

学位論文

分裂酵母 Wee1 キナーゼの
動原体と微小管の接続における
新規機能の解析

高堂 将広

目次

| | |
|--|----|
| 要旨 | 2 |
| 第一章 序論 | |
| 1-1. 細胞周期 | 4 |
| 1-2. サイクリン・CDK 複合体 | 4 |
| 1-3. Wee1 キナーゼ | 6 |
| 1-4. 染色体分配 | 8 |
| 1-5. スピンドルチェックポイント | 9 |
| 第二章 結果 | |
| 2-1. <i>wee1</i> 変異株の生育はスピンドルチェックポイントに依存する | 12 |
| 2-2. <i>wee1</i> 変異株では動原体とスピンドル微小管の接続が不安定である | 14 |
| 2-3. <i>wee1</i> 変異株ではスピンドルチェックポイントが活性化している | 17 |
| 2-4. <i>wee1-50 mad2Δ</i> 二重変異株では染色体の不均衡分配が起こる | 20 |
| 第三章 考察 | 22 |
| 第四章 材料と方法 | 35 |
| 参考文献 | 42 |
| 謝辞 | 48 |
| 図表 | 50 |

要旨

Wee1 キナーゼは広く真核生物に保存されたタンパク質で、Cdk1 / Cdc2 キナーゼをリン酸化することにより細胞周期の M 期（分裂期）の開始を抑制する機能を持つ。分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* では Wee1 を欠損すると M 期の開始が早まるが、致死でないことが知られている。

本研究では Wee1 を欠損した細胞の生存が M 期の監視機構であるスピンドルチェックポイントに依存することを示した。M 期の開始が早まる他の変異株ではこの依存性は見られなかったため、Wee1 にはこれまでに知られている M 期開始のタイミングの制御以外の新規機能があることが示唆された。

また、生細胞におけるタイムラプス観察により、*wee1* 変異株では約 3 割の M 期細胞でスピンドル微小管から外れた動原体が観察された。この種の動原体は *wee1* 変異株において一過的に出現し、やがてスピンドル微小管に捕捉されるが、それまで姉妹染色分体の分離は起こらなかった。さらに *wee1* 変異株ではスピンドル微小管に未接続の動原体上に局在するスピンドルチェックポイントタンパク質 Mad2 の集積が観察された。

以上より、Wee1 タンパク質は M 期においてスピンドル微小管と動原体の接続の安定性に関わることが明らかとなった。それゆえ *wee1* 変異株が染色体を均等に分配して生育するためにはスピンドルチェックポイントの活性化によって姉妹染色分体の分離を遅延させてスピンドル微小管と動原体の接続が完了するための時間を稼ぐ必要があるというモデルが考えられる。

この知見は、従来の M 期開始タイミングの制御機能に基づいて計画されている、Wee1 阻害剤を用いたがん治療においても新たな判断材料を提供するものと考えられる。

第一章

序論

1-1. 細胞周期

細胞の増殖は、生命を特徴づける最も根源的な性質の一つである (Monod, 1972; Nurse, 2003)。細胞は増殖にあたり構成成分を倍化する必要があるが、とりわけ 1 細胞あたりのゲノム DNA の分子数は厳密に制御されている (Nasmyth, 1996)。通常の細胞増殖に際してゲノム DNA の複製はただ一度だけ起こり、複製されたゲノム DNA は娘細胞に均等に分配される。真核細胞ではこの 2 つの時期は時間的に区切られており、ゲノム DNA の複製と分配とは同時には起こらない。それゆえ細胞の増殖サイクル (細胞周期) は次の 4 つの時期に分けて考えることができる (図 1) (Hartwell and Kastan, 1994; Matthews et al., 2022)。DNA 複製の準備期間である G1 期、DNA が複製される S 期、複製された DNA を分配するための準備期間としての G2 期、DNA を分配し母細胞が 2 つの娘細胞に分裂する M 期 (有糸分裂期) の 4 つの時期である。M 期が完了すると、分かれた娘細胞は再び G1 期に進入し、栄養源やその他の条件が許せばもう一度細胞周期が進行することになる。M 期以外の 3 つの時期はまとめて間期と呼ばれる。

1-2. サイクリン・CDK 複合体

細胞周期が進行するメカニズムは、サイクリンタンパク質と CDK (Cyclin-Dependent Kinase) タンパク質の複合体の制御がその核にある (図 2A) (Hunt,

1989; Koliopoulos and Alferi, 2022; Morgan, 1995; Pines, 1994)。CDK は様々な基質タンパク質をリン酸化する酵素（キナーゼ）で、その活性化によって細胞周期を進行させる機能をもつ。CDK の活性化には次の 2 つの制御機構が存在する。1 つ目は CDK の調節サブユニットであるサイクリンの安定性の制御である。サイクリンは合成と分解によってその存在量が調節されており、合成が優位になると蓄積し CDK と結合するものが増加する。2 つ目は CDK が受けるリン酸化修飾であり、修飾を受けるアミノ酸残基の位置によって CDK を活性化するものと不活性化するものがある。活性化型の修飾を持った CDK とサイクリンの複合体は細胞周期進行に必要なタンパク質のリン酸化を行えるようになる。サイクリンと CDK は各々複数種類が存在するが、本論文で扱う分裂酵母の G2 / M 期の制御に限ると、この時期に働くサイクリンは Cdc13 タンパク質、CDK は Cdc2 タンパク質の 1 種ずつが知られている。したがって分裂酵母においては G2 期の終わりに Cdc13 が蓄積し、Cdc2 のリン酸化状態が活性化型になると Cdc13・Cdc2 複合体が活性化し、細胞周期が M 期へと進行する (Coleman and Dunphy, 1994; Nurse, 1990; Wood and Nurse, 2015)。

Cdc2 タンパク質が受けるリン酸化修飾にはその修飾部位によって活性化型と不活性化型がある。このうち Cdc2 を不活性化するのが 15 番目のチロシン残基 (Y15) のリン酸化である (図 2B) (Kellogg, 2003; Russell and Nurse, 1987)。

このリン酸化は Wee1 キナーゼによって行われ、Cdc2 が活性化するためには Cdc25 フォスファターゼによる脱リン酸化が必要である (Russell and Nurse, 1986)。すなわち Cdc2 の Y15 のリン酸化は M 期開始直前まで見られ、Cdc25 による脱リン酸化とともに Cdc2 キナーゼが活性化して M 期開始に必要なタンパク質のリン酸化を行い、M 期が進行していく。

1-3. Wee1 キナーゼ

Wee1 キナーゼは真核生物において広く保存されているが、元は分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の *cdc* (cell division cycle) 変異株のスクリーニングの中で見つかった (Nurse, 1975) (この論文中の *cdc9-50* 変異株がのちに *wee1-50* 変異株と改称された (Thuriaux et al., 1978))。このスクリーニングは細胞周期の一時点で増殖サイクルが停止し、細胞成長のみが起こることによって細胞長が長くなることを指標に様々な高温感受性変異株の取得を可能にした (Nurse et al., 1976)。例えば *cdc2-33* 変異株は *cdc2⁺* 遺伝子に変異を持つ。この株では高温条件下において Cdc2 キナーゼの活性が減弱するため、M 期の開始に必要なタンパク質のリン酸化が起こらず細胞周期が G2 期と M 期の境界で停止する。また、*cdc25-22* 変異株は *cdc25⁺* 遺伝子に変異を持ち、高温条件下では M 期開始に必要な Cdc2 タンパク質の脱リン酸化が起こらないため、同様に細胞周期が

G2 期と M 期の境界で停止する (Fantès, 1979)。

このスクリーニングでは細胞長が長くなるもの (*cdc* 変異株) が多く取得されたが、同時に短くなるものも取得され *wee* 変異株と名付けられた (*wee* はスコットランド語で「小さい」を意味する)。その後の解析で *wee* 変異株の原因遺伝子として *wee1⁺* 遺伝子と *cdc2⁺* 遺伝子が同定された (Thuriaux et al., 1978)。*wee1-50* 変異株では高温条件下で Wee1 の活性が減弱し Cdc2 の Y15 のリン酸化が起こりにくくなるため早期に Cdc2 が活性化する。そのため G2 期で細胞が長く成長する前に M 期を開始し細胞分裂が起こるので細胞長が短くなる。一方、*wee2-1* 変異株 (その後の解析で原因遺伝子が *cdc2⁺* 遺伝子であることが判明し、*cdc2-1w* 変異株に改称された (Fantès, 1981)。前述の *cdc2-33* 変異株とは変異点が異なる) では Wee1 キナーゼは野生型のままであるにも関わらず変異型 Cdc2 が Wee1 による抑制を受けにくくなっているため、やはり M 期開始が早まり細胞長が短くなる。このほか *cdc25-22* 変異株の高温感受性を抑圧する *cdc2⁺* 遺伝子の変異として *cdc2-3w* 変異も単離されている (Fantès, 1981) (*wee1-50* 変異あるいは *cdc2-1w* 変異も *cdc25-22* 変異株の高温感受性を抑圧することが確認されている)。 *cdc* 変異が細胞周期を停止する致死的な変異なのに対して、*wee* 変異は高温条件下でも細胞長が短くなるのみで生育には影響しない。

1-4. 染色体分配

Cdc2 キナーゼが活性化し M 期（有糸分裂期）が開始すると、細胞内では染色体の分配に向けて以下の変化が起き始める（図 3A）（Ding et al., 1993; Hagan, 1998; Nakaseko et al., 2001）。まず紡錘極体（SPB : spindle pole body）（微小管の形成中心で、菌類における中心体の相同器官）が 2 つに分離する。分離した SPB は核膜上をお互いに遠ざかり、核内にできるスピンドル微小管の重合核となる（分裂酵母は M 期に核膜の崩壊が起こらない closed mitosis を行う（Sazer et al., 2014））。それに伴い、間期に特徴的な細胞質の微小管は消失（脱重合）する。SPB は核の両極に到達するまで移動し、2 つの SPB の間には中期スピンドル微小管が形成される。姉妹染色分体のそれぞれのセントロメア領域上に形成された動原体（キネトコア）に、それぞれ相異なる方向（両極の SPB）から伸びてきたスピンドル微小管が接続すると、動原体と微小管の両極性接続（bipolar attachment）が完成する（図 3B）（Tanaka, 2013）。この状態の染色体（動原体）には両極から等しい張力がかかるため、各染色体は両極の SPB を結ぶ線上の中央付近（赤道面）に整列する（Funabiki et al., 1993; Hirai et al., 2014; Nabeshima et al., 1998; Rieder and Salmon, 1998; Salas-Pino and Daga, 2019; Yanagida, 1995）。全ての染色体において両極性接続が成立し赤道面に到達する（M 期中期と呼ぶ）と、姉妹染色分体を繋ぎ留めていたコヒーシタンパク質がセパレー

タンパク質により切断され、姉妹の染色体は両極に引っ張られて各々娘細胞へと分配される（M 期後期と呼ぶ）（図 4A）（Matsumoto and Yanagida, 2005; Nasmyth et al., 2000）。

1-5. スピンドルチェックポイント

各々の染色体が両極性接続を完成させるまでの間、セパレースタンパク質のプロテアーゼ活性はセキュリタンパク質によって負に制御されており、コヒーシン複合体の分解が抑制されている。これはスピンドル微小管に接続していない動原体が存在するとスピンドルチェックポイントという仕組みが起動されるからである（図 4B）（Luo and Yu, 2008; Musacchio, 2015; Zich and Hardwick, 2010）。スピンドル微小管に未接続の動原体上にスピンドルチェックポイントを担うタンパク質である Mad1、Mad2、Mad3、Bub1 などが集積し、Mad2、Mad3、Slp1、Bub3 からなる MCC 複合体（Mitotic Checkpoint Complex）を形成する（Sudakin et al., 2001; Zich et al., 2016）。これが APC/C（Anaphase Promoting Complex / Cyclosome）ユビキチンリガーゼ複合体を阻害するため、その基質であるセキュリタンパク質のポリユビキチン化と、続くプロテアソーム複合体による分解が抑制され、その結果セパレーズはセキュリンに阻害されたままになる（Peters, 2002）。この仕組みは最後の未接続動原体がスピンドル

微小管と接続し両極性接続を完成させるまで続くので、その間姉妹染色分体の分離は起こらず細胞周期の進行は遅延する。

もし万が一スピンドルチェックポイントが働かず、未接続動原体が存在する状態でセパレーズが活性化してしまうと、その染色体はスピンドル微小管によって引っ張られないため、どちらの娘細胞に分配されるかがランダムとなり異数体細胞が発生してしまう可能性が出てくる。異数体は分裂酵母においては致死となるが、ヒト細胞などにおいては細胞死を起こすほか、発生の異常やがん化との関連が示唆されている (Holland and Cleveland, 2009; Lakhani et al., 2023; Pfau and Amon, 2012)。

本研究では分裂酵母における Wee1 キナーゼの温度感受性変異株 *wee1-50* 株が生育するのにスピンドルチェックポイントを必要とすることを見出した。この依存性が生じる原因を調べることで Wee1 キナーゼに M 期開始の制御以外の新規の機能があるのではないかという可能性について検討することを研究の目的とした。

第二章

結果

2-1. *wee1* 変異株の生育はスピンドルチェックポイントに依存する

これまで分裂酵母 *S. pombe* の *wee1-50* 高温感受性株は 36°C で Wee1 キナーゼの活性が減弱し野生型株 (WT) よりも早期に M 期へと進入するが、その条件下でも生育できることが報告されていた (Fantès, 1979; Matsumoto, 1997; Nurse, 1975)。本研究では *wee1-50* 高温感受性株においてスピンドルチェックポイント因子 *mad2⁺* を欠損させると 36°C で生育が阻害されることを見出した (図 5A)。*mad2⁺* 遺伝子の単独欠損株 (*mad2Δ*) では温度による生育の変化は起こらず、チアベンダゾール (TBZ) のような微小管の重合阻害剤が存在するときのみ生育阻害が起こる (He et al., 1997; Tange and Niwa, 2008)。この生育阻害は、動原体と接続するべき微小管が TBZ により不安定化しているにも関わらずスピンドルチェックポイントが活性化できないため、動原体と微小管とが安定に接続するのを待たずに姉妹染色分体が分かれてしまうことによって染色体が不均等に分配される結果と理解されている。それゆえ *wee1-50 mad2Δ* 二重変異株が示す高温感受性は、*wee1⁺* 遺伝子の変異によって動原体と微小管の接続が不安定化していることにより引き起こされたのではないかと推察された。

この推察を確かめるため、Mad2 以外のスピンドルチェックポイントの関連因子 Mad1、Mad3、Bub1 の欠損、さらにスピンドルチェックポイントの標的である APC/C のサブユニット Slp1 における変異で Mad2 による阻害を受けなく

なる変異 (*slp1-mr63* (Kim et al., 1998)) のそれぞれと *wee1-50* 変異の二重変異株を作成し、生育の度合いを評価した (図 5A, B)。その結果、いずれの二重変異株においても 36°C で生育の阻害が見られた。このことから、*wee1-50 mad2Δ* 二重変異株で見られた生育阻害は *mad2* 遺伝子の欠損に特異的な事象ではなく、スピンドルチェックポイントの機能が欠損することによって起こるものと理解された。また、スピンドルチェックポイントが感知する対象が微小管に未接続の動原体 (キネトコア) であることから、*wee1* 変異株の中では動原体とスピンドル微小管の接続が不安定化していることが考えられた。

さらに、スピンドルチェックポイントの欠損による生育阻害は *cdc2-1w*、*cdc2-3w* といった変異株では見られなかった (図 6A)。*wee1-50* 変異株と同様、*cdc2-1w*、*cdc2-3w* 変異株はいずれも Cdc2 キナーゼの活性化が Cdc25 に依存せず早期に起こるため M 期の開始が早まる (図 6B)。また、M 期の開始が早まるため、G2 期が短くなり細胞長が短くなるという特徴を持つ (35°C における細胞分裂時の細胞長の平均は、野生型株: 14.2 μ m、*wee1-50* 変異株: 7.9 μ m、*cdc2-1w* 変異株: 7.7 μ m、*cdc2-3w* 変異株: 9.3 μ m だったという報告がある (Fantès, 1981))。スピンドルチェックポイントの欠損による生育阻害が *cdc2-1w*、*cdc2-3w* 変異株では見られず、*wee1* 変異株に特異的に見られるということは、生育阻害の原因は M 期開始の早期化あるいは細胞長の変化ではないと推察される (表 1)。

2-2. *wee1* 変異株では動原体とスピンドル微小管の接続が不安定である

スピンドルチェックポイントの欠損により生育阻害が起こることから、*wee1* 変異株の中では微小管に未接続の動原体が野生型株よりも高頻度で出現しているのではないかと考えられたので、微小管と動原体（キネトコア）の細胞内局在を観察した。しかし、*wee1-50* 高温感受性株はスピンドルチェックポイントが正常であれば 36°C でも生育可能であることから、微小管に未接続の動原体は一過的にしか出現しないと予想された。そのため、微小管と動原体のタイムラプス観察を行うこととした。また、*wee1-50* 高温感受性株で表現型を観察するには 36°C で培養し続ける必要があるが、これは野生型株においても至適温度といえない。加えて、顕微鏡一式を 36°C に保つ必要があるが、観察サンプルの交換等でドアを開閉したときに温度が下がり観察結果に影響を与えかねないと判断し、ここでは *wee1-50* 高温感受性株でなく *wee1⁺* 遺伝子の欠損株（温度感受性はない）を用いることにした（図 7）。これにより、顕微鏡のある部屋の室温と変わりのない 26°C での観察が可能になった。 α -チューブリン (Atb2) と mCherry、CENP-A (Cnp1) と GFP の融合タンパク質を野生型株 (WT) と *wee1⁺* 遺伝子の欠損株 (*wee1 Δ*) にそれぞれ発現させて微小管と動原体のマーカーとした（図 8）。

間期特有の細胞質微小管が消失し、核内にスピンドル微小管が形成され始めるタイミングを M 期の開始点とすると、野生型株 (30 細胞) では 15 分以内に

GFP-Cnp1 の輝点が 1 点から 2 点へと変化した (図 8A)。分裂酵母では間期からセントロメア領域が紡錘極体 (SPB) 近傍に集積しており、スピンドル微小管に捕捉され M 期後期に両極に引っ張られるまでは 1 点に見える (Hirai et al., 2014; Nabeshima et al., 1998)。つまり、野生型株では M 期開始後 15 分以内に M 期後期に進入することがわかった。また、この GFP-Cnp1 の輝点は M 期開始後、常にスピンドル微小管上に観察された。

一方、*wee1* 欠損株 (62 細胞) では M 期後期開始前に GFP-Cnp1 の輝点が 2 点見える細胞 (62 細胞中 18 細胞) が観察された (図 8B、C)。しかもこの 2 つの輝点の片方はスピンドル微小管上にあったが、もう片方はスピンドル微小管から離れた位置に存在していた。以後、これを「サテライトキネトコア」と呼称する。サテライトキネトコアにおける GFP-Cnp1 の輝点は一過的にスピンドル微小管から離れた位置に局在するが、時間が経つとスピンドル微小管上に局在する他の GFP-Cnp1 の輝点と融合し 1 点となった。M 期後期になると野生型株と同様に 2 点に分かれ、娘細胞に分配された。また、図 8C に示すようにサテライトキネトコアの輝点の中には一度スピンドル微小管上に局在を変化させたのちに再びスピンドル微小管上から外れるものも観察された (18 細胞中 4 細胞)。少なくとも 1 回以上サテライトキネトコアが出現する細胞の割合を調べると、野生型株では 0% (0/30 細胞) だったのに対し、*wee1* 欠損株ではおよそ 29%

