑制していることから、Aurora キナーゼが減数分裂進行を抑制するということは真核生物に共通の現象であると考えられ、オートファジーの欠損はこの制御に関与しているのかもしれない。また、細胞周期の制御に関与する Clp1 フォスファターゼ(Esteban et al., 2004; Wolfe & Gould, 2004)がオートファジー変異株において異常な局在を示したことから、Clp1 が減数分裂の進行に関与している可能性も考えられる。

染色体分配およびスピンドル動態とオートファジーとの関係

オートファジー変異株では第一分裂において染色体とスピンドルとの結合に異常が生じていた。この事実に一致して、染色体とスピンドルの結合異常を感知し anaphase の開始を遅らせる働きのある SAC によって anaphase の開始が遅れていた。一般に、SAC によって metaphase が延長されると、誤った染色体とスピンドルとの結合を修正する機会が増加し、誤った結合が減少すると考えられている。しかし、SAC はオートファジー変異株における染色体とスピンドルの結合異常を緩和できていなかった。さらに、スピンドルとの結合が失われた染色体が見られたこと、および、anaphase においてスピンドルから脱落した染色体が見られたことを考慮すると、オートファジー変異株で見られた染色体脱落の原因には少なくとも二つの可能性が考えられる。一つは、スピンドル微小管による染色体の捕捉過程に欠陥がある場合で、この場合、染色体をスピンドル微小管が捉えて結合を形成することができず、染色体とスピンドルの結合は起こらない。もう一つは、安定な染色体とスピンドルの結合形成に欠陥がある場合で、この場合、染色体はスピンドルと一時的には結合するが染色体はスピンドルから脱落がする。つまり、オートファジー変異株では、SAC によって metaphase が延長されても染色体はある頻度でスピンドルと結合しない、あるいは、誤った結合は修正されても結合が安定でなく anaphase には染色体が脱落してしまう可能性が考えられる。

オートファジー変異株は、染色体とスピンドルの結合異常に加えて、スピンドルが過剰に伸長する表現型を示した。以下二つの結果から、オートファジー変異株が示したこれら染色体やスピンドルの表現型には Aurora キナーゼが関与していると考えられた。第一に、オートファジー変異株では Aurora キナーゼの細胞内局在に変化が生じていた。Ark1 のセントロメアやスピンドルにおける局在量は増加し、スピンドルに局在する Ark1 の動態も顕著に変化していた。第二に、Ark1 の発現を抑制することによりオートファジー変異株で見られた染色体の脱落や anaphase 開始の遅延、スピンドルの過剰伸長が抑制された。Aurora キナーゼにはキネトコアのスピンドルからの脱離を促進する働きがあるため(Carmena et al., 2012; Santaguida & Musacchio, 2009; Tanaka, 2010)、セントロメアに過剰に蓄積した Ark1 が染色体の脱落を引き起こす可能性が考えられる。また、出芽酵母で Aurora キナーゼは、anaphase におけるスピンドルの伸長を制御する微小管束化因子 Ase1 とキネシンファミリーモータータンパク質である Cin8 のスピンドルの midzone への局在を制御している(Khmelinskii et al., 2007; Kotwaliwale et al., 2007)。分裂酵母でも同じ様に、Ase1 やキネシンモーターKlp9 が anaphase におけるスピンドル伸長に関与することが分かっている(Fu et al., 2009; Loïodice et al., 2005; Yamashita et al., 2005)。それゆえ、Ark1 のスピンドル局在量、特に midzone における局在量の増加は、Ase1 と Klp9 を介して、midzone における微小管の伸長や逆並行なスピンドル微小管のスライディングを促進する可能性が考えられる。そしてこれらの働きによって midzone が狭まらないために、Ark1 の局在領域が縮小せず、さらにスピンドルの過剰な伸長を引き起こしている可能性が考えられる（図 70）。

