

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06500

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

研究課題名(英文) Functional analysis of the RNA-binding protein that regulates the initiation of meiosis.

研究代表者

山下 朗 (Yamashita, Akira)

基礎生物学研究所・分野横断研究ユニット・准教授(兼任)

研究者番号：30312276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、有性生殖に欠かせない特殊な細胞分裂である減数分裂の開始を制御する分子機構を、分裂酵母*S. pombe*を用いて明らかにすることを目標とする。分裂酵母は、栄養源が枯渇すると無性的な増殖である栄養増殖を停止し、有性生殖過程へと移行して減数分裂を行う。本研究では、外界の栄養状態が細胞内でTORキナーゼを介して伝達され、最終的にRNA結合タンパク質Mei2が活性化して減数分裂が誘導されるまでの詳細を明らかにすることを旨とした。遺伝学的スクリーニングを行い、TORとMei2に関連した新規因子を複数単離し、減数分裂開始に翻訳制御やクロマチン構造変化が重要な働きをしていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生殖細胞は、減数分裂を経て体細胞から生み出されるが、減数分裂の開始は厳密な制御下であり、通常体細胞で減数分裂が誤って開始されることはない。減数分裂の遺伝子の発現も体細胞では厳格に抑制されている。減数分裂遺伝子が異所的に体細胞で発現することが疾患につながる可能性も指摘されており、減数分裂遺伝子の発現を含めた減数分裂開始制御の詳細を明らかにする意義は大きい。本研究は、減数分裂を簡便に誘導することができ、遺伝学的なアプローチによる新規因子の単離が可能な酵母を用いて、未だ謎の多い減数分裂開始制御に迫るものである。酵母で得られた情報を基にすることでより複雑なシステムの制御系の理解が進むと期待される。

研究成果の概要(英文)：Meiosis is a special type of cell division that is essential for sexual reproduction. It remains unclear how the initiation of meiosis is regulated. The aim of this study is to elucidate the molecular mechanisms that control the initiation of meiosis using the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Fission yeast cells enter sexual differentiation and undergo meiosis when starved of nutrients. A conserved protein kinase complex, TORC1, and an RNA-binding protein, Mei2, play crucial roles in meiosis initiation. However, their mode of action is still not fully understood. Here, I identified and characterized novel factors related to TORC1 and Mei2, and showed that translational regulation and chromatin modification are critical for meiosis initiation.

研究分野：分子生物学

キーワード：減数分裂 有性生殖 分裂酵母

1. 研究開始当初の背景

減数分裂は、半数体である生殖細胞を作る際に行われる特殊な細胞分裂であり、有性生殖に欠かせないプロセスである。減数分裂を始める条件は、ホルモンや栄養状態など生物種によって異なっているが、いずれにおいても減数分裂の開始は厳密な制御下にある。減数分裂に関連する遺伝子を異所的に体細胞で発現することで、染色体分配異常や腫瘍形成が誘導されることがモデル生物を用いた解析から示されており、減数分裂開始の厳格な制御の重要性が浮かび上がってきていた。しかし、その重要性にも関わらず、生物種ごとの多様性に加えて、実験系の複雑さもあり、減数分裂開始の制御系には、不明な点が多く残されていた。そこで本研究では、減数分裂を人為的に誘導することができ、研究代表者が長年減数分裂制御系の解析に用いてきた分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* をモデル系として、謎に包まれた減数分裂開始の制御機構の全貌を明らかにすることを目指した。

分裂酵母は通常一倍体で体細胞分裂を行って無性的に増殖するが、栄養源が枯渇すると接合による二倍体化、減数分裂、胞子形成と続く有性生殖過程へと移行する(図1)。分裂酵母は、栄養源の枯渇と細胞の二倍体性という二つの条件が満たされた場合に減数分裂を開始するが、その制御系の中心に位置するのが RNA 結合タンパク質 Mei2 である。Mei2 はリン酸化によって不活化されるが、非リン酸化型の Mei2、すなわち活性化型の Mei2 を発現するだけで、分裂酵母は倍数性や栄養条件に関わらず体細胞分裂を停止して減数分裂を開始してしまう。このことから、Mei2 が分裂酵母の減数分裂開始のスイッチ分子として働いていることが分かる。代表者らの解析から Mei2 が、非コード RNA である meiRNA と協調して減数分裂に欠かせない遺伝子群の発現を制御していることや、ストレス応答 MAP キナーゼ経路を活性化することなどが明らかとなっていた。しかし、これらだけでは Mei2 の減数分裂誘導活性を説明することはできず、その強力さにも関わらず、Mei2 が減数分裂を誘導する際の役割についてはなんら情報が得られていない状況にあった。また、栄養源の枯渇から Mei2 の活性化に至る経路についても、真核生物全般に保存された TOR キナーゼが果たす不可欠な役割などが分かっているが、多くの謎が残されていた。