(18/62 細胞)だった (図 9)。

個々の細胞におけるスピンドル微小管の伸長を示したのが図 10 である。それぞれの線が 1 つの細胞に対応している。野生型株では細胞間の相違は小さく、スピンドル微小管が核内に現れてからほとんど止まることなくスピンドル微小管を伸長していることがわかる。一方で *wee1* 欠損株では個々の細胞間でばらつきがあり、スピンドル長が $2\mu\text{m}$ 前後で留まる細胞が存在していたが、それらの細胞も最終的には他の細胞と同程度までスピンドル微小管が伸長し、M 期を脱している。

図 11 は個々の細胞の M 期の長さ (M 期開始から後期開始までの時間) とサテライトキネトコアの有無を対応させたグラフである。後期の開始はスピンドル微小管上の GFP-Cnp1 の輝点が 1 点から 2 点に分かれたタイミング (姉妹染色分体が分離したと考えられる) とした。図 10 と同様、野生型株ではそのばらつきは小さいが、*wee1* 欠損株では細胞間のばらつきが大きい。しかし *wee1* 欠損株においてもサテライトキネトコアが出現しなかった細胞 (図中の青棒) の M 期の長さはほぼ揃っていて、ばらついているのはサテライトキネトコアが出現した細胞 (図中の緑棒) においてである。これらの細胞において、M 期後期が開始するのはサテライトキネトコアがスピンドル微小管上に局在を移した (緑棒中の色が濃い緑色から薄い緑色に変わった) 後であり、それまでは後期の開始

が遅延している。

過去の論文でも報告されているように、*wee1* 欠損株の中には1つの細胞の中に2つの核が共存する dikaryon とみられるものも存在した(76細胞中14細胞) (図12) (Grallert et al., 1998; Thuriaux et al., 1978)。これらの細胞ではスピンドル微小管が2本観察されたが、M期に入る前から GFP-Cnp1 の輝点が2点存在した。これはおそらく紡錘極体 (SPB) が2つ存在する (M期にそれぞれが分かれて計4つになる) ことにより、セントロメアの SPB への集積が2箇所で行われているものと推察される。今回のタイムラプス観察では野生型株も *wee1* 欠損株も通常の haploid 株同士で比較するために、dikaryon とみられる14細胞は集計から除外した (76-14=62細胞)。

2-3. *wee1* 変異株ではスピンドルチェックポイントが活性化している

図11で *wee1* 欠損株においてサテライトキネトコアが出現すると M 期後期の開始が遅延していることがわかった。この遅延がスピンドルチェックポイントの活性化によるものではないかと考えられたので、スピンドルチェックポイントの中心因子で微小管に未接続の動原体上に局在する Mad2 タンパク質に注目した(Chen et al., 1996; Li and Benezra, 1996; Waters et al., 1998)。GFP を融合した Mad2、mCherry を融合した α -チューブリン (Atb2) を野生型株と *wee1*

欠損株に発現させてタイムラプス観察を行なった (図 13)。

過去の報告にもあるように、Mad2 タンパク質は M 期が開始すると SPB 近傍に局在し、その後 M 期が進行するとスピンドル微小管全体に薄く局在が見られるようになる (Ikui et al., 2002; Saitoh et al., 2005)。これらの局在の意義については現時点であまりよくわかっていないが、本観察で見られた野生型株での Mad2-GFP の局在はこれと一致するものであった (30 細胞) (図 13A)。これに対して *wee1* 欠損株ではスピンドル微小管から離れた位置に Mad2-GFP の輝点 (薄く見える Mad2 のシグナルと区別して Mad2 スペックルと呼称) が観察された。これも GFP-Cnp1 の観察で見られたサテライトキネトコアの挙動と同様に、細胞によって一度だけ出現するもの (図 13B) と複数回出現するものが存在した (図 13C)。少なくとも 1 回 Mad2 スペックルが出現した細胞を数えると、野生型株では 30 細胞中 0 細胞 (0%)、*wee1* 欠損株では 101 細胞中 28 細胞 (およそ 28%) だった (図 14)。この数字は GFP-Cnp1 の観察で得られたサテライトキネトコアの出現頻度 (29%) とよく一致している。

図 15 では図 10 と同様に M 期開始後の個々の細胞でのスピンドル微小管の伸長の様子をプロットした。概観は図 10 とよく似ており、野生型株では細胞間のばらつきが小さく、*wee1* 欠損株ではばらつきが大きい。細胞によってはスピンドル長が $2\mu\text{m}$ 前後で留まりなかなかスピンドル微小管が伸びてこないものが

観察されたことも図 10 の結果とよく一致している。これらの細胞も図 10 と同様、最終的にはスピンドル微小管を伸長し M 期を脱している。

図 16 は個々の細胞の M 期の長さ と Mad2 スペックルの有無の対応を示している。動原体のマーカ (GFP-Cnp1) が ない の で スピンドル微小管の伸び方から後期の開始を判断した。図 15 でスピンドル長が $2\mu\text{m}$ 前後から急に伸び始めるタイミング (姉妹染色分体が分離したと考えられる) を後期の開始とした (図 15 の変曲点) (Nabeshima et al., 1998)。ここでも野生型株ではばらつきは小さく M 期開始後 15 分以内に後期が開始している。一方、*wee1* 欠損株では Mad2 スペックルが出現しなかった細胞 (図 16 の青棒) 間ではばらつきは小さく M 期開始後 20 分以内に後期が開始しているが、Mad2 スペックルが出現した細胞 (図 16 の緑棒) では後期の開始が遅延しており、Mad2 スペックルが消失して (図 16 の緑棒が濃い緑色から薄い緑色に変わってから) はじめて後期が開始していることがわかる。以上より、*wee1* 欠損株ではスピンドルチェックポイントが活性化しており、それが細胞周期の進行の遅延を引き起こしていることが考えられた。

また、Mad2 以外のスピンドルチェックポイント因子として、スピンドル微小管に未接続の動原体上に局在する Bub1 も Mad2 と同様の局在パターンを示すと考えられた (Sudakin et al., 2001)。GFP を融合した Bub1 と、mCherry を融合

した α -チューブリン (Atb2) を発現させた野生型株と *wee1* 欠損株をそれぞれメタノールで固定して観察した結果が図 17 である。予想通り、*wee1* 欠損株では Bub1 もスピンドル微小管から離れた位置に輝点 (Bub1 スペックルと呼称) が観察された。

2-4. *wee1-50 mad2* Δ 二重変異株では染色体の不均衡分配が起こる

ここまでの結果で、*wee1* 変異株では動原体と微小管の接続が不安定化しており、スピンドルチェックポイントに依存して M 期後期の開始が遅延するとわかった。そうであれば、図 5 において *wee1-50 mad2* Δ 二重変異株が示す生育阻害は次のように解釈できる。高温条件下では Wee1 キナーゼの活性が減弱するので動原体と微小管の接続が不安定化する。通常であればスピンドルチェックポイントが活性化して、接続が回復するまで細胞周期の進行が止められるので生育には問題が生じない。しかし、動原体と微小管の接続が不安定化しているにも関わらずスピンドルチェックポイントが働かないと、接続が完了しないまま M 期後期が開始し姉妹染色分体の分離が起こるため、染色体がどちらの娘細胞へ分配されるかがランダムになってしまう。したがって、*wee1-50 mad2* Δ 二重変異株では染色体の不均衡分配が起こっていると予想される。

そこで、許容温度である 26°C で培養した野生型株 (WT)、*wee1-50* 変異株、

mad2 欠損株 (*mad2* Δ)、*wee1-50 mad2* Δ 二重変異株と、同じ株を 26°C で培養した後に制限温度 36°C で 1 時間培養したものをそれぞれメタノールで固定し、DNA をヘキスト 33342 で染色した (図 18)。核を 2 つ持った細胞 (binucleate cells) を選び、ヘキスト 33342 で染色されている領域の面積を測定し、染色体の分配パターンを D 値という指標を用いて評価した (計算方法は「材料と方法」に記載した)。ヘキスト 33342 で染色される面積と含まれる DNA 量はおおよそ比例関係にあると考えられるので、染色体が均等に分配されれば理論的には D 値は 0 になり、全ての染色体が片方の娘細胞に偏って分配されると 1 になる)。分裂酵母は 3 本の染色体を持つので、一番短い 3 番染色体が誤った分配を起こしたときの D 値 ≈ 0.20 を閾値として、これより小さな D 値の場合は染色体が均等に分配され、0.20 以上の D 値を持つ場合は不均等分配が起こったとみなした。

この基準を用いて 26°C と 36°C における各株の 2 核細胞における染色体の分配パターンを集計したのが図 19、20 である。予想通り、寒天培地上で生育阻害のみられない野生型株、*wee1-50* 変異株、*mad2* 欠損株においてはほとんどの細胞で D 値は 0.20 未満であった。それに対して *wee1-50 mad2* Δ 二重変異株では 36°C において約 4 割の 2 核細胞で D 値が 0.20 以上であり、染色体が不均等に分配されていることが推察された。

第三章

考察

3-1. *wee1* 変異がスピンドルチェックポイント欠損と合成致死になる理由

本研究では、単一遺伝子変異であれば高温下でも生育可能な *wee1-50* 高温感受性株において、スピンドルチェックポイント因子である *mad2⁺* 遺伝子を欠損すると高温下で致死になることを見出し、その原因を調べた (図 5)。

この遺伝的相互作用は *mad2⁺* 遺伝子以外のスピンドルチェックポイント因子の変異 (*mad1Δ*、*mad3Δ*、*bub1Δ*、*mph1Δ*、*slp1-mr63*) でも観察された (図 5)。このことから、*wee1-50* 高温感受性株は *mad2⁺* 遺伝子を特異的に要求するわけではなく、スピンドルチェックポイントが総体として機能することを要求することが明らかとなった。

また、タイムラプス生細胞観察により、*wee1* 変異株においてスピンドル微小管から離れた位置に動原体 (サテライトキネトコア) が出現することがわかった (図 8、9)。図 11 より、染色体の分配はサテライトキネトコアが観察されなくなって初めて起こることから、サテライトキネトコアは少なくとも姉妹の動原体のうちのどちらかがスピンドル微小管との接続が完了していない「未接続動原体」であり、接続が完了するまで細胞周期の進行が停止していることが考えられる。加えて、サテライトキネトコアが一度だけ出現する細胞 (18 細胞中 14 細胞) と複数回出現する細胞 (18 細胞中 4 細胞) が存在した。これらのことから、*wee1* 変異株では動原体とスピンドル微小管との接続が不安定にな

っており、接続が外れるとスピンドルチェックポイントによって感知され、接続が完了するまで細胞周期の進行が止められていることが考えられた。

今回の観察の解像度ではスピンドル微小管がサテライトキネトコアを捕捉する様子やサテライトキネトコアとなっている姉妹の動原体のうちどちらがスピンドル微小管と未接続になっているかを捉えることはできなかった。しかし、出現したサテライトキネトコアが解消されるまでの時間はサテライトキネトコアごとに幅があり、概ね 15 分程度で解消されるものとそれよりも長時間かかるもののが観察された (図 11)。前者は姉妹の動原体のうちの片方が、後者は姉妹の両方がスピンドル微小管と未接続になっていることを反映しているのではないかと推察される (図 23)。いずれにしても既知の動原体構成因子の変異体と異なり、時間さえかければ動原体とスピンドル微小管との両極性接続が完了し、生育可能であるということは今回観察した *wee1* 変異株に特徴的な表現型である (図 18-20 vs. 図 21、22) (Hayashi et al., 2004; Kerres et al., 2007; Nabetani et al., 2001; Takahashi et al., 1994)。

wee1 変異株で観察されたサテライトキネトコアが未接続動原体だとすると、それが解消されるまで染色体分配が遅延していたのはスピンドルチェックポイントがはたらいっていたからだと考えられる。実際、図 13 の Mad2-GFP のタイムラプス生細胞観察、図 17 の Bub1-GFP の固定細胞での観察により、

wee1 変異株ではスピンドルチェックポイントが活性化していることが裏付けられた。ここでも図 16 より、Mad2 スペックルが消失するまでは M 期後期は開始していない。

また、図 18、19、20 において *wee1-50 mad2Δ* 二重変異株では 36°C で染色体の不均等分配が起こっていることが確かめられた。

以上のことから *wee1* 変異がスピンドルチェックポイント欠損と合成致死になるのは、*wee1* 変異株の中では動原体とスピンドル微小管との接続が不安定になっており、スピンドル微小管が動原体を捕捉し両極性接続が完了するまでの間、スピンドルチェックポイントが姉妹染色分体の分離のタイミングを遅延させて時間を稼がなければ染色体の均等な分配を保証できないからだと考えられる。

3-2. *wee1* 変異株で動原体とスピンドル微小管の接続が不安定になる理由

Wee1 キナーゼの基質となるタンパク質は分裂酵母においては Cdc2 のみが知られている (Kellogg, 2003; Russell and Nurse, 1987)。しかし今回の研究において、Wee1 による阻害を受けない *cdc2-1w* 変異株と *cdc2-3w* 変異株では *mad2^Δ* 遺伝子を欠損しても生育阻害は起こらなかったことから、確定的とは言えないまでも今回の *wee1* 変異株の表現型の原因となる基質タンパク質は Cdc2

以外に存在するのではないかと考えている（図 6、表 1）。これを確かめるためには Wee1 の標的となる Cdc2 の 15 番目のチロシン残基をフェニルアラニン残基に変異させた非リン酸化型 Cdc2 変異株で *mad2* 遺伝子を破壊し生育をみる方法が考えられる。加えて Cdc2 以外の基質タンパク質が実際に存在するかどうかを検証する必要がある。

分裂酵母では間期に 3 本の染色体のセントロメアが SPB に集積している。この間期のセントロメアのクラスタリングには SPB タンパク質である Sad1 とそれに結合する Csi1 タンパク質が必要だということがわかっている (Hou et al., 2012; London et al., 2023)。M 期に入ると SPB が 2 つに分離し、染色体と SPB は直接ではなくスピンドル微小管を介してつながることになる（図 3B） (Salas-Pino and Daga, 2019)。過去の論文で Wee1 はまさにこのタイミングで SPB の核内側に一過的に局在することが報告されている (Masuda et al., 2011)。Wee1 の基質は染色体と SPB のつながり方が変化するときに必要なタンパク質なのかもしれない。もしそうであれば、野生型細胞では Wee1 によるリン酸化が起こるために染色体と SPB のつながり方が Csi1 と Sad1 を介したもものからスピンドル微小管を介したものにつなぎかえがうまくいくが、*wee1* 変異株では Wee1 によるリン酸化が起こらないためにつなぎかえがスムーズに行われずサテライトキネトコアが出現すると予想される。

ただ、この「つなぎかえ」は動原体とスピンドル微小管の接続に必須というよりは、安定性を上げるといった性質のものではないかと考えられる。実際に図9で *wee1* 変異株においてサテライトキネトコアが出現したのは約3割の細胞で、残り7割の細胞では観察されなかった。これは撮影間隔の5分の一過的にサテライトキネトコアが出現していたかもしれないことを否定できないが、いずれにしても *wee1* 変異株の3割の細胞で見られたサテライトキネトコアも最終的にはスピンドル微小管と接続を完了させることができている。M期開始時の「つなぎかえ」のタイミングであれば動原体がSPBに近い位置を占めているのでスピンドル微小管が安定な接続を構築しやすいが、核内に動原体が散逸して捕捉しづらくなってもスピンドルチェックポイントによる時間稼ぎがあれば時間がかかりながらも接続を遂げることができるということだろう。ただし、今回の観察では一旦スピンドル微小管上に乗った動原体がサテライトキネトコアに変わる現象もみられた（図8C、サテライトキネトコアがみられた18細胞中4細胞：22%）。つなぎかえのときに両極性接続ができたようにみえても、M期が進行すると途中で接続が外れるような不安定な接続になることもありうるのかもしれない。

この *wee1* 変異株における動原体の状況は、図20 (*wee1-50 mad2Δ* 二重変異株) と図22 (動原体構成因子の高温感受性変異株 *mis12-537*) のD値の分

布を比べてみることによっても窺える。*mis12-537*変異株では動原体の構造そのものに影響することを反映してD値が0.90以上、すなわち3本の染色体がすべて片方の娘細胞に分配されたと考えられる細胞が約30%を占めている。一方、*wee1-50 mad2Δ* 二重変異株では約2%にとどまっている。これはWee1による効果が、Mis12タンパク質のようにすべての染色体上の動原体構造に決定的に影響を与えるものではなく、動原体とスピンドル微小管の接続の安定性を上げるといった確率的なものであることを示唆している。

3-3. Cdc2 以外に報告されている Wee1 の基質に対する検討

本研究の結果より、Wee1 キナーゼが動原体とスピンドル微小管の安定な接続に関わることが明らかとなった。スピンドルチェックポイントの必要性を調べた実験（図6、表1）より、このWee1 キナーゼの機能はCdc2 キナーゼを介したものではないと示唆されたため、Cdc2 以外の基質がこの機能を担っていると考えられる。

分裂酵母以外の他の生物種において、ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* で KLP61F タンパク質、ヒト *Homo sapiens* とハツカネズミ *Mus musculus* および出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* でヒストン H2B タンパク質が Wee1 の基質として報告されている (Garcia et al., 2009; Mahajan et al.,

2012)。これらの分裂酵母オルソログ Cut7 (KLP61F) と Htb1 (H2B) が本研究における Wee1 の標的であるかどうかは今後の検討課題である。以下にこれまで報告されていることをまとめる。

3-3-1. KLP61F タンパク質

KLP61F はショウジョウバエ *D. melanogaster* におけるキネシン 5 であり、3 つのチロシン残基 (Y23、Y152、Y207) が Wee1 によってリン酸化される。これらのリン酸化部位のチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換した非リン酸化型 KLP61F^{3YF} をショウジョウバエにおいて発現させるとスピンドルが異常な形態を示す。この表現型はショウジョウバエの Wee1 の変異体でも共通して見られるが、M 期への進入が早くなる他の変異体では見られないことから、Cdk1 (Cdc2 のオルソログ) の制御とは独立に起こっていることではないかと推察されている (Garcia et al., 2009; Stumpff et al., 2005)。

ショウジョウバエの KLP61F における 3 つのリン酸化部位のうち、Y207 残基はヒト *H. sapiens* におけるオルソログ Eg5 (Y211) でも保存されており、Src キナーゼによるリン酸化を受けることが報告されている (Bickel et al., 2017)。Y211 残基をグルタミン酸残基に置換したリン酸化ミミック変異体をヒト細胞に発現させると中心体が分離しない単極性のスピンドルが形成される。

これは Eg5 を siRNA によりノックダウンしたときの表現型と酷似している。反対に、Y211 残基をフェニルアラニン残基に置換した非リン酸化型変異体をヒト細胞に発現させると歪んだ形態のスピンドルが形成され、こちらは Src キナーゼの阻害剤である SU6656 で細胞を処理したときに見られる表現型と似ている。