本研究ではオートファジー変異株の減数第二分裂においてはスピンドルから脱落した染色体や Ark1 局在の変化は見出せなかったが、SAC 依存的な anaphase 開始の遅延やスピンドルの最大長の増加は第二分裂でも第一分裂と同様に見られた。このことから、第二分裂でも Aurora キナーゼの働きが強まっている可能性が考えられる。第二分裂における染色体-スピンドル結合の欠陥は今回の解析法で見出せるほど顕著なものではなかったのかもしれない。あるいは、第二分裂では染色体とスピンドルの結合は正常であるが SAC は別の何らかの理由で活性化したのかもしれない。また、今回の解析では、オートファジー変異に加え、Aurora キナーゼの発現抑制によっても減数第三分裂様のスピンドルの形成が誘発されることが分かった。オートファジー変異株では細胞質にある Ark1 が減少していたことから、細胞質における Aurora キナーゼ活性の低下が第三分裂様のスピンドル形成の原因であるのかもしれない。

オートファジーの活性がなくなると Aurora キナーゼの局在が変化することを見出したが、これがどのような作用機序によって起こるのかということは現在

のところ不明なままである。Aurora キナーゼのセントロメア局在は、Aurora キナーゼを含む Chromosome Passenger Complex (CPC)が CDK によってリン酸化されることで起きている(Tsukahara et al., 2010)。しかし、オートファジー変異株では Cdc2 の活性が低下していることが想定されることから、Cdc2 の活性上昇によって Aurora キナーゼのセントロメア局在量が上昇しているという状況は考えにくい。また、オートファジー変異株では、オートファジーの欠損により Aurora キナーゼの局在を増加させる、あるいは、活性を強める働きを持つ因子の分解が行われず、Aurora キナーゼの局在や活性の異常が引き起こされている可能性も考えられる。しかし、窒素源枯渇下で減数分裂の進行遅延や多数核の形成の表現型が強まったこと(図 22, >4 核, -N at 4hr)を考慮すると、現在のところオートファジー欠損の結果として起こる窒素源の供給不足が Aurora キナーゼの局在異常の原因として最も有力な候補と考えられる。

高等真核生物では窒素源の供給が減少すると TOR 複合体 1（TORC1）のキナーゼ活性が一過的に低下し、これによりオートファジーが誘導される。その後、オートファジーに依存した窒素源の供給によって TORC1 が再活性化する(Rong et al., 2011; Yu et al., 2010)。同様に、酵母でも窒素源の枯渇下では TORC1 活性が低下しオートファジーは活性化することから(Kamada et al., 2000; Uritani et al., 2006)、オートファジーによる TORC1 の再活性化もおそらく起きるだろう。さらに、出芽酵母では TORC1 活性を低下させると Aurora キナーゼ活性の低下により引き起こされる染色体分配の異常が軽減されることが報告されている(Tatchell et al., 2011)。これらのことから、オートファジーが TORC1 を介して Aurora キナーゼの制御に関与している可能性が考えられる（図 71)。つまり、窒素源枯渇により減数分裂が誘導された後、オートファジーが窒素源を供給して TORC1 を再活性化し、再活性化した TORC1 がセントロメアやスピンドルへの Aurora キナーゼの過剰な蓄積を抑えるのかもしれない。それゆえ、オートファジー変異株の表現型の原因を明らかにするためには、今後 TORC1 の機能を研究する必要があるかもしれない。

オートファジーと加齢に伴う減数分裂期染色体分配異常の増加

本研究で見出した減数分裂期の染色体分配におけるオートファジーの働きは、加齢に伴って減数分裂期の染色体分配異常が増加する機構を解明する上でも重要になるかもしれない。マウスやヒトでは、母体年齢の増加に伴って減数分裂の染色体分配異常が増加することが指摘されており、この染色体分配異常により異数体の細胞が形成させれ、流産や死産、あるいは、ダウン症候群のような染色体数異常による疾患を引き起こすと予想されている(Sakakibara et al., 2015) [reviewed in (Chiang et al., 2012; Nagaoka et al., 2012)]。加齢はオートファジーの活

性低下と関連があり (オートファジーの欠陥が老化に関連した表現型を示し、また、オートファジーの活性を高めると老化抑制の効果が見られる)、加齢によってオートファジーの活性が低下することが予想されている (reviewed in (Rubinsztein et al., 2011))。マウスやヒトでもオートファジーが減数分裂期の染色体分配において働きを持つならば、加齢によるオートファジーの活性低下が Aurora キナーゼを介して染色体分配異常を増加させ、ダウン症候群などの一因となる可能性がある。そのため、減数分裂におけるオートファジーの働きが高等生物にも存在するかどうかは今後の重要な研究課題である。

