

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15751

研究課題名（和文）減数分裂の開始・進行におけるCDK/TOR pathwayの役割

研究課題名（英文）The role of the CDK/TOR pathway in meiosis

研究代表者

松田 真弥（Matsuda, Shinya）

静岡県立大学・薬学部・研究支援者

研究者番号：40805488

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：減数分裂は遺伝子を次世代に継承するための重要な細胞分裂プロセスである。本研究では、減数分裂の開始・進行に関わる新たな制御系として見出された分裂酵母Pef1（哺乳類CDK5オルソログ）/TORC1シグナル伝達経路の詳細な解析を行った。リン酸化タンパク質相対定量解析を行い、Pef1の基質候補を見出すことができ、同シグナル伝達経路解明の手がかりを得ることができた。また、Pef1はClg1およびPs11と結合し、減数分裂前DNA複製を促進することが明らかとなった。本研究結果は減数分裂の分子機構を理解し、その制御法を確立するうえでの重要な知見となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Pef1の機能は不明であり、国内外問わずPef1の活性調節機構や生理機能に言及した先行研究はわずかである。一方で、TORC1に関する知見は世界中で日々刷新され続けている。近年では、TORC1が糖尿病や癌、老化などに関与することが明らかになり、研究の進行度に応じて新たな治療戦略が練られている。しかしながら減数分裂過程におけるTORC1シグナル伝達制御機構の多くは未解明であることから、本研究結果は当該研究分野において重要な知見となる。本研究は、CDK及びTORC1の理解を深め、減数分裂制御法の確立に向けた基盤的な研究といえる。

研究成果の概要（英文）：Meiosis is an important cell division process that mediates genetic information to the next generation. This study aimed to elucidate the role of *S. pombe* Pef1 (mammalian CDK5 ortholog)/TORC1 signaling pathway in meiosis. Relative quantitative analysis of phosphorylated proteins identified candidate substrates for Pef1, providing a clue to the understanding of this signaling pathway. I also found that Pef1 complexes with Clg1 and Ps11 to promote premeiotic DNA replication. These results provide valuable insights into the molecular mechanisms of meiosis.

研究分野：細胞内シグナル伝達

キーワード：CDK5 TORC1 Pef1 減数分裂 cyclin 分裂酵母

1. 研究開始当初の背景

減数分裂は、遺伝子を次世代に継承するための重要な細胞分裂プロセスである。その最大の特徴は、第一減数分裂期に染色体の相同組換えを引き起こすことであり、これにより次世代に多種多様な遺伝的特徴が継承され、環境の変化にも対応することが可能となる。しかしながら動物や植物など多細胞生物においては、減数分裂は生殖細胞形成時のみに現れる現象である。そのため、減数分裂を人為的に誘発することができる培養細胞の実験系がなく、その分子機構の解析は十分に進められていない。

これに対して、単細胞性の真核生物である分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) では培養条件を変えるだけで人為的に減数分裂を誘導することができる。富栄養環境下では分裂酵母は1倍体で生存し体細胞分裂により増殖しているが、栄養が枯渇すると増殖を停止し、接合、減数分裂、孢子形成からなる有性生殖過程へと移行する (図1)。飢餓環境下では、哺乳類と同様に分裂酵母においても第一、第二減数分裂を経て一倍体の配偶子 (孢子) が形成されるようになる。そのため、分裂酵母の様々な変異株を用いることで、減数分裂の制御に関わる遺伝子を同定することが可能となる。また、分裂酵母 *pat1-114* 変異株では、培養の温度を上げるだけで増殖が停止され強制的に減数分裂が開始されることから、減数分裂を同調的に誘導する系として用いられている。このような分裂酵母の性質を活用することで、減数分裂の分子機構を詳細に調べることが可能となる。