以上より Eg5 タンパク質の Y211 残基および KLP61F タンパク質の Y207 残基が、これらのキネシンタンパク質がスピンドルの形態を制御するのに重要なリン酸化部位と推測できる。分裂酵母においてはキネシン 5 ファミリータンパク質としては Cut7 タンパク質のみが知られているが、この部位にチロシン残基が保存されていないため本研究に関わるものかどうかは現在のところ不明である。また、上記の論文で報告された細胞の表現型はいずれもスピンドル微小管自体の形態の異常であり、スピンドル微小管と未接続の動原体が生じるといふ本研究での *wee1* 変異株の表現型とは異なっている。

3-3-2. ヒストン H2B タンパク質

H2B タンパク質はヌクレオソームを構成するコアヒストンタンパク質で、Wee1 キナーゼによって哺乳類細胞では Y37 残基、出芽酵母 *S. cerevisiae* では Y40 残基がリン酸化される。このリン酸化は S 期の終わりに、それまで発現し

ていたヒストン遺伝子上流域に存在するヌクレオソーム内の H2B タンパク質上で起こる。これにより下流のヒストン遺伝子の転写が停止し、細胞内のヒストンタンパク質の量が一定に保たれていると考えられている。

分裂酵母にもヒストン H2B タンパク質が存在し、Y37 残基が保存されているが詳しい解析はなされていない。また、少なくとも上記の論文(Mahajan et al., 2012)では出芽酵母 H2B タンパク質のリン酸化部位をアラニンに置換した変異体を作成しているが、細胞の生育や有糸分裂がどうなるかといったことは言及されていない。

よって本研究での Wee1 キナーゼの機能には、これまでに報告されている 2 例の基質以外の基質が関わっている可能性も含め検討する必要がある。

3-4. 本研究の医学的意義

Wee1 キナーゼはがん治療における標的として注目を集めているため、本研究も Wee1 キナーゼ阻害剤の使い方に新たな判断材料を提供するものと期待される (da Costa et al., 2023; Do et al., 2013; Matheson et al., 2016)。

多くのがん細胞では p53 遺伝子に変異を起こし機能が減弱している (図 24)。そのため、本来であれば DNA 合成期である S 期に入る前に修復されて

いたはずの DNA の損傷が S 期に持ち込まれる。その結果、それらの DNA 損傷や、損傷のために複製されなかったゲノム DNA 領域は G2 期に（M 期に入ってしまう前に）修復あるいは複製せざるを得なくなる。このとき、DNA 修復や複製が完了するまで M 期に進入しないようにはたらいっているのが Wee1 キナーゼである。すなわち Wee1 キナーゼの阻害剤を用いれば、がん細胞に自身のゲノム DNA を修復・複製する時間を与えず、強制的に M 期に突入させることができ、分裂期崩壊（mitotic catastrophe）と呼ばれる現象とそれに引き続く細胞死を引き起こすことが示されている (Mir et al., 2010)。

本研究では、分裂酵母の *wee1* 変異株においてスピンドルチェックポイント依存的な M 期の進行の遅延が起こっていることを見出した。Wee1 阻害剤の一つである MK-1775（アダボセルチブ、AZD1775）をがん細胞に用いた研究でも同じく M 期の進行の異常を認める報告がある。1 報目はヒトの子宮頸がんの細胞株である HeLa 細胞の細胞周期を M 期の前中期に同調した上で同薬剤を与えたもので、後期の開始が遅延することを報告している (Lewis et al., 2017)。

Wee1 キナーゼが M 期開始前だけでなく、M 期に入ってからもはたらいっていることを示唆している。2 報目はヒトの舌の扁平上皮癌の細胞株（SAS）に同薬剤を与えたもので、細胞周期が M 期中期に停止することを報告している (Nojima et al., 2020)。この中期停止は、スピンドルチェックポイント因子であ

る Mps1 キナーゼの阻害剤 AZ-3146 を与えると解除できることからスピンドルチェックポイントに依存していることがわかる。本研究は、これらの論文で報告されている M 期進行の遅延が動原体とスピンドル微小管の接続の不安定性によるものではないかということを示唆している。がん治療において、上記の DNA 損傷の未修復を利用してがん細胞に分裂期崩壊を起こさせるアプローチに加えて、スピンドルチェックポイントの阻害 (Mps1 阻害剤) を併用することによりがん細胞に細胞死を誘導する効率を上げることができれば、それぞれの薬剤の投与量を抑え正常細胞への副作用を抑制する効果が期待できるのではないかと考えられる。

3-5. まとめ

本研究では Wee1 キナーゼが動原体とスピンドル微小管との接続の安定性に関わることが明らかとなったが、そのメカニズムの詳細は不明のままである。今後の研究においては Wee1 キナーゼの基質を同定し、野生型細胞の中で Wee1 キナーゼがどのような機構でその役割を果たすのかを調べることが必須である。それにより、そもそも動原体とスピンドル微小管との「不安定な接続」とはどのような形態なのか、スピンドルチェックポイントによる時間稼ぎ

の間にそれをどのように修復するのかという、より本質的な疑問に答えることができるようになると期待される。

第四章

材料と方法

4-1. 分裂酵母菌株と培養条件

本研究で用いた分裂酵母 *S. pombe* の菌株リストを以下に示す。全ての菌株は YES 培地あるいは EMM2 培地を用いて 26°C、または必要があれば 36°C で培養した。タイムラプス観察ではロイシンを添加した EMM2 培地を用いた。

| 株名 | 遺伝子型 | 由来 |
|---------|--|--------------------|
| 972 | <i>h</i> | Lab stock |
| SP6 | <i>h leu1-32</i> | Lab stock |
| MT59 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-d18</i> | This study |
| MT2222 | <i>h leu1-32 wee1-50</i> | This study |
| SP623 | <i>h leu1-32 cdc2-1w</i> | Lab stock |
| SP661 | <i>h leu1-32 cdc2-3w</i> | Lab stock |
| AE147 | <i>h leu1-32 ura4-d18 mad2::ura4⁺</i> | Lab stock |
| FY18581 | <i>h leu1-32 bub1D::kanr</i> | NBRP/YGRC |
| MT2628 | <i>h leu1-32 ura4-d18 mad1::ura4⁺</i> | This study |
| MT2583 | <i>h leu1-32 ura4-d18 mad2::ura4⁺ wee1-50</i> | This study |
| MT3130 | <i>h⁺ leu1-32 bub1D::kanr wee1-50</i> | This study |
| MT2844 | <i>h leu1-32 ura4-d18 mad1::ura4⁺ wee1-50</i> | This study |
| MT3153 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-d18 mad3::ura4⁺</i> | This study |
| MT3175 | <i>h leu1-32 ura4-d18 mad3::ura4⁺ wee1-50</i> | This study |
| YT408 | <i>h leu1-32 mph1::kanR</i> | Gift from Dr. Niwa |
| MT3094 | <i>h leu1-32 wee1-50 mph1::kanR</i> | This study |
| MT3157 | <i>h leu1-32 slp1-mr63</i> | This study |
| MT3095 | <i>h leu1-32 wee1-50 slp1-mr63</i> | This study |
| MT2798 | <i>h leu1-32 ura4-d18 mad2::ura4⁺ cdc2-1w</i> | This study |
| MT2806 | <i>h leu1-32 ura4-d18 mad2::ura4⁺ cdc2-3w</i> | This study |
| SP530 | <i>h leu1-32 cdc25-22</i> | This study |
| MT2784 | <i>h leu1-32 cdc25-22 wee1-50</i> | This study |
| MT2797 | <i>h leu1-32 cdc25-22 cdc2-1w</i> | This study |

| | | |
|----------------|--|-------------------------|
| MT2796 | <i>h⁻ leu1-32 cdc25-22 cdc2-3w</i> | This study |
| MT2570 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-d18 wee1::LEU2</i> | This study |
| CRLh62 | <i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 lys1::nda3p-GFP-atb2:lys1⁺ ade6-M216</i> | This study |
| FY17728 | <i>h⁻ leu1 ura4 his2 pim1-F201S GFP-atb2-kanr cut11-3mRFP-hygr sfi1-CFP-natr</i> | NBRP/YGRC |
| MT2415 | <i>h⁻ leu1-32 lys1::nda3p-GFP-atb2:lys1⁺ Cut11-3mRFP-hygr</i> | This study |
| MT2417 | <i>h⁻ leu1-32 wee1-50 lys1::nda3p-GFP-atb2:lys1⁺ Cut11-3mRFP-hygr</i> | This study |
| MT2483 | <i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 mad2::ura4⁺ lys1::nda3p-GFP-atb2:lys1⁺ Cut11-3mRFP-hygr</i> | This study |
| MT2485 | <i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 mad2::ura4⁺ wee-50 lys1::nda3p-GFP-atb2:lys1⁺ Cut11-3mRFP-hygr</i> | This study |
| SP1766 | <i>h⁻ lys1 ura4 GFP-Cnp1-hph</i> | Gift from Dr. Takahashi |
| FY25107 | <i>h⁻ leu1 ade6 hrk1::hygr Z::Padh13-mCherry-atb2<<natr</i> | NBRP/YGRC |
| MT2223 | <i>h⁻ leu1-32 GFP-cnp1-hph Z::Padh13-mCherry-atb2<<natr</i> | This study |
| MT2694 | <i>h⁻ leu1-32 wee1::LEU2 GFP-cnp1-hph Z::Padh13-mCherry-atb2<<natr</i> | This study |
| AE304 | <i>h⁻ leu1-32 Mad2-GFP:LEU2</i> | Lab stock |
| MT2777 | <i>h⁻ leu1-32 Mad2-GFP:LEU2 Z::Padh13-mCherry-atb2<<natr</i> | This study |
| MT2778 | <i>h⁻ leu1-32 wee1::LEU2 Mad2-GFP:LEU2 Z::Padh13-mCherry-atb2<<natr</i> | This study |
| MT3099 | <i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 bub1-GFP-ura4⁺ Z::Padh13-mCherry-atb2<<natr</i> | This study |
| MT3108 | <i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 wee1::LEU2 bub1-GFP-ura4 Z::Padh13-mCherry-atb2<<natr</i> | This study |
| MT3232 | <i>h⁻ leu1-32 mis12-537 Cut11-3mRFP-hygr</i> | This study |

4-2. *wee1*⁺遺伝子の欠損株の作出

CRISPR-Cas9 のシステムを用いて、分裂酵母のゲノム上の *wee1*⁺遺伝子を出芽酵母の *LEU2* 遺伝子で置き換えることにより *wee1* 欠損株を作成した。*wee1*⁺遺伝子の 5'UTR と ORF の境界領域にガイド RNA を設計した

(5'-caccAAGAGCTCATGTTTTCTGTA-3'

& 5'-aacTACAGAAAACATGAGCTCTT-3')。これらをハイブリダイズさせて、pAH243 プラスミド (NBRP/YGRC から購入した(Hayashi and Tanaka, 2019)) の BbsI サイトにクローニングした (pCas9-*ura4*⁺-*wee1*⁺ 5'UTR と命名した)。

ドナーDNA として、*wee1*⁺遺伝子の 5'UTR からターミネーター配列 (SpeI サイトから XbaI サイトまでの領域) 中の *wee1*⁺の ORF を *LEU2* に置き換えた DNA 断片を用意した。pCas9-*ura4*⁺-*wee1*⁺ 5'UTR とドナーDNA をサケ精子 DNA とともに MT59 株(*h*⁺ *leu1-32 ura4-d18*)に形質転換した。EMM2 培地上で生えてきたコロニーにおいて、コロニーPCR により *wee1*⁺遺伝子が欠失しているかを調べた (KAPA2G Robust、日本ジェネティクス、東京、日本)。候補株を YES 上で繰り返し培養し、pCas9-*ura4*⁺-*wee1*⁺ 5'UTR を失ったクローンを選抜し、再び PCR により *wee1*⁺遺伝子の欠失を確認した (図 7)。

4-3. タイムラプス生細胞観察

情報通信研究機構の近重裕次博士、山本孝治博士との共同研究により行い、撮

影は山本博士、解析は高堂が担当した。方法は(Yamamoto et al., 2019)に従った。

デルタビジョン顕微鏡システム (GE ヘルスケア、シカゴ、アメリカ)、Plan Apo 60 倍油浸対物レンズ (開口数=1.4; オリンパス、東京、日本)、CoolSNAP HQ2 CCD (Photometrics、 ツーソン、アメリカ) を用いた。

0.2 mg/mL のダイズレクチン (シグマアルドリッチ、 セントルイス、 アメリカ) 溶液で表面をコートした 35mm ガラスボトムディッシュ(MatTek、 アッシュランド、アメリカ)に、ロイシンを添加した EMM2 で培養した細胞の培養液を乗せ、26°Cで培養しながら観察を行なった。

Z 軸方向に 0.3 μ m 刻みで 11 枚の写真を 5 分おきに撮影した。図 8 の写真は softWoRx ソフトウェア (GE ヘルスケア) においてデノイジングアルゴリズム (Boulangier et al., 2009)を用いて処理し、最大値投影法により重ね合わせた。図 13 の写真はデノイジングをせずに最大値投影法により重ね合わせた。

4-4. 染色体の分配パターンの推定

メタノールで固定した細胞の DNA をヘキスト 33342 (ナカライテスク、京都、日本) で染色した。写真は、DM5500 B 蛍光顕微鏡 (ライカマイクロシステムズ、ヴェッツラー、ドイツ) に HAMAMATSU ORCA-ER DIGITAL CAMERA (浜松ホトニクス、浜松、日本) を取り付けて撮影し、IPLab/Win (ソリューションシステムズ、船橋、日本) を用いて処理した。Cut11 タンパク質に RFP 蛍

光タンパク質を融合し核膜マーカーとして用い、2核細胞の持つ両方の核の核膜にピントが合っているものを選び、ヘキスト 33342 で染色された領域の面積を Fiji を用いて測定した。

2核細胞のそれぞれの核に含まれる DNA 量を C_1 、 C_2 として、両核の DNA 量の差を評価する値 (D 値) を、 $D = |C_1 - C_2| / (C_1 + C_2)$ で定義した。分裂酵母 *S. pombe* は 3 本の染色体を持ち、それぞれの長さは Ch 1: 5.6 Mb、Ch 2: 4.5 Mb、Ch 3: 2.5 Mb である。このうち、最も短い 3 番の姉妹染色分体の両方が片方の娘細胞に誤って分配されると、 $C_1 = 5.6 + 4.5 + 2.5 \times 2 = 15.1$ (Mb)、 $C_2 = 5.6 + 4.5 = 10.1$ (Mb) となり、 $D = (15.1 - 10.1) \text{ Mb} / (15.1 + 10.1) \text{ Mb} \doteq 0.20$ と計算できる。

核内の DNA 量は概ねヘキスト 33342 で染色された DNA 領域の大きさと比例すると推定できるので、本研究では上式の C_1 と C_2 の値としてヘキスト 33342 で染色された DNA 領域の面積を採用した。上の計算から D 値が 0.20 未満のものを均等分配、0.20 以上のものを不均等分配とした。各株の培養液は独立に 3 回調製し 26°C で培養しメタノールで固定、あるいは 26°C で培養後 36°C で 1 時間培養してメタノールで固定した。それぞれの計測では 50 個以上の 2 核細胞を用いた。各株で用いた 2 核細胞の数はそれぞれ、野生型: 51、55、51 細胞 (26°C)、58、57、70 細胞 (36°C) ; *wee1-50* 変異株: 67、55、59 細胞 (26°C)、95、66、

56 細胞 (36 °C) ; *mad2* 欠損株 : 57、58、60 細胞 (26 °C)、59、56、55 細胞 (36 °C) ; *wee1-50 mad2Δ* 二重変異株 : 64、61、57 細胞 (26 °C)、62、91、101 細胞 (36 °C) である。

また、この解析の妥当性をみるために染色体の不均衡分配が起こることが知られている *mis12-537* 高温感受性変異株 (Mis12 タンパク質は動原体の構成因子で、変異体はスピンドル微小管との接続に欠損を示す(Goshima et al., 1999)) を用いた。26°Cで培養したもの、あるいは26°Cで培養後36°Cで8時間培養したものをメタノールで固定し、ヘキスト 33342 で DNA を染色した後、D 値を測定した (26°C : 52 細胞、36°C : 56 細胞) (図 21、 22)。許容温度である 26°C では約 98%の細胞で D 値が 0.20 を下回り均等分配と判定されること、制限温度である 36°Cでは約 59%の細胞で D 値が 0.20 以上となり不均等分配と判定できることにより、測定方法は染色体の分配パターンの判定に適切であると考えた。

参考文献

- Bickel, K.G., B.J. Mann, J.S. Waitzman, T.A. Poor, S.E. Rice, and P. Wadsworth. 2017. Src family kinase phosphorylation of the motor domain of the human kinesin-5, Eg5. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 74:317-330.
- Boulanger, J., C. Kervrann, and P. Bouthemy. 2009. A simulation and estimation framework for intracellular dynamics and trafficking in video-microscopy and fluorescence imagery. *Med Image Anal*. 13:132-142.
- Chen, R.H., J.C. Waters, E.D. Salmon, and A.W. Murray. 1996. Association of spindle assembly checkpoint component X MAD2 with unattached kinetochores. *Science*. 274:242-246.
- Coleman, T.R., and W.G. Dunphy. 1994. Cdc2 regulatory factors. *Curr Opin Cell Biol*. 6:877-882.
- da Costa, A.A.B.A., D. Chowdhury, G.I. Shapiro, A.D. D'Andrea, and P.A. Konstantinopoulos. 2023. Targeting replication stress in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 22:38-58.
- Ding, R., K.L. McDonald, and J.R. McIntosh. 1993. Three-dimensional reconstruction and analysis of mitotic spindles from the yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Biol*. 120:141-151.
- Do, K., J.H. Doroshov, and S. Kummar. 2013. Wee1 kinase as a target for cancer therapy. *Cell Cycle*. 12:3159-3164.
- Fantes, P. 1979. Epistatic gene interactions in the control of division in fission yeast. *Nature*. 279:428-430.
- Fantes, P.A. 1981. Isolation of cell size mutants of a fission yeast by a new selective method: characterization of mutants and implications for division control mechanisms. *J Bacteriol*. 146:746-754.
- Funabiki, H., I. Hagan, S. Uzawa, and M. Yanagida. 1993. Cell cycle-dependent specific positioning and clustering of centromeres and telomeres in fission yeast. *J Cell Biol*. 121:961-976.
- Garcia, K., J. Stumpff, T. Duncan, and T.T. Su. 2009. Tyrosines in the kinesin-5 head domain are necessary for phosphorylation by Wee1 and for mitotic spindle integrity. *Curr Biol*. 19:1670-1676.
- Goshima, G., S. Saitoh, and M. Yanagida. 1999. Proper metaphase spindle length is determined by centromere proteins Mis12 and Mis6 required for faithful chromosome segregation. *Genes Dev*. 13:1664-1677.
- Grallert, A., B. Grallert, B. Ribar, and M. Sipiczki. 1998. Coordination of initiation

- of nuclear division and initiation of cell division in *Schizosaccharomyces pombe*: genetic interactions of mutations. *J Bacteriol.* 180:892-900.
- Hagan, I.M. 1998. The fission yeast microtubule cytoskeleton. *J Cell Sci.* 111 (Pt 12):1603-1612.
- Hartwell, L.H., and M.B. Kastan. 1994. Cell cycle control and cancer. *Science.* 266:1821-1828.
- Hayashi, A., and K. Tanaka. 2019. Short-Homology-Mediated CRISPR/Cas9-Based Method for Genome Editing in Fission Yeast. *G3 (Bethesda).* 9:1153-1163.
- Hayashi, T., Y. Fujita, O. Iwasaki, Y. Adachi, K. Takahashi, and M. Yanagida. 2004. Mis16 and Mis18 are required for CENP-A loading and histone deacetylation at centromeres. *Cell.* 118:715-729.
- He, X., T.E. Patterson, and S. Sazer. 1997. The *Schizosaccharomyces pombe* spindle checkpoint protein mad2p blocks anaphase and genetically interacts with the anaphase-promoting complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:7965-7970.
- Hirai, H., K. Arai, R. Kariyazono, M. Yamamoto, and M. Sato. 2014. The kinetochore protein Kis1/Eic1/Mis19 ensures the integrity of mitotic spindles through maintenance of kinetochore factors Mis6/CENP-I and CENP-A. *PLoS One.* 9:e111905.
- Holland, A.J., and D.W. Cleveland. 2009. Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:478-487.
- Hou, H., Z. Zhou, Y. Wang, J. Wang, S.P. Kallgren, T. Kurchuk, E.A. Miller, F. Chang, and S. Jia. 2012. Csi1 links centromeres to the nuclear envelope for centromere clustering. *J Cell Biol.* 199:735-744.
- Hunt, T. 1989. Maturation promoting factor, cyclin and the control of M-phase. *Curr Opin Cell Biol.* 1:268-274.
- Ikui, A.E., K. Furuya, M. Yanagida, and T. Matsumoto. 2002. Control of localization of a spindle checkpoint protein, Mad2, in fission yeast. *J Cell Sci.* 115:1603-1610.
- Kellogg, D.R. 2003. Wee1-dependent mechanisms required for coordination of cell growth and cell division. *J Cell Sci.* 116:4883-4890.
- Kerres, A., V. Jakopcic, and U. Fleig. 2007. The conserved Spc7 protein is required for spindle integrity and links kinetochore complexes in fission yeast. *Mol Biol Cell.* 18:2441-2454.