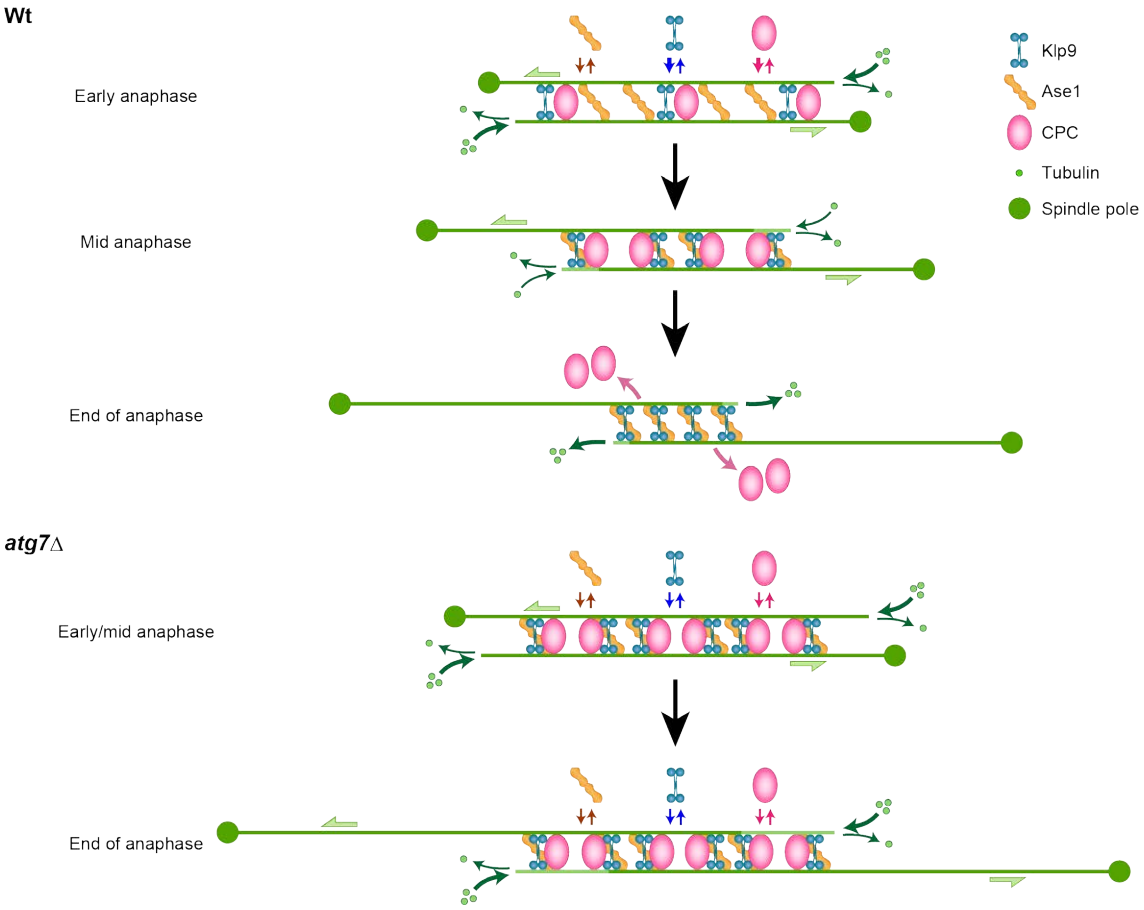


図 70　Anaphase におけるスピンドルの伸長制御の仮説

Anaphase 開始時には Chromosome Passenger Complex（Aurora キナーゼを含む複合体）や微小管束化因子 Ase1、キネシンモーターKlp9 がスピンドルに局在している。Ark1 の局在領域がスピンドルの伸長とともに狭まることから、midzone はスピンドルの伸長とともに狭まっていることが予想される。midzone の狭まりは微小管の伸長（tubulin の重合による：濃緑色矢印）が逆並行なスピンドル微小管のスライディング（淡緑色矢印）に比べて緩やかであるために起こると考えられる。Anaphase 終了の直前になると midzone はかなり小さくなり、Ark1 が midzone から離れ、やがてスピンドルが崩壊する。一方、オートファジー変異株 (*atg7Δ*)では、Ase1 や Klp9 がスピンドルに多く局在することで微小管の伸長や微小管のスライディングをより促進しているかもしれない。微小管の伸長が大きいために midzone は狭まらず、スピンドルの伸長は細胞内の tubulin がなくなるまで続くと考えられる。Wt: 野生株。

