

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19710164

研究課題名（和文） 分裂酵母の減数分裂特異的発現遺伝子群の包括的単離と機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis and comprehensive isolation of meiosis-specific genes in *Schizosaccharomyces pombe*.

研究代表者

奥崎 大介 (OKUZAKI DAISUKE)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：00346131

研究成果の概要（和文）：生殖細胞の研究は必須かつ急務だがヒトや高等生物では倫理的・技術的な問題を抱える。この問題を克服するため、生殖・減数分裂の研究に分裂酵母をモデル生物とし十数年前より研究を続けている。“他段階差引法”という独自技術とゲノム情報を基盤とした網羅的解析によって減数分裂特異的に転写誘導される遺伝子群の包括的単離と機能解析を行い、哺乳動物にも存在する遺伝子を多数同定・解析することで哺乳動物の生殖メカニズムへの理解を目指す。

研究成果の概要（英文）：Germ cell research in humans and higher organisms, but is essential and urgent task facing the ethical and technical issues. To overcome this problem continues to study more than ten years ago with a model organism for the study of meiosis in fission yeast reproduction. Isolation and functional analysis performed comprehensive transcription of genes specifically induced by meiosis-based comprehensive analysis of genome information and proprietary technology that also exist in mammalian genes aimed at understanding the mechanism of mammalian reproduction identified by analyzing a large number.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,400,000	540,000	3,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：分裂酵母、減数分裂、生殖・分化、細胞周期、リン酸化

## 1. 研究開始当初の背景

不妊は再生やクローン技術の問題と密接に関わっている。これらの技術を利用するためには生殖メカニズムを正しく理解するため分子レベルでの研究が必須かつ急務である。生殖細胞は染色体数が半減する点で体細胞分裂と大きく異なった分裂様式をとる

が、高等な生物では倫理的・技術的な問題を抱え、未知の領域が残された分野である。哺乳動物の生殖細胞の培養系が存在しないこと、ポストゲノムの時代を迎えても生殖・減数分裂期でいったいどのくらいのどの遺伝子が働き体細胞分裂と異なる分裂を起こすのか網羅的に解析されていない点な

どが挙げられる。我々はこの問題を克服するため、生殖・減数分裂の研究に分裂酵母を優れたモデル生物として選択し国内外の研究グループより先駆けて十数年前より研究を続けている。

“他段階差引法”という独自の技術とゲノム情報を基盤とした網羅的ノーザン解析によって分裂酵母の減数分裂特異的に転写誘導されている *meu+*, *mcp+* 遺伝子群の包括的単離と機能解析を行ってきた。現在まで哺乳動物にも存在する遺伝子を多数同定・解析し、本研究の目的である哺乳動物への理解の準備に確実に近づいている。

## 2. 研究の目的

これまで同定した多数の *meu+*, *mcp+* 遺伝子群のうち、減数分裂特異的な現象を理解するために新規遺伝子の機能解析を行う。特に、我々は **Meu13**, **Mcp7** が減数分裂組み換えチェックポイント制御機構に関わることを明らかにしたことからそのシグナルを受けて行われる2回の核分裂が何故連続して起こるかという問題について展開しようと試みた。他グループのマイクロアレイを用いた解析から減数分裂期では数多くの遺伝子の発現が上昇していることが明らかになり、減数分裂期特有の染色体の相同組み換えや2回の連続した染色体分配にこれらの遺伝子群が関わり、体細胞分裂期にはない様々なタンパク間相互作用も増加していると予想できた。特にタンパクの質複合体形成に必要で生物間において普遍的に存在するコイルドコイルモチーフに着目した。前述のデータベースからコイルドコイルモチーフを有する機能未知な約60個のタンパク質に候補を絞り、ノザンプロットから厳密な減数分裂期での発現パターンを調べてみた。その結果、7つの遺伝子の減数分裂特異的な発現を見出し、これらを *mcp+*

