

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：82508

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570223

研究課題名(和文) 分裂酵母の減数分裂の開始と進行を制御するRNA結合タンパク質Mei2の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of the RNA-binding protein Mei2, which is a key player for meiosis in fission yeast

研究代表者

山下 朗 (Yamashita, Akira)

公益財団法人かずさDNA研究所・ヒトゲノム研究部・室長

研究者番号：30312276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生殖細胞形成に欠かせない減数分裂を制御する分子機構の解明を目標に、分裂酵母の減数分裂の開始と進行の鍵を握るRNA結合タンパク質Mei2の機能解析を行った。本研究により、Mei2がストレス応答MAPキナーゼを活性化して、転写因子Ste11の発現を誘導し、自分自身の発現を正に制御していることが明らかとなった。また、Mei2が体細胞分裂期に真核生物全般に保存されたTorキナーゼの分裂酵母ホモログであるTor2に依存したリン酸化を受けて、ユビキチン-プロテアソーム系により分解されていることが示された。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study is to understand the molecular mechanisms underlying meiosis, which is a special type of cell division for gametogenesis. Mei2 is an RNA-binding protein, which is a key player for both the induction and progression of meiosis in fission yeast. It has been shown by this study that activated Mei2 can enhance expression of a transcription factor Ste11 through a positive feedback loop involving the stress-responsive MAP kinase pathway. Furthermore, it has turned out that Mei2 is phosphorylated in mitotically growing cells depending on one of the two TOR kinase complexes in fission yeast, namely TORC1, and is degraded through the ubiquitin-proteasome pathway.

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：減数分裂 RNA結合タンパク質 分裂酵母

1. 研究開始当初の背景

減数分裂は、半数体である配偶子を形成する際に欠かせないプロセスである。しかし、減数分裂の制御機構は、体細胞分裂ほどには解析されていない状況にある。減数分裂を研究する上で、取り扱いの容易さと実験手法の豊富さから、分裂酵母は優れたモデル系となってきた。

分裂酵母において減数分裂の開始は、RNA 結合タンパク質 Mei2 の活性状態によって規定されている。Mei2 が脱リン酸化状態になり、活性化されることで、分裂酵母細胞は体細胞分裂を停止し、減数分裂期へと移行することが示されていた。しかし、Mei2 がどのように働いて減数分裂を開始させているのかは不明であった。

Mei2 は、減数分裂の開始制御のみならず、減数分裂の進行においても必須の役割を果たしている。Mei2 は、減数分裂を開始させる機能を発揮した後、non-coding RNA である meiRNA と結合し、核内で Mei2 ドットと呼ばれる構造体を形成して、減数第一分裂の開始を制御する。このドット構造は、meiRNA をコードする遺伝子座で形成される。転写された meiRNA が自身の遺伝子座に留まり、その場で Mei2 と結合してドット構造が形成されると考えられる。Mei2-meiRNA が形成する Mei2 ドットは減数分裂阻害因子 Mmi1 を機能抑制することで、減数第一分裂を誘導する機能を果たしている。Mei2 ドットが機能抑制する Mmi1 の解析から、減数分裂 mRNA の選択的な除去機構という新規の遺伝子発現制御機構の存在が明らかとなった。Mmi1 は、RNA 結合タンパク質であり、減数分裂特異的に発現する一群の mRNA に存在する DSR と名付けられた領域に結合し、それら mRNA の分解を誘導する因子であった。これらのことから、Mei2 ドットの働きは、Mmi1 を抑制することで、一群の mRNA を分解から守り、減数分裂の進行に必要な遺伝子の発現を可能にすることであると明らかとなった。しかし、Mei2 ドットの形成機構の詳細や、Mmi1 の抑制機構については不明な点が多く残されていた。また、Mmi1 の作用機構についても、その全貌は明らかとなっていない状況であった。

2. 研究の目的

本研究課題では、減数分裂の制御系の解明を目標に、分裂酵母の減数分裂の開始と進行を司る Mei2 タンパク質の機能解析を行った。Mei2 が持つ強力な減数分裂誘導活性の実体と、Mei2 と non-coding RNA が形成する核内ドット構造である Mei2 ドットの形成機構を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

