

機関番号：82508

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2009～2013

課題番号：21227007

研究課題名(和文) 分裂酵母における減数分裂の制御機構

研究課題名(英文) Regulatory Mechanisms of Meiosis in Fission Yeast

研究代表者

山本 正幸 (Yamamoto, Masayuki)

公益財団法人かずさDNA研究所・その他部局等・特別客員研究員

研究者番号：40114706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 162,500,000円、(間接経費) 48,750,000円

研究成果の概要(和文)：分裂酵母を用いて減数分裂を制御する分子機構を調べた。減数分裂に必要な一群のmRNAは栄養増殖時の細胞では「選択的除去」とよぶRNA分解を受ける。この機構を解析し、関係する諸分子を明らかにした。中心因子であるMmi1タンパク質は、標的mRNA上の特定の6塩基配列を認識し結合した。減数分裂時にMmi1を不活化させるmeiRNAにはこの6塩基配列が多数存在し、Mmi1をおびき寄せていた。また、RNA polymerase II のC末端領域のSer-2のリン酸化が減数分裂開始に必要な特定遺伝子の転写に不可欠なこと、ストレスに応答するMAPキナーゼ経路がそこ介在することを解明した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the regulatory mechanisms of meiosis in fission yeast. Certain mRNAs required for meiosis are transcribed but undergo degradation called "selective elimination" in vegetatively growing cells. We analyzed this mechanism and identified a number of molecules involved. A pivotal factor Mmi1 protein recognized and bound to specific hexanucleotide motifs on the target mRNAs. meiRNA, which inactivates Mmi1 to promote meiosis, carried numerous copies of the hexanucleotide motifs and lured Mmi1. Meanwhile, we found that phosphorylation of Ser-2 residues on the C-terminal domain (CTD) of RNA polymerase II was essential to transcribe a specific gene required for the initiation of meiosis, and that the stress-responsive MAP kinase pathway was involved in this regulation.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：遺伝学 発生・分化 減数分裂 情報伝達 RNA 微小管

## 1. 研究開始当初の背景

減数分裂は、生殖細胞を生み出すための特殊化した細胞分裂様式で、染色体数を半減させ、また染色体間で遺伝情報の組換えを可能にする、有性生殖にとって不可欠の過程である。本研究開始時には、研究代表者らによる分裂酵母を対象とする解析で、減数分裂の制御機構について次のような知見が明らかにされていた。(1)「選択的除去」と呼ぶ、減数分裂のための mRNA を体細胞分裂期に特異的に分解する機構の発見、(2) 減数第二分裂に必要とされる *Mes1* タンパク質が、サイクリンの分解を抑制する因子であることの解明、(3) TOR キナーゼ複合体 TORC1 と TORC2 のサブユニット構成の同定と、それらが有性生殖に対して抑制と促進の対照的な働きをすることの解明。これらを発展させる形で本研究が企画された。

## 2. 研究の目的

多様で複雑な生命世界を生み出す原動力となった有性生殖の分子機構を知ることは、生命の歴史を知るうえでも、生殖細胞の疾患に対処するためにも重要である。減数分裂は、配偶子形成時に染色体数を半減させ、また相同染色体間に遺伝情報の交換をもたらす重要な過程である。進化に寄与したことに加え、減数分裂には未解明の分子機構が多々含まれている。本研究では、減数分裂研究の最先端の材料ともなっている分裂酵母を主要な対象とし、次の3点を中心に、減数分裂制御の基本メカニズムを明らかにしようとした。(1) 減数分裂における新たな制御機構である、減数分裂のための mRNA を体細胞周期において特異的に分解する「選択的除去」の分子機構の詳細の解明。(2) 減数分裂のマスター制御因子 *Mei2* タンパク質が果たす、選択的除去の抑止以外の分子機能の追究。(3) 分裂酵母 TOR キナーゼが減数分裂の誘導において果たす役割の解明。