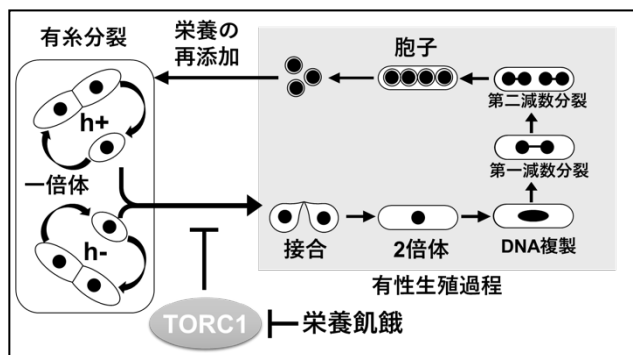


図1. 分裂酵母の生活環

栄養源の認識と減数分裂開始をつなぐ制御系ではTORC1 (target of rapamycin complex 1) が中心的な役割を担っている (図1)。TORC1は、mTOR (mechanistic target of rapamycin) を中心とするタンパク質複合体であり、栄養状態を感知して活性化し、タンパク質や脂質の合成を始めとする代謝制御、細胞の増殖やオートファジーなどを調節している。TORC1の阻害剤であるRapamycinが減数分裂の進行を抑制することに着目した先行研究では、TORC1が減数分裂期に再活性化し、減数分裂前のDNA複製を促進することが明らかにされている。しかしながら減数分裂期のTORC1活性がどのように制御されているかは依然として不明である。

一方で最近、分裂酵母のサイクリン依存性キナーゼ (Cyclin-dependent kinase; CDK) ファミリーであるPef1 (*pombe* pho eighty-five) の遺伝子欠損株において接合効率が減少することが見出された。CDKは真核生物において細胞周期制御を始め、様々な細胞機能の調節に関わるセリン/スレオニン型タンパク質リン酸化酵素である。Pef1は、神経細胞の機能制御などに関わる哺乳類CDK5 subfamily (CDK5, CDK14-18) のオルソログであるが (図2)、機能は明らかにされていない。そこで、研究代表者は *pat1-114* 変異株を用いた解析を行い、Pef1が減数分裂の開始・進行制御に関わることを見出した。また、Pef1がTORC1活性の制御に関与するかをPsk1 (哺乳類S6Kのオルソログ) のリン酸化状態をTORC1活性の指標として調べた。その結果、減数分裂の進行に伴いTORC1は再活性化されるのに対し、*pef1* 欠損株では減数分裂におけるTORC1の再活性化が抑制されることが明らかとなった。これらの結果から、Pef1は減数分裂期におけるTORC1の再活性化を促進することで、減数分裂の開始・進行を制御することが示唆された。しかしながら、Pef1/TORC1シグナル伝達機構を解明する手掛かりはまだ掴めていない。

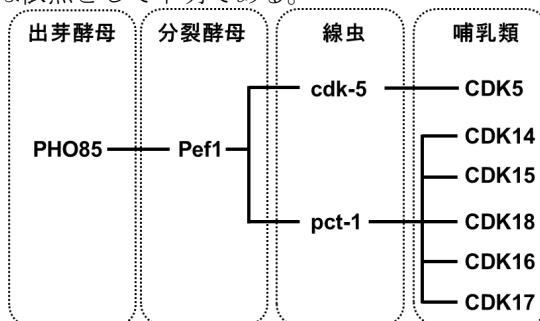


図2. CDK5 subfamily orthologs

2. 研究の目的

減数分裂の開始・進行制御においてPef1/TORC1シグナル伝達経路は重要な役割を担うことが示唆されているが、その分子機構は不明である。そこで本研究は(1) Pef1/TORC1シグナル伝達制御機構、(2) Pef1の活性制御機構を解明し、減数分裂の制御系を明らかにすることを目的とした。他のどの生物種においても、減数分裂期にPef1オルソログ (CDK5) がTORC1の制御に関わることを明確に示した研究報告はない。そのため、Pef1/TORC1シグナル伝達機構を明らかにすることで、減数分裂の根幹的な制御機構の解明に迫ることができる。このように、本研究は減数分裂の分子機構を理解し、その制御法を確立するうえでの基盤的な研究である。またTORC1の阻害剤であるRapamycinの新たな薬理作用の発見に繋がることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 減数分裂期における Pef1/TORC1 シグナル伝達機構の解析

