

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570178

研究課題名 (和文) 分裂酵母の減数分裂を制御する RNA 結合タンパク質の機能解析

研究課題名 (英文) Analysis of RNA-binding proteins that regulate meiotic cell cycle in fission yeast

研究代表者

山下 朗 (YAMASHITA AKIRA)

東京大学・大学院理学系研究科・講師

研究者番号：30312276

研究成果の概要 (和文)：分裂酵母の減数分裂の開始と進行の鍵を握る二つの RNA 結合タンパク質 Mei2p と Mmi1p の解析を行い、RNA ポリメラーゼ II のリン酸化制御が Mei2p の発現において重要な役割を持つことを見出した。また、減数分裂特異的な転写産物の分解を誘導する Mmi1p と協調して働く因子を同定し、Mmi1p による RNA 分解誘導にポリ A 鎖の付加が必要であることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：The aim of this study is to elucidate the function of RNA-binding proteins, Mei2p and Mmi1p, that regulate meiotic cell cycle in fission yeast. It turned out that phosphorylation of RNA polymerase II is crucial for the expression of Mei2p. It has been also proved that polyadenylation of meiotic mRNAs is essential for the selective elimination induced by Mmi1p.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2008 年度 | 1,400,000 | 420,000   | 1,820,000 |
| 2009 年度 | 1,300,000 | 390,000   | 1,690,000 |
| 2010 年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 総計      | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞周期・減数分裂・発現制御

## 1. 研究開始当初の背景

分裂酵母の Mei2p は、減数分裂の開始と進行に必須の役割を果たす RNA 結合タンパク質である。Mei2p が活性化しさえすれば、分裂酵母は体細胞分裂を停止し、減数分裂期へと移行してしまう。これまでの解析によって、Mei2p が減数分裂を誘導した後、もう一つの RNA 結合タンパク質 Mmi1p を阻害すること

で、減数分裂を進行させていることを示してきた。また Mmi1p が、減数分裂期特異的に発現する一群の mRNA に存在する DSR (Determinant of Selective Removal) と名づけた領域に結合し、それら mRNA の分解を誘導する因子であることを示してきた。さらに、Mmi1p が誘導する mRNA 分解に RNA 分解複合体 exosome の核特異的サブユニット

ト Rrp6p が関与していることも明らかとなっていた。しかし、Mei2p が減数分裂を誘導する機構、Mmilp が標的 mRNA を認識して、それらの分解を誘導する機構の詳細は不明であった。

## 2. 研究の目的

(1) 分裂酵母の RNA 結合タンパク質 Mei2p は、体細胞分裂と減数分裂を切り換えるスイッチとしての活性を有している。Mei2p が減数分裂を誘導する活性の実体を明らかにすることで、分裂酵母の減数分裂開始を制御する分子機構を解明する。

(2) RNA タンパク質 Mmilp は体細胞分裂期に、一群の減数分裂特異的 mRNA の DSR 領域に結合し、mRNA 分解を誘導する因子である。Mmilp が誘導する減数分裂特異的 mRNA の分解の詳細を明らかにし、減数分裂特異的な遺伝子発現パターン形成機構に迫る。また Mmilp が認識する DSR 配列の実体を明らかにし、新規減数分裂関連遺伝子の同定、解析につなげる。

## 3. 研究の方法

分裂酵母の古典的な遺伝学的手法に、分子遺伝学的手法や生化学的、分子生物学的、細胞生物学的手法を組合せ、解析を進める。

(1) Mei2 と遺伝学的、あるいは物理的に相互作用する因子の探索、解析を行う。

(2) これまでに取得した Mmilp と関連することが示唆されている因子の解析を行う。Mmilp との相互作用、mRNA 分解への寄与を検討する。

## 4. 研究成果

(1) Mei2p が減数分裂を誘導する機構を解き明かすため、活性化型 Mei2p が誘導する致死的な減数分裂を抑制する変異体の単離と解析を行った。その結果、新規の Mei2p 発現制御系が明らかとなった。Mei2p は、体細胞分裂期には、リン酸化により不活性化されることが報告されている。このリン酸化部位をアラニンに置換した活性化型変異と Mei2p の温度感受性変異を組合せ、高温では Mei2p が失活しており増殖可能であるが、低温では Mei2p が活性化して減数分裂が始まってしまう、増殖不能となる変異株を作製した。この株にランダムに変異を導入し、低温で増殖可能となる抑制変異体を単離し、解析を行った。得られた変異体の原因遺伝子には、Mei2p の発現制御に関わるものと、Mei2p の下流で働くものが含まれると期待される。抑制変異の原因遺伝子を決定したところ、一つの原因遺伝子が、RNA polymerase II の C 末端領域