- Kim, S.H., D.P. Lin, S. Matsumoto, A. Kitazono, and T. Matsumoto. 1998. Fission yeast Slp1: an effector of the Mad2-dependent spindle checkpoint. *Science*. 279:1045-1047.
- Koliopoulos, M.G., and C. Alfieri. 2022. Cell cycle regulation by complex nanomachines. *FEBS J*. 289:5100-5120.
- Lakhani, A.A., S.L. Thompson, and J.M. Sheltzer. 2023. Aneuploidy in human cancer: new tools and perspectives. *Trends Genet*. 39:968-980.
- Lewis, C.W., Z. Jin, D. Macdonald, W. Wei, X.J. Qian, W.S. Choi, R. He, X. Sun, and G. Chan. 2017. Prolonged mitotic arrest induced by Wee1 inhibition sensitizes breast cancer cells to paclitaxel. *Oncotarget*. 8:73705-73722.
- Li, Y., and R. Benezra. 1996. Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2. *Science*. 274:246-248.
- London, N., B. Medina-Pritchard, C. Spanos, J. Rappsilber, A.A. Jeyaprakash, and R.C. Allshire. 2023. Direct recruitment of Mis18 to interphase spindle pole bodies promotes CENP-A chromatin assembly. *Curr Biol*. 33:4187-4201.e4186.
- Luo, X., and H. Yu. 2008. Protein metamorphosis: the two-state behavior of Mad2. *Structure*. 16:1616-1625.
- Mahajan, K., B. Fang, J.M. Koomen, and N.P. Mahajan. 2012. H2B Tyr37 phosphorylation suppresses expression of replication-dependent core histone genes. *Nat Struct Mol Biol*. 19:930-937.
- Masuda, H., C.S. Fong, C. Ohtsuki, T. Haraguchi, and Y. Hiraoka. 2011. Spatiotemporal regulations of Wee1 at the G2/M transition. *Mol Biol Cell*. 22:555-569.
- Matheson, C.J., D.S. Backos, and P. Reigan. 2016. Targeting WEE1 Kinase in Cancer. *Trends Pharmacol Sci*. 37:872-881.
- Matsumoto, T. 1997. A fission yeast homolog of CDC20/p55CDC/Fizzy is required for recovery from DNA damage and genetically interacts with p34cdc2. *Mol Cell Biol*. 17:742-750.
- Matsumoto, T., and M. Yanagida. 2005. The dream of every chromosome: equal segregation for a healthy life of the host. *Adv Exp Med Biol*. 570:281-310.
- Matthews, H.K., C. Bertoli, and R.A.M. de Bruin. 2022. Cell cycle control in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 23:74-88.
- Mir, S.E., P.C. De Witt Hamer, P.M. Krawczyk, L. Balaj, A. Claes, J.M. Niers, A.A. Van Tilborg, A.H. Zwinderman, D. Geerts, G.J. Kaspers, W. Peter Vandertop, J. Cloos, B.A. Tannous, P. Wesseling, J.A. Aten, D.P. Noske, C.J.

- Van Noorden, and T. Würdinger. 2010. In silico analysis of kinase expression identifies WEE1 as a gatekeeper against mitotic catastrophe in glioblastoma. *Cancer Cell*. 18:244-257.
- Monod, J. 1972. Chance and necessity: an essay on the natural philosophy of modern biology. Vintage Books.
- Morgan, D.O. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature*. 374:131-134.
- Musacchio, A. 2015. The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. *Curr Biol*. 25:R1002-1018.
- Nabeshima, K., T. Nakagawa, A.F. Straight, A. Murray, Y. Chikashige, Y.M. Yamashita, Y. Hiraoka, and M. Yanagida. 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.
- Nabetani, A., T. Koujin, C. Tsutsumi, T. Haraguchi, and Y. Hiraoka. 2001. A conserved protein, Nuf2, is implicated in connecting the centromere to the spindle during chromosome segregation: a link between the kinetochore function and the spindle checkpoint. *Chromosoma*. 110:322-334.
- Nakaseko, Y., G. Goshima, J. Morishita, and M. Yanagida. 2001. M phase-specific kinetochore proteins in fission yeast: microtubule-associating Dis1 and Mtc1 display rapid separation and segregation during anaphase. *Curr Biol*. 11:537-549.
- Nasmyth, K. 1996. At the heart of the budding yeast cell cycle. *Trends Genet*. 12:405-412.
- Nasmyth, K., J.M. Peters, and F. Uhlmann. 2000. Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids. *Science*. 288:1379-1385.
- Nojima, H., H. Homma, Y. Onozato, A. Kaida, H. Harada, and M. Miura. 2020. Differential properties of mitosis-associated events following CHK1 and WEE1 inhibitor treatments in human tongue carcinoma cells. *Exp Cell Res*. 386:111720.
- Nurse, P. 1975. Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature*. 256:547-551.
- Nurse, P. 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*. 344:503-508.
- Nurse, P. 2003. The great ideas of biology. *Clin Med (Lond)*. 3:560-568.
- Nurse, P., P. Thuriaux, and K. Nasmyth. 1976. Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet*. 146:167-178.

- Peters, J.M. 2002. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell*. 9:931-943.
- Pfau, S.J., and A. Amon. 2012. Chromosomal instability and aneuploidy in cancer: from yeast to man. *EMBO Rep*. 13:515-527.
- Pines, J. 1994. Protein kinases and cell cycle control. *Semin Cell Biol*. 5:399-408.
- Rieder, C.L., and E.D. Salmon. 1998. The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Trends Cell Biol*. 8:310-318.
- Russell, P., and P. Nurse. 1986. cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell*. 45:145-153.
- Russell, P., and P. Nurse. 1987. Negative regulation of mitosis by wee1+, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell*. 49:559-567.
- Saitoh, S., K. Ishii, Y. Kobayashi, and K. Takahashi. 2005. Spindle checkpoint signaling requires the mis6 kinetochore subcomplex, which interacts with mad2 and mitotic spindles. *Mol Biol Cell*. 16:3666-3677.
- Salas-Pino, S., and R.R. Daga. 2019. Spatiotemporal control of spindle disassembly in fission yeast. *Cell Mol Life Sci*. 76:3543-3551.
- Sazer, S., M. Lynch, and D. Needleman. 2014. Deciphering the evolutionary history of open and closed mitosis. *Curr Biol*. 24:R1099-1103.
- Stumpff, J., D.R. Kellogg, K.A. Krohne, and T.T. Su. 2005. Drosophila Wee1 interacts with members of the gammaTURC and is required for proper mitotic-spindle morphogenesis and positioning. *Curr Biol*. 15:1525-1534.
- Sudakin, V., G.K. Chan, and T.J. Yen. 2001. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol*. 154:925-936.
- Takahashi, K., H. Yamada, and M. Yanagida. 1994. Fission yeast minichromosome loss mutants mis cause lethal aneuploidy and replication abnormality. *Mol Biol Cell*. 5:1145-1158.
- Tanaka, K. 2013. Regulatory mechanisms of kinetochore-microtubule interaction in mitosis. *Cell Mol Life Sci*. 70:559-579.
- Tange, Y., and O. Niwa. 2008. Schizosaccharomyces pombe Bub3 is dispensable for mitotic arrest following perturbed spindle formation. *Genetics*. 179:785-792.
- Thuriaux, P., P. Nurse, and B. Carter. 1978. Mutants altered in the control coordinating cell division with cell growth in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. *Mol Gen Genet*. 161:215-220.
- Waters, J.C., R.H. Chen, A.W. Murray, and E.D. Salmon. 1998. Localization of

- Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension. *J Cell Biol.* 141:1181-1191.
- Wood, E., and P. Nurse. 2015. Sizing up to divide: mitotic cell-size control in fission yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 31:11-29.
- Yamamoto, T.G., D.Q. Ding, Y. Nagahama, Y. Chikashige, T. Haraguchi, and Y. Hiraoka. 2019. Histone H2A insufficiency causes chromosomal segregation defects due to anaphase chromosome bridge formation at rDNA repeats in fission yeast. *Sci Rep.* 9:7159.
- Yanagida, M. 1995. Frontier questions about sister chromatid separation in anaphase. *Bioessays.* 17:519-526.
- Zich, J., and K.G. Hardwick. 2010. Getting down to the phosphorylated 'nuts and bolts' of spindle checkpoint signalling. *Trends Biochem Sci.* 35:18-27.
- Zich, J., K. May, K. Paraskevopoulos, O. Sen, H.M. Syred, S. van der Sar, H. Patel, J.J. Moresco, A. Sarkeshik, J.R. Yates, J. Rappsilber, and K.G. Hardwick. 2016. Mps1Mph1 Kinase Phosphorylates Mad3 to Inhibit Cdc20Slp1-APC/C and Maintain Spindle Checkpoint Arrests. *PLoS Genet.* 12:e1005834.

謝辞

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Masahiro Takado, Takaharu G. Yamamoto, Yuji Chikashige
and Tomohiro Matsumoto

Fission Yeast Wee1 is required for stable kinetochore-microtubule attachment
Open Biology, Jan;14(1), 2024

DOI: 10.1098/rsob.230379

とてもとても長きに渡り面倒を見ていただいた松本智裕先生に心から感謝しています。22年前、理学部の2回生のときにミニプレップや形質転換を教えていただいたところから始まり、お陰様でようやく論文をまとめることができました。これまで何度も挑戦の機会を与えていただきありがとうございました。

近重裕次先生には17年前より顕微鏡観察やマイクロアレイ解析でたびたびお世話になってきました。今回の論文でも年度末のお忙しい中ディスカッションの機会を作っていただいただけでなく、図の構成の仕方もアドバイスしていただき大変勉強になりました。ありがとうございました。

山本孝治博士には論文の決め手となるタイムラプス観察を何度もおこなっていただきました。サテライトキネトコアの発見は山本さんなくしてはありえなかったと思います。ありがとうございました。

甲南大学の武田鋼二郎先生には共同研究に誘っていただき、またデータについてディスカッションしていただきありがとうございました。話し合いながら実験系を一から作り上げていく過程は勉強になっただけでなくとても楽しい時間でした。

小松賢志先生、高田穰先生、渡邊正己先生、井倉毅先生、原田浩先生、古谷寛治先生、小林純也先生、北尾洋之先生、茂木章先生、土生敏行先生、久能樹先生、放生研の先生方には大変なご心配をおかけしてきました。これまで折に触れてあたたかいお言葉をかけていただいて大変勇気付けられました。ありがとうございました。

杉山弘先生、毎年メッセージをありがとうございます。なかなか良いご報告ができていませんでしたが、お陰様で研究を形にすることができました。杉山研に在籍していたのは学部在籍時の1年間だけでしたが、篠原憲一博士をはじめとして先輩方にもとてもよくしていただきました。ありがとうございます。

竹田純博士、飯森真人博士、北川哲平博士、伊東大一輔博士、中沢宜彦博士、中村恭介博士、柳原啓見博士、島田幹男博士、堀越保則博士、斎藤裕一朗博士、村上弘章博士には在学中から今に至るまで目をかけていただき、ありが

とうございました。飲みに連れて行っていただいた回数はとても数えきれず、研究がなかなかうまくいかない中の心の支えとなりました。

中瀬由起子博士、須摩美智子博士、斉菲博士には隔週のミーティングで私の拙い研究発表を聴いていただき、さまざまな貴重なご意見を頂戴しました。お忙しい中時間を作っていただき、また3年半ものあいだ継続していただき大変助けになりました。ありがとうございました。

放生研でともに研究をした先輩、同級生、後輩たち、職員の方々お一人お一人にもその時々で多くの助けをいただきました。特に浅沼高寛さん、工藤康央さん、和田阿佐子さん、二川奈津美さんには卒業後も気にかけていただき、また励ましていただき大変感謝しています。現在松本研に在籍している磯合竜弥さんにはWee1の研究をバックアップしていただき大変助かっています。秘書の酒井由貴子さんにも長きに渡り研究活動をサポートしていただきました。放射線について一から勉強する意思が芽生えたのも酒井さんに声をかけていただいたからでした。

なかなか論文に辿りつかない私を心配し続けてくれた友人たち、森田大輔博士、森田茉莉博士、松井響子さん、村上陽子さん、森耕一さん、太田晋平さん、長東大樹さん、大塚かずみさん、今木和歌子さんにも大変お世話になりました。ありがとうございました。

ナショナルバイオリソースプロジェクト・酵母(NBRP/YGRC)にも長きに渡り菌株やプラスミドの分譲でお世話になりました。なかなか成果論文をお知らせできず心苦しい年月でしたが、ようやく一つ恩返しができました。

これまで出会った数多くの生徒たちとご家族にも私の事情を察していただき大変にサポートしていただきました。心より御礼申し上げます。

最後になりましたが、これまで支え励まし続けてくれた両親、祖父母、叔父、叔母、上田さんご夫妻、中田さん、鳥羽さんご夫妻に心から感謝いたします。

2024年1月

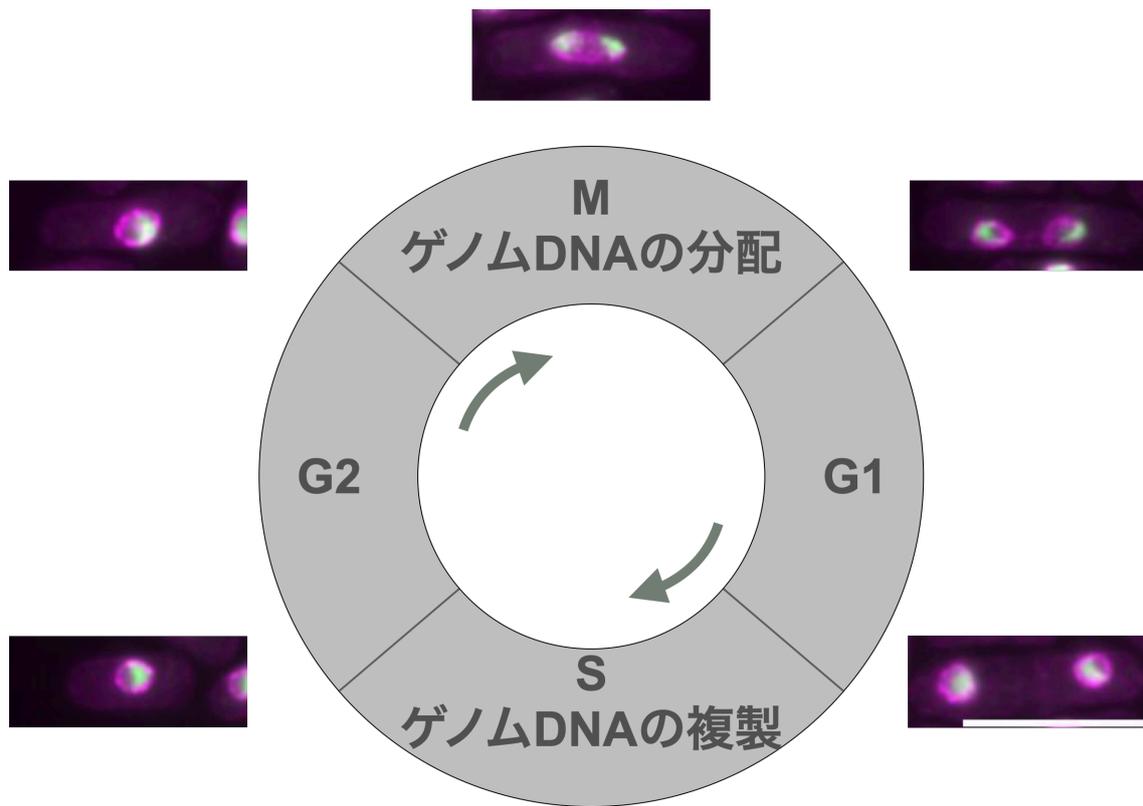


図 1：細胞周期を構成する 4 つの時期とそれぞれの時期に対応する分裂酵母 *S. pombe* の顕微鏡写真

ヘキスト 33342 で染色した DNA を緑色、核膜マーカー Cut11-RFP タンパク質の局在をマゼンタで示している。M 期にゲノム DNA が 2 つの娘細胞へと均等に分配される。スケールバーは $10\mu\text{m}$ 。