分裂酵母の遺伝学的な手法に、生化学的、細胞生物学的な手法を組み合わせ、解析を進

めた。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を行った。また、Mei2 や meiRNA などを蛍光タンパク質で標識し、詳細な生細胞観察を行い、Mei2 ドットの形成機構の解析を行った。

4. 研究成果

Mei2 が減数分裂を誘導する機構を明らかにするため、活性化型の Mei2 を強制的に発現し、異所的に減数分裂を誘導できる株を作製した。その株の抑圧変異体を取得し、解析を行った。その結果、Mei2 がストレス応答 MAP キナーゼを介して、自分自身の発現を制御していることが明らかとなった。解析を行った抑圧変異のうちの一つの変異の原因遺伝子は、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った。この遺伝子、*Isg1* を破壊すると、Mei2 の転写を制御する転写因子 Ste11 の発現が大幅に低下した。減数分裂条件下で、CTDK-I が活性化して Ste11 の発現誘導に至る過程について解析を進めた。その結果、ストレス応答性 MAP キナーゼ Sty1 が CTDK-I のキナーゼサブユニット Lsk1 をリン酸化することで、CTDK-I が活性化することが明らかとなった。また、活性化した Mei2 がストレス応答 MAP キナーゼ経路の MAPKKK である Wis4、Win1 を活性化することが分かった。これらことから、Mei2 の発現に対する以下の正のポジティブフィードバック回路が存在することが明らかとなった(図 1)。Mei2 は、MAPKKK に働きかけ、ストレス応答性 MAP キナーゼ Sty1 を活性化する。引き続いて、Sty1 によるリン酸化によって CTDK-I が活性化し、その結果、転写因子 Ste11 の発現が誘導され、Mei2 のさらなる転写誘導へと至る。現在、Mei2 が MAPKKK を活性化する機構について解析を継続している。

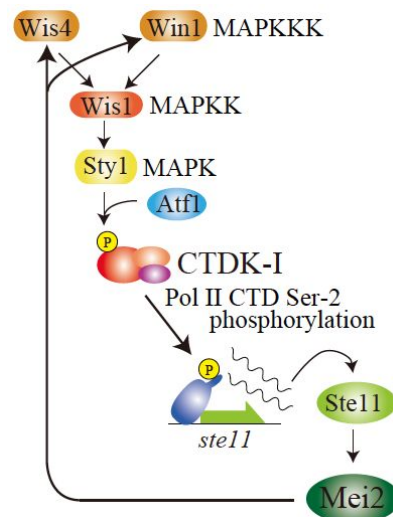


図 1. Me2 の発現を制御する正のフィードバック回路

Mei2 の発現制御機構についてさらなる解析を行った。その結果、体細胞分裂期の細胞では、Mei2 が TOR キナーゼ複合体 1 依存的にリン酸化され、ユビキチン-プロテアソームによる分解を受けていることが明らかとなった(図 2)。

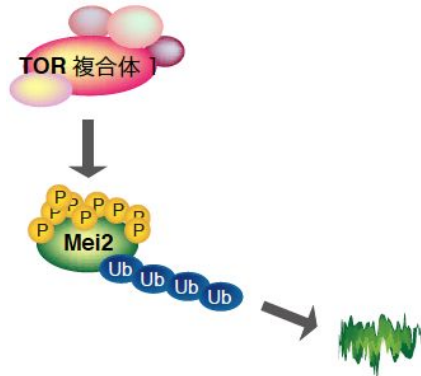


図 2. TOR 複合体 1 による Mei2 の発現制御

Mei2 と meiRNA が核内ドット構造を形成して、減数分裂の阻害因子である Mmi1 を機能抑制する機構について解析を行った。蛍光タンパク質を用いて meiRNA を生細胞内で可視化できる系を構築し、meiRNA の自身の遺伝子座への繫留には Mei2 が不要ないことを明らかにした。また、meiRNA が Mmi1 の誘導する RNA 分解機構の標的となっていることを見出し、meiRNA が Mmi1 の疑似餌として働き、Mmi1 の機能を効率的に抑制しているというモデルを提唱した。さらに、Mmi1 の関連因子として新規因子 Iss10 を単離し、減数分裂期には Iss10 の発現量が低下することで Mmi1 の機能低下が促進されることを示した。

