

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：32641
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2017～2022
課題番号：17K07392
研究課題名（和文）減数分裂の制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of meiosis

研究代表者

村上 浩士（Murakami, Hiroshi）

中央大学・理工学部・教授

研究者番号：80262020

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：減数分裂は遺伝的多様性を生み出し、配偶子形成に必須であるがその制御機構に関しては不明な点が多い。本研究で、減数分裂前DNA複製と遺伝子組換え開始の制御機構に関しては、Cds1キナーゼがフォークヘッド型転写因子Mei4をリン酸化し、リン酸化がチェックポイントに必要であることを示した。減数分裂前DNA複製と第一減数分裂開始の制御機構に関しては、Cds1がフォークヘッド型転写因子であるFkh2をリン酸化し、このリン酸化がチェックポイントに必要であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

減数分裂は遺伝的多様性を生み出し、配偶子形成に必須であるがその制御機構に関しては不明な点が多い。減数分裂において、細胞周期が順序正しく進行するために、チェックポイント機構が必要である。しかし、このチェックポイント機構は、ほとんどの生物で未解明であった。この研究により、その一部が明らかにされた。

研究成果の概要（英文）：Meiosis generates genetic diversity and is essential for gametogenesis, but there are many unclear points about its regulatory mechanism. In this study, we showed that Cds1 kinase phosphorylates the forkhead transcription factor Mei4 and that phosphorylation is required for checkpoints in the regulation of premeiotic DNA replication and initiation of recombination. Regarding the control mechanism of pre-meiotic DNA replication and first meiotic initiation, we showed that Cds1 phosphorylates Fkh2, a forkhead transcription factor, and that this phosphorylation is required for the checkpoint.

研究分野：生物学

キーワード：減数分裂 細胞周期 遺伝的組換え チェックポイント DNA複製

1. 研究開始当初の背景

減数分裂は遺伝的多様性を生み出し、配偶子形成に必須であるがその制御機構に関しては不明な点が多い。減数分裂に特有の諸現象を協調的に進行させる制御機構は、特に未解明であった。

(1) 減数分裂前 DNA 合成と遺伝的組換えの関係 (2) 減数分裂前 DNA 合成と第一減数分裂の開始との関係については解明が遅れている。

(1) の制御機構において、減数分裂前 DNA 複製が阻害されると DNA の二重鎖切断から始まる遺伝的組換えが起こらないことが知られていた。しかし、DNA 複製チェックポイント因子 (分裂酵母では Rad1, Rad3, Rad9, Rad17, Rad26, Hus1 及び Cds1) が不活性化すると、DNA 複製が阻害されているにもかかわらず二重鎖切断が生じることが明らかにされ、チェックポイント機構により制御されていることが申請者のグループにより明らかにされていた。

フォークヘッド型転写因子である Mei4 は減数分裂中期の数百の遺伝子の発現に関与していることが知られていた。また、Mei4 は遺伝的組み換えの開始、第一減数分裂の開始、胞子形成に必要であることが明らかにされていた。申請者のグループは、Mei4 の第一減数分裂開始に重要なターゲット遺伝子(*cdc25* 遺伝子と *wee1* 遺伝子)を同定していた。

(2) の制御機構において、減数分裂前 DNA 複製が阻害されると第一減数分裂が起こらないことが知られていた。しかし、DNA 複製チェックポイント因子が不活性化すると、DNA 複製が阻害されているにもかかわらず第一減数分裂及び第二減数分裂が起こることが明らかにされ、この停止はチェックポイント機構により制御されていることが申請者のグループにより明らかにされていた。さらに、DNA 複製が阻害されると第一減数分裂の進行に中心的な役割を果たす Cdk1 の 15 番目のチロシン残基はリン酸化され Cdk1 は不活性化していた。しかし、Cdk1 の 15 番目のチロシン残基をリン酸化されないようにすると、Cdk1 のキナーゼ活性は上昇したが、第一減数分裂は起こらなかった。そのため、減数分裂の DNA 複製チェックポイント機構においては Cdk1 の 15 番目のチロシン残基はリン酸化制御だけでなく、未知の機構が関与していると考えられていた。