(CTD) の 7 アミノ酸からなる繰り返し配列中の 2 番目のセリン残基をリン酸化する複合体 CTDK-I のガンマサブユニットをコードする遺伝子であることが明らかとなった。この遺伝子を *lsk1* と名づけ、解析を続けた。CTDK-I の他のサブユニットをコードする *lsk1*、*lsc1* 両遺伝子を破壊すると、*lsg1* 遺伝子を破壊した場合と同様に、Mei2p の活性化型変異を抑制できることが明らかとなった。*lsg1* 遺伝子破壊株を用いてマイクロアレイ解析を行った結果、*lsg1* 破壊株では Mei2p の転写を制御する転写因子 Ste11p の発現が大幅に低下していることが分かった。Ste11p は、Mei2p のみならず、減数分裂に先立つ接合過程に必須の因子群の転写誘導を行っているが、CTDK-I 各サブユニットをコードする遺伝子の破壊株では接合率の低下が見られた。また、CTDK-I 破壊株での接合率の低下は、Ste11p の過剰発現により抑制されることが明らかとなった。これらの結果から、CTDK-I による RNA polymerase II の C 末端領域のリン酸化によって Ste11p の転写が促進され、*mei2* 遺伝子の転写が誘導されるというモデルを提唱した (図 1)。

*lsg1* 遺伝子以外にも、活性化型 Mei2p の抑制因子が複数単離されている。それら変異体の中には、Mei2p の発現には影響はみられず、Mei2p の下流で働いている因子の変異体であることが期待されるものも存在していた。現在 *lsg1* 以外の変異体についても解析を継続して行っている。

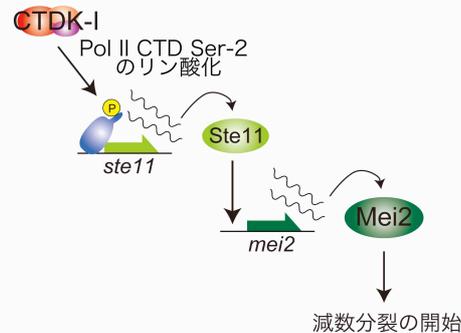


図 1. CTDK-I による Mei2p の発現制御系

(2) Mmilp が減数分裂特異的 mRNA の分解を誘導する機構を明らかにするため、分解の担い手であることが示唆されていた RNA 分解複合体 exosome の核特異的サブユニット Rrp6p と Mmilp の関係を検討した。分裂酵母抽出液を用いた免疫沈降実験によって、

Mmi1p と Rrp6p が分裂酵母内で相互作用していることを示した。また、*rrp6* 変異体では Mmi1p 依存的な mRNA 分解が起きず、体細胞分裂期に Mmi1p の標的 mRNA が検出されることが明らかとなった。これらの事実から Rrp6p が、Mmi1p が誘導する mRNA 分解の担い手であることが強く示唆される。

遺伝学的スクリーニングと two-hybrid スクリーニングにより Mmi1p 関連因子を探索したところ、Rrp6p に加えて、poly(A) ポリメラーゼ Pla1p、poly(A) 結合タンパク質 Pab2p や mRNA の 3' 末端成熟因子 Rna15p が得られた。これらの変異体を作製したところ、*rrp6* 変異体と同様に、体細胞分裂期に Mmi1p の標的となる減数分裂特異的 mRNA が検出された。また、これら因子と Mmi1p が相互作用していることが免疫沈降実験により確認された。さらに Rrp6p を含めたこれらの因子が、体細胞分裂期に Mmi1p と同じ核内ドット構造に局在することが明らかとなった。