① リン酸化タンパク質相対定量解析による Pef1 の基質探索

国内外において Pef1 の先行研究は極めて少なく、その基質は未だ同定されていない。このことが Pef1/TORC1 間のシグナル伝達経路解明の障壁となっている。そこで、iTRAQ 試薬を用いたリン酸化タンパク質相対定量解析により Pef1 の基質同定を試みた。分裂酵母野生株および *pef1* 欠損株からタンパク質を抽出し、リン酸化ペプチドを濃縮・精製した。次に、iTRAQ 試薬を用いて総タンパク質及び濃縮・精製したリン酸化ペプチドを標識し、質量分析計で分析した。

② *pef1* 欠損による減数分裂制御因子の発現およびリン酸化への影響

先行研究により、TORC1 が減数分裂前 DNA 複製を促進することが明らかとなっている。そこで、Pef1 が減数分裂前 DNA 複製に関与するか検証した。*pef1* 欠損二倍体変異株を作製し、窒素源飢餓により減数分裂および胞子形成を誘導した。同細胞から mRNA を抽出し、cDNA へ逆転写後、リアルタイム PCR により DNA 複製に関与する遺伝子群の発現変化を調べた。また、*pat1-114* 変異株を用いて同調的な減数分裂を誘導し、FACS 解析により DNA 複製の開始・進行への影響を評価した。

(2) Pef1 の活性制御機構の解析

有糸分裂期において、Pef1 は 3 種類のサイクリン (Clg1、Pas1、Ps11) と結合することが明らかとなっている。しかしながら、減数分裂期において同サイクリンが Pef1 の活性調節因子として機能するかは不明である。そこで、ウエスタンブロットおよび免疫沈降法により、減数分裂期における Pas1、Clg1、Ps11 の発現量および Pef1 との相互作用の有無を調べた。また、*clg1*、*pas1*、*ps11* 欠損による減数分裂の開始・進行や TORC1 活性への影響を調べ、減数分裂期に同サイクリンが Pef1 の活性調節因子として働くか検証した。

4. 研究成果

(1) 減数分裂期における Pef1 / TORC1 シグナル伝達機構の解明

① リン酸化タンパク質相対定量解析による Pef1 の基質探索

リン酸化タンパク質相対定量解析により、*pef1* 欠損によりリン酸化が減少するタンパク質を 8 種類見出すことができた。同 8 種類のタンパク質が、Pef1 によって直接リン酸化されるか現在解析中である。

② *pef1* 欠損による減数分裂制御因子の発現およびリン酸化への影響

窒素源飢餓により、分裂酵母二倍体野生株では減数分裂前 DNA 複製に関わる遺伝子群が発現した後、第一・第二減数分裂を経て胞子を形成した。一方で、*pef1* 欠損株では同遺伝子群の発現が抑制され、胞子形成効率も著しく低下した。また、*pat1-114* 一倍体変異株を用いた同調的減数分裂においても、コントロール細胞と比較すると *pef1* 欠損株では減数分裂前の DNA 複製が開始されず、同遺伝子の発現が抑制されることに加え、第一減数分裂への移行に必要な Cdc2 Tyr-15 のリン酸化も大幅に減弱していた。さらに、*pef1* 欠損株に *pef1* 野生型を過剰発現させた回復実験では、同遺伝子群の発現ならびに Cdc2 Tyr-15 のリン酸化はコントロール細胞と同程度まで増加し、DNA 複製が促進されたことで第一・第二減数分裂へ移行可能となった。従って、Pef1 は DNA 複製を促進することで減数分裂を制御していることが明らかとなり、TORC1 を介して減数分裂前 DNA 複製を促進することが予想される。

(2) Pef1 の活性制御機構の解明

まず初めに、*clg1* と *pas1*、*ps11* が減数分裂の制御に関与するか検証した。同サイクリンの遺伝子欠損株を作製し、減数分裂進行や TORC1 活性への影響を調べた。その結果、*pat1-114* 変異株を用いた減数分裂誘導系において、コントロール細胞と比較すると *clg1* 欠損株、*ps11* 欠損株では減数分裂の進行に遅延が生じ、TORC1 活性も半減していた。一方で、*pas1* 欠損株では減数分裂の開始・進行、及び TORC1 活性に対する影響はほとんどなかった。また、*clg1 ps11* 二重欠損株では減数分裂が開始されず、TORC1 活性は *pef1* 欠損株と同程度まで抑制されていた。すなわち、減数分裂期において Clg1 と Ps11 が Pef1 の活性調節因子として機能し、減数分裂期の TORC1 活性を制御することが予想される。さらに、FACS 解析により *clg1* 欠損により減数分裂が DNA 複製期で停止することが明らかとなった。ウエスタンブロットおよびリアルタイム PCR による解析では、*clg1* 欠損により DNA 複製に関与する遺伝子群の発現および Cdc2 Tyr-15 のリン酸化が顕著に減少し、*pef1* 欠損株と酷似する表現形を示した。

次に、*clg1*、*ps11*、*pas1* の ORF 3' 側に GFP、*pef1* の ORF 3' 側に 13myc を挿入した分裂酵母変異株を作製し、*pat1-114* 変異株と掛け合わせて同調的減数分裂を誘導した。同変異株からタンパク質を抽出し、抗 GFP 抗体および抗 myc 抗体を用いたウエスタンブロットにより各サイクリンの発現を調べた。その結果、Pef1、Pas1 および Ps11 の発現量に変化は認められなかったが、Clg1 は減数分裂の進行に伴い発現量が増加した。また、同条件下で免疫沈降を行った結果、Pas1 と Pef1 との結合は検出限界以下であったが、Ps11 と Pef1 は強固に結合していた。一方で、同調的減数分裂誘導前では Pef1 に対する Clg1 の結合は微弱であるが、減数分裂誘導後では Ps11

に匹敵する程の強い結合を示した。すなわち、Clg1 は減数分裂期に発現が促進され、Pef1 と結合することで減数分裂前 DNA 複製を制御している可能性が考えられる。

以上、本研究により、Pef1 が TORC1 を介して減数分裂前 DNA 複製を促進することが予想された。また、リン酸化タンパク質相対定量解析により、Pef1 の基質候補を同定し、Pef1/TORC1 間のシグナル伝達経路解明の緒を掴むことができた。加えて、既知の 3 種類のサイクリンのうち、減数分裂前 DNA 複製期における Pef1 の主要な活性調節因子は Clg1 であることが予想された。しかしながら、Psl1 の減数分裂における役割は不明瞭であり、今後更なる解析が必要である。体細胞分裂においては、CDK は結合するサイクリンを切り替えることで活性を調節し、細胞周期を制御している。Pef1 もまた、減数分裂の様々な局面に応じて結合するサイクリンを変換して活性を微調整し、減数分裂の開始・進行を制御していることが予想される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsuda Shinya, Kikkawa Ushio, Nakashima Akio	4. 巻 11
2. 論文標題 The <i>S. pombe</i> CDK5 Orthologue Pef1 Cooperates with Three Cyclins, Clg1, Pas1 and Ps11, to Promote Pre-Meiotic DNA Replication	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 89 ~ 89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom11010089	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 Matsuda Shinya, Kikkawa Ushio, Uda Haruka, Nakashima Akio	4. 巻 133
2. 論文標題 <i>S. pombe</i> Pef1/CDK5 regulates sexual differentiation through control of the TORC1 pathway and autophagy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs247817
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.247817	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松田真弥、岡久萌菜、宮本由衣、吉川潮、中嶋昭雄
2. 発表標題 分裂酵母Pef1/CDK5によるTORC1制御機構
3. 学会等名 第9回TOR研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松田真弥、岡久萌菜、宮本由衣、吉川潮、中嶋昭雄
2. 発表標題 分裂酵母Pef1/TORC1シグナル伝達機構の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第52回研究報告
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松田真弥、岡久萌菜、宮本由衣、吉川潮、中嶋昭雄
2. 発表標題 分裂酵母サイクリン依存性キナーゼPef1はTORC1を介して減数分裂の開始・進行を制御する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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
---------	---------