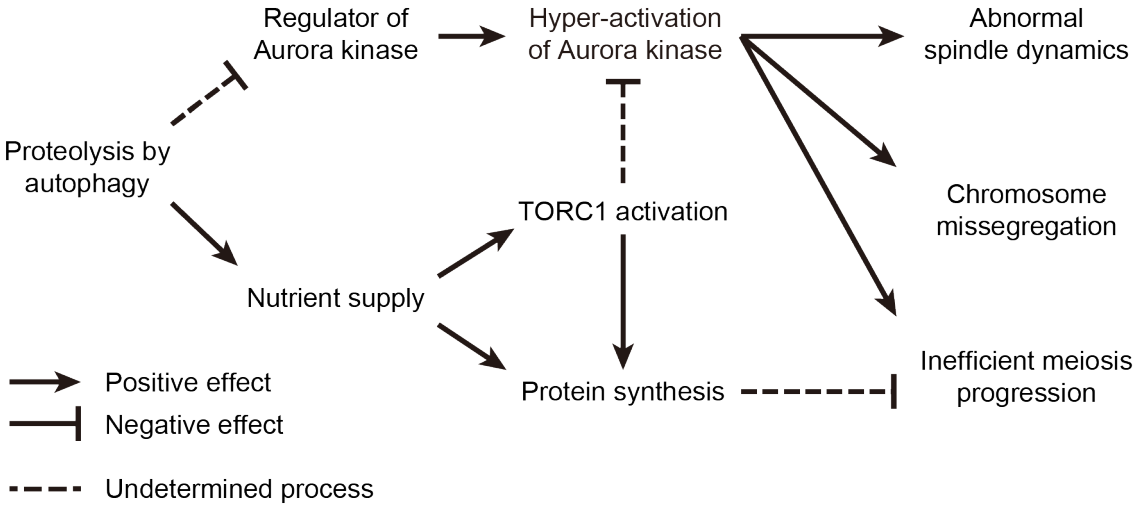


図 71　オートファジーの働きと減数分裂制御異常の機序

まとめ

本研究では、減数分裂の染色体分配機構の解明するために、減数分裂期の染色体分配が異常になる分裂酵母変異株のスクリーニングを行い、オートファジー関連因子に変異がある 4 株を染色体分配異常変異株として同定した。同定されたオートファジー変異株は減数分裂へ誘導した後の染色体の形状、核膜の形状および核小体の数に異常を示したことから、オートファジーが分裂酵母の減数分裂において、正しい核構造の制御に重要であることが示唆された。また、これら変異株は減数分裂の進行に窒素源を必要としたことから、オートファジーが正常な減数分裂進行に必要な窒素源を供給していることが示唆された。さらに、これら変異株は減数分裂の染色体分配においても、スピンドルチェックポイント依存的な anaphase 開始の遅延が見られ、スピンドルの過剰な伸長が起こり、第一分裂のスピンドルから脱落する染色体が高い頻度で見られるといった異常が観察され、オートファジーが正確な染色体分配を行う上で重要な働きを持つことが明らかになった。さらに、オートファジー変異株の減数分裂では、染色体とスピンドルとの結合やスピンドルの伸長を制御する因子である Aurora キナーゼの局在量の変化や局在異常が見られ、オートファジー変異株の Aurora キナーゼの働きを低下させることで染色体の脱落やスピンドルの過剰な伸長は抑制された。これらのことから、オートファジーが減数分裂の染色体分配において Aurora キナーゼの過剰な働きを抑制することが示唆された。以上のように、本研究では、オートファジーが減数分裂において複数の制御に関与していることを明らかにした。オートファジーがこれらの制御へ関与する詳細な経路の解明は今後の重要な研究課題である。また、減数分裂におけるオートファジーの働きが他種の生物にも共通に存在しているかどうかを明らかにすることも重要な課題である。減数分裂でのオートファジーの重要な働きは出芽酵母でも見られるようである(Piekarska et al., 2010)ほか、線虫では減数分裂の進行において栄養が重要であることがわかっている(Lopez et al., 2013)。このため、多細胞生物でも減数分裂においてオートファジーが機能していることが予想される。一方で、ほ乳類では減数分裂におけるオートファジーの機能は現在のところ知られていない。本研究で得られた結果から考えると、オートファジーを欠損しても染色体分配などへの影響は割合的にも致死的な程度ではないために、これまでに行われたオートファジー欠損体の解析では見逃されている可能性も考えられる。加えて、マウスでは着床前の受精卵の細胞分裂においてオートファジーによる栄養供給が重要である可能性が示されており(Mizushima & Levine, 2010)、少なくとも栄養源の限られる条件での体細胞分裂においてはオートファジーが同様の