Mmi1p が誘導する mRNA 分解に関わる因子として、mRNA の 3' 末端、特に poly(A) 鎖に関連したものが複数得られたので、mRNA 分解と poly(A) 鎖の関連を検討した。Mmi1p が認識する DSR 配列を持たせたレポーター遺伝子の下流に snRNA 遺伝子のターミネーター領域をつないだコンストラクトを作製した。snRNA 遺伝子のターミネーターでは、転写後、特殊なステムループ構造が形成され、トリミングが行われ、poly(A) 鎖の付加は行われない。このよなレポーターコンストラクトでは、コントロールの通常の mRNA 型のターミネーターを用いた場合と異なり、Mmi1p 依存的な mRNA 分解が起きないことが明らかとなった。このコンストラクト中に poly(A) 配列を挿入すると、分解誘導が起き、さらに *pab2* 遺伝子を破壊すると分解が起きなくなったことから、Mmi1p 依存的な mRNA 分解には、標的 mRNA に poly(A) 鎖が付加され、そこに poly(A) 結合タンパク質 Pab2p が結合することが必要であると結論づけた(図 2)。

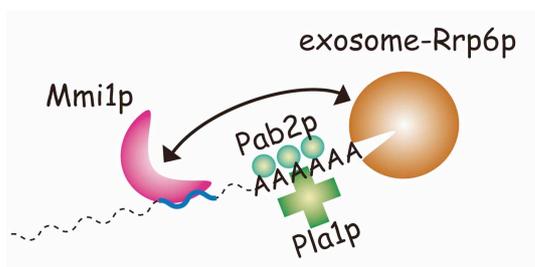


図 2. Mmi1p による減数分裂特異的 mRNA の分解誘導

Mmi1p が認識する RNA 配列を、既知の標的 mRNA に存在する DSR 配列を用いた配列抽出により特定した。特定した 6 ベースからなる配列モチーフ (DSR core motif) が実際に、Mmi1p によって、*in vitro*、*in vivo* で認識されることを確認した。この配列を利用して、新規の Mmi1p の標的遺伝子を複数同定した。また、機能未知の Mmi1p の標的遺伝子の解析を行い、減数分裂前期での染色体対合を促進する核の往復運動に必須のダイニンのサブユニットをコードしていることを明らかにした。

## 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 Yamanaka, S., Yamashita, A., Harigaya, Y., Iwata, R. and Yamamoto, M. (2010) Importance of polyadenylation in the selective elimination of meiotic mRNAs in growing *S. pombe* cells. *EMBO J.* 29, 2173-2181. (査読有り)

② Fujita, I., Yamashita, A. and Yamoto, M. (2010) Contribution of dynein light intermediate and intermediate chains to subcellular localization of the dynein-dynactin motor complex in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes to Cells* 15, 359-372. (査読有り)

[学会発表] (計 7 件)

① 山下朗 「分裂酵母の減数分裂特異的 mRNA の選択的除去機構」第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 10 日、神戸ポートアイランド(兵庫)

② 山下朗 「分裂酵母の減数分裂特異的 mRNA の除去機構」第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 12 日、パシフィコ横浜(神奈川県)

③ Akira Yamashita “Molecular basis to eliminate meiotic transcripts from mitotic cells by an RNA-binding protein Mmi1p” The fifth international fission yeast meeting, 2009 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)

④ Akira Yamashita “In vivo analysis of cytoplasmic dynein-dynactin complex in fission yeast” Cytokinesis: dynamics of the contractile ring, 2009 年 6 月 6 日、学習院大学(東京)

⑤ 山下朗 「分裂酵母の減数分裂特異的 mRNA

の除去機構」第31回日本分子生物学会年会、  
2008年12月11日、神戸ポートアイランド(兵庫  
庫)

⑥ Akira Yamashita “Analysis of meiotic  
mRNA removal induced by RNA-binding  
protein Mmilp” Asia-Pacific regional S.  
pombe meeting, 2008年7月26日, Genome  
Institute of Singapore (Singapore)

⑦ 山下朗 「分裂酵母の減数分裂を制御する  
RNA結合タンパク質」第18回酵母合同シンポ  
ジウム、2008年6月5日、甲南大学(兵庫)

[図書] (計2件)

① 山下朗 「分裂酵母における減数分裂開始  
の分子機構」(2010) 細胞周期フロンティア  
(共立出版)、138-144

② 山下朗、山本正幸 「分裂酵母の減数分裂  
制御機構」(2008) 細胞工学(秀潤社)、27、  
486-490

[その他]

ホームページ等

<http://www.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/yamamoto-lab/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山下 朗 (YAMASHITA AKIRA)

東京大学・大学院理学系研究科・講師

研究者番号：30312276