

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22687013

研究課題名(和文)mRNA分解による減数分裂抑制機構の解明

研究課題名(英文)Suppression of meiosis by mRNA degradation

研究代表者

杉山 智康(Sugiyama, Tomoyasu)

筑波大学・生命領域学際研究センター・研究員

研究者番号：80503490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,300,000円、(間接経費) 5,790,000円

研究成果の概要(和文)：減数分裂の実行機構と比較し、減数分裂を抑制する機構については殆ど明らかにされていない。そこで本研究では、分裂酵母をモデルにmRNAを標的とする減数分裂抑制機構の解析を行った。核内構造体を形成するRed1の解析から、Red1が栄養増殖期における減数分裂期mRNAを分解し、正常な遺伝子発現を制御することを見出した。さらに、Red1結合タンパク質Red2およびRed3の生化学的同定、新規タンパク質Red5がRed1とは異なるステップでmRNA分解を促進していること、新規タンパク質Rhn1が減数分裂期mRNAの発現を抑制し、その機能は線虫でも保存されていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The mechanism(s) by which untimely meiosis is prevented in mitotic cells is not understood fully. Using the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, we studied mRNA degradation-based suppression of meiosis.

We isolated Red1, which forms nuclear foci, and found that 1) Red1 promotes selective degradation of meiotic mRNAs in vegetative cells; 2) Red1 forms a complex with two novel proteins Red2 and Red3, both of which are essential for meiotic mRNA elimination; 3) Red5 facilitates meiotic mRNA decay after the Red1 complex adds poly(A) tails to target mRNAs; and 4) Rhn1, which is homologous to a transcription termination factor, suppresses meiotic mRNAs in growing cells, and Cids-2, an Rhn1 homolog in *C. elegans*, also suppresses germline-specific transcripts in somatic cells. These results suggest that meiotic mRNA suppression is a common mechanism by which meiosis is inhibited in eukaryotes.

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：減数分裂 RNA分解 核内構造体

## 1. 研究開始当初の背景

有性生殖は、減数分裂期における相同組み換えにより父性・母性とは異なる遺伝情報をもつ配偶子を形成し、その後の接合により更に遺伝情報が多様化した子孫を生み出す。このような有性生殖を繰り返してきた結果、高等動物や植物などから成る多様で複雑な生物界を形成することを可能にしてきたと同時に、様々な環境に適応する個体を産み出し、種の保存を図ってきたと考えられる。したがって、遺伝情報の正確な伝達および多様化に中心的な役割を果たす減数分裂機構の理解は、種の保存だけでなく進化の原動力の解明にもつながっていくと期待される。

減数分裂を行う潜在的な能力 (meiotic potential) は、全ての真核生物が有していると考えられるが、実際には生殖細胞でのみ減数分裂が起こる。当然の事ながら、生殖細胞以外の体細胞が誤って配偶子を形成するという状況は、非常に好ましくない。したがって、体細胞では減数分裂への移行を複数の方法で完全に阻害しており、一方生殖細胞では体細胞分裂から減数分裂への切り換えが厳密な制御機構により行われているものと推測される。しかしながら、真核生物において減数分裂の開始や進行、あるいは減数分裂開始抑制がどのようにして遂行されているかは、生物学的に極めて重要な課題であるにもかかわらず未解明な点が多く残されている。

本研究では、分裂酵母をモデルに mRNA 発現調節を標的とした減数分裂期抑制機構の理解を目指し、核内構造体を形成する新規タンパク質 Red1 の機能解析を中心に行う。

## 2. 研究の目的

本研究では分裂酵母を対象に、遺伝学的・生化学的・細胞生物学的アプローチを駆使して 1) Red1 の機能解明、2) Red1 の標的遺伝子の同定と解析、3) Red1 同様に mRNA 発現抑制に関与する新規因子の同定、を行うことにより、分裂酵母における減数分裂抑制機構の全

容解明を目的とする。また、これらの解析から得られた知見を、多細胞生物を用いた解析と組み合わせることにより、高等真核生物における RNA 分解を介した減数分裂制御機構解明も目指す。