働きをしているかもしれない。このように、本研究で見出された減数分裂におけるオートファジーの働きが他生物にも共通に存在する働きであるのかについてはまだ明確な結論はなく今後の詳細な研究が望まれるところであるが、本研究での発見が減数分裂の制御機構やオートファジーの働きを広く理解する上で重要な知見であることは間違いないだろう。

参考文献

書籍

Michael R. G., Joseph S. “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”

論文

Aoi, Y., Arai, K., Miyamoto, M., Katsuta, Y., Yamashita, A., Sato, M., & Yamamoto, M. (2013). Cuf2 boosts the transcription of APC/C activator Fzr1 to terminate the meiotic division cycle. *EMBO Rep.* **14**, 553–560.

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

Basi, G., Schmid, E., & Maundrell, K. (1993). TATA box mutations in the Schizosaccharomyces pombe nmt1 promoter affect transcription efficiency but not the transcription start point or thiamine repressibility. *Gene* **123**, 131–136.

Carmena, M., Wheelock, M., Funabiki, H., & Earnshaw, W.C. (2012). The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 789–803.

Chiang, T., Schultz, R.M., & Lampson, M.A. (2012). Meiotic origins of maternal age-related aneuploidy. *Biol. Reprod.* **86**, 1–7.

Cueille, N., Salimova, E., Esteban, V., Blanco, M., Moreno, S., Bueno, A., & Simanis, V. (2001). Flp1, a fission yeast orthologue of the s. cerevisiae CDC14 gene, is not required for cyclin degradation or rum1p stabilisation at the end of mitosis. *J. Cell Sci.* **114**, 2649–2664.

Ding, D.-Q., Sakurai, N., Katou, Y., Itoh, T., Shirahige, K., Haraguchi, T., & Hiraoka, Y. (2006). Meiotic cohesins modulate chromosome compaction during meiotic prophase in fission yeast. *J. Cell Biol.* **174**, 499–508.

Esteban, V., Blanco, M., Cueille, N., Simanis, V., Moreno, S., & Bueno, A. (2004). A role for the Cdc14-family phosphatase Flp1p at the end of the cell cycle in controlling the rapid degradation of the mitotic inducer Cdc25p in fission yeast. *J. Cell Sci.* **117**, 2461–

2468.

Fu, C., Ward, J.J., Loiodice, I., Velve-Casquillas, G., Nedelec, F.J., & Tran, P.T. (2009). Phospho-regulated interaction between kinesin-6 Klp9p and microtubule bundler Ase1p promotes spindle elongation. *Dev. Cell* **17**, 257–267.

Girard, J.P., Caizergues-Ferrer, M., & Lapeyre, B. (1993). The SpGAR1 gene of Schizosaccharomyces pombe encodes the functional homologue of the snoRNP protein GAR1 of Saccharomyces cerevisiae. *Nucleic Acids Res.* **21**, 2149–2155.

Guo, J.Y., Xia, B., & White, E. (2013). Autophagy-mediated tumor promotion. *Cell* **155**, 1216–1219.

Harigaya, Y., Tanaka, H., Yamanaka, S., Tanaka, K., Watanabe, Y., Tsutsumi, C., Chikashige, Y., Hiraoka, Y., Yamashita, A., & Yamamoto, M. (2006). Selective elimination of messenger RNA prevents an incidence of untimely meiosis. *Nature* **442**, 45–50.