## 3. 研究の方法

(1) mRNA の選択的除去に関わる分子機構の解明：減数分裂に特異的に機能する一群の遺伝子の mRNA は DSR と呼ぶ領域を含んでおり、その作用により栄養増殖時には選択的に除かれる。DSR に結合するタンパク質 *Mmi1p* がこの選択的除去に不可欠の役割を果たしている。以下の項目により *Mmi1p* が DSR を認識して mRNA を体細胞分裂期の細胞から除去する分子メカニズムを調べた。

DSR 配列を詳しく比較検討し、機能領域の限定を進めて DSR の基本的要素を明らかにする。

最終的に mRNA の分解を担当するのは exosome であることが示唆されていた。また壊される mRNA はポリ A 付加を受ける必要が示唆されていた。ポリ A 付加を進める因子や、ポリ A 結合タンパク質などがどのように *Mmi1p* と協調して mRNA の分解を導くかを

追究した。

(2) 減数分裂のマスター制御因子 *Mei2* タンパク質の分子機能：上述の選択的除去に関わる *Mmi1p* の機能を抑えることが減数分裂制御因子 *Mei2p* の重要な分子機能であると明らかとなった。しかし、状況証拠からは、*Mei2p* は *Mmi1p* を抑制する以外の機能を併せもつと推定された。以下の項目によりこの機能を探った。

減数分裂前 DNA 合成に必要な *Mei2p* の機能の欠損を補う抑圧遺伝子の取得を遺伝学的に進める。

*Mei2p* 機能が RNA ポリメラーゼ II の修飾状態と関係する可能性が示唆されており、これを追究する。

*Mei2p* は *meiRNA* と結合して染色体上に点状構造を形成し、そこに *Mmi1p* を引きつけて機能を抑える。この RNA-タンパク質複合体が染色体上の一点に留まることができ分子基盤を探る。

(3) 分裂酵母 TOR 経路と減数分裂制御の関わり：有性生殖に対して抑制的に作用している TOR キナーゼ複合体 TORC1 に着目し、以下のようにその制御経路を探った。

TORC1 経路と *Mei2p* との相互作用の生理的意義を解明する。

分裂酵母の *Rhb1p* (RHEB ホモログ) と TORC1 経路との関係を究明する。

(4) 上記3課題と関連した、減数分裂の進行に関わる因子の解析：主として次の2項目につき解析を進めた。

減数分裂前期に見られる核の周期的往復運動を成立させている分子メカニズム。

減数分裂前期の核における染色体の動態と微小管との関わり。

## 4. 研究成果

研究の目的に述べた3項目について得られた成果と、研究の進展の中で得られた予せぬ研究成果を以下にまとめる。

(1)「選択的除去」RNA 分解機構については、ヌクレアーゼ複合体 exosome が中心的な分解マシナリーであり、標的の mRNA はその3'末端にポリ A 配列が付加される必要があることを予備的に見いだしていた。解析を進めて、選択的除去に必要なポリ A 付加を行うのは、一般の mRNA にポリ A をつける酵素であって、RNA 分解誘導に特化したポリ A 付加複合体として知られる TRAMP 複合体ではないことを明らかにした。また付加されたポリ A 鎖にはポリ A 結合タンパク質 *Pab2* が結合し、選択的除去の引き金因子 *Mmi1* タンパク質と協同して exosome を呼び込むと考えられること、*Mmi1* 複合体には *Iss10* と名付けた新たな構成因子が含まれることなど、選択的除去の分子機構の詳細を明らかにした。

一方、除去の標的となる減数分裂特異的 mRNA には DSR と命名した領域が含まれ、*Mmi1* がそこに結合することを先に明らかにしていた。しかし、DSR 配列にはほとんど共

通性が見いだされず、どのような性質が DSR を規定しているのかは不明であった。本研究で、DSR の基礎となるのは Mmi1 に親和性のある 4 種の 6 塩基の配列で、それらが複数寄り集まることで強い DSR 活性が生じてくることを明らかにした。