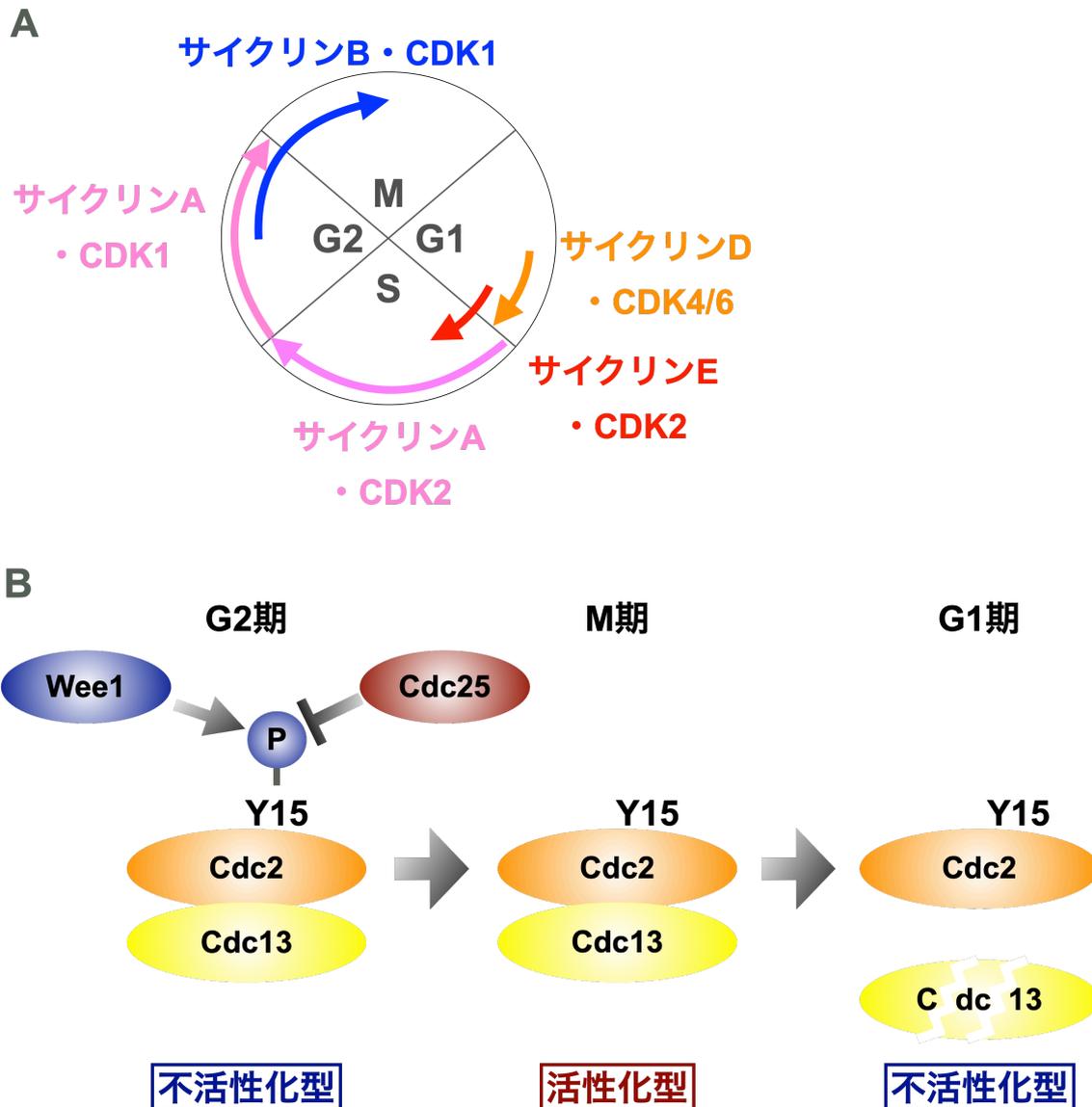


図2：サイクリン・CDK複合体

A) ヒト *Homo sapiens* の細胞においてそれぞれのサイクリン・CDK 複合体がはたらく時期を図示した（参考文献：Koliopoulos & Alfieri, 2022 に基づく）。

B) Cdc2 タンパク質（CDK1）のリン酸化状態及び Cdc13 タンパク質（サイクリン B）の受ける分解と Cdc13・Cdc2 複合体のキナーゼ活性の関係を図示した（参考文献：Coleman & Dunphy, 1994; Nurse, 1990 に基づく）。

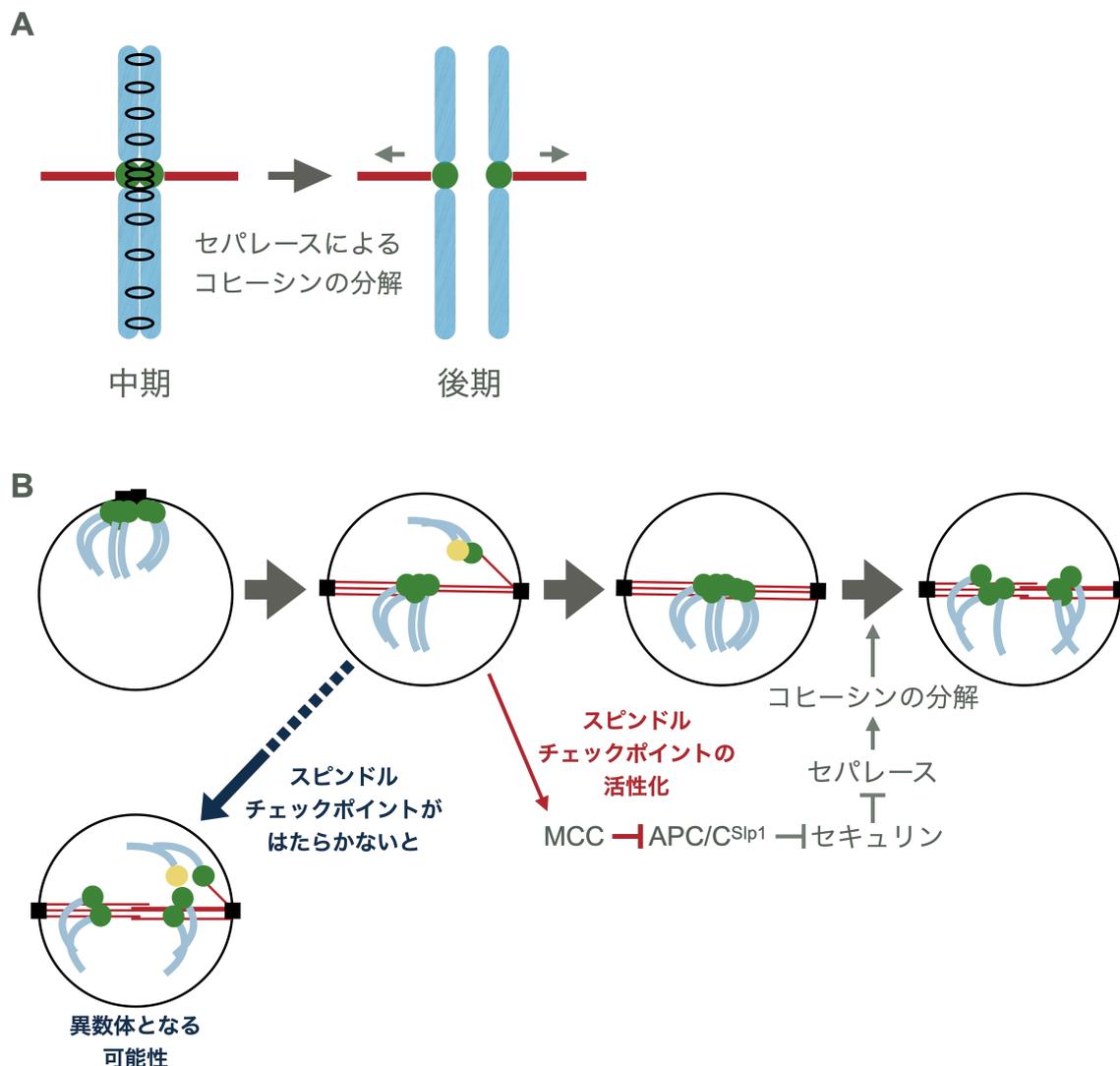


図 4：染色体の分配とスピンドルチェックポイント

A) セパレーズタンパク質によってコヒーシン複合体が切断されることにより、姉妹染色分体はスピンドル微小管によって細胞の両極に牽引されるようになる。染色体腕部を水色、動原体を緑色、コヒーシン複合体を黒色、スピンドル微小管を赤色で示した（参考文献：Matsumoto and Yanagida, 2005 に基づく）。

B) スピンドル微小管と未接続の動原体が存在するとスピンドルチェックポイントが活性化して中期から後期への移行を遅延させ、両極性接続が成立するまでの時間を稼ぐ（参考文献：Luo and Yu, 2008 に基づく）。

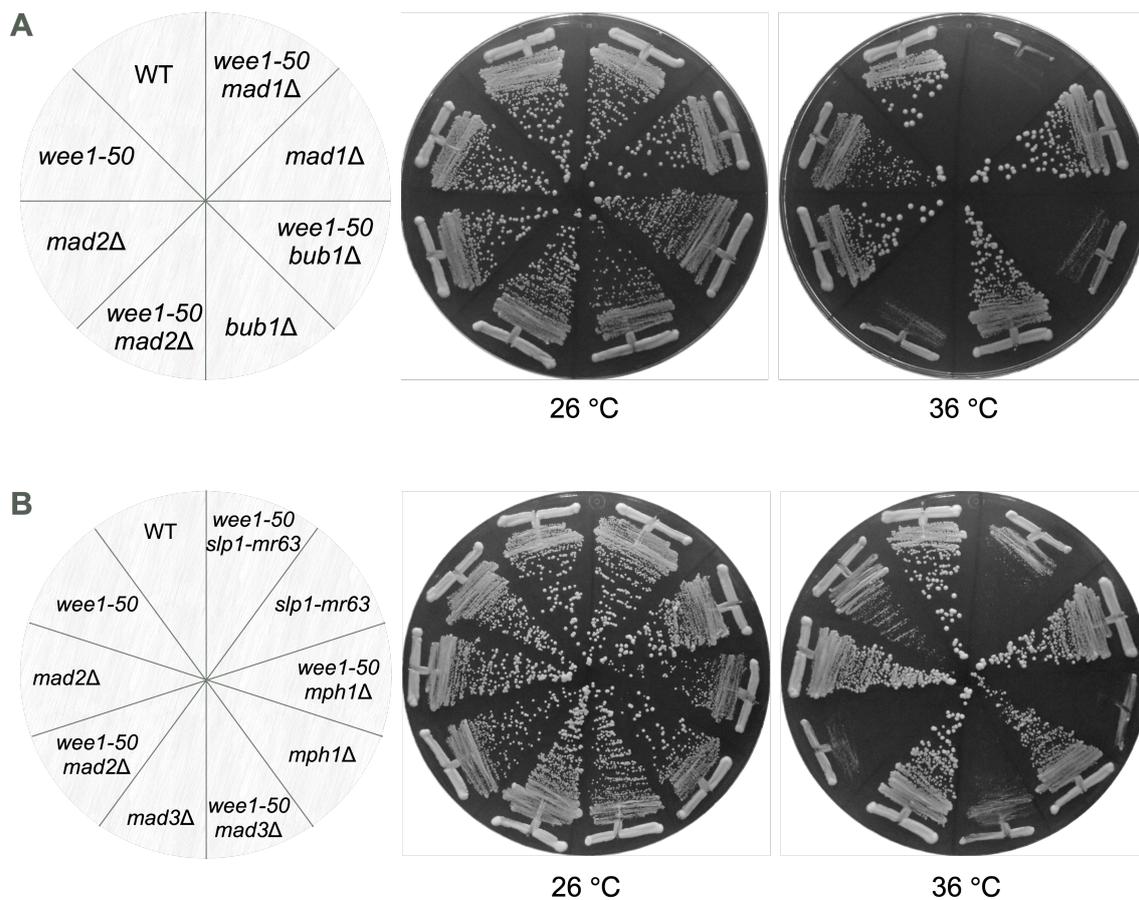


図 5: *wee1-50* 変異株の制限温度での生育はスピンドルチェックポイントに依存する

wee1+ 遺伝子の高温感受性変異株 *wee1-50* 株 (許容温度: 26°C、制限温度: 36°C) において、種々のスピンドルチェックポイント因子を欠損 (*mad2Δ*, *bub1Δ*, *mad1Δ*, *mad3Δ*, *mph1Δ*) あるいは変異 (*slp1-mr63*) させた二重変異株を作成し、それぞれ許容温度と制限温度で生育度合いを比較した。いずれの単独変異株も 36°C で生育可能だが、*wee1-50* 変異との二重変異株は生育阻害を示した。

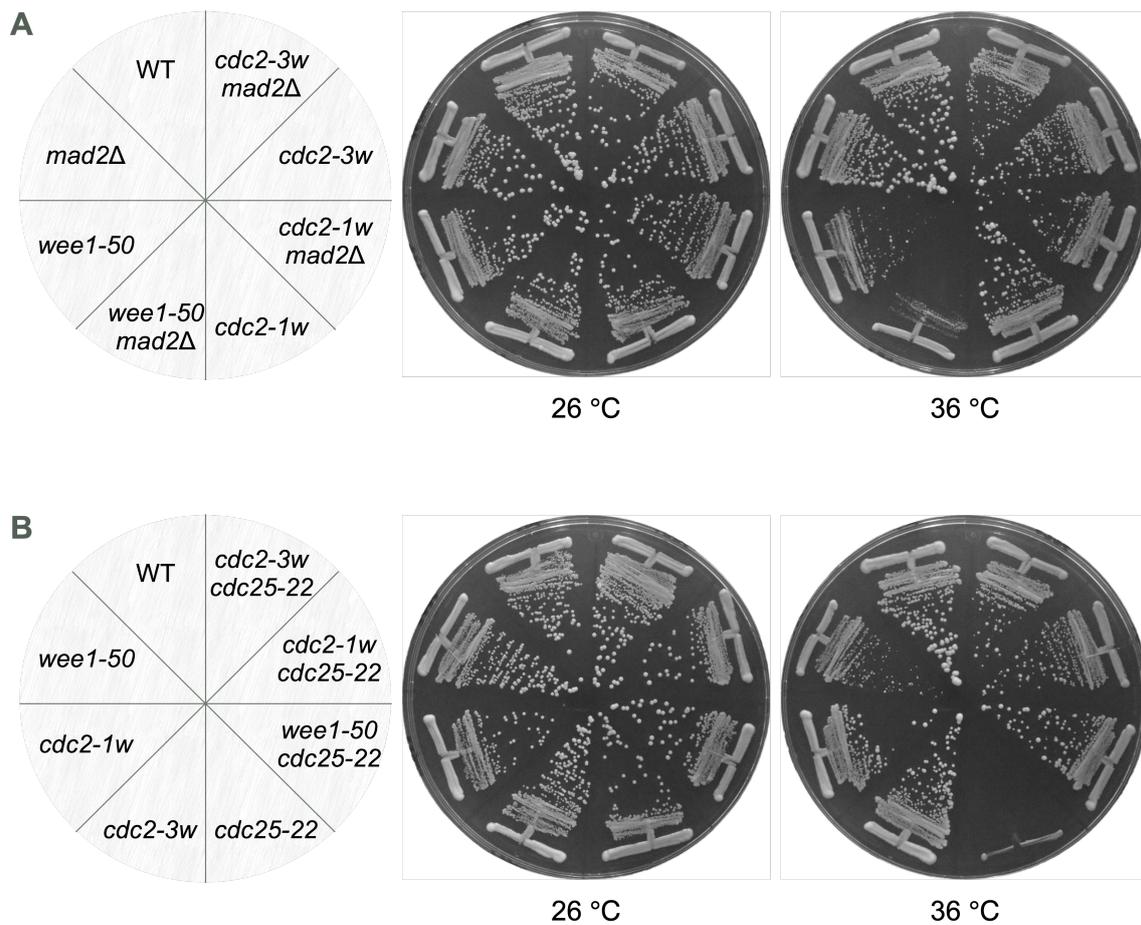


図 6:スピンドルチェックポイントへの依存性は *wee1-50* 変異株に特異的である

A) 細胞長が短いにも関わらず M 期に早期に進入してしまう他の変異株 (*cdc2-1w*, *cdc2-3w*) ではスピンドルチェックポイントへの依存性は見られなかった。

B) *cdc25-22* 高温感受性変異株では制限温度 (36°C) で Cdc2 タンパク質を活性化できず、細胞周期が G2 期と M 期の境界で停止してしまうが、*wee1-50* 変異、*cdc2-1w* 変異、*cdc2-3w* 変異はいずれもこれを抑圧できた。

表 1：表現型のまとめ

| | M 期への進入 | <i>cdc25-22</i> 高温感受性の 抑圧 | スピンドル チェックポイントの 必要性 |
|----------------|---------|---------------------------------|---------------------------|
| WT | 正常 | できない | なし |
| <i>wee1-50</i> | 早い | できる | あり |
| <i>cdc2-1w</i> | 早い | できる | なし |
| <i>cdc2-3w</i> | 早い | できる | なし |

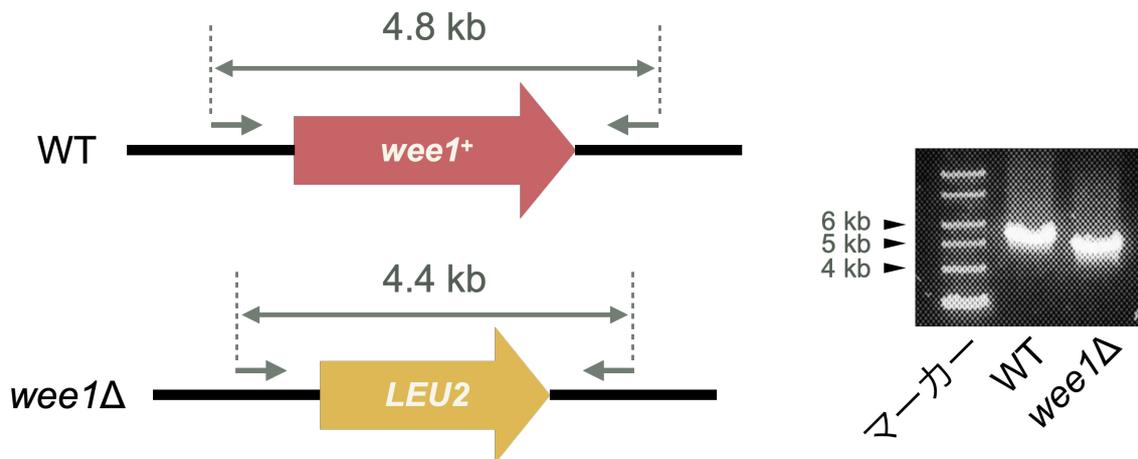


図 7 : *wee1⁺*遺伝子の欠損株の作成

第四章「材料と方法」4-2. *wee1⁺*遺伝子の欠損株の作出の方法に基づいて CRISPR-Cas9 により *wee1⁺*遺伝子欠損株を作成した。左上図は野生型株の *wee1⁺*遺伝子座、左下図は *wee1⁺*遺伝子欠損株の同遺伝子座の模式図である。図中の片矢印は確認に用いたプライマーの結合部位を示す。右図は野生型株と、作成した *wee1⁺*遺伝子欠損株のゲノム DNA を鋳型として PCR をおこなった後の電気泳動の結果である。それぞれ予想される大きさの DNA バンドが確認できた。