## 3. 研究の方法

(1) Red1 欠損株の解析：分裂酵母 Red1 の機能を探るために、Red1 破壊株の表現型を解析する。これにより Red1 の機能を決定する。

(2) Red1 標的 mRNA の同定：マイクロアレイを用いた発現解析により、Red1 により抑制される mRNA 群を包括的に同定する。また、同定した標的遺伝子の減数分裂における機能を解析する。

(3) Red1 の局在解析：Red1 が形成する核内構造体が既知のものであれば、Red1 の機能解明の手懸かりとなることが予想される。そこで、Red1 の形成する核内構造体を細胞生物学的に同定し、機能解明への手懸かりとする。

(4) Red1 結合タンパク質の同定：Red1 を分裂酵母より精製し、Red1 結合タンパク質を同定する。そして、個々のサブユニットの機能を遺伝学的および生化学的に明らかにする。

(5) 新規 mRNA 分解因子の探索：Red1 と同様に減数分裂期 mRNA の発現抑制を行う新規因子の同定を細胞生物学的および遺伝学的手法により行う。

(6) 多細胞生物における減数分裂期抑制機構の有無：分裂酵母で同定した因子の多細胞生物におけるホモログの機能解析により、mRNA 発現を標的とした減数分裂制御機構が進化的に保存されているか否かを検討する。によりヒト Red1 が直接あるいは間接的に制御する遺伝子群を同定および機能解析を行う。

#### 4. 研究成果

(1) Red1 欠損株の解析: Red1 破壊株 (*red1Δ*) を作成し、その表現型を調べたところ、1) 細胞増殖速度の低下、2) 低温感受性、および 3) 接合能と孢子形成効率の低下が観察された。これらの結果から、Red1 が 1) 正常な栄養増殖、および 2) 正常な減数分裂の開始と孢子形成に必要な因子であることが明らかとなった。

(2) Red1 標的 mRNA の同定: マイクロアレイを用いた発現解析により、野生株と *red1Δ* における RNA 発現状態を比較したところ、*red1Δ* では約 120 種の RNA が野生株と比較して 2 倍以上蓄積していた。そして、このうち約 9 割が減数分裂期 mRNA として分類されている mRNA 群であった。このことは、栄養増殖期において減数分裂期 mRNA の蓄積が Red1 により抑制されることを示している。そして、(1) で観察された *red1Δ* の表現型は、減数分裂期 mRNA の異常発現によるものと予想される。

(3) Red1 の局在解析: 分裂酵母における核内構造体研究は殆ど行われていなかった。そこで、分裂酵母細胞内局在データベースを利用し、核内で構造体を形成する既知因子との局在比較を行った。その結果、Red1 は減数分裂期 mRNA 分解に関与する Mmi1 だけでなく、mRNA のポリ A 付加に関与する複数の因子 (Pcf11、Pla1、Pab2)、および Mmi1 の下流で減数分裂期 mRNA を分解する RNA 分解酵素複合体エキソソームサブユニット Rrp6 渡航局在していた。さらに、Red1 が Pla1 や Rrp6 と物理的に相互作用していることを免疫沈降法により確認した。これらの結果から、Red1 による選択的 mRNA 分解には、標的 mRNA のポリ A 鎖付加と密接な関連があるものと思われる。

実際、減数分裂期 mRNA の分解にはポリ A 鎖は必須であるという報告があったため、

*red1Δ* における減数分裂期 mRNA のポリ A 鎖の長さを調べたところ、*red1Δ* では分解前に生じるはずのポリ A 鎖の伸長が起らなくなっていた。このことから、Red1 は通常 Pla1 などの因子とともに標的 mRNA のポリ A 鎖伸長を行っているが、*red1Δ* ではそれが起らないために減数分裂期 mRNA が分解されずに蓄積されていると考えられる。