上記の発見はさらに興味深い事実を明らかにした。Mei2 タンパク質と結合して核内ドット構造を作り、Mmi1 タンパク質を不活性化する役割をもつ meiRNA は、当初長さが 500b 程度と考えられていたが、実はより長い 3' テイル部分をもつ 1.5kb ほどの分子種が存在し、このテイル部分に上述の 6 塩基の配列が多数含まれていることが明らかとなった。この部分は実際、Mmi1 に依存した分解を受けている。すなわち、meiRNA の 3' テイル部分は Mmi1 タンパク質をおびきよせる疑似餌の役割を果たしているという興味深い機構が浮かび上がってきた。また、Mei2-meiRNA 複合体を染色体に繋ぎ留めてドット構造にさせる主因子は meiRNA であり、その際 Mmi1 の関与が必要であることも分かった。

(2) Mei2 タンパク質が果たしている減数分裂開始機構における新奇の役割の探求では、Mei2 活性に影響を与える新たな因子の遺伝学的スクリーニングを行った。その結果、RNA polymerase II の C-terminal domain (pol II CTD) にある 7 アミノ酸残基リピート中の Ser-2 をリン酸化するキナーゼ CTDK-I が同定された。Mei2 と CTDK-I の関係を分析したところ、mei2 遺伝子の主要な転写因子である Ste11 をコードする ste11 遺伝子の発現誘導に CTDK-I が不可欠であることが判明した。また、細胞を生理的な減数分裂誘導条件である窒素源飢餓におくと、pol II CTD Ser-2 のリン酸化が CTDK-I 依存的に増加することが認められた。さらに、このリン酸化の制御に、ストレスに応答する Sty1 MAP キナーゼの経路が関与していることを解明した。Sty1 は *in vitro* で CTDK-I の (触媒) サブユニットをリン酸化する活性をもつことも証明した。一方、栄養源が豊富な条件下で Mei2 の活性化型変異 Mei2-SATA を発現させて人為的に異所的減数分裂を誘導した場合にも、pol II CTD Ser-2 のリン酸化の増加が観察され、ste11 の転写誘導が起こった。この場合にも、Ser-2 のリン酸化上昇には Sty1 MAP キナーゼ経路の働きが必要であった。Sty1 や Ste11 は mei2 遺伝子を発現させるために経路の上流で働く因子であり、今回の研究結果は、活性化した Mei2 が Sty1 MAP キナーゼの経路に MAPKKK を介して正のフィードバックシグナルを与えることを指し示している。Mei2 が活性化することで生じる現象のいくつかは、このフィードバック制御によって説明が可能となった。

(3) 分裂酵母は動物細胞と類似した TOR キナーゼの制御システムをもち、外界の情報を細胞の生育、大きさ、寿命などの生理状態に反映させる役割をもつ TOR キナーゼの働き

を解析する有利な実験系である。従来の研究によって、Mei2 タンパク質は TORC1 と物理的に相互作用することが知られていたが、今回 *in vitro* のリン酸化アッセイシステムを立ち上げることによって、Mei2 タンパク質が TORC1 によってリン酸化を受ける基質であること、このリン酸化によって分解が促進され活性が抑えられることを明らかにした。

また、分裂酵母においても動物細胞と同様に、TORC1 経路が S6 キナーゼ Psk1 をリン酸化により制御していることを証明した。

(4) 上述の 3 課題に加えて、研究中に明らかになった減数分裂制御に関わる興味深い知見を以下に述べる。

選択的除去を受ける mRNA の中に、モータータンパク質ダイニンの軽中鎖をコードするものが含まれることを見いだした。遺伝子の破壊を行うことにより、ダイニン軽中鎖が、すでに解析された重鎖と同じく、減数分裂時に見られる核の周期的往復運動に必要とされることが明らかとなった。ダイニン軽中鎖が欠失すると、相同組換えの頻度が大きく低下し、減数分裂を正しく完了できない細胞の割合が増加した。