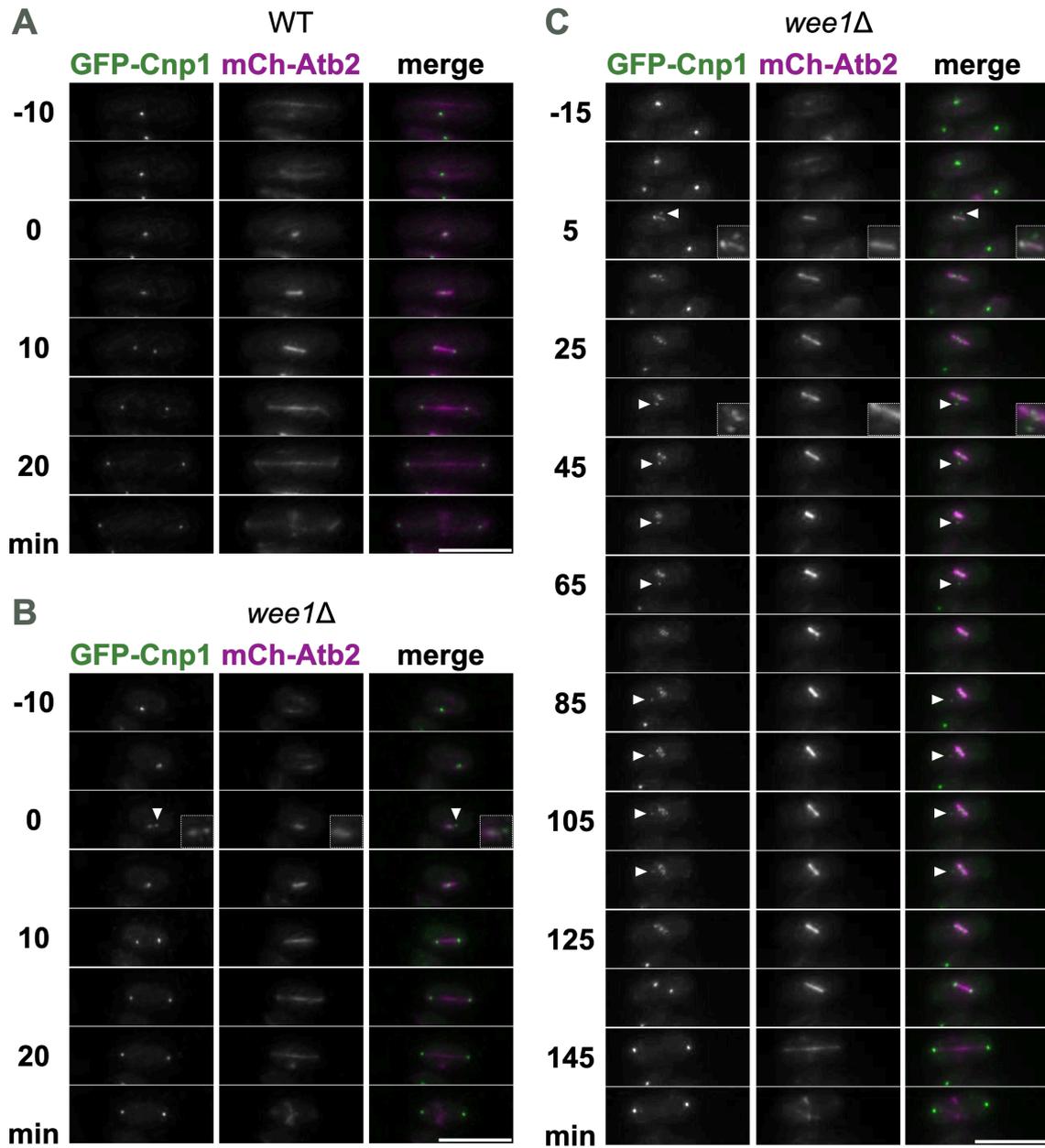


図 8: *wee1* 欠損株では動原体とスピンドル微小管の接続が不安定である
 野生型株(A)と *wee1* 欠損株(B, C)においてタイムラプス観察をした。merge
 写真では GFP-Cnp1 を緑色、mCherry-Atb2 をマゼンタで示している。B、C
 においてサテライトキネトコア（スピンドル微小管から離れた位置に見える
 GFP-Cnp1 の輝点）が見られるものに矢じりをつけ、インセット内に拡大画像
 を付した。B はサテライトキネトコアが一度だけ、C は複数回見られたものを
 載せた。スケールバーは 10 μ m。

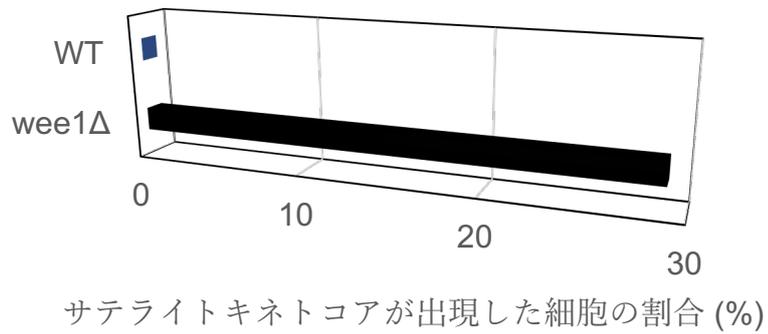


図 9: *wee1* 欠損株では有糸分裂中にサテライトキネトコアが出現する

タイムラプス観察のデータ (図 8 にかかるデータ) より、有糸分裂中に一度でもサテライトキネトコアが出現した細胞を数えた。野生型株(WT)では 30 細胞中 0 細胞(0%)だった。*wee1* 欠損株(*wee1*Δ)では 62 細胞中 18 細胞(29%)だった。

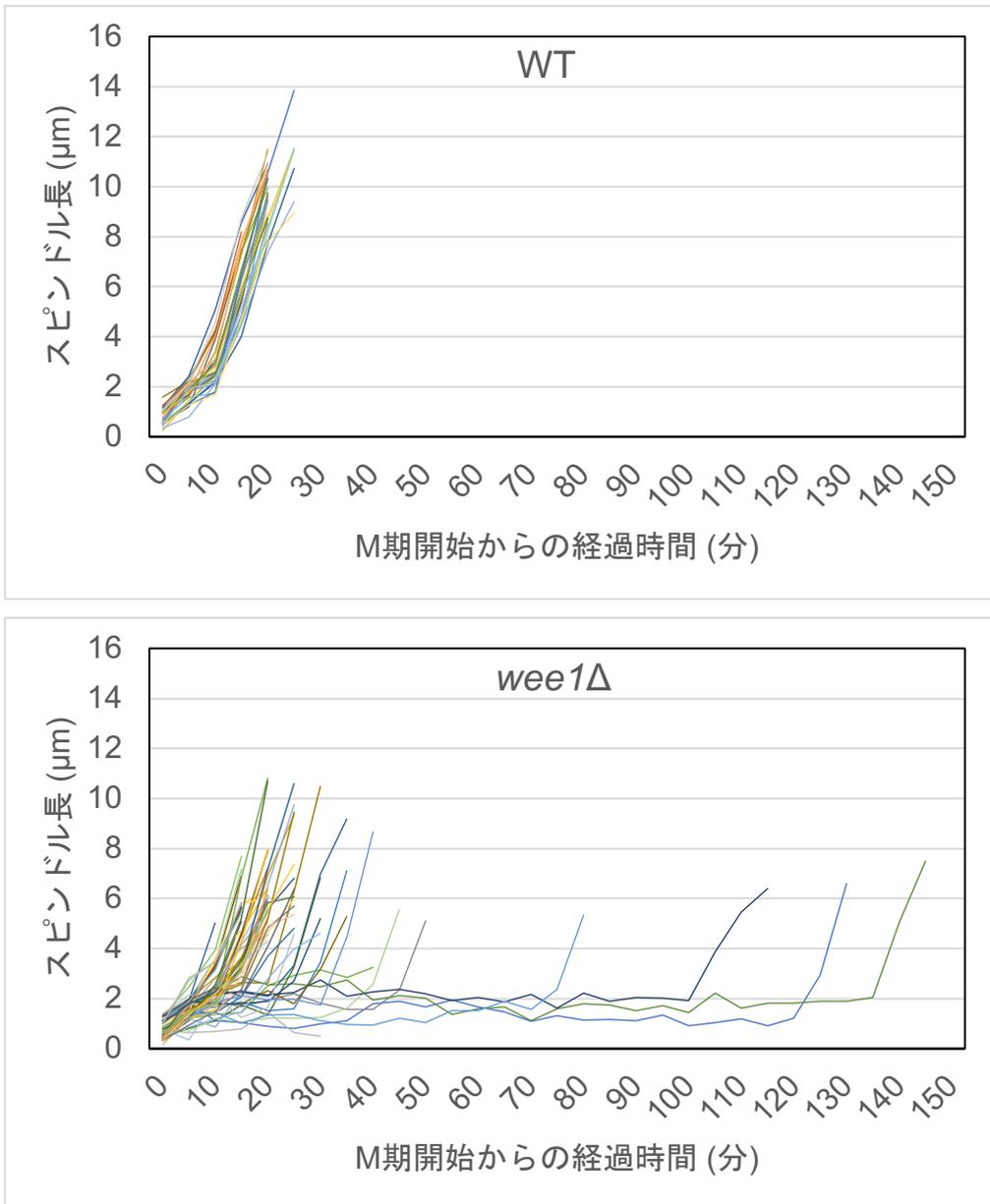


図 10 : *wee1* 欠損株ではスピンドル微小管の伸長に遅延が見られる

タイムラプス観察のデータ (図 8 にかかるデータ) より、個々の細胞のスピンドル長を計測した (Z 軸方向に $0.3\mu\text{m}$ 刻みで撮影した 11 枚の写真の重ね合わせ画像を用いた)。上段は野生型株(WT)、下段は *wee1* 欠損株(*wee1Δ*)のデータ。

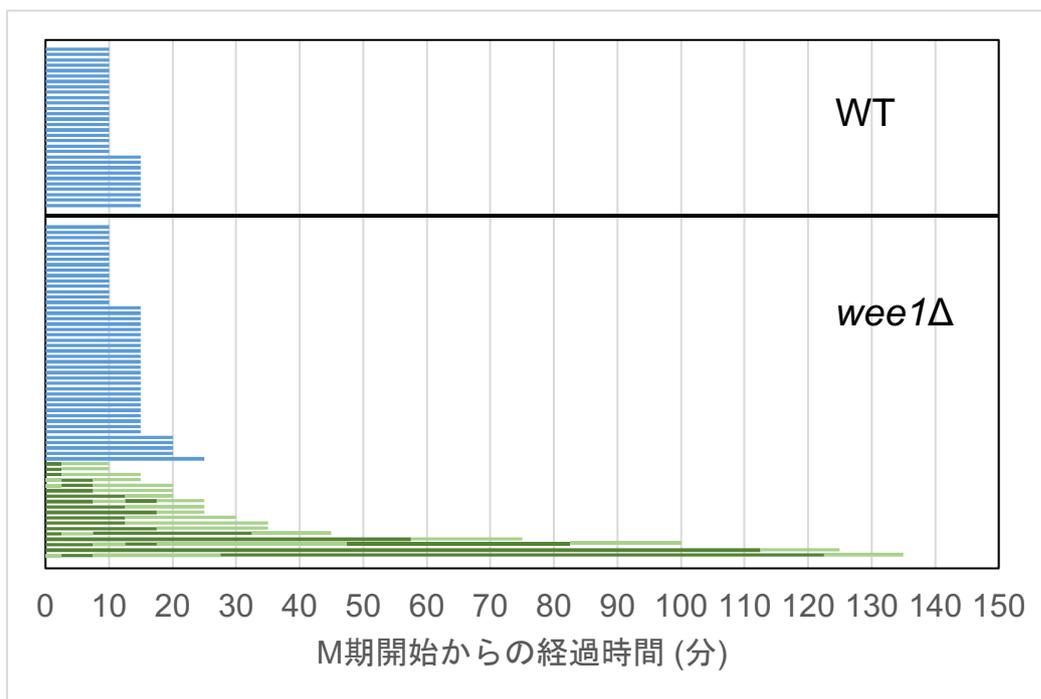


図 11：サテライトキネトコアが解消されるまで M 期後期の開始は遅延する
 タイムラプス観察のデータ（図 8 にかかるデータ）より、個々の細胞における
 M 期開始から後期開始までの時間を棒グラフで表した。上段は野生型株
 (WT)、下段は *wee1* 欠損株(*wee1Δ*)のデータ。M 期開始はスピンドル微小管
 の出現、後期開始はスピンドル微小管に乗った GFP-Cnp1 の輝点が 2 点に分か
 れた時点とした。青色はサテライトキネトコアが出現しなかった細胞、緑色は
 サテライトキネトコアが出現した細胞を表している。濃い緑色がサテライトキ
 ネトコアが現れている時間帯、薄い緑色は現れていない時間帯を示す。いずれ
 の細胞においてもサテライトキネトコアが解消してから（棒グラフの色が濃い
 緑色から薄い緑色に変わってから）後期が始まっている。

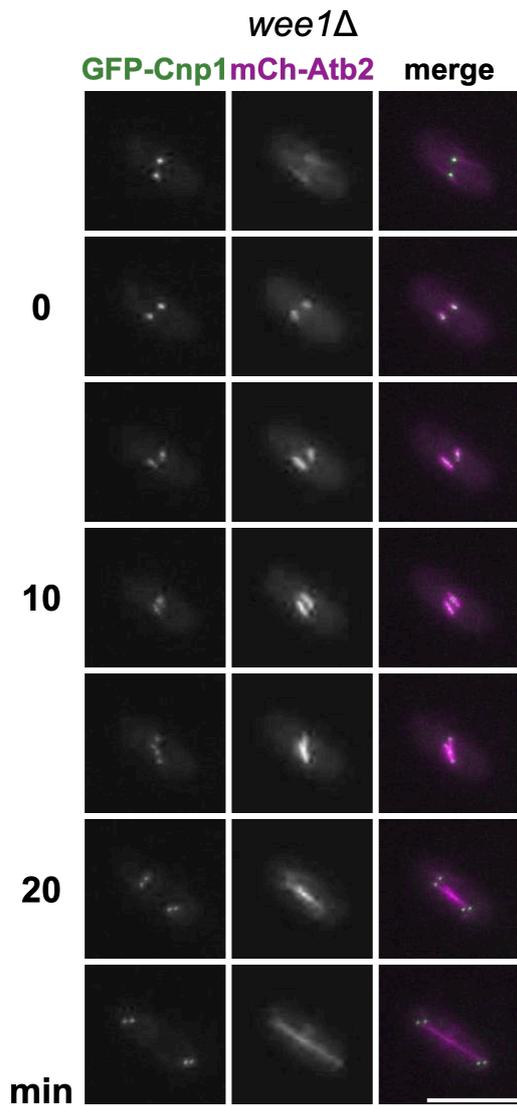


図 12 : *wee1* 欠損株で見られた dikaryon の例

merge 画像では GFP-Cnp1 を緑色、mCherry-Atb2 をマゼンタで示している。これらの dikaryon では GFP-Cnp1 の輝点が間期から 2 点観察され、有糸分裂期に入ってからにはスピンドル微小管が 2 本伸びるのが観察された。スケールバーは $10\ \mu\text{m}$ 。

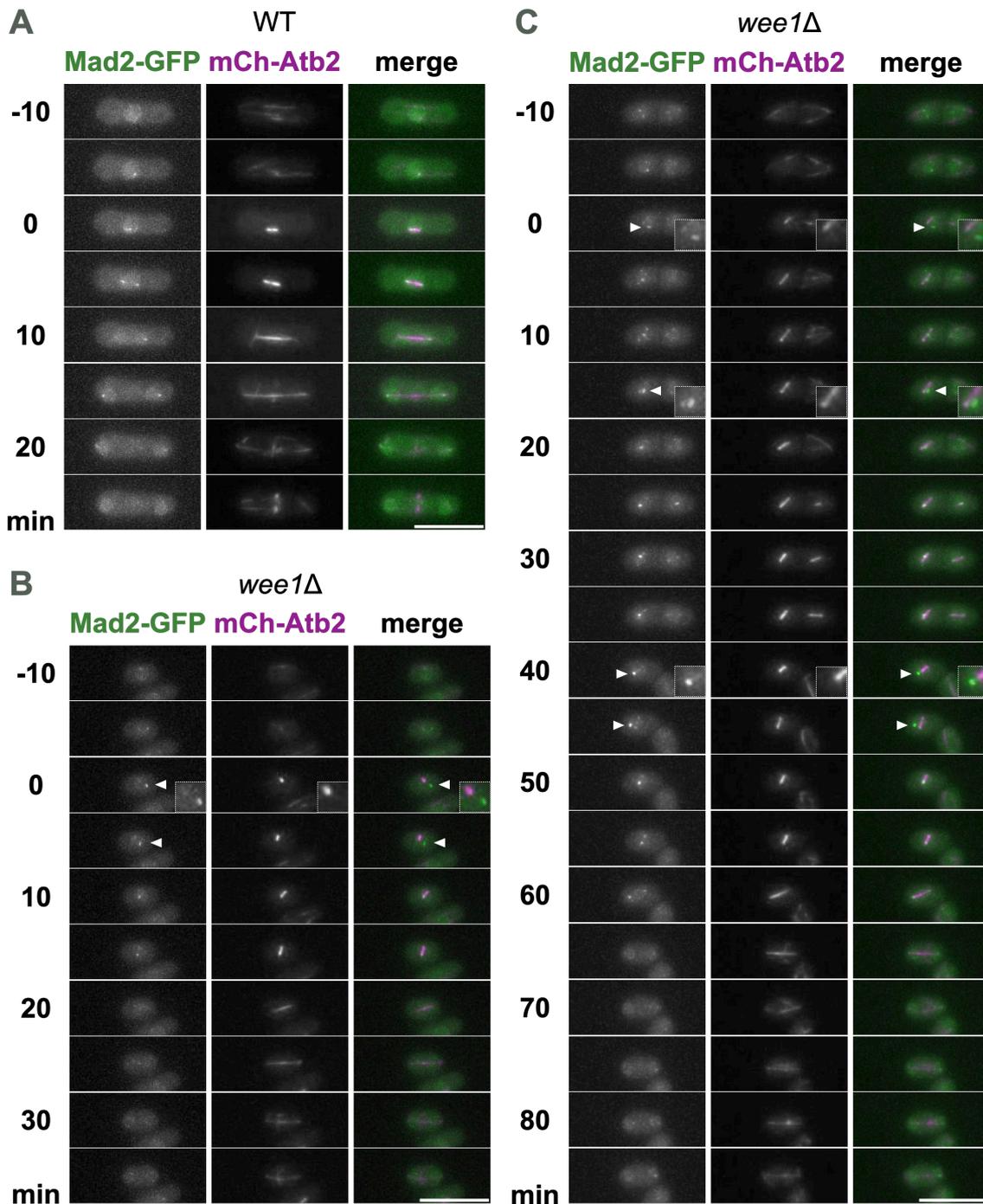


図 13 : *wee1* 欠損株ではスピンドルチェックポイントの活性化が見られる
 野生型株(A)と *wee1* 欠損株(B, C)においてタイムラプス観察をした。merge
 写真では Mad2-GFP を緑色、mCherry-Atb2 をマゼンタで示している。B、C
 において Mad2 スペックルが見られるものに矢じりをつけ、インセット内に拡
 大画像を付した。B は Mad2 スペックルが一度だけ、C は複数回見られたもの
 を載せた。スケールバーは $10\mu\text{m}$ 。