Hauf, S., Biswas, A., Langegger, M., Kawashima, S.A., Tsukahara, T., & Watanabe, Y. (2007). Aurora controls sister kinetochore mono-orientation and homolog bi-orientation in meiosis-I. *EMBO J.* **26**, 4475–4486.

Hentges, P., Van Driessche, B., Tafforeau, L., Vandenhaute, J., & Carr, A.M. (2005). Three novel antibiotic marker cassettes for gene disruption and marker switching in Schizosaccharomyces pombe. *Yeast Chichester Engl.* **22**, 1013–1019.

Iino, Y., & Yamamoto, M. (1985). Negative control for the initiation of meiosis in Schizosaccharomyces pombe. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 2447–2451.

Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., & Ohsumi, Y. (2000). Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J. Cell Biol.* **150**, 1507–1513.

Kawashima, S.A., Tsukahara, T., Langegger, M., Hauf, S., Kitajima, T.S., & Watanabe, Y. (2007). Shugoshin enables tension-generating attachment of kinetochores by loading Aurora to centromeres. *Genes Dev.* **21**, 420–435.

Khmelinskii, A., Lawrence, C., Roostalu, J., & Schiebel, E. (2007). Cdc14-regulated midzone assembly controls anaphase B. *J. Cell Biol.* **177**, 981–993.

Kim, S., Meyer, R., Chuong, H., & Dawson, D.S. (2013). Dual mechanisms prevent premature chromosome segregation during meiosis. *Genes Dev.* **27**, 2139–2146.

Kim, S.H., Lin, D.P., Matsumoto, S., Kitazono, A., & Matsumoto, T. (1998). Fission yeast Slp1: an effector of the Mad2-dependent spindle checkpoint. *Science* **279**, 1045–1047.

Kishimoto, T. (2003). Cell-cycle control during meiotic maturation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 654–663.

Klionsky, D.J., Cregg, J.M., Dunn, W.A., Emr, S.D., Sakai, Y., Sandoval, I.V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., & Ohsumi, Y. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell* **5**, 539–545.

Kohda, T.A., Tanaka, K., Konomi, M., Sato, M., Osumi, M., & Yamamoto, M. (2007). Fission yeast autophagy induced by nitrogen starvation generates a nitrogen source that drives adaptation processes. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* **12**, 155–170.

Kotwaliwale, C.V., Frei, S.B., Stern, B.M., & Biggins, S. (2007). A pathway containing the Ipl1/aurora protein kinase and the spindle midzone protein Ase1 regulates yeast spindle assembly. *Dev. Cell* **13**, 433–445.

Kovacikova, I., Polakova, S., Benko, Z., Cipak, L., Zhang, L., Rumpf, C., Miadokova, E., & Gregan, J. (2013). A knockout screen for protein kinases required for the proper meiotic segregation of chromosomes in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. *Cell Cycle* **12**, 618–624.

Krawchuk, M.D., & Wahls, W.P. (1999). High-efficiency gene targeting in Schizosaccharomyces pombe using a modular, PCR-based approach with long tracts of flanking homology. *Yeast Chichester Engl.* **15**, 1419–1427.

Kroemer, G., Mariño, G., & Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell* **40**, 280–293.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.

Liu, E.Y., & Ryan, K.M. (2012). Autophagy and cancer--issues we need to digest. *J. Cell Sci.* **125**, 2349–2358.

Loïodice, I., Staub, J., Setty, T.G., Nguyen, N.-P.T., Paoletti, A., & Tran, P.T. (2005).

Ase1p organizes antiparallel microtubule arrays during interphase and mitosis in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1756–1768.

Lopez, A.L., Chen, J., Joo, H.-J., Drake, M., Shidate, M., Kseib, C., & Arur, S. (2013). DAF-2 and ERK couple nutrient availability to meiotic progression during Caenorhabditis elegans oogenesis. *Dev. Cell* **27**, 227–240.

Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E.H., & Kroemer, G. (2014). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 81–94.

Marston, A.L., & Amon, A. (2004). Meiosis: cell-cycle controls shuffle and deal. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 983–997.

Masuda, H., Toda, T., Miyamoto, R., Haraguchi, T., & Hiraoka, Y. (2006). Modulation of Alp4 function in Schizosaccharomyces pombe induces novel phenotypes that imply distinct functions for nuclear and cytoplasmic gamma-tubulin complexes. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* **11**, 319–336.