体細胞分裂でも減数分裂でも核膜が崩壊しない分裂酵母において、減数第二分裂の一時期にだけ核膜の透過性が増大し、核と細胞質の隔離が消失することを見いだした。この現象は、前胞子膜形成のための小胞輸送が引き金となって、核膜の性質が変化することによりもたらされていた。分裂期に核膜が崩壊する動物細胞の分裂様式への橋渡しとなる現象と見ることもできる。

分裂酵母の減数第二分裂においては、紡錘体の形成を阻害した場合にも染色体分配が進行することを見いだした。微小管阻害剤によって極間微小管が消失しても、紡錘極体から構築される前胞子膜が複製した紡錘極体を分離し、そこに結合した染色体を両極に分離させる能力をもつことが分かった。染色体分配機構の進化を考える上で興味深い。

体細胞分裂の際には紡錘極体を構成する因子に大きな変化は認められないが、減数第一分裂では、前期にいくつかの構成因子が紡錘極体から離脱し、第一分裂開始の直前に再結集してくることを発見した。その制御に Polo キナーゼが関係することも明らかにした。この特異な事象は、紡錘極体の過剰複製を抑制するために必要と考えられた。

減数第一分裂が開始する直前には染色体の構造が大きく変化し、それまでテロメアが紡錘極体 (SPB) に結合していた状態からセントロメアが SPB に結合した状態へと移行する。この移行において、SPB から伸び出した新たな微小管構造がセントロメアを捉え、SPB へと引き寄せていることを明らかにした。

減数第二分裂においては、後期促進複合体 APC/C の抑制因子 Mes1 が働いてサイクリンの分解を部分的なものに抑えることが

必要である。Mes1 の欠損ほどは強く減数第二分裂を阻害しないが、欠損すると第二分裂が正常に進行できない細胞が増加する Spo5 タンパク質の機能を解析し、Spo5 がサイクリンの mRNA に結合して、合成の面から第二分裂期に必要なサイクリン量の確保に寄与していることを明らかにした。

Cuf2 タンパク質が後期促進複合体 APC/C の活性化因子 Fzr1 のための転写因子であることを明らかにした。さらに、Cuf2 および Fzr1 は第二分裂後にサイクリンを完全分解するために必要であり、これらが欠損した場合は、壊されずに残存したサイクリンにより、減数第三分裂とも言えるような異常な分裂が引き起こされることを発見した。

共同研究により、選択的除去の中心因子 Mmi1 が、増殖時の細胞において、減数分裂特異的の遺伝子領域に RNA 干渉因子を呼び込み、一過性のヘテロクロマチンを形成させる役割をもつことが明らかとなった。

共同研究により、Mmi1 活性を抑える働きをもつ Mei2-meiRNA ドットが、減数分裂前期に相同染色体を極めて強く結びつけるいわゆる pairing center として機能することが分かった。さらに、その機能を担う中心因子が meiRNA であることを明らかにした。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 27 件)

1) Y. Otsubo, A. Yamashita, H. Ohno and M. Yamamoto: *S. pombe* TOR complex 1 activates the ubiquitin-proteasomal degradation of the meiotic regulator Mei2 in cooperation with Pat1 kinase. **J. Cell Sci.** in press (2014). 査読有

2) N. Okada, T. Toda, M. Yamamoto and M. Sato: CDK-dependent phosphorylation of Alp7-Alp14 (TACC-TOG) promotes its nuclear accumulation and spindle microtubule assembly. **Mol. Biol. Cell** in press (2014). 査読有

3) Y. Shichino, A. Yamashita and M. Yamamoto: Meiotic long non-coding meiRNA accumulates as a dot at its genetic locus facilitated by Mmi1 and plays as a decoy to lure Mmi1. **Open Biol.** 4, 140022 (2014). 査読有  
DOI: 10.1098/rsob.140022