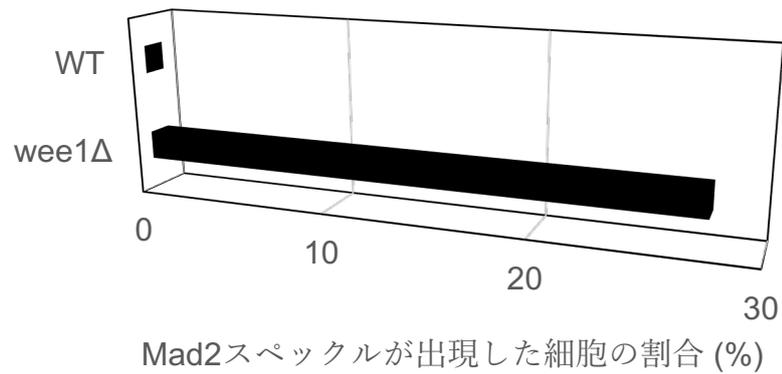


図 14 : *wee1* 欠損株では有糸分裂中に Mad2 スペックルが出現する

タイムラプス観察のデータ（図 13 にかかるデータ）より、有糸分裂中に一度でも Mad2 スペックルが出現した細胞を数えた。野生型株(WT)では 30 細胞中 0 細胞(0%)だった。*wee1* 欠損株(*wee1*Δ)では 101 細胞中 28 細胞(28%)だった。

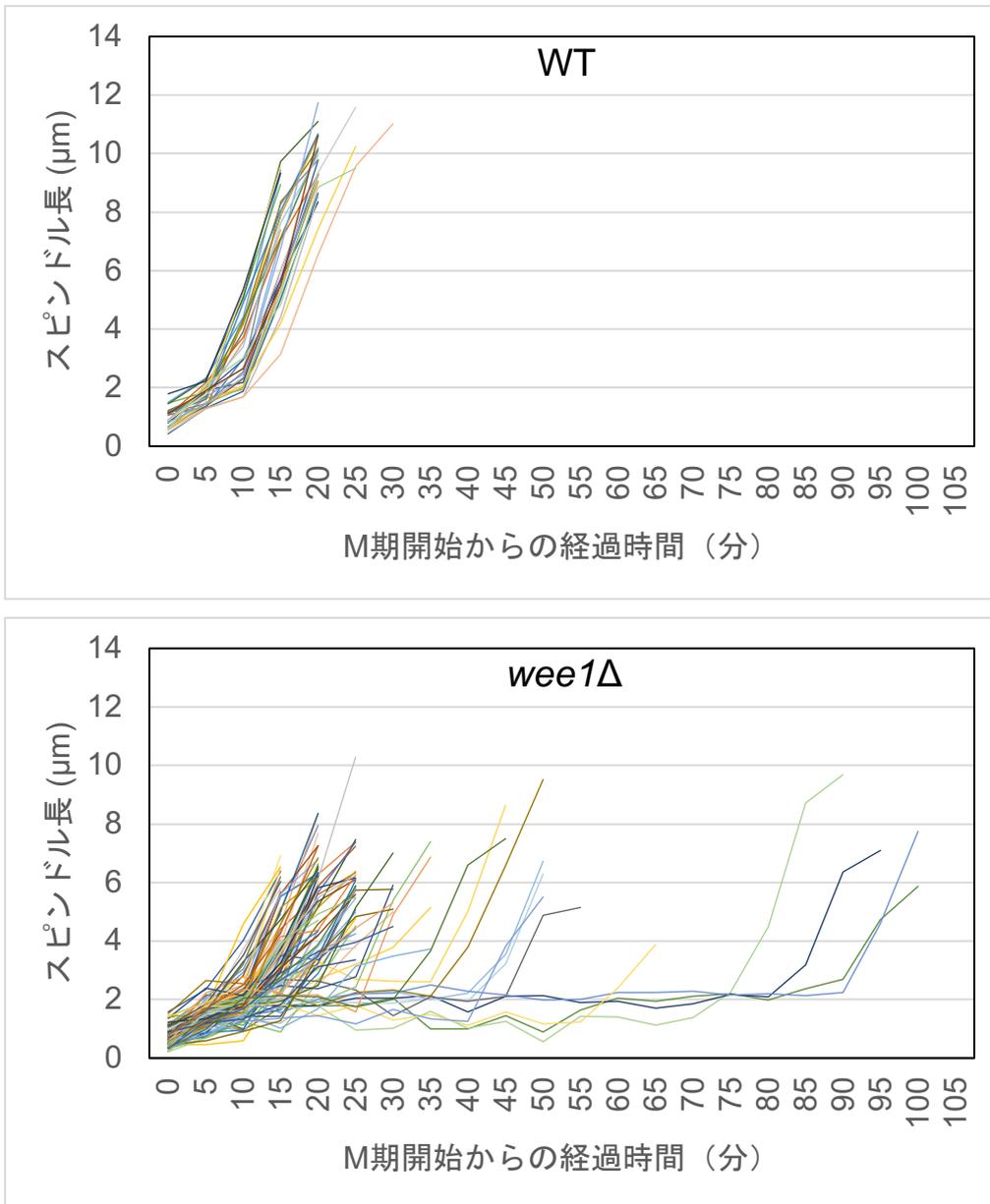


図 15 : *wee1* 欠損株ではスピンドル微小管の伸長に遅延が見られる

タイムラプス観察のデータ (図 13 にかかるデータ) より、個々の細胞のスピンドル長を計測した (Z 軸方向に $0.3\ \mu\text{m}$ 刻みで撮影した 11 枚の写真の重ね合わせ画像を用いた)。上段は野生型株(WT)、下段は *wee1* 欠損株(*wee1Δ*)のデータ。

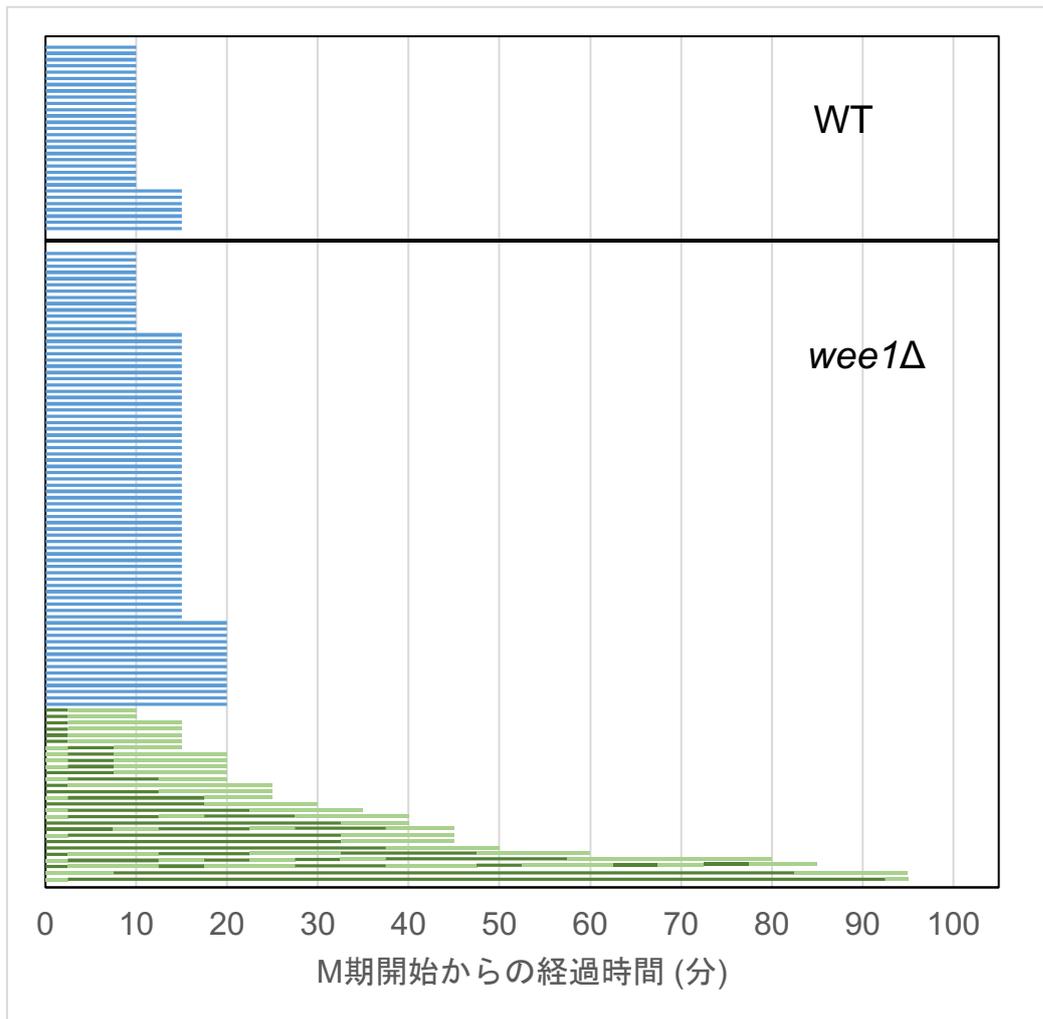


図 16 : Mad2 スペックルが消失するまで M 期後期の開始は遅延する

タイムラプス観察のデータ (図 13 にかかるデータ) より、個々の細胞における M 期開始から後期開始までの時間を棒グラフで表した。上段は野生型株 (WT)、下段は *wee1* 欠損株 (*wee1Δ*) のデータ。M 期開始はスピンドル微小管の出現、後期開始はスピンドル長が $2\mu\text{m}$ 前後から急に伸び始める時点とした。青色は Mad2 スペックルが出現しなかった細胞、緑色は Mad2 スペックルが出現した細胞を表している。濃い緑色が Mad2 スペックルが現れている時間帯、薄い緑色は現れていない時間帯を示す。いずれの細胞においても後期は Mad2 スペックルが消失してから (棒グラフの色が濃い緑色から薄い緑色に変わってから) 始まっている。

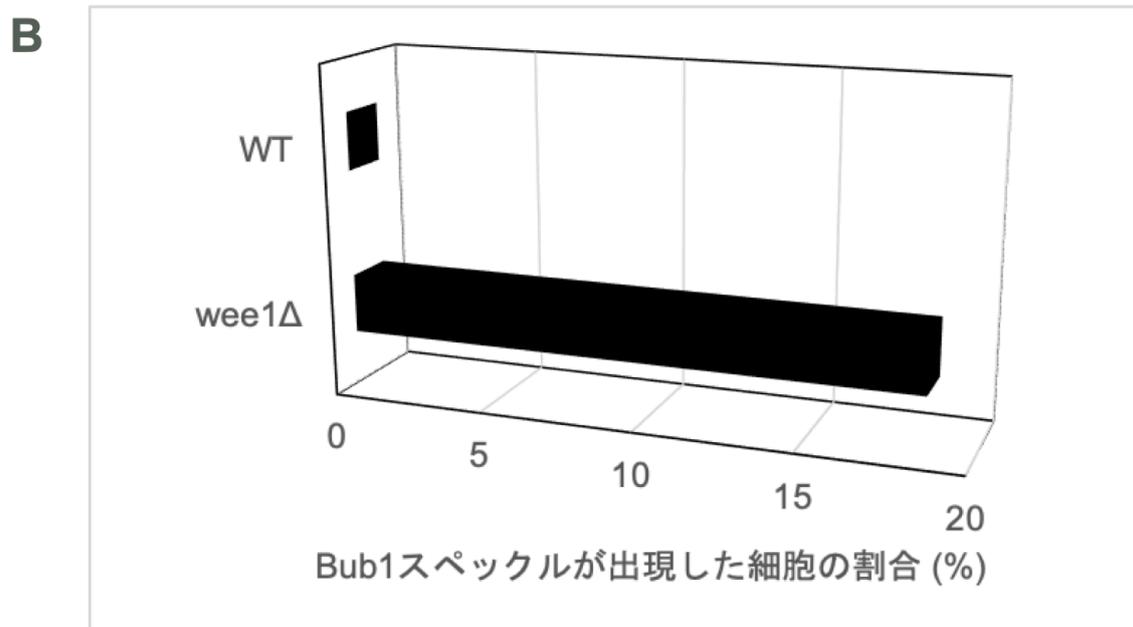
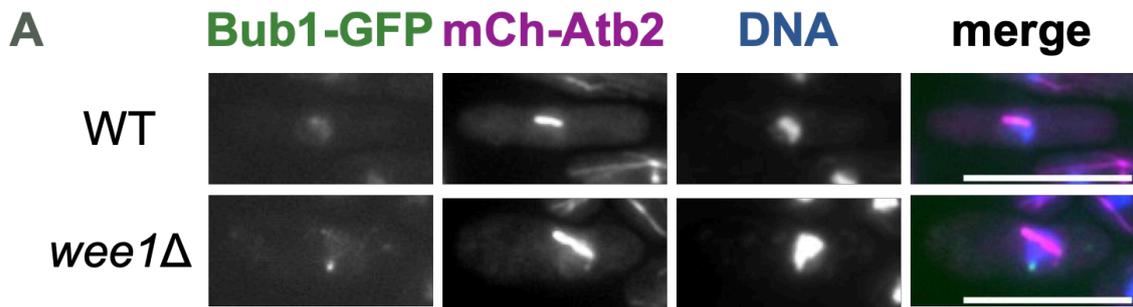


図 17: *wee1* 欠損株では有糸分裂中に Bub1 スペックルが出現する

メタノールで固定した野生型株 (WT) と *wee1* 欠損株 (*wee1Δ*) の M 期前期から中期の細胞 (スピンドル微小管を持ち、まだ染色体が分かれていない細胞) の中で Bub1 スペックル (スピンドル微小管から離れた位置に見える Bub1-GFP の輝点) が見られる細胞を数えた。野生型細胞では 63 細胞中 0 細胞 (0%)、*wee1* 欠損株では 167 細胞中 31 細胞 (19%) だった。

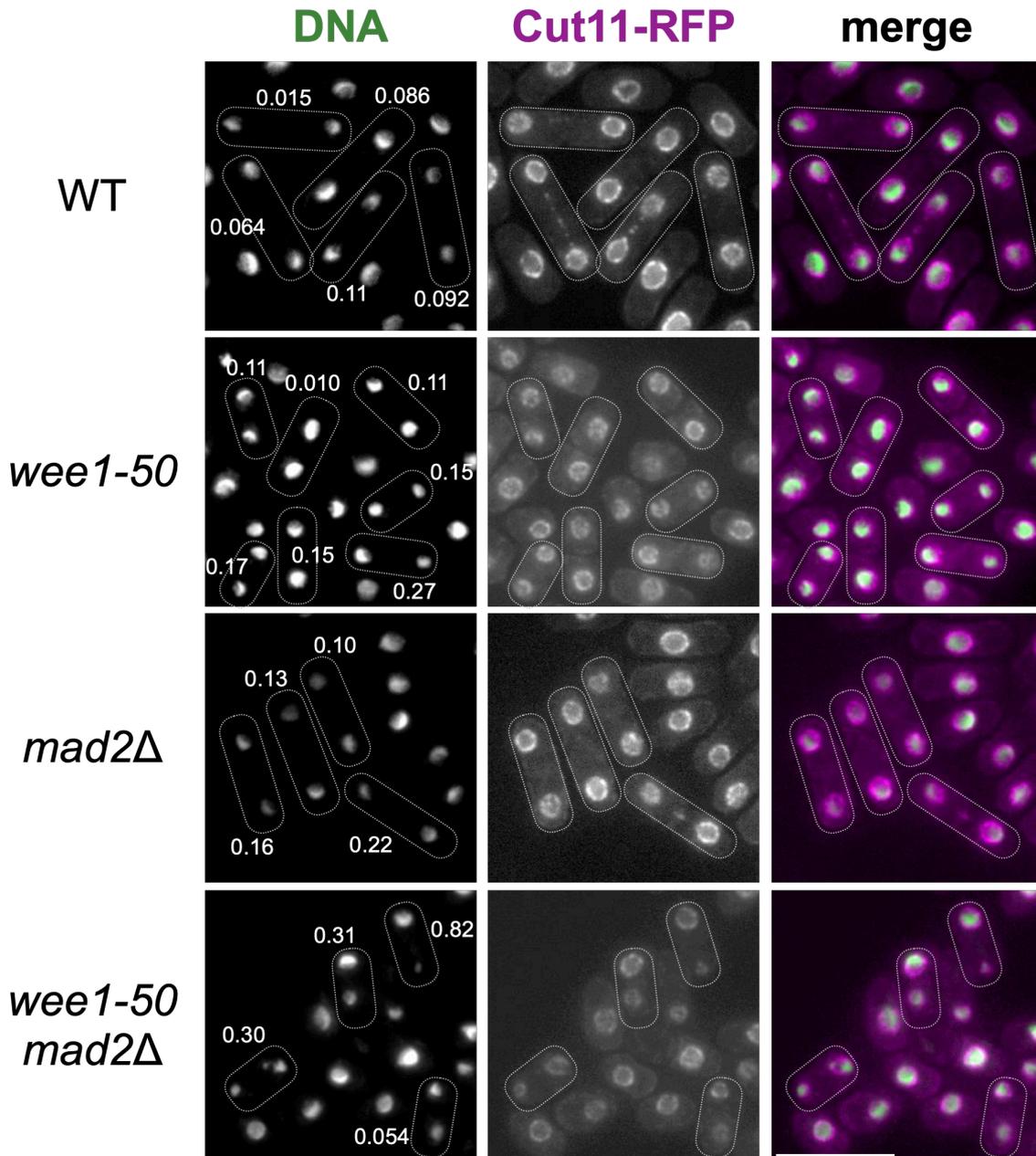


図 18 : *wee1-50 mad2Δ* 二重変異株では染色体の不均等分配が起こる
 それぞれの遺伝子型の株を 36°C で 1 時間培養し、メタノールで固定した。
 DNA はヘキスト 33342 で染色し緑色で示した。Cut11-RFP は核膜のマーカー
 でマゼンタで示した。写真中の 2 核細胞を点線で囲み、それぞれの娘核の大き
 さを「材料と方法」に記載した方法で測定し計算した D 値を付した。スケール
 バーは 10 μ m。