2. 研究の目的

(1) 減数分裂前 DNA 合成と遺伝的組換えの関係は DNA 複製チェックポイント因子(Rad3、Cds1 など)が必要であることは明らかにされていたが、その下流は明らかにされていなかった。そこで、チェックポイント因子の中で遺伝学的に最下流に位置する Cds1 キナーゼがリン酸化する基質を同定することを目的とした。

(2) 減数分裂前 DNA 合成と第一減数分裂開始の関係は DNA 複製チェックポイント因子(Rad3、Cds1 など)が必要であることは明らかにされていたが、その下流は明らかにされていなかった。そこで、チェックポイント因子の中で遺伝学的に最下流に位置する Cds1 キナーゼがリン酸化する基質を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 分裂酵母で減数分裂の遺伝的組換え開始に必須である Mei4 に着目した。in vitro におい

て、Cds1 は RXXS/T 配列をよくリン酸化することが知られている。そこで、この部位を Me14 で探したところ、7箇所見つかった。そこで、Me14 がリン酸化されないように7箇所全てをアラニンあるいはリン酸化を模倣するアスパラギン酸に置換し、この変異株で減数分裂前 DNA 合成と遺伝的組換え開始のチェックポイントが正常に機能しているかどうか調べた。

(2) (1)と同様に、第一減数分裂の開始に必須の Me14 に着目した。上記の変異株を用いて、減数分裂前 DNA 合成と第一減数分裂のチェックポイントが正常に機能しているかどうか調べた。

4 . 研究成果

(1) Me14 が Cds1 によりリン酸化されないように変異を導入した変異株 (*me14-7A*) では、減数分裂前 DNA 合成を阻害しても遺伝的組換え開始に必須の二重鎖切断が観察された。すなわち、Cds1 によるリン酸化制御がこのチェックポイントにおいて重要な役割を果たしていることが示唆された。

また、減数分裂前 DNA 合成を阻害すると、Me14 は in vivo で Rad3 と Cds1 依存的にリン酸化が起こった。また、Cds1 によるリン酸化部位を特定するため、N 末端よりの4箇所あるいはC末端よりの3箇所をアラニンに置換した株 (*me14-4A*, *me14-3A*) を作成した。この株を用いて調べたところ、C 末端ではなく、ほとんど N 末端よりの4箇所がリン酸化されていることが明らかになった。また、in vitro においても Me14 は Cds1 により N 末端よりの4箇所がリン酸化された。*me14-4A*, *me14-3A* 株ともにチェックポイント異常を示した。

N 末端側には Me14 の DNA 結合領域が存在するため、ゲルシフト法によりリン酸化の影響をアスパラギン酸に置換した (*Me14-3D*) を用いて調べたところ、野生型に比べターゲットの DNA との親和性が低下していた。

すなわち、減数分裂前 DNA 合成を阻害すると、Rad3 が活性化され、次に Cds1 が活性化され、Me14 の N 末端よりの部位をリン酸化することで、Me14 が不活性化し、ターゲットの遺伝子との親和性が弱まり、遺伝的組換えが阻害されるというモデルを提唱した。