(*meiotic coiled coil protein*)遺伝子群と名づけた。**Mcp7** が他段階差引法により単離された相同染色体の対合と組換えに必要な **Meu13** と相互に結合し機能していることを証明し報告している。同時に **Mcp6** は真核生物において相同染色体間の組み換え反応を促進するこの時期特有のブーケ構造を形成するために必要な中心体構造タンパク質の1つであることも報告している。

**Mcp5** についても相同染色体間の組換え反応を促進するために必要であることがわかり、継続的に解析を進めている。このように *mcp7*, *6*, *5*, *4*, *3*, *2*, *1* 遺伝子の減数分裂における個々の役割と連携を解析し、減数分裂期の全体像の一端を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1)対象遺伝子破壊株の作製

①相同染色体間の組換え頻度の低下を計測

②減数分裂期の核の運動を GFP で可視化

### (2) 対象遺伝子のタグ融合変異株を作成

①SPB 因子、核タンパク質と比較する。

②微小管の構造解析

(3)細胞生物学的解析に加え、リン酸化修飾、タンパク質間相互作用を調べる生化学的解析手法

(4)細胞内の網羅的発現解析を行うマイクロアレイ解析

## 4. 研究成果

### (1) *Mcp4* の研究成果

減数分裂に特有なタンパク質間相互作用に着目し、7つの減数分裂特異的 Coiled-coil タンパク質を単離解析を行った。減数第二分裂期の F-アクチンの局在に関与する *Mcp4* タンパク質について、アクチンは細胞の形態形成に重要な因子であることは言うまでもないが、精子形成においても精細胞特異的アクチンが半数体精子細胞の形態形成に重要であることが知られている。分裂酵母の F-アク

チンには減数分裂特異的なものはない為、胞子形成時の特別な機能は時期特異的な他の因子によって制御されていると考えられる。Mcp4はF-アクチンや Meu14が形成する先端リング構造の更に内側にリング構造を形成していた。この局在性はこれまでに報告されてきた分裂酵母の局在解析の中のどれにも属さず、全く新しい減数分裂特異的構造体であった為、その新規性が評価され Eukaryotic Cell の表紙として取り上げられた。減数分裂期の F-アクチンの局在性にリンクするこの新規構造体の研究は前例のない最先端に位置していた。Mcp4 は分裂酵母以外にオルソログは見出せないが、Mcp4 の研究は全生物細胞の基本骨格の一つであるアクチンのダイナミクス制御に関する全く新しい進化的知見が得られた。mcp4 破壊株では F-アクチンの特徴的なリング形態のほとんどが異常になり、形成した破壊株由来の胞子は NaCl 感受性を示し、発芽の遅れや生存率の低下が見られた。これらの結果から、Mcp4 は F-アクチンのポジショニングに関与し、正常な胞子形成過程に貢献していると結論した。

### (2) Mug27 の研究成果

減数分裂特異的に発現する Latsファミリーメンバーである Mug27について機能解析を行った。第二減数分裂後に起こる配偶子形成過程の制御メカニズムには不明な点が多い。Latsファミリーは有糸分裂期において、核分裂後に起こる細胞質分裂の最終段階を制御するが、減数分裂においても核分裂後の配偶子形成を制御すると予想した。この経路は分裂酵母では Septation Initiation Network(SIN)として知られており、その構成タンパク質の多くが高等生物まで保存されている。mug27破壊株の解析を行った結果、Latsファミリーが分裂酵母の配偶子膜で

ある前胞子膜の形成という膜の再構築過程に必須の役割を持つことを示した。更に第二分裂時に SPB から一部の核が分離するという興味深い現象を見出した。このことは Mug27 が核膜と SPB との結合維持に機能することを示唆している。続いて、Mug27 が既知の SIN タンパク質とは異なる性質を持っており、そのリン酸化酵素活性が正常な前胞子膜形成に必須であることを示した。一方で、SIN に関わる Lats2 ホモログである Sid2 の過剰発現により mug27 の変異株で生じる異常を回復できることを発見した。これらの実験結果から、Mug27 は SIN と一部協調して配偶子膜形成を促進するモデルを提唱し、胞子形成過程における Lats リン酸化酵素の関わりを明らかにした。本研究で得られた成果は、配偶子形成制御に重要な知見をもたらすと考える。