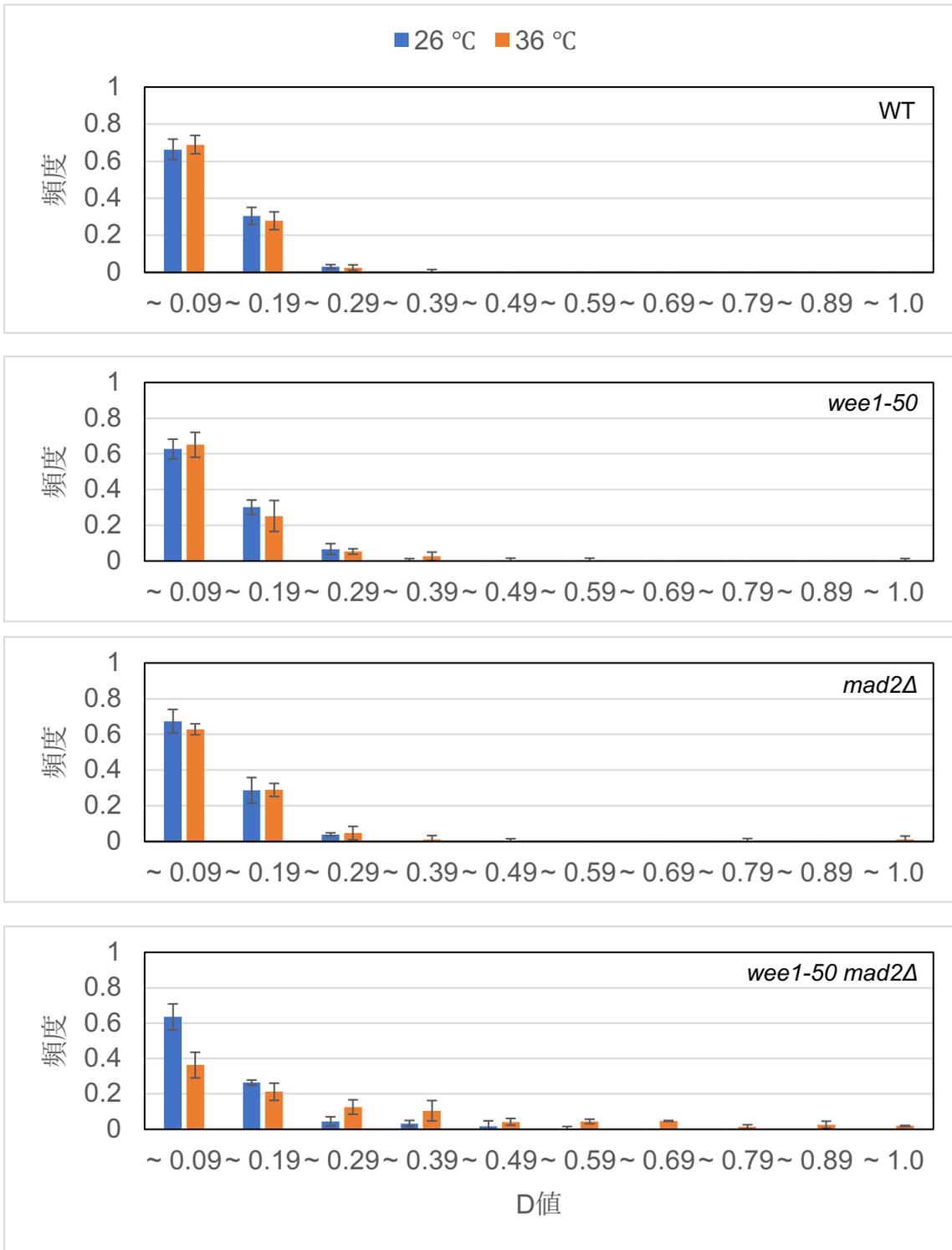


図 20 : *wee1-50 mad2Δ* 二重変異株では染色体の不均衡分配が起こる

図 18 で測定した D 値の頻度をヒストグラムに表した。

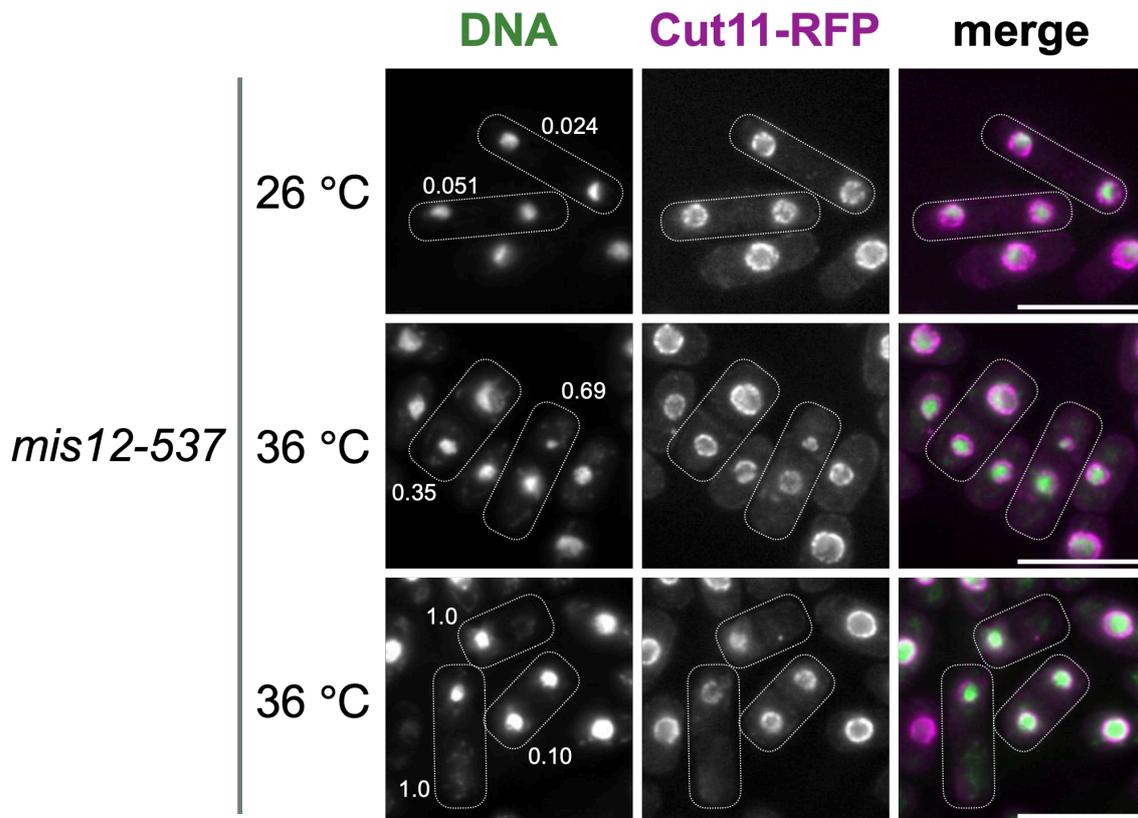


図 21 : D 値の測定のコントロールとして *mis12-537* 高温感受性株を用いた

(詳細は第四章「材料と方法」4-4. 染色体の分配パターンの推定に記載)

DNA を緑色、核膜マーカーCut11-RFP をマゼンタで示した。図中の数字は各 2 核細胞における D 値。*mis12-537* 変異株では D 値が 0.90 から 1.0 の範囲に入る場合が約 30%あった (上図の 3 段目、図 22B のヒストグラム)。スケールバーは 10 μ m。

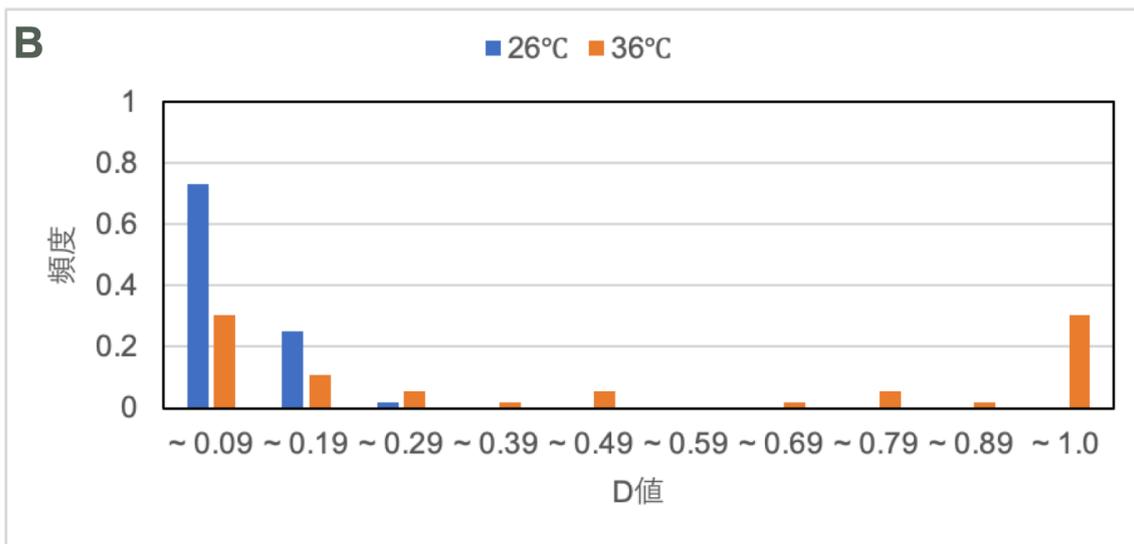
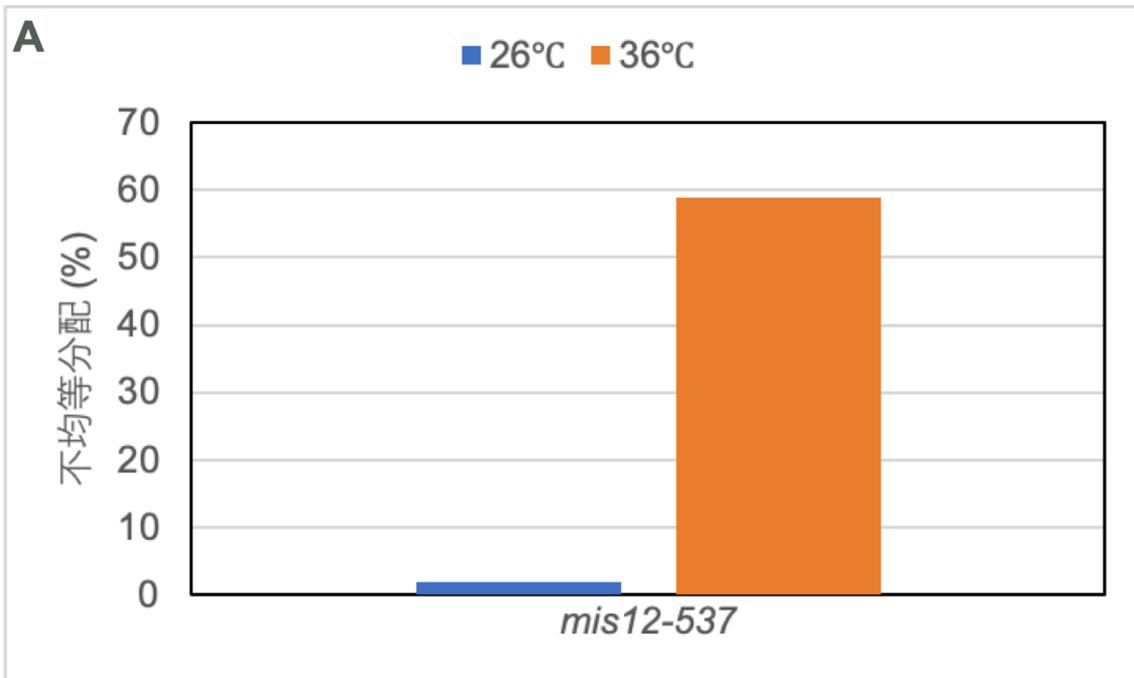


図 22 : D 値の測定のコントロールとして *mis12-537* 高温感受性株を用いた
(詳細は第四章「材料と方法」4-4. 染色体の分配パターンの推定に記載)

A) 図 21 で測定した D 値を元に染色体の分配パターンを推定した。0.20 未満を均等分配、0.20 以上を不均等分配とした。測定に用いた細胞数は 26°C のサンプルで 52 細胞、36°C のサンプルで 56 細胞だった。

B) D 値のヒストグラム。0.90 以上の頻度が約 30% だった。

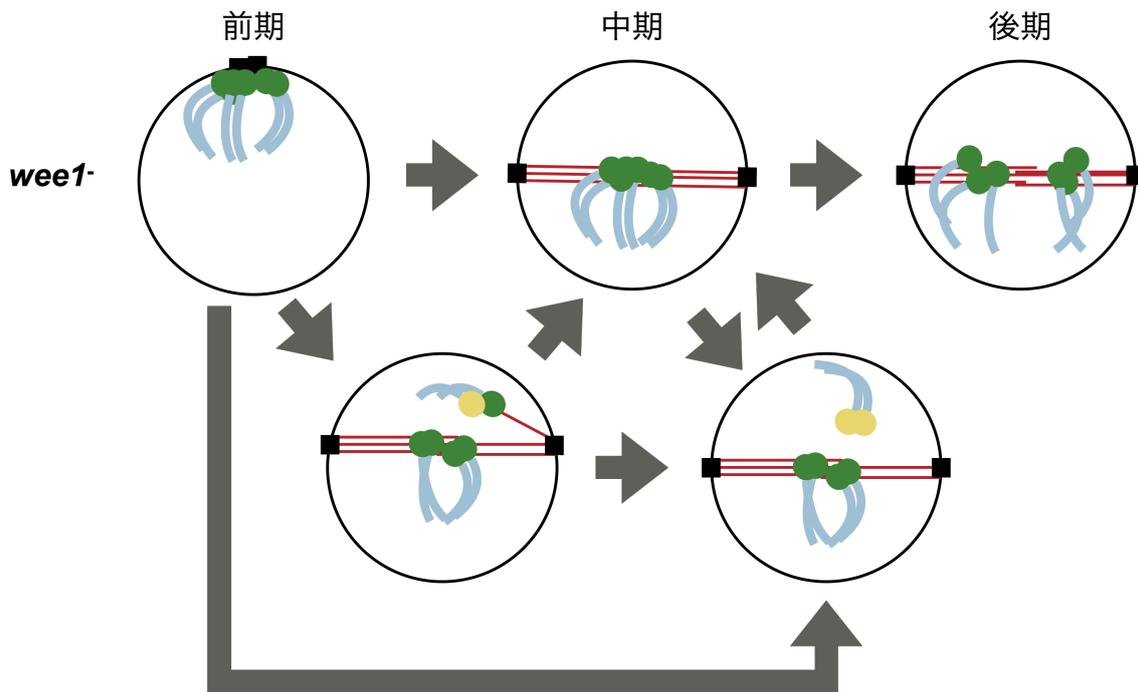


図 23 : *wee1* 変異株で見られたサテライトキネトコアの動態の予想図

図 8 にかかるタイムラプス生細胞観察で、サテライトキネトコアが生じた後、スピンドル微小管上に輝点が移る（スピンドル微小管との接続が完了する）までの時間が短時間で済むものと長時間かかるものとが観察された。前者は姉妹の動原体の片方が未接続となっており、後者は両方が未接続となっていることが予想される。いずれにしても、接続が完了するまでの間スピンドルチェックポイントがはたらいて染色体分配のタイミングを遅延させていれば均等な染色体分配が可能であると考えられる。核膜を黒色円形、紡錘極体（SPB）を黒色四角形、染色体腕部を水色、動原体（キネトコア）を緑色、スピンドル微小管に未接続の動原体を黄色、スピンドル微小管を赤色で示した。

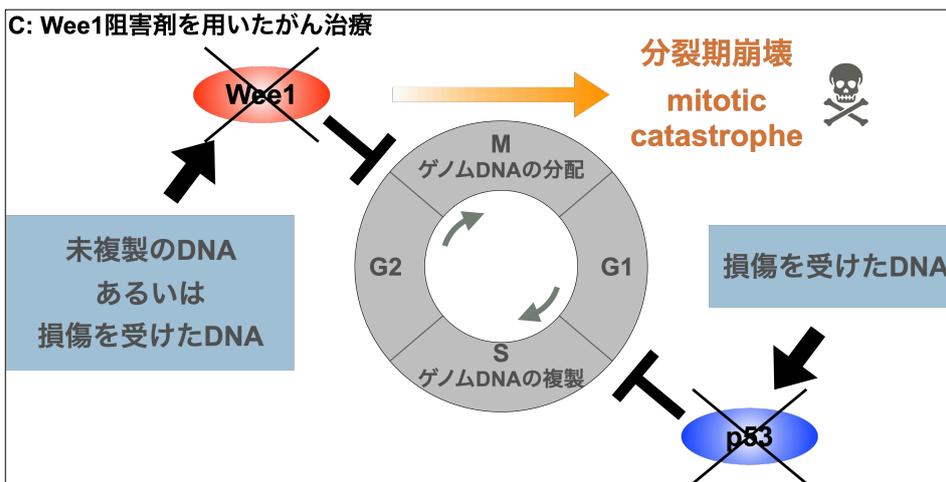
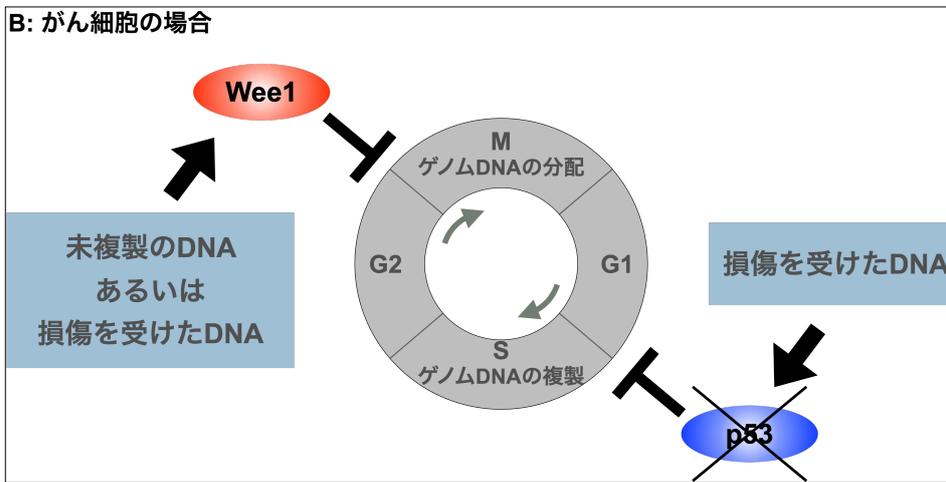
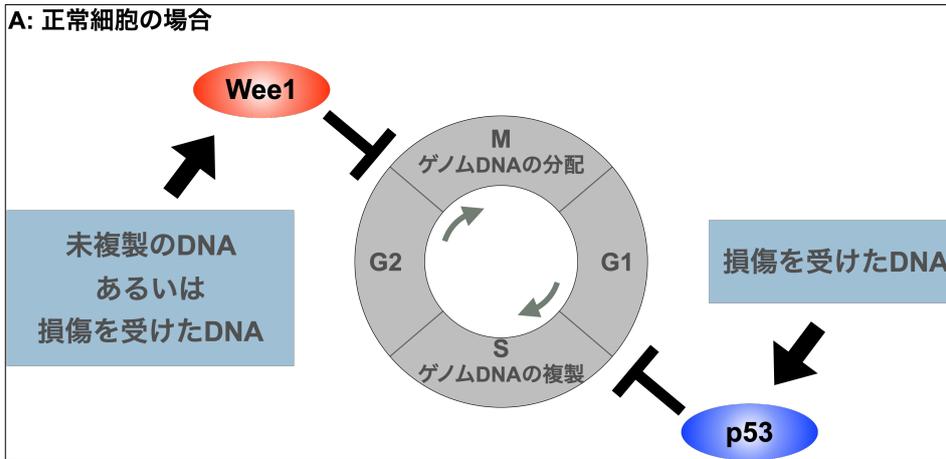


図 24 : Wee1 阻害剤を用いたがん治療の概念図

がん細胞の DNA 修復が G2 期に依存していることを利用し、Wee1 阻害剤によって強制的に M 期に突入させて細胞死を起こさせるアプローチである。