(4) Red1 結合タンパク質の同定: FLAG タグを付加した Red1 を発現する分裂酵母株を作製した。この株から細胞抽出液を調整し、Red1 を抗 FLAG 抗体により精製した。精製分画を SDS-PAGE で分離し Red1 に結合するタンパク質の有無を検討したところ、二つの新規タンパク質 Red2 および Red3 が検出された。さらに、*red2* 破壊株および *red3* 変異株では、*red1Δ* と同様に減数分裂期 mRNA の上昇が見られた。したがって、これら 3 つのタンパク質が生体内で複合体として存在し、減数分裂期 mRNA の分解を担っているものと考えられる。

(5) 新規 mRNA 分解因子の探索: Red1 と同様に減数分裂期 mRNA の発現抑制を行う新規因子を探索したところ、Rhn1、Red5、および核膜孔複合体構成因子を同定した。

##### a. Rhn1

Rhn1 は一次構造から種々の生物に保存されており、pre-mRNA 転写終結に関与する因子と相同性を示した。実際、Rhn1 はポリ A 付加依存的な転写終結に関与する Pcf11 と結合、および核内で共局在していた。次に、*rhn1* 欠損株を作製し表現型を調べたところ、*rhn1* 欠損株は高温感受性を示すと共に、栄養増殖期にもかかわらず減数分裂期 mRNA の発現レベルが上昇していることを見出した。さらに、線虫における Rhn1 の相同遺伝子を RNAi 法によりノックダウンしたところ、生殖細胞特異的遺伝子の発現上昇が体細胞に於いて観察された。これらの結果から、Rhn1 は減数分裂期 mRNA 抑制に関

わる因子であり、その機能が多細胞生物においても保存されていることが示唆された。

#### b. Red5

Red5はZnフィンガーを5つもつ新規タンパク質で、核内でRed1と共存していた。Red5は生育に必須であるため、温度感受性変異株 (*red5-2*) を単離し表現型を解析した。その結果、DNA損傷に対する高感受性、接合効率の低下、および減数分裂期mRNAの蓄積が観察された。*red5-2*で蓄積している減数分裂期mRNAのポリA鎖の状態を調べたところ、ポリA鎖の伸長は起こっているが、分解されていない状態であることを見出した。したがって、Red5は標的mRNAの分解を促進しているものと予想される。さらに、*red5-2*を制限温度下で培養すると、核内にmRNAが蓄積することを見出した。このことは、Red5が減数分裂期mRNAの分解に関与するとともに、mRNAの核外輸送にも関与することを明らかにした。

#### c. 核膜孔複合体

Red5の解析から、mRNA輸送因子が減数分裂期mRNA分解に関与することが示唆されたため、多数のmRNA輸送因子の欠損株、あるいは温度感受性変異株における減数分裂期mRNAの発現状態を調べた。その結果、殆どの欠損株および変異体において顕著な異常は観察されなかった。しかしながら、核膜孔複合体を構成する因子の一部 (Nup120など) の欠損株で、減数分裂期mRNAの発現上昇が観察された。これらの結果から、mRNA輸送因子の中には減数分裂期mRNA分解に関与するものもあるが、輸送自体が分解に必要ではないと予想される。

(6) 多細胞生物における減数分裂期抑制機構の有無: Red1 のゼブラフィッシュホモログを同定し発現解析を行った。その結果、胚発生のごく初期から発現しており、発現部位は全身であるという結果を得た。今後さらなる機能解析が必要である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

全て査読有り(\*corresponding author; \*equal contribution)

1. [\\*Sugiyama T.](#), Watanabe N., Kitahata E., Tani T., and Sugioka-Sugiyama R. (2013). "Red5 and three nuclear pore components are essential for efficient suppression of specific mRNAs during vegetative growth of fission yeast." *Nucleic Acids Res.*, 41(13): 6674-6686. doi: 10.1093/nar/gkt363.
2. [\\*Sugiyama T.](#), [\\*Sugioka-Sugiyama R.](#), Hada K., and Niwa R. (2012). "Rhn1, a nuclear protein, is required for suppression of meiotic mRNAs in mitotically dividing fission yeast." *PLoS One*, 7(8); e42962. doi: 10.1371/journal.pone.0042962.
3. [\\*Sugiyama T.](#) and Sugioka-Sugiyama R. (2011). "Red1 promotes the elimination of meiosis-specific mRNAs in vegetatively growing fission yeast." *EMBO J.*, 30(6): 1027-1039. doi: 10.1038/emboj.2011.32.

