

平成21年 5月 1日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19780076

研究課題名（和文） 減数分裂の進行に必須なクロマチン構造制御の分子機構解析

研究課題名（英文） Analysis of the essential role of chromatin remodeling factor in control of meiotic progression.

研究代表者

湯川 格史 (YUKAWA MASASHI)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・助教

研究者番号：50403605

研究成果の概要：

減数分裂におけるクロマチン制御とその役割について明らかにするため、出芽酵母の減数分裂に関してクロマチン制御因子の新たな生理機能および機能調節機構について調査した。その結果、ATP依存型クロマチン制御因子 RSC がクロマチン制御と共役的に mRNA の成熟化に関わる可能性や、ヒストン脱アセチル化酵素 Rpd3 複合体がその構成因子のリン酸化によって機能調節を受け、減数分裂の進行に必須な機能を果たしている可能性を見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	0	2,400,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：発生・分化、減数分裂、クロマチン

1. 研究開始当初の背景

真核細胞の遺伝情報を担う染色体 DNA はクロマチンと呼ばれるコンパクトに折り畳まれた構造で核内に存在している。生命システムは、この高次構造を適宜動的に再編すること(クロマチンリモデリング)によって、遺伝情報の転写・複製・修復・組換えといった諸反応を制御している。このようなクロマチンリモデリングに働く分子種として、ヒストン蛋白質のアセチル化/脱アセチル化のような化学修飾/脱修飾を行う酵素と ATP 依存的にクロマチン構造の再編を行うリモデリン

グ因子が存在し、これらの分子種は酵母からヒトに至るまで高度に保存されていることが明らかにされている。しかし、これらのクロマチンリモデリング因子の細胞核内における生理機能の詳細については不明な点が多く、とりわけ減数分裂過程におけるこれらの因子の役割についてはほとんど明らかにされていないのが現状であった。

減数分裂過程は遺伝的な子孫の多様性を生み出すための極めて重要な生命現象であり、環境変化への対応や進化に貢献していると考えられている。減数分裂の進行制御にお

いて未解明な部分が多いクロマチンレベルの制御機構に関する理解が深まることは、学術的に重要な意義をもつばかりでなく、不妊治療や農作物の育種といった医療や農業生産などへの応用にもつながることが期待されたため、本研究を開始するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、出芽酵母の分化過程として位置づけられる減数分裂過程の進行に必須な各事象について、クロマチン構造制御が果たす役割とその分子制御機構に関する知見を得るため、減数分裂の開始に必須な ATP 依存型クロマチンリモデリング因子 RSC が、既に判明している減数分裂初期遺伝子群の転写制御以外に新たにどのような生理機能を果たしているのか、また、第一減数分裂の進行に必須なヒストン脱アセチル化酵素 Rpd3 複合体が、この過程においてどのような機能調節を受けて働いているのか明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) RSC の減数分裂における機能解析

申請者らは、出芽酵母の生育に必須な ATP 依存型クロマチンリモデリング因子 RSC が、減数分裂の開始に必須な *IME2* 遺伝子をはじめとする初期遺伝子群の転写活性化に働くことを既に明らかにしている。しかし、RSC が、減数分裂初期以降のクロマチン構造制御を必要とする各生命現象に関与するかどうかについては不明であった。有糸分裂時において、RSC が染色体の分配、修復および接着に関与していることを考え合わせると、分配様式が類似している第二減数分裂時の染色体分配や減数分裂期組換えといった現象に関与している可能性が十分に考えられたため、以下に述べる方法により、RSC の減数分裂における新たな生理機能の解明を目指すことにした。

① 減数分裂における RSC の新たな作用点の同定

減数分裂過程の各生命現象は連続的に起こるため、減数分裂開始時に必須な働きを担う RSC の機能発現を開始時から抑制してしまうと後の事象に関与するかどうかを調べることが非常に困難になる。そこで、減数分裂の特定の時期に RSC の機能発現を速やかに抑制させるシステムを構築し、その際の表現型を解析することにより、RSC の減数分裂における新たな作用点の解明を試みることにした。

② 減数分裂において RSC と協調的に働く因子の同定

減数分裂過程において、RSC と遺伝学的に協調して働く因子を探索するため、以前に出芽酵母の系で開発された SGA 解析法

(Synthetic genetic array: Tong AH, *et al.*, *Science*, 2004) を応用して、RSC の欠損と合成的に孢子形成不能になる遺伝子破壊株の網羅的取得を試みることにした。原理は以下に記す通り。まず、出芽酵母において網羅的に作製された一倍体の非必須遺伝子破壊株ライブラリーと RSC の活性サブユニットをコードする *NPS1* 遺伝子の変異アリル *nps1-105* 変異を掛け合わせるによりヘテロタリックな二倍体株を作成する。次に、これらの二倍体株を減数分裂させて得られる一倍体から接合型の異なる二重変異株をそれぞれ選択的に取得する。この目的のため、異なる接合型 (*MATa* および *MATα*) の細胞においてそれぞれ特異的に発現する遺伝子のプロモーターを利用し、その下流に異なるマーカー遺伝子を連結した融合遺伝子 (*MFA1p::HIS3* および *MFA1p::URA3*) を構築して、これを親株である *nps1-105* 変異株に予め持たせておく。次に、生育可能な二重変異株について異なる接合型の一倍体同士を掛け合わせるにより、二重変異をホモにもつ二倍体株を網羅的に作成し、その孢子形成能を調べる。孢子形成不能な二重変異株のうち、以前の解析結果 (Rabitsch KP, *et al.*, *Curr Biol.*, 2001: Briza P, *et al.*, *Yeast*, 2002) により、*nps1-105* 変異株と掛け合わせた遺伝子の単独破壊株が孢子形成不能になるものを除き、*nps1-105* 変異と合成的に孢子形成不能になる変異株を取得する。

(2) 減数分裂における Rpd3 複合体の機能調節に関する解析

Rpd3 は栄養増殖時に L 型および S 型の二種類の複合体を形成して機能分化していることが明らかにされている。そこで、いずれの複合体が減数分裂の進行に必要であるかについて調べた。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果・インパクト

① 減数分裂過程の特定の時期に RSC の発現を速やかに抑制する手法について検討した。Nps1 に特異性の非常に高い *tobacco etch virus* (TEV) 由来プロテアーゼの認識部位を付加し、同時に TEV プロテアーゼをガラクトース誘導性の *GAL1* プロモーターによって発現させることにより、RSC の機能発現をガラクトース存在下で速やかに抑制することに成功した。次に、減数分裂初期で発現する *IME1* 遺伝子プロモーターおよび中期で発現する *NDT80* 遺伝子プロモーターを利用して TEV プロテアーゼの発現時期をコントロールすることにより、減数分裂初期および中期に RSC の機能発現を抑制しようとした。結果として、これらの遺伝子プロモーターからの TEV プロテアーゼの発現量では、RSC の発現

抑制に不十分であり、減数分裂時期特異的な機能発現の抑制には至らなかった。

② RSC 複合体の欠損と合成的胞子形成不能になる遺伝子破壊株の取得を試みるため、まず、スクリーニングに必要な *nps1-105* 変異株を持つ親株を作成した。この親株と遺伝子破壊株ライブラリーを網羅的に掛け合わせたヘテロ二倍体株を取得し、この二倍体株を胞子形成させた後、再び栄養増殖させることにより接合型の異なる一倍体二重変異株を網羅的に取得した。この際、取得した一倍体二重変異株の表現型が接合型間で異なる場合や、ヘテロ二倍体株の胞子形成を再試行して得られた一倍体二重変異株の表現型に再現性が認められない場合が高頻度で観察されたことから、二重変異をホモに持つ二倍体株の作成を中止した。その代わりとして、*nps1-105* 変異との合成的ハプロ不全により胞子形成不能となる株の取得を試みた。方法として、先に作成したヘテロ二倍体株について胞子形成させてから再び栄養増殖させても一倍体選択培地で生育が認められなかったグループから、過去の知見により、胞子形成への関与が示唆される遺伝子の破壊株を選抜した。次に、選抜したグループの中で、これらの遺伝子を単独でヘテロに破壊した二倍体株が胞子形成可能であり、さらに *nps1-105* 変異がヘテロに加わると合成的ハプロ不全により胞子形成能が著しく低下する株を選抜した。その結果、*hpr1* 破壊株の取得に成功した。*Hpr1* は転写伸長と mRNA の核外輸送を共役させる THO/TREX 複合体の構成因子で、体細胞分裂時の遺伝子組換えに働く。従って、RSC も減数分裂時にクロマチン制御と共役的に mRNA の成熟化に関わる可能性が示唆された。

③ L 型および S 型のいずれの Rpd3 複合体の機能が第一減数分裂の進行に必須であるかについて調べるため、L 型特異的な構成因子で、この複合体形成に必須な *SDS3* 遺伝子および S 型特異的な構成因子で、この複合体の機能に必須な *RCO1* 遺伝子をそれぞれ破壊したホモ二倍体株を構築して、その胞子形成率を測定した。結果として、*rco1* 破壊株の胞子形成率は野生株に比べてわずかにしか低下しないのに対し、*sds3* 破壊株の胞子形成率は著しく低下した(図 1)。従って、減数分裂において、L 型複合体の機能がより重要であることが明らかになった。しかし、驚くべきことに、*rdp3* 破壊株がほとんど胞子形成できないのに対して、*rco1sds3* 二重破壊株は胞子形成率は低下するものの、胞子形成可能であることがわかった(図 1)。従って、減数分裂において Rpd3 は L 型でも S 型でもない新たな複合体を形成しているか、あるいは単独でも機能している可能性が示唆された。これまで、Rpd3 複合体は L 型か S 型のいずれかの複合体を形成

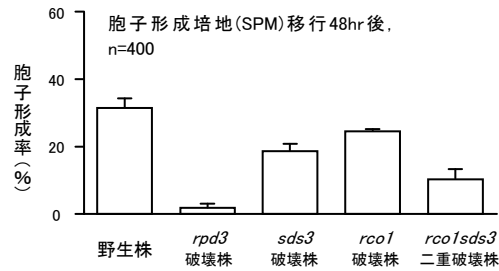


図1 Rpd3L型およびS型複合体欠損株の胞子形成率

して機能していると考えられていたことから、この可能性が実証されれば、そのインパクトは非常に大きいと考えられる。

次に、*Sds3* の減数分裂における発現について調べた結果、発現量の増減や Rpd3 との相互作用の変化は観察されなかったが、興味深い事に減数分裂初期にリン酸化修飾を受け、この修飾は中・後期まで続くことを見出した(図 2)。さらに、このリン酸化は GSK3 依存的

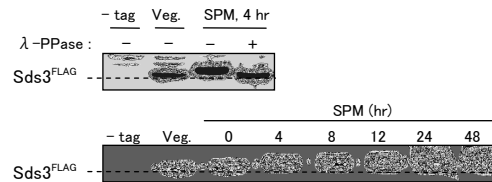


図2 減数分裂特異的なSds3のリン酸化制御

に起こることがわかった。従って、L 型複合体は *Sds3* のリン酸化を介して何らかの機能調節を受け、減数分裂の進行に必要な機能を果たしている可能性が考えられた。現在、非リン酸化型 *sds3* 変異株を作成し、その表現型について調べている。

(2) 今後の展望

本研究により、ATP 依存型クロマチン制御因子 RSC が減数分裂において mRNA の成熟化に関わる可能性や、ヒストン脱アセチル化酵素 Rpd3 複合体がその構成因子である *Sds3* のリン酸化によって減数分裂特異的な機能調節を受け、この過程の進行に必須な機能を果たしている可能性を新たに見出すことができた。今後、これらの可能性を実証していくことにより、減数分裂過程におけるクロマチンリモデリング因子の新たな生理機能やこの過程特異的な機能調節機構が明らかになり、減数分裂進行制御の理解が一層深まることが期待される。また、本研究で試みた減数分裂における時期特異的な RSC の発現抑制は、開発が実現できれば、他の遺伝子についても表現型解析を行う上で非常に有効な解析法になると考えられることから、今後、TEV プロテアーゼのコピー数を増やすなどして解析法の確立を目指したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① 湯川格史, 楊一幸, 長谷川裕章, 上野勝, 土屋英子, The Rpd3/HDAC complex is present at the URS1 *cis*-element with hyperacetylated histone H3., *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73巻, 378-384頁, 2009年, 査読有
- ② 湯川格史, ヒストン脱アセチル化酵素を介した転写タイミングの調節, *化学と生物*, 45巻, 446-448頁, 2007年, 査読無

[学会発表] (計7件)

- ① 湯川格史, 出芽酵母のヒストン脱アセチル化酵素複合体による新たな転写タイミング調節機構, 日本農芸化学会 2009年度大会, 2009年3月29日, 福岡市
- ② 湯川格史, 減数分裂における出芽酵母 Rpd3/HDAC 複合体の機能調節, 第26回染色体ワークショップ, 2009年1月27日, 姫路市
- ③ 湯川格史, ヒストン脱アセチル化酵素複合体 Rpd3L の機能発現における Sds3 の役割, 第31回日本分子生物学会年会, 2008年12月9日, 神戸市
- ④ 湯川格史, 出芽酵母の HAT・HDAC を介した転写切り替え機構の解析, 日本農芸化学会 2008年度大会, 2008年3月28日, 名古屋市
- ⑤ 湯川格史, ヒストン脱アセチル化酵素複合体による新たな転写タイミング調節, 第30回日本分子生物学会年会, 2007年12月12日, 横浜市
- ⑥ 湯川格史, 出芽酵母 *SRL1* 遺伝子の微小管動態制御における機能解析, 酵母遺伝学フォーラム第40回研究報告会, 2007年9月11日, 吹田市
- ⑦ 湯川格史, Regulation of the transcriptional activation of the *IME2* gene., 第23回Yeast Genetics and Molecular Biology 国際会議, 2007年7月3日, オーストラリア連邦メルボルン市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

湯川 格史 (YUKAWA MASASHI)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・助教
研究者番号: 50403605

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者