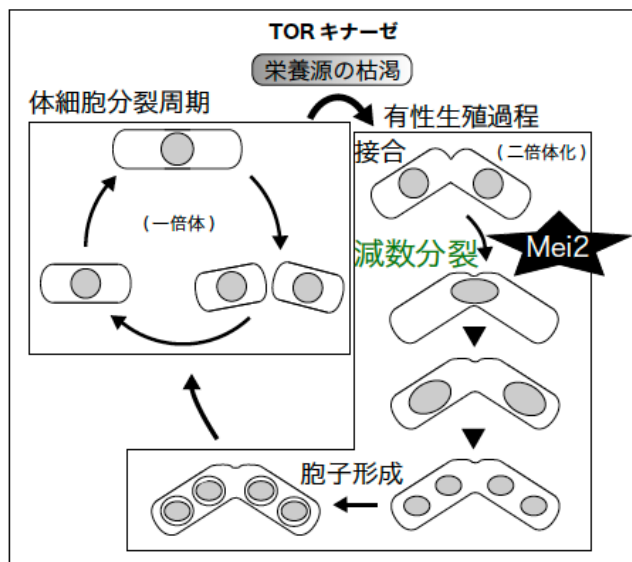


図1. 分裂酵母は栄養源枯渇により有性生殖へと移行する

2. 研究の目的

本研究は、未だ謎の多い減数分裂開始を制御する分子機構をモデル生物分裂酵母 *S. pombe* を用いて解き明かすことを目標とするものである。減数分裂を制御する仕組みを理解することは、不妊や生殖細胞の異常に起因する疾患に対処する上で基盤となる情報を得ることにつながる。しかし、減数分裂の制御系については、体細胞分裂ほどには解析が進んでいない状況にある。

本研究では、分裂酵母細胞が栄養源の有無を感知し、TOR キナーゼ経路を介して細胞内で情報を伝達し、スイッチ分子 Mei2 を活性化して減数分裂を開始するまでの仕組みの解明に取り組んだ。分裂酵母においては、減数分裂開始の引き金が栄養源の枯渇であることから、本研究により、全ての細胞に備わる最も基本的かつ必須の制御系である栄養源認識機構の理解が進むことも期待される。

3. 研究の方法

RNA 結合タンパク質 Mei2 を中心とする分裂酵母の減数分裂開始の制御機構を解き明かすため、Mei2 の上流、下流について、複数の手法で並行して解析を進め、得られる情報を統合することで、分裂酵母の減数分裂開始の制御系の全貌解明を目指した。Mei2 の新規結合 RNA の特定と遺伝学的スクリーニングによる新規 Mei2 関連因子、TOR 関連因子の探索を行った。

4. 研究成果

Mei2 の減数分裂誘導活性の実態を明らかにするため、Mei2 の新規結合 RNA の探索を行った。既知の Mei2 結合 RNA である非コード RNA 分子 meiRNA をコードする遺伝子を欠失させた株で減数分裂を誘導した後に、Mei2 を精製して結合してくる RNA を次世代シーケンスにより特定した。

候補となる RNA 群が得られてきたので、現在それらの働きについて、Mei2 の減数分裂誘導活性との関係に注目しながら解析を進めている。

Mei2 は減数分裂開始を誘導することに加えて、減数分裂開始後も必須の機能を果たしていることが分かっていた。そこで、複数の変異を組み合わせることで Mei2 の減数分裂開始機能に特に強い欠損を示す株の作製を行った。減数分裂不能の表現型を示すこの変異株の抑圧変異の単離を行い、Mei2 の減数分裂開始活性に関わる新規因子の探索を進めた。スクリーニングから、クロマチン構造を制御する因子や TOR キナーゼに関連した因子などが得られてきた。現在、それらが減数分裂開始制御において果たす役割について解析を進めている。

栄養源認識から Mei2 の活性化に至る経路の解析については、栄養状態に応答した TOR キナーゼの活性調節に tRNA の前駆体に関わっていることを見出していた。データベースサーチなどを行い、tRNA 前駆体と TOR キナーゼをつなぐ因子の候補を得た。この因子の遺伝子破壊株や過剰発現株を作製し、この因子が TOR キナーゼの活性調節に関わることを示した。また、栄養源の枯渇に応答して有性生殖、減数分裂が始まる仕組みを 1 細胞レベルで解析するために、TOR キナーゼの活性変化を顕微鏡下で生細胞観察できるバイオセンサーの開発を進めている。

TOR キナーゼによる栄養源認識機構の詳細を明らかにするため、TOR キナーゼの変異の高温での増殖不能の表現型を抑圧する変異体の探索を行った。複数の抑圧変異体を単離し、変異の原因遺伝子の特定を進めた。その結果、翻訳制御関連の因子の変異が TOR キナーゼ変異の高温感受性を抑圧することが分かり、栄養状態に応じた生殖モードの切り換えにおいて翻訳制御が重要な役割を果たしている可能性が浮かび上がってきた。現在、詳細な解析を進めている。