4) M. Arata, M. Sato, A. Yamashita and M. Yamamoto: The RNA-binding protein Spo5 promotes meiosis II by regulating cyclin Cdc13 in fission yeast. **Genes Cells** 19, 225-238 (2014). 査読有

5) A. Yamashita, T. Takayama, R. Iwata and M. Yamamoto: A novel factor Iss10 regulates Mmi1-mediated selective elimination of meiotic transcripts.: **Nucleic Acids Res.** 41, 9680-9687 (2013). 査読有

6) Y. Kakui, M. Sato, N. Okada, T. Toda and M. Yamamoto: Microtubules and Alp7-Alp14 (TACC-TOG) reposition chromosomes before meiotic segregation. **Nat. Cell Biol.** 15, 786-796

(2013). 査読有

7) Y. Nakase, M. Nakase, J. Kashiwazaki, T. Murai, Y. Otsubo, I. Mabuchi, M. Yamamoto, K. Takegawa and T. Matsumoto: The fission yeast  $\square$ -arrestin-like protein Any1 is involved in TSC-Rheb signaling and the regulation of amino acid transporters. **J. Cell Sci.** 126, 3972-3981 (2013). 査読有

8) Y. Aoi, K. Arai, M. Miyamoto, Y. Katsuta, A. Yamashita, M. Sato and M. Yamamoto: Cuf2 boosts the transcription of APC/C activator Fzr1 to terminate the meiotic division cycle. **EMBO Rep.** 14, 553-60 (2013). 査読有

9) A. Yamashita, Y. Fujita and M. Yamamoto: Proper microtubule structure is vital for timely progression through meiosis in fission yeast. **PLoS One** 8, e65082 (2013). 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0065082

10) Y. Otsubo and M. Yamamoto: Signaling pathways for fission yeast sexual differentiation at a glance. **J. Cell Sci.** 125, 2789-2793 (2012). 査読有

11) M. Ohta, M. Sato and M. Yamamoto: SPB components are reorganized during fission yeast meiosis. **Mol. Biol. Cell** 23, 1799-1811 (2012). 査読有

12) D.-Q. Ding, K. Okamasa, M. Yamane, C. Tsutsumi, T. Haraguchi, M. Yamamoto and Y. Hiraoka: Meiosis-specific non-coding RNA mediates robust pairing of homologous chromosomes in meiosis. **Science** 336, 732-736 (2012). 査読有

13) E. Hiriart, A. Vavasseur, L. Touat- Todeschini, A. Yamashita, B. Gilquin, E. Lambert, J. Perot, Y. Shichino, N. Nazaret, C. Boyault, J. Lachuer, D. Perazza, M. Yamamoto and A. Verdel: Mmi1 RNA surveillance machinery directs RNAi complex RITS to selective meiotic genes in fission yeast. **EMBO J.** 31, 2296-2308 (2012). 査読有

14) A. Nakashima, Y. Otsubo, A. Yamashita, T. Sato, M. Yamamoto and F. Tamanai: Psk1, an AGC kinase family member in fission yeast, is directly phosphorylated and controlled by TORC1 and functions as S6 kinase. **J. Cell Sci.** 125, 5840-5849 (2012). 査読有

15) C. Funaya, S. Samarasinghe, S. Pruggnaller, M. Ohta, Y. Connolly, J. Müller, H. Murakami, A. Grallert, M. Yamamoto, D. Smith, C. Antony and K. Tanaka: Transient structure associated with the spindle pole body directs meiotic microtubule reorganization in *S. pombe*. **Curr. Biol.** 22, 562-574 (2012). 査読有

16) T. Akera, M. Sato and M. Yamamoto: Interpolar microtubules are dispensable in fission yeast meiosis II. **Nat. Commun.** 3, 695 (2012). 査読有  
DOI: 10.1038/ncomms1725

17) A. Yamashita, Y. Shichino, H. Tanaka, E. Hiriart, L. Todeschini, A. Vavasseur, D.-Q. Ding,