Mijaljica, D., Prescott, M., & Devenish, R.J. (2010). The intricacy of nuclear membrane dynamics during nucleophagy. *Nucleus* **1**, 213–223.

Mizushima, N., & Komatsu, M. (2011). Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* **147**, 728–741.

Mizushima, N., & Levine, B. (2010). Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat. Cell Biol.* **12**, 823–830.

Molnar, M., Bähler, J., Kohli, J., & Hiraoka, Y. (2001). Live observation of fission yeast meiosis in recombination-deficient mutants: a study on achiasmate chromosome segregation. *J. Cell Sci.* **114**, 2843–2853.

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

Mukaiyama, H., Kajiwara, S., Hosomi, A., Giga-Hama, Y., Tanaka, N., Nakamura, T., & Takegawa, K. (2009). Autophagy-deficient Schizosaccharomyces pombe mutants undergo partial sporulation during nitrogen starvation. *Microbiol. Read. Engl.* **155**, 3816–3826.

Nabeshima, K., Nakagawa, T., Straight, A.F., Murray, A., Chikashige, Y., Yamashita, Y.M., Hiraoka, Y., & Yanagida, M. (1998). Dynamics of centromeres during metaphase-anaphase transition in fission yeast: Dis1 is implicated in force balance in metaphase bipolar spindle. *Mol. Biol. Cell* **9**, 3211–3225.

Nagaoka, S.I., Hassold, T.J., & Hunt, P.A. (2012). Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 493–504.

Nakase, Y., Nakamura, T., Hirata, A., Routt, S.M., Skinner, H.B., Bankaitis, V.A., & Shimoda, C. (2001). The Schizosaccharomyces pombe spo20(+) gene encoding a homologue of Saccharomyces cerevisiae Sec14 plays an important role in forespore membrane formation. *Mol. Biol. Cell* **12**, 901–917.

Newnham, L., Jordan, P.W., Carballo, J.A., Newcombe, S., & Hoffmann, E. (2013). Ipl1/Aurora kinase suppresses S-CDK-driven spindle formation during prophase I to ensure chromosome integrity during meiosis. *PloS One* **8**, e83982.

Pereira, G., & Schiebel, E. (2003). Separase regulates INCENP-Aurora B anaphase spindle function through Cdc14. *Science* **302**, 2120–2124.

Piekarska, I., Kucharczyk, R., Mickowska, B., Rytka, J., & Rempola, B. (2010). Mutants of the Saccharomyces cerevisiae VPS genes CCZ1 and YPT7 are blocked in different stages of sporulation. *Eur. J. Cell Biol.* **89**, 780–787.

Rong, Y., McPhee, C.K., McPhee, C., Deng, S., Huang, L., Chen, L., Liu, M., Tracy, K., Baehrecke, E.H., Baehreck, E.H., Yu, L., & Lenardo, M.J. (2011). Spinster is required for autophagic lysosome reformation and mTOR reactivation following starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 7826–7831.

Rubinsztein, D.C., Mariño, G., & Kroemer, G. (2011). Autophagy and Aging. *Cell* **146**, 682–695.

Sakakibara, Y., Hashimoto, S., Nakaoka, Y., Kouznetsova, A., Höög, C., & Kitajima, T.S. (2015). Bivalent separation into univalents precedes age-related meiosis I errors in oocytes. *Nat. Commun.* **6**, 7550.

Santaguida, S., & Musacchio, A. (2009). The life and miracles of kinetochores. *EMBO J.* **28**, 2511–2531.

Shintani, T., & Klionsky, D.J. (2004). Cargo proteins facilitate the formation of

transport vesicles in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 29889–29894.

Sun, L.-L., Li, M., Suo, F., Liu, X.-M., Shen, E.-Z., Yang, B., Dong, M.-Q., He, W.-Z., & Du, L.-L. (2013). Global analysis of fission yeast mating genes reveals new autophagy factors. *PLoS Genet.* **9**, e1003715.

Tamai, K.K., & Shimoda, C. (2002). The novel HECT-type ubiquitin-protein ligase Pub2p shares partially overlapping function with Pub1p in Schizosaccharomyces pombe. *J. Cell Sci.* **115**, 1847–1857.