分裂酵母は各種栄養源のうち窒素源の枯渇により有性生殖過程へと移行し、減数分裂を行う。窒素源以外の栄養源と有性生殖、減数分裂の関係について解析を行った。その結果、硫黄飢餓によって窒素源飢餓と同様に TOR キナーゼ活性が低下することが分かった。しかしながら、細胞周期の G1 期停止と有性生殖への移行を誘導する窒素源飢餓とは異なり、硫黄飢餓では G2 期停止が起きて、有性生殖への移行は起きないことが分かった。また、リン酸飢餓によって、TOR キナーゼの活性低下、G1 期停止、有性生殖への移行が誘導されることが分かった。TOR キナーゼの変異体で TOR キナーゼ活性を低下させると G1 期停止、有性生殖への移行が誘導される一方で、各栄養源の枯渇により TOR キナーゼの活性低下が起きた後の反応に違いが生じるという結果は、細胞の栄養応答と有性生殖開始の両方の観点から興味深いものであり、今後その詳細を明らかにしていく必要がある。

Mei2 は減数分裂開始を誘導した後に、減数分裂特異的に機能する遺伝子群の発現を誘導することが分かっていた。減数分裂の特異性が生み出させる仕組みを明らかにするため、Mei2 によって発現制御を受ける減数分裂遺伝子について機能解析を行った。それら減数分裂遺伝子群には、減数分裂前期に見られ、減数分裂の進行に欠かせない相同染色体の対合を促進する特徴的な核の往復運動の駆動力を生み出す細胞質ダイニンやその関連因子が含まれていた。蛍光タンパク質を用いた生細胞観察と *in silico* でのシミュレーションモデルを利用した解析を行い、核の往復運動が生み出される仕組みを明らかにし、報告した。減数分裂前期の核の往復運動は細胞表層に局在する細胞質ダイニンが核につながった微小管を引っ張ることで誘導されることがすでに示されていたが、微小管を引く力に加えて、微小管が細胞表層を押し出す力が往復運動に大きく寄与していることが明らかとなった。さらに、往復運動が、細胞長と核のサイズに依存していることが示された。また、キネシン Klp6 による細胞表層での微小管脱重合が核の往復運動を成立させる上で不可欠な役割を果たしていることが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ohtsuka Hokuto, Kobayashi Mikuto, Shimasaki Takafumi, Sato Teppei, Akanuma Genki, Kitaura Yasuyuki, Otsubo Yoko, Yamashita Akira, Aiba Hirofumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Magnesium depletion extends fission yeast lifespan via general amino acid control activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 MicrobiologyOpen	6. 最初と最後の頁 e1176
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mbo3.1176	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ohtsuka Hokuto, Hatta Yoshiko, Hayashi Kana, Shimasaki Takafumi, Otsubo Yoko, Ito Yurika, Tsutsui Yu, Hattori Nobutake, Yamashita Akira, Murakami Hiroshi, Aiba Hirofumi	4. 巻 1
2. 論文標題 Cdc13 (cyclin B) is degraded by autophagy under sulfur depletion in fission yeast	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Autophagy Reports	6. 最初と最後の頁 51～64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/27694127.2022.2047442	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yoshimura Shinji, Otsubo Yoko, Yamashita Akira, Ishikawa Kenji	4. 巻 60
2. 論文標題 Insights into normothermic treatment with direct irradiation of atmospheric pressure plasma for biological applications	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 10502
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.35848/1347-4065/abcbd2	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 Otsubo Yoko, Kamada Yoshiaki, Yamashita Akira	4. 巻 11
2. 論文標題 Novel Links between TORC1 and Traditional Non-Coding RNA, tRNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 956
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes11090956	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fujita Ikumi, Kimura Akatsuki, Yamashita Akira	4. 巻 24
2. 論文標題 A force balance model for a cell size dependent meiotic nuclear oscillation in fission yeast	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e44867
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202255770	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohtsuka Hokuto, Sakata Hiroki, Kitazaki Yuto, Tada Masanobu, Shimasaki Takafumi, Otsubo Yoko, Maekawa Yasukichi, Kobayashi Mikuto, Imada Kazuki, Yamashita Akira, Aiba Hirofumi	4. 巻 136
2. 論文標題 The ecl family gene ecl3+ is induced by phosphate starvation and contributes to sexual differentiation in fission yeast	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs260759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.260759	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山下朗
2. 発表標題 分裂酵母のTORC1 biosensorの開発
3. 学会等名 第 11 回 TOR 研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下朗
2. 発表標題 分裂酵母のTORキナーゼ複合体による生殖モードの切り替え制御機構
3. 学会等名 酵母研究会第90回講演会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------