### (3) Mug28 の研究成果

多段差引法（段階的サブトラクション法）を用い、分裂酵母の減数分裂で特異的に転写される多数（68 個）の non-coding RNA を単離した。次いで、協調して機能する RNA 結合タンパク質の機能解析を進めた。減数分裂期で特異的に発現誘導される mug28<sup>+</sup> は RNA 認識モチーフを 3 つ持つタンパク質をコードする。mug28<sup>+</sup> の mRNA と Mug28 タンパク質は減数第一分裂期から減数第二分裂期にかけて発現が誘導され、GFP-Mug28 は主に細胞質に局在した。mug28<sup>+</sup> 破壊株は減数分裂へ誘導すると、野生株と比較して顕著に胞子生存率が低下した。その形状を観察すると半数以上が、4 胞子が出来たあとで胞子壁が出芽したような異常な形態を示し、2 ケ（達磨状）あるいは 3 ケ（串団子状）の胞子を形成していた。電子顕微鏡観察(TEM)による解析により、mug28<sup>+</sup> 破壊株では胞子壁の厚い胞子や達

磨状の形態が異常な孢子が数多く観察された。これらのことから、*mug28<sup>+</sup>*破壊株では孢子成熟に異常が見られると思われたので、前段階で生じる前孢子膜の形成について *Psy1-GFP* で可視化して破壊株の前孢子膜を詳細にタイムラプス観察によって調べてみた。その結果、4核を取り囲んだ前孢子膜から更に新たな前孢子膜が出芽して余分な前孢子膜が形成される様子が観察された。また *mug28<sup>+</sup>*破壊株では前孢子膜の伸長を先導する *Meu14* タンパク質の挙動にも異常が見られた。以上の結果から、*Mug28* の機能は孢子壁の適正な成熟の制御であることが示唆された。

#### (4) *Mek1* の研究成果

分裂酵母の減数分裂特異的プロテインキナーゼある *Mek1* は、分裂酵母の *Cds1* やヒトやマウスの *Chk2* に類似した構造を持ち、減数分裂期相同組換えと減数分裂チェックポイント制御に必要である。*Mek1* の減数分裂における役割を知るため、*Mek1* が仲介するキナーゼカスケードの機能解析を行った。まず、上流のキナーゼとして *Rad3/Tel1* によるリン酸化部位の同定を行った。その結果、T15に隣接する S12/S14 も含めた3ヶ所のリン酸化部位が同定できた。ここに T15 はチェックポイントに必要であることが報告されている *Cds1* の T11、*hChk2* の T68 に対応する。*rad3tel1* 二重破壊株における減数分裂過程での *Mek1* のリン酸化状態 (ウエスタン法) とキナーゼ活性 (*in vitro* リン酸化アッセイ) の顕著な低下は、このリン酸化が *Mek1* の活性化に重要であることを示唆する。一方、*mek1* 破壊株 (*mek1 $\square$* ) は相同組換え頻度が半減するが、これら3アミノ酸をアラニンに置換した *mek1-S12AS14AT15A* 株では僅かしか頻度が低下しなかった。次いで *Mek1* の自己リン酸化部位をキナーゼ領域内に1か所同定し、この

アミノ酸をアラニンに置換した変異株を調べたところ、リン酸化活性と相同組換え頻度の低下を確認できた。これらの結果はこのリン酸化カスケードの後半部分が減数分裂期相同組換えに重要である事を示す。さらに *Mek1* のリン酸化標的を検索し、減数分裂期相同組換えに必須の *Tid1* と *Mus81* を見出し、それぞれにおいて複数のリン酸化部位を決定した。このうち *Mus81* については、*Mek1* および *Cds1* を用いた *in vitro* のリン酸化解析から、*Mek1* によってのみリン酸化される2つのアミノ酸、および *Mek1* と *Cds1* によってリン酸化される1つのアミノ酸を同定した。これらをアラニンに置換した変異株を用いた *Mek1* 依存的なリン酸化標的の挙動についても報告し、*Mek1* が仲介するキナーゼカスケードの詳細明らかにした。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計15件)