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 10 件)

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

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

Yamashita, A., Fujita, Y., and Yamamoto, M. (2013) Proper microtubule structure is vital for timely

progression through meiosis in fission yeast. *Plos One*, 8, e65082 (査読有り)

Aoi, Y., Arai, K., Miyamoto, M., Katsuta, Y., Yamashita, A., Sato, M., and Yamamoto, M. (2013) Cuf2 boosts the transcription of APC/C activator Fzr1 to terminate the meiotic division cycle. *EMBO reports*, 14, 553-560 (査読有り)

Yamashita, A., Kariyazono, R., and Watanabe, Y. (2012) Meiotic pairing by non-coding RNA? *EMBO reports*, 13, 766 (査読無し)

Nakashima, A., Otsubo, Y., Yamashita, A., Sato, T., Yamamoto, M., and Tamanoi, F. (2012) Psk1, an AGC kinase family member in fission yeast, is directly phosphorylated and controlled by TORC1 as S6 kinase. *Journal of Cell Science*, 2, 5840-5849 (査読有り)

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

Yamashita, A., Shichino, Y., Tanaka, H., Hiriart, E., Touat-Todeschini, L., Vavasseur, A., Ding, D-Q., Hiraoka, Y., Verdel, A., and Yamamoto, M. (2012) Hexanucleotide motifs meidate recruitment of the RNA elimination machinery to silent meiotic genes. *Open Biology*, 2, 120014 (査読有り)

Sukegawa, Y., Yamashita, A., and Yamamoto, M. (2011) The fission yeast stress-responsive MAPK pathway promotes meiosis via the phosphorylation of pol II CTD in response to environmental and feedback cues. *Plos Genetics*, 7, e1002387 (査読有り)

Nakano, K., Toya, M., Yoneda, A., Asami, Y., Yamashita, A., Kamasawa, N., Osumi, M., and Yamamoto, M. (2011) Pob1 ensures cylindrical cell shape by coupling two distinct Rho signaling events during secretory vesicle targeting. *Traffic*, 12, 726-739 (査読

有り)

〔学会発表〕(計6件)

Yoko Otsubo, Akiko Nishimura, Tomohiko Matsuo, Akira Yamashita, and Masayuki Yamamoto “Analysis of the molecular mechanisms regulating the onset of sexual differentiation in fission yeast” 第36回日本分子生物学会年会、2013年12月5日、神戸国際会議場(兵庫)

Akira Yamashita, Tomomi Takayama, Yuichi Shichino, Ryo Iwata, and Masayuki Yamamoto “Molecular mechanism for the selective removal of meiotic transcripts in fission yeast” 7th International Fission Yeast Meeting, 2013年6月25日、University College London (United Kingdom)

山下朗、高山知美、七野悠一、岩田遼、山本正幸「減数分裂特異的転写産物の選択的除去機構」第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日、マリンメッセ福岡(福岡)

山下朗、高山知美、七野悠一、岩田遼、山本正幸「減数分裂特異的転写産物の選択的除去機構」第14回日本RNA学会年会、2012年7月18日、東北大学(宮城)

Akira Yamashita, Yuko Sukegawa, Yoko Otsubo, and Masayuki Yamamoto “Novel regulatory network for the expression of Mei2, the master regulator of meiosis in fission yeast” 第34回日本分子生物学会年会、2011年12月16日、パシフィコ横浜(神奈川)

Akira Yamashita, Yuko Sukegawa, Yoko Otsubo, and Masayuki Yamamoto “Novel regulatory network for the expression of Mei2, the master regulator of meiosis in fission yeast” 6th International Fission Yeast Meeting, 2011年6月29日、Harvard Medical School (USA)

〔図書〕(計1件)

山下朗「減数分裂の進行を制御する non-coding RNA」(2013)実験医学増刊”生命分子を統合する RNA – その秘められた役割と制御機構”(羊土社)、31、213-218

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: