

令和 元年 5 月 31 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04333

研究課題名(和文) RNA結合タンパク質による減数分裂制御機構

研究課題名(英文) RNA-binding protein-mediated regulation of meiosis in fission yeast

研究代表者

山下 朗 (Yamashita, Akira)

基礎生物学研究所・細胞応答研究室・特任准教授

研究者番号：30312276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生殖細胞の形成に不可欠なプロセスである減数分裂を制御する分子機構を明らかにすることを目標に、分裂酵母の減数分裂制御において重要な役割を果たすRNA結合タンパク質の機能解析を行った。その結果、減数分裂阻害するRNA結合タンパク質Mmi1が、減数分裂遺伝子の転写産物の分解、ヘテロクロマチン化誘導に加え、転写終結と転写産物の核外排出を制御することで、体細胞分裂期の細胞での減数分裂遺伝子の発現を抑制していることを明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

減数分裂遺伝子の発現は厳格な制御下にあり、減数分裂を行わない体細胞で誤って減数分裂遺伝子が発現する事態は通常は生じない。一部の腫瘍細胞で減数分裂遺伝子の異所的な発現が認められることや、減数分裂関連遺伝子の強制発現で腫瘍形成、染色体分配異常が誘導されることから、減数分裂遺伝子の発現制御の重要性は明らかである。本研究により、モデル生物分裂酵母の新規減数分裂遺伝子の発現制御が見出された。この情報を元に研究を進めることで、他の生物種での減数分裂遺伝子の発現制御系の解明につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Meiosis is a special type of cell division that generates haploid gametes from diploid cells. In this study, we performed functional analysis of RNA-binding proteins that regulate meiosis in fission yeast. In fission yeast, a YTH-type RNA-binding protein, Mmi1, suppresses expression of meiotic genes in mitotically growing cells by inducing selective RNA degradation and facultative heterochromatin formation. We demonstrated that Mmi1 prevents the untimely expression of meiotic genes by tethering their mRNAs to nuclear foci. Mmi1 also regulates the termination of transcription of its target genes.

研究分野：分子生物学

キーワード：減数分裂 RNA結合タンパク質 分裂酵母

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

減数分裂は、配偶子形成に伴う染色体数を半減させる特殊な分裂様式であり、有性生殖に欠かせないプロセスである。減数分裂を制御する分子機構を明らかにしていくことは、生物学的に興味深いというだけでなく、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我々にもたらすことになる。しかし減数分裂の制御系に関しては、実験系の複雑さもあり、体細胞分裂周期ほどには理解が進んでいない状況にある。減数分裂を研究する上で、人為的に減数分裂を誘導することができ、様々な実験手法が整った分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は、非常に優れたモデルシステムの一つとされてきた。分裂酵母で明らかとなった制御系の保存性を、より高等な生物で検討していく戦略をとることで、体細胞分裂の研究がそうであったように、減数分裂研究も大きく進展していくと期待される。

分裂酵母の減数分裂の開始と進行の制御に不可欠な役割を果たす RNA 結合タンパク質が複数知られていた。体細胞分裂で増殖する細胞が減数分裂過程へと移行すると、遺伝子の発現状態に大幅な変化が起きる。この大規模な遺伝子発現の変動には、転写のオン、オフという比較的シンプルな制御に加えて、転写後調節も大きく寄与していることが示されており、RNA 結合タンパク質による減数分裂関連遺伝子の発現制御が予想された。減数分裂の開始と進行に欠かせない RNA 結合タンパク質の解析を行うことで、減数分裂特異的な遺伝子の発現調節機構の詳細が解き明かされると考えられた。

### 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を制御する三つの RNA 結合タンパク質、Mei2、Mmi1、Spo5 の機能解明を行った。

分裂酵母は、通常一倍体で体細胞型の分裂を行い増殖するが、外界の栄養源が枯渇すると、接合して二倍体となり、減数分裂、引き続いて孢子形成を行う。栄養状態と二倍体性という減数分裂の開始を規定する条件は、最終的に RNA 結合タンパク質 Mei2 の活性に変換される。Mei2 が活性化しさえすれば、分裂酵母細胞は栄養状態や倍数性に関わらず、増殖を停止して減数分裂を行ってしまう。これらのことから、Mei2 は分裂酵母の減数分裂開始のスイッチ分子であることが分かる。しかし、Mei2 の減数分裂誘導活性の実体は不明であった。

Mei2 は減数分裂の誘導だけでなく、減数分裂の進行過程でも必須の役割を果たしている。Mei2 は減数分裂を誘導後、非コード RNA 分子 meiRNA と結合し、核内で Mei2 ドットと名付けられた点状構造体を形成し、減数分裂の進行を制御している。Mei2 ドットは、減数分裂阻害因子である Mmi1 を捕らえて抑制することで、減数第一分裂を誘導する。Mmi1 は、体細胞分裂期に働く YTH 型の RNA 結合タンパク質で、減数分裂の進行に必要な一群の転写産物に結合して、RNA 分解複合体 exosome による RNA 分解を誘導する因子である。Mmi1 はまた、標的とする減数分裂転写産物をコードする遺伝子座のヘテロクロマチン化を誘導して発現を抑制する。しかし、Mmi1 による RNA 分解誘導、ヘテロクロマチン形成誘導による減数分裂遺伝子の発現抑制機構や、Mei2 と meiRNA が形成する Mei2 ドットによる Mmi1 阻害機構を解き明かすためにはさらなる研究が必要な状況であった。

Mmi1 の標的の一つである減数分裂遺伝子 *spo5* は、減数第二分裂と孢子形成時に働く RNA 結合タンパク質をコードする。Spo5 は、細胞周期制御の中心的存在の一つであるサイクリン B の mRNA に結合し、その発現を調節することで、減数分裂の進行を制御している可能性が見出されていたが、その詳細は不明であった。

本研究課題では、Mei2 による減数分裂誘導活性、Mei2 による Mmi1 機能抑制、Mmi1 による減数分裂遺伝子の発現抑制、Spo5 による減数分裂進行制御という RNA 結合タンパク質による減数分裂制御の解明に取り組み、そこから得られる情報を統合することで、減数分裂の開始と進行を制御する分子機構の全体像の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

分裂酵母の遺伝学的手法に、生化学的、細胞生物学的手法を組み合わせ、減数分裂を制御する RNA 結合タンパク質の機能解析を行った。Mei2 の減数分裂誘導活性の実体を明らかにするため、Mei2 の活性化型変異の抑圧変異体の解析と、Mei2 と相互作用する新規 RNA の探索を進めた。Mmi1 と遺伝学的、あるいは物理的に相互作用することが知られていた因子群の解析を行った。Mmi1 が誘導する RNA 分解の詳細を探るため、Mmi1 の標的である減数分裂遺伝子の転写産物の細胞内での挙動を蛍光タンパク質を利用した生細胞観察や FISH 法などで明らかにした。Mmi1 の標的遺伝子は減数分裂特異的に発現誘導されることから、減数分裂で重要な機能を持つ因子をコードすることが期待される。そこで、機能未知の Mmi1 標的因子の解析を行った。

### 4. 研究成果

Mei2 による減数分裂開始機構を明らかにするため、Mei2 タンパク質を分裂酵母細胞より精製し、同時に精製される RNA の特定を進めた。Mei2 結合 RNA の候補が複数得られ、現在それらの解析を進めている。また、体細胞分裂期に Mei2 をリン酸化し、proteasome による分解を誘導する TOR キナーゼの解析を進めた。その結果、TOR キナーゼの活性調節において tRNA の前駆体が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、TOR キナーゼが Mei2 に加えて、Mei2 の発現を制御する転写因子 Ste11 を標的としていることが示された。

Mmi1 の標的転写産物の細胞内での挙動を FISH 法と蛍光タンパク質を利用した生細胞観察を行って明らかにした。その結果、Mmi1 が RNA 分解誘導とヘテロクロマチン形成促進に加えて、標的転写産物の核外排出を阻害して翻訳を抑制することで、減数分裂の遺伝子の発現を抑制していることが明らかとなった(図)。Mmi1 が誘導する RNA 分解に欠損が生じる変異体において、Mmi1 標的転写産物の細胞内局在を観察すると、大部分が核内で点状に局在し、細胞質へと移行していないことが分かった。標的転写産物の核内での点状の局在位置は、Mmi1 が形成する点状構造体に一致すると考えられた。また、RNA 分解の変異体においては、Mmi1 の標的転写産物が安定に存在するにも関わらず、それらから翻訳されるタンパク質の発現は大幅に低下していた。これらの結果から、Mmi1 が転写産物の核外排出を阻害することが明らかとなった。また、Mmi1 が N 末端側の領域で自己相互作用しており、その領域が Mmi1 の局在、機能に欠かせないことが分かった。Mmi1 関連因子として遺伝学的なスクリーニングで単離された因子の一つである Erh1 が Mmi1 の自己相互作用を補助していることも明らかとなった。

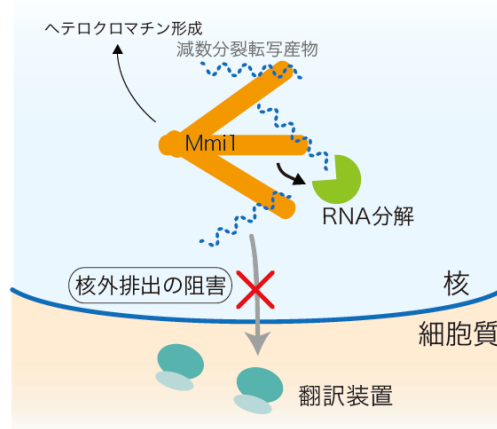


図. Mmi1 による減数分裂遺伝子の発現抑制

減数分裂特異的に発現する Mmi1 の標的因子の解析を行い、減数分裂前期に見られる特徴的な核の往復運動に欠かせない細胞質ダイニンを制御するダイナクチン複合体の新規サブユニット Arp1、Mug5、Jnm1 を同定した。それらが細胞表層タンパク質 Num1 と協調してダイニンを細胞表層につなぎ止めることで、核運動が誘導されることが分かった。

Mmi1 の標的因子の解析を進め、Mmi1 が非コード RNA 分子 *nam1* の発現制御を介して、減数分裂に先立つ接合過程を制御していることが分かった。*nam1* 遺伝子座は、接合過程に必須の MAP キナーゼキナーゼキナーゼをコードする *byr2* の上流に位置していた。*nam1* が発現すると、*byr2* の発現は抑制され、接合が阻害される。Mmi1 は、*nam1* の分解を誘導することに加えて、転写終結を制御し、*byr2* の発現を正に制御していることが明らかとなった。Mmi1 による同様の制御がセントロメア領域でも見られ、セントロメア領域のヘテロクロマチン制御における Mmi1 の役割が示唆された。さらに、Mmi1 が、様々なレベルで遺伝子発現制御に関わる Ccr4/Not 複合体を呼び込むことで、標的遺伝子のヘテロクロマチン形成を促進していることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

Otsubo, Y., Matsuo, T., Nishimura, A., Yamamoto, M., and Yamashita, A. (2018) RNA production links nutrient conditions to the onset of sexual differentiation through the TORC1 pathway. *EMBO Reports* 19, e44867 (査読有り)  
DOI: 10.15252/embr.201744867

Shichino, Y., Otsubo, Y., Kimori, Y., Yamamoto, M., and Yamashita, A. (2018) YTH-RNA-binding protein prevents deleterious expression of meiotic proteins by tethering their mRNAs to nuclear foci. *eLife* 7, e32155 (査読有り)  
DOI: 10.7554/eLife.32155

Touat-Todeschini, L., Shichino, Y., Dangin, M., Thierry-Mieg, N., Gliquin, B., Hiriart, E., Sachidanandam, R., Lambert, E., Brettschneider, J., Reuter, M., Kadlec, J., Pillai R., Yamashita, A., Yamamoto, M., and Verdel, A. (2017) Selective termination of lncRNA transcription promotes epigenetic silencing and cell differentiation. *EMBO Journal* 36, 2626-2641 (査読有り)  
DOI: 10.15252/embj.201796571

Otsubo, Y., Nakashima, A., Yamamoto, M., and Yamashita, A. (2017) TORC1-dependent phosphorylation targets in fission yeast. *Biomolecules* 7, 50 (査読有り)  
DOI: 10.3390/biom7030050

山下朗 (2015) meiRNA による減数分裂の制御. 実験医学 (増刊「ノンコーディング RNA テキストブック」) 33, 90-91 (査読無し)  
<https://www.yodosha.co.jp/yodobook/book/9784758103510/>

Yamashita, A., Shichino, Y., and Yamamoto, M. (2016) The long non-coding RNA world in yeasts. *Biochimica et Biophysica Acta Gene Regulatory Mechanisms* 1859, 147-154 (査読有り)  
DOI: 10.1016/j.bbagr.2015.08.003

Cotobal, C., Rodríguez-López, M., Duncan, C., Hasan, A., Yamashita, A., Yamamoto, M., Bähler, J., and Mata, J. (2015) Role of Ccr4-Not complex in heterochromatin formation at meiotic genes and subtelomeres in fission yeast. *Epigenetics & Chromatin* 8, 28 (査読有り)  
DOI: 10.1186/s13072-015-0018-4

Fujita, I., Yamashita, A., and Yamamoto, M. (2015). Dynactin and Num1 cooperate to establish the cortical anchoring of cytoplasmic dynein in *S. pombe*. *Journal of Cell Science* 128, 1555-1567 (査読有り)  
DOI: 10.1242/jcs.163840

[学会発表](計 21 件)

Otsubo, Y., Yamamoto, M., Yamashita, A., Novel regulatory factors in the TORC1-mediated nutrient sensing pathway in fission yeast. 第 41 回日本分子生物学会 年会 (2018)

大坪瑶子、山本正幸、山下朗 「分裂酵母 *S. pombe* の tRNA 前駆体による TORC1 制御」酵母遺伝学フォーラム第 51 回研究報告会 (2018)

大坪瑶子、山本正幸、山下朗 「tRNA 前駆体による TOR キナーゼ活性調節機構」第 20 回日本 RNA 学会年会 (2018)

大坪瑶子、山本正幸、山下朗 「分裂酵母における tRNA 前駆体による TORC1 活性制御」第 8 回 TOR 研究会 (2017)

中嶋昭雄、山下朗、大坪瑶子、松田真弥、鎌田真司、瓜谷眞裕、山本正幸、吉川潮 「減数分裂における分裂酵母 TORC1 の制御」第 40 回日本分子生物学会年会 (2017)

大坪瑶子、山本正幸、山下朗 「分裂酵母の tRNA 前駆体による TORC1 制御」第 40 回日本分子生物学会年会 (2017)

大坪瑶子、山本正幸、山下朗 「分裂酵母における tRNA 前駆体による TORC1 制御」日本遺伝学会第 89 回大会 (2017)

大坪瑶子、山本正幸、山下朗 「分裂酵母における tRNA 前駆体による TORC1 制御」第 7 回 TOR 研究会 (2017)

七野悠一、山本正幸、山下朗 「YTH ドメインタンパク質 Mmi1 は減数分裂 mRNA を核内で凝集させ翻訳を抑制する」第 19 回日本 RNA 学会年会 (2017)

Yamashita, A., Multilayered regulation of meiotic gene expression by the YTH family RNA-binding protein Mmi1 in fission yeast. 第 39 回日本分子生物学会年会 (2016)

七野悠一、山本正幸、山下朗 「分裂酵母の YTH ドメインタンパク質 Mmi1 は減数分裂特異的な mRNA の核内凝集を促進し翻訳を抑制する」第 39 回日本分子生物学会年会 (2016)

七野悠一、山本正幸、山下朗 「RNA 結合タンパク質 Mmi1 は減数分裂 mRNA の核内凝集を促進し翻訳を抑制する」酵母遺伝学フォーラム第 49 回研究報告会 (2016)

Shichino, Y., Yamashita, A., and Yamamoto, M., The YTH domain-containing protein Mmi1 induces intranuclear foci formation of meiotic transcripts through its self-interaction and sequesters them from the translation machinery. *RNA* 2016 (2016)

大坪瑶子、山本正幸、山下朗 「分裂酵母における tRNA 前駆体による TORC1 制御の可能性」

## 第 6 回 TOR 研究会 (2016)

七野悠一、山下朗、山本正幸 「分裂酵母における減数分裂特異的な転写産物の空間的制御は発現抑制に重要である」第 38 回日本分子生物学会年会 (2015)

中嶋昭雄、山下朗、大坪瑶子、鎌田真司、瓜谷眞裕、山本正幸、吉川潮 「減数分裂における分裂酵母 TORC1 の制御と機能」第 38 回日本分子生物学会年会 (2015)

七野悠一、山下朗、山本正幸 「減数分裂特異的な転写産物の空間的制御による発現抑制機構」酵母遺伝学フォーラム第 48 回研究報告会 (2015)

七野悠一、山下朗、山本正幸 「分裂酵母の減数分裂特異的 RNA の空間的制御」第 17 回日本 RNA 学会年会 (2015)

Shichino, Y., Yamashita, A., and Yamamoto, M., Spatial control in the Mmi1/DSR system that selectively eliminates meiotic transcripts. The eighth international fission yeast meeting (2015)

Nakashima, A., Yamashita, A., Otsubo, Y., Kamada, S., Uritani, M., Yamamoto, M., and Kikkawa, U., Regulation of TORC1 signaling in meiosis under nitrogen starvation. The eighth international fission yeast meeting (2015)

⑫ Yamamoto, M., Otsubo, Y., Shichino, Y., and Yamashita, A., Overview of the mitosis-meiosis switch in fission yeast - Signaling, transcription and post-transcriptional events. The eighth international fission yeast meeting (2015)

### 〔図書〕(計 1 件)

Yamashita, A., Sakuno, T., Watanabe, Y., and Yamamoto, M. (2016) Analysis of *Schizosaccharomyces pombe* Meiosis. Fission Yeast, A Laboratory Manual, Edited by Hagan, I., Carr, A., Gallert, A., and Nurse, P. Cold Spring Harbor Press.251-270

### 〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

### 〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/pombe/>

## 基礎生物学研究所プレスリリース

2018.02.13

生殖細胞形成に関わる遺伝子の新規発現制御機構 ～減数分裂遺伝子の転写産物は体細胞分裂期には核内点状構造に隔離され、発現抑制される～

<http://www.nibb.ac.jp/press/2018/02/13.html>

2018.01.18

栄養状態に応答して有性生殖を開始させる経路上で、tRNA の前駆体が TOR 複合体 1 の活性制御の鍵を握る

<http://www.nibb.ac.jp/press/2018/01/18.html>