- ① Honda T, Fujino K, Okuzaki D, Ohtaki N, Matsumoto Y, Horie M, Daito T, Itoh M, Tomonaga K. Upregulation of insulin-like growth factor binding protein 3 in astrocytes of transgenic mice that express borna disease virus phosphoprotein. *J Virol*. 2011 May;85(9):4567-71. (査読有)
- ② Oneyama C, Ikeda J, Okuzaki D, Suzuki K, Kanou T, Shintani Y, Morii E, Okumura M, Aozasa K, Okada M. MicroRNA-mediated downregulation of mTOR/FGFR3 controls tumor growth induced by Src-related oncogenic pathways. *Oncogene*. 2011 Oncogene advance online publication 7 March 2011; doi: 10.1038/onc.2011.63. (査読有)
- ③ Tougan T, Kasama T, Ohtaka A, Okuzaki D, Saito TT, Russell P, Nojima H. The *Mek1* phosphorylation cascade plays a role in meiotic

- recombination of *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Cycle*. 2010 Dec 1;9(23):4688-702. (査読有)
- ④ Okuzaki D, Fukushima T, Tougan T, Ishii T, Kobayashi S, Yoshizaki K, Akita T, Nojima H. Genopal™: a novel hollow fibre array for focused microarray analysis. *DNA Res*. 2010 Dec;17(6):369-79. (査読有)
- ⑤ Funato Y, Terabayashi T, Sakamoto R, Okuzaki D, Ichise H, Nojima H, Yoshida N, Miki H. Nucleoredoxin sustains Wnt/β-catenin signaling by retaining a pool of inactive dishevelled protein. *Curr Biol*. 2010 Nov 9;20(21):1945-52. (査読有)
- ⑥ Okuzaki D, Kasama T, Hirata A, Ohtaka A, Kakegawa R, Nojima H. Spo5 phosphorylation is essential for its own timely degradation and for successful meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Cycle*. 2010 Sep 15;9(18):3751-60.
- ⑦ Shigehisa A, Okuzaki D, Kasama T, Tohda H, Hirata A, Nojima H. Mug28, a meiosis-specific protein of *Schizosaccharomyces pombe*, regulates spore wall formation. *Mol Biol Cell*. 2010 Jun 15;21(12):1955-67. (査読有)
- ⑧ Iio K, Nagasawa Y, Iwatani H, Yamamoto R, Horii A, Okuzaki D, Furumatsu Y, Inohara H, Nojima H, Imai E, Isaka Y, Rakugi H. Microarray analysis of tonsils in immunoglobulin A nephropathy patients. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Mar 19;393(4):565-70. (査読有)
- ⑨ Tougan T, Okuzaki D, Nojima H. Chum-RNA allows preparation of a high-quality cDNA library from a single-cell quantity of mRNA without PCR amplification. *Nucleic Acids Res*. 2008 Sep;36(15):e92. (査読有)
- ⑩ Kobayashi S, Ito A, Okuzaki D, Onda H, Yabuta N, Nagamori I, Suzuki K, Hashimoto H, Nojima H. Expression profiling of PBMC-based diagnostic gene markers isolated from vasculitis patients. *DNA Res*. 2008 Aug;15(4):253-65. (査読有)
- ⑪ Ohtaka A, Okuzaki D, Nojima H. Mug27 is a meiosis-specific protein kinase that functions in fission yeast meiosis II and sporulation. *J Cell Sci*. 2008 May 1;121(Pt 9):1547-58. (査読有)
- ⑫ Tougan T, Onda H, Okuzaki D, Kobayashi S, Hashimoto H, Nojima H. Focused microarray analysis of peripheral mononuclear blood cells from Churg-Strauss syndrome patients. *DNA Res*. 2008 Apr 30;15(2):103-14. (査読有)
- ⑬ Yabuta N, Okada N, Ito A, Hosomi T, Nishihara S, Sasayama Y, Fujimori A, Okuzaki D, Zhao H, Ikawa M, Okabe M, Nojima H. Lats2 is an essential mitotic regulator required for the coordination of cell division. *J Biol Chem*. 2007 Jun 29;282(26):19259-71. (査読有)
- ⑭ Ohtaka A, Okuzaki D, Saito TT, Nojima H. Mcp4, a meiotic coiled-coil protein, plays a role in F-actin positioning during *Schizosaccharomyces pombe* meiosis. *Eukaryot Cell*. 2007 Jun;6(6):971-83. (査読有)
- ⑮ Ohtaka A, Saito TT, Okuzaki D, Nojima H. Meiosis specific coiled-coil proteins in *Shizosaccharomyces pombe*. *Cell Div*. 2007 May 18;2:14. (査読有)
- [学会発表] (計 1 1 件)
- ① 奥崎 大介、Spo5 phosphorylation is essential for its own timely degradation and for successful meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*、第 33 回日本分子生物学会大会、平