[学会発表](計11件)

1. [杉山 智康](#), [渡邊 常義](#), Jianguo Zhu, 北畑 衣里, Yang Zhou, 杉岡(杉山) 梨恵, 谷 時雄, Tamás Fischer「核内構造体構成タンパク質によるRNA分解機構の解析」第15回日本RNA学会年会(口頭発表) 松山 2013年7月26日
2. [Sugiyama T.](#), Watanabe N., Kitahata E., Tani T., and Sugioka-Sugiyama R. "Red5: An Essential Factor for Selective Elimination of Meiotic mRNAs in Vegetative Fission Yeast." The 7th International Fission Yeast Meeting (ポスター発表), London, UK 2013年6月26日

3. 杉山智康、杉岡(杉山)梨恵、北原衣里、谷時雄「Red5 is required for the selective elimination of meiotic mRNAs in vegetative fission yeast」第35回日本分子生物学会年会(ポスター発表)、博多 2012年12月11日
  4. Sugiyama T., Sugioka-Sugiyama R., Kitahata E., and Tani T. “Red5 is required for the selective elimination of meiotic mRNAs in vegetative fission yeast.” EMBO-EMBL Symposium: The complex life of mRNA (ポスター発表), Heidelberg, Germany 2012年10月7日
  5. 杉山智康、杉岡(杉山)梨恵、波田一正、丹羽隆介「Rhn1/Cids-2 suppresses meiosis/germ-specific mRNAs in vegetative fission yeast and in somatic cells of worms」第14回日本RNA学会年会(ポスター発表)仙台 2012年7月18日
  6. Sugiyama T., Sugioka-Sugiyama R, Hada K., and Niwa R. “Rhn1/Cids-2 suppresses meiosis/germ-specific mRNAs in vegetative fission yeast and in somatic cells of worms,” The 22nd CDB Meeting: RNA Sciences in Cells and Developmental Biology II (ポスター発表), 神戸 2012年6月11日
  7. 杉山智康「Red proteins that localize as nuclear dots promote selective elimination of meiotic mRNAs in vegetative fission yeast」第34回日本分子生物学会年会(口頭発表)横浜 2011年12月16日
  8. Sugiyama T. “Selective elimination of meiotic mRNAs in eukaryotes” NTU-JST Joint Meeting on RNA & Biofunctions - Asia Studies (口頭発表), 淡水, 台湾 2011年11月11日
  9. Sugiyama T., and Sugioka-Sugiyama R. “Red1, which forms nuclear bodies, promotes the elimination of meiosis-specific mRNAs in vegetative fission yeast.” The 16th Annual Meeting of the RNA Society (ポスター発表), 京都 2011年6月16日
  10. 杉山智康、杉山梨恵「The Selective Elimination of meiotic mRNAs in Fission Yeast」第12回日本RNA学会年会(ポスター発表)東京 2010年7月27日
  11. 杉山智康「核内構造体を形成するRed1による減数分裂期mRNA除去」第62回日本細胞生物学会大会(口頭・ポスター発表)大阪 2010年5月20日
- 〔その他〕
- A. 受賞
    1. 筑波大学における間接経費を伴う外部資金獲得に係る報奨金(2013年3月)
    2. 第62回日本細胞生物学会大会 日本細胞生物学会若手優秀発表賞(2010年5月)
  - B. マスコミによる報道等
    1. プレスリリース「不要な mRNA を選択的に分解するしくみを解明 -医療応用への新規番を目指す-」筑波大学発表 (<http://www.tsukuba.ac.jp/public/press/110212.pdf>) (2010年2月12日)
    2. 日刊工業新聞掲載(2010年3月3日)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
 

杉山 智康 (SUGIYAMA TOMOYASU)

筑波大学・生命領域学際研究センター・研究員 研究者番号: 80503490