(2) *me14-7A*, *me14-4A*, *me14-3A* 株は、いずれも DNA 複製を阻害しても第一減数分裂は開始しなかった。すなわち、減数分裂前 DNA 合成と第一減数分裂開始のターゲットは Me14 のこれらの部位のリン酸化でないと示唆された。そこで、他のフォークヘッド型転写因子 Fkh2 や Sep1 について、このチェックポイントに関与しているかどうかを調べている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nambu M, Kishikawa A, Yamada T, Ichikawa K, Kira Y, Itabashi Y, Honda A, Yamada K, Murakami H, Yamamoto A.	4. 巻 135
2. 論文標題 Direct evaluation of cohesin-mediated sister kinetochore associations at meiosis I in fission yeast.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Cell Sci.	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.259102.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamada S, Kugou K, Ding DQ, Fujita Y, Hiraoka Y, Murakami H, Ohta K, Yamada T.	4. 巻 46
2. 論文標題 The histone variant H2A.Z promotes initiation of meiotic recombination in fission yeast.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res.	6. 最初と最後の頁 609-620
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkx1110.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hokuto Ohtsuka, Masahiro Takinami, Takafumi Shimasaki, Takahide Hibi, Hiroshi Murakami, and Hirofumi Aiba	4. 巻 105
2. 論文標題 Sulfur restriction extends fission yeast chronological lifespan through Ecl1 family genes by downregulation of ribosome	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol Microbiol.	6. 最初と最後の頁 84-97
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/mmi.13686.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takafumi Shimasaki, Hokuto Ohtsuka, Chikako Naito, Kenko Azuma, Takeshi Tenno, Hidekazu Hiroaki, Hiroshi Murakami & Hirofumi Aiba	4. 巻 292
2. 論文標題 Ecl1 is a zinc-binding protein involved in the zinc-limitation-dependent extension of chronological life span in fission yeast	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Genomics,	6. 最初と最後の頁 475-481
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00438-016-1285-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 岡崎亜美 1、小菅清二 1、三輪由紀子 2、饗場浩文 2、村上浩士 1
2. 発表標題 S. pombeでの減数分裂におけるFkh2の減数分裂前DNA複製と減数分裂を連携するチェックポイント機構の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第 52 回研究報告会プログラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小菅清二 1、山田貴富 1, 2、村上優子 3、饗場浩文 4、 村上浩士 1
2. 発表標題 分裂酵母における DNA 複製と相同組換え開始を制御する Cds1 キナーゼと転写因子 Mei4 の機能解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第 52 回研究報告会プログラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Murakami1, Seiji Kosuge1, Takatomi Yamada1, Hirofumi Aiba2, Yuko Murakami3,
2. 発表標題 Phosphorylation of Mei4 by Cds1 in the meiotic DNA replication checkpoint linking pre-meiotic DNA replication and meiotic recombination in fission yeast.
3. 学会等名 10th International Fission Yeast Meeting, Barcelona, Spain,
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小菅清二、山田貴富、饗場浩文、村上浩士
2. 発表標題 分裂酵母DNA複製チェックポイント因子Cds1のリン酸化による転写因子Mei4を介した相同組換え開始の制御機構
3. 学会等名 第 5 1 回酵母遺伝学フォーラム研究報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 南部将志、市川絢登、岸川敦紀、山田貴富、村上浩士、山本 歩
2. 発表標題 減数分裂型キネトコア形成にはセントロメアコアとキネトコアの結合が必要である
3. 学会等名 第51回酵母遺伝学フォーラム研究報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田貴富、太田邦史、村上浩士
2. 発表標題 分裂酵母ヒストンH2A.Zが減数分裂期交差型組換えを制御する可能性の検討
3. 学会等名 第51回酵母遺伝学フォーラム研究報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuuki Akiya, Atsushi Ogihara, Hirofumi Aiba and Hiroshi Murakami
2. 発表標題 Regulation of mei4+ expression during mitotic cell cycle in fission yeast
3. 学会等名 9th International Fission yeast meeting, (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小菅清二、山田貴富、饗場浩文、村上浩士
2. 発表標題 減数分裂時のDNA複製と相同組換えを連携するチェックポイント
3. 学会等名 第50回酵母遺伝学フォーラム研究報告会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山田貴富、村上浩士	4. 発行年 2018年
2. 出版社 国際文献社	5. 総ページ数 9
3. 書名 化学と生物 vol 56, No.4、生体内における減数分裂組換えの開始制御、p262-271, 2018	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------