Y. Hiraoka, A. Verdel and M. Yamamoto: Hexanucleotide motifs mediate recruitment of the RNA elimination machinery to silent meiotic genes. **Open Biol.** 2, 120014 (2012). 査読有  
DOI: 10.1098/rsob.120014

18) S. Okamoto, M. Sato, T. Toda and M. Yamamoto: SCF ensures meiotic chromosome segregation through a resolution of meiotic recombination intermediates. **PLoS One** 7, e0030622 (2012). 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0030622

19) Y. Sukegawa, A. Yamashita and M. Yamamoto: The fission yeast stress-responsive MAPK pathway promotes meiosis via the phosphorylation of Pol II CTD in response to environmental and feedback cues. **PLoS Genet.** 7, e1002387 (2011). 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pgen.1002387

20) Y. Kakui, M. Sato, K. Tanaka and M. Yamamoto: A novel fission yeast mei4 mutant that allows efficient synchronization of telomere dispersal and the first meiotic division. **Yeast** 28, 467-479 (2011). 査読有

21) K. Nakano, M. Toya, A. Yoneda, Y. Asami, A. Yamashita, N. Kamasawa, M. Osumi and M. Yamamoto: Pobl ensures cylindrical cell shape by coupling two distinct rho signaling events during secretory vesicle targeting. **Traffic** 12, 726-739 (2011). 査読有

22) M. Yamamoto: The selective elimination of messenger RNA underlies the mitosis-meiosis switch in fission yeast. **Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.** 86, 788-797 (2010). 査読有

23) K. Arai, M. Sato, K. Tanaka and M. Yamamoto: Nuclear compartmentalization is abolished during fission yeast meiosis. **Curr. Biol.** 20, 1913-1918 (2010). 査読有

24) Y. Otsubo and M. Yamamoto: TOR and sexual development in fission yeast. **The Enzymes** 27, 229-250 (2010). 査読有

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

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

27) M. Sato, N. Okada, Y. Kakui, M. Yamamoto, M. Yoshida and T. Toda: Nucleocytoplasmic transport of Alp7/TACC organizes spatiotemporal microtubule formation in fission yeast. **EMBO Rep.** 10, 1161-1167 (2009). 査読有

[学会発表](計 7件)

M. Yamamoto: Molecular basis for the selective elimination of meiosis-specific mRNAs

in growing fission yeast cells. The EMBO Conference on Meiosis, 2009年9月22日 Isle sur la Sorme, France

M. Yamamoto: Molecular basis for the selective elimination of meiosis-specific mRNAs in growing cells. The 5th International Fission Yeast Meeting, 2009年10月26日 Tokyo, Japan

M. Yamamoto: Regulation of meiosis-specific gene expression in fission yeast. Gordon Research Conference on Meiosis, 2010年6月16日 New Hampshire, U.S.A.

M. Yamamoto: Regulatory network controlling the activity of Mei2, the master meiotic regulator in fission yeast. The 6th UK-Japan Cell Cycle Workshop, 2011年4月11日 Windermere, UK

山本 正幸: Pursuing Meiosis. 第34回日本分子生物学会年会(招待講演)2011年12月15日 横浜

M. Yamamoto: Control of meiosis by RNA destruction in fission yeast. Gordon Research Conference on Meiosis, 2012年6月6日 New Hampshire, U.S.A.

M. Yamamoto: RNA degradation switches mitotic growth to meiotic development in fission yeast. CDB meeting on "RNA Sciences in Cell and Developmental Biology II", 2012年06月11日 Kobe, Japan

[図書](計 0件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]  
該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 正幸 (YAMAMOTO, Masayuki)  
かずさDNA研究所・特別客員研究員  
研究者番号: 40114706

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

山下 朗 (YAMASHITA, Akira)  
かずさDNA研究所・ヒトゲノム研究部・  
室長  
研究者番号: 30312276

佐藤 政充 (SATO, Masamitsu)  
早稲田大学・先進理工学部・准教授  
研究者番号: 50447356