- 成 22 年 12 月 10 日、神戸ポートアイランド
- ② 奥崎 大介、A novel Diagnostic markers for Takayasu Arteritis obtained by Genopal™ focused microarray based on Spearman rank correlation、第 33 回日本分子生物学会大会、平成 22 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド
  - ③ 奥崎 大介、分裂酵母 RNA 結合タンパク質 Mug28 による配偶子形成の制御機構、第 43 回酵母遺伝学フォーラム研究報告会、平成 22 年 9 月 10 日、奈良
  - ④ 奥崎 大介、A novel Diagnostic markers for Takayasu Arteritis obtained by Genopal focused microarray based on Spearman rank correlation、第 10 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、平成 22 年 9 月 8 日、淡路夢舞台国際会議場
  - ⑤ 奥崎 大介、細胞生物学者の視点でみるマイクロアレイと次世代シーケンス、第 62 回日本細胞生物学会、平成 22 年 5 月 19 日、大阪国際会議場
  - ⑥ 奥崎 大介、MUG28, A MEIOSIS-SPECIFIC PROTEIN OF SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE, REGULATES SPORE WALL FORMATION、The 5th International Fission Yeast Meeting、平成 21 年 10 月 29 日、国立オリンピック記念青少年総合センター（東京都）
  - ⑦ 奥崎 大介、DETECT システムの開発、第 82 回生化学会 平成 21 年 10 月 21 日、神戸ポートアイランド（兵庫県）
  - ⑧ 奥崎 大介、Genopal™; a novel device for focused microarray equipped with hollow fiber array、第 9 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、平成 21 年 9 月 10 日、淡路夢舞台国際会議場（兵庫県）
  - ⑨ 奥崎 大介、Fission yeast Arp1 facilitates meiotic nuclear oscillation via Dhcl and Mcp5、

The 2008 Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting、平成 20 年 7 月 23 日、カナダ・トロント大学

- ⑩ 奥崎 大介、分裂酵母の減数分裂特異的カイネース:Mug27/Lts1 の機能解析、BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年会)、2007 年 12 月 12 日、パシフィコ横浜
- ⑪ 奥崎 大介、分裂酵母の減数分裂期特異的コイルドコイルタンパク質:Mcp4 の機能解析、第 40 回 酵母遺伝学フォーラム、2007 年 9 月 11~13 日、大阪大学コンベンションセンター

#### 〔産業財産権〕

##### ○出願状況（計 1 件）

名称：白血球タンパク質の回収方法および回収装置

発明者：野島博、藪田紀一、奥崎大介

権利者：大阪大学

種類：特許

番号：K2009-0042

出願年月日：平成 21 年 10 月 26 日

国内外の別：国内

##### ○取得状況（計 0 件）

#### 〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/lab/molgenet/>

[http://www.biken.osaka-u.ac.jp/DNA\\_chip/](http://www.biken.osaka-u.ac.jp/DNA_chip/)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

奥崎 大介 (OKUZAKI DAISUKE)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：00346131