Tanaka, T.U. (2010). Kinetochore-microtubule interactions: steps towards bi-orientation. *EMBO J.* **29**, 4070–4082.

Tatchell, K., Makrantoni, V., Stark, M.J.R., & Robinson, L.C. (2011). Temperature-sensitive ipl1-2/Aurora B mutation is suppressed by mutations in TOR complex 1 via the Glc7/PP1 phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 3994–3999.

Trautmann, S., Wolfe, B.A., Jorgensen, P., Tyers, M., Gould, K.L., & McCollum, D. (2001). Fission yeast Clp1p phosphatase regulates G2/M transition and coordination of cytokinesis with cell cycle progression. *Curr. Biol. CB* **11**, 931–940.

Tsukada, M., & Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of Saccharomyces cerevisiae. *FEBS Lett.* **333**, 169–174.

Tsukahara, T., Tanno, Y., & Watanabe, Y. (2010). Phosphorylation of the CPC by Cdk1 promotes chromosome bi-orientation. *Nature* **467**, 719–723.

Uritani, M., Hidaka, H., Hotta, Y., Ueno, M., Ushimaru, T., & Toda, T. (2006). Fission yeast Tor2 links nitrogen signals to cell proliferation and acts downstream of the Rheb GTPase. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* **11**, 1367–1379.

Wolfe, B.A., & Gould, K.L. (2004). Fission yeast Clp1p phosphatase affects G2/M transition and mitotic exit through Cdc25p inactivation. *EMBO J.* **23**, 919–929.

Yamamoto, A., & Hiraoka, Y. (2003). Monopolar spindle attachment of sister chromatids is ensured by two distinct mechanisms at the first meiotic division in fission yeast. *EMBO J.* **22**, 2284–2296.

Yamamoto, A., Kitamura, K., Hihara, D., Hirose, Y., Katsuyama, S., & Hiraoka, Y.

(2008). Spindle checkpoint activation at meiosis I advances anaphase II onset via meiosis-specific APC/C regulation. *J. Cell Biol.* **182**, 277–288.

Yamashita, A., Sato, M., Fujita, A., Yamamoto, M., & Toda, T. (2005). The roles of fission yeast ase1 in mitotic cell division, meiotic nuclear oscillation, and cytokinesis checkpoint signaling. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1378–1395.

Yoshida, M., Katsuyama, S., Tateho, K., Nakamura, H., Miyoshi, J., Ohba, T., Matsuhara, H., Miki, F., Okazaki, K., Haraguchi, T., Niwa, O., Hiraoka, Y., & Yamamoto, A. (2013). Microtubule-organizing center formation at telomeres induces meiotic telomere clustering. *J. Cell Biol.* **200**, 385–395.

Yu, L., McPhee, C.K., Zheng, L., et al. (2010). Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature* **465**, 942–946.

謝辞

静岡大学の山本歩 教授には、研究指導の教員として、実験法や研究進行、論文の作成を指導していただきました。静岡大学の丑丸敬史 教授、瓜谷眞裕 教授ご両名には、合同ゼミで研究についてご助言をいただき、また、投稿論文の作成でご助言をいただきました。静岡大学の大吉崇文 講師には合同ゼミでご助言をいただきました。基礎生物学研究所の鎌田芳彰 助教には、投稿論文の作成でご助言をいただきました。大阪大学の篠原彰 教授、寺澤匡博 特任助教、Hanumanthu B. D. Prasada Rao さんには、DeltaVision 顕微鏡システムの使用やそれにかかわる技術的な操作でご支援をいただきました。九州大学の竹川薫教授には、本研究で得られた変異株の特徴について比較するために数種のオートファジー関連因子欠損株をご提供いただきました。廣瀬幸伸さん、日原大輔さん、中村博人さん、市川絢登さんには、いくつかの酵母菌株やプラスミドをご提供いただきました。

酵母菌株およびゲノム DNA ライブラリーを文部科学省によるナショナルバイオリソースプロジェクトから提供いただきました。DNA 含量のフローサイトメトリー解析には静岡大学グリーン科学技術研究所 研究支援室の設備を利用させていただきました。

また、本研究は、静岡大学学生公募プロジェクトによる助成金、および、大阪大学蛋白質研究所の共同研究員制度を利用させていただきました。