

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32641

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2014

課題番号：21370004

研究課題名(和文)減数分裂の制御機構

研究課題名(英文)Regulation of meiosis

研究代表者

村上 浩士 (Murakami, Hiroshi)

中央大学・理工学部・教授

研究者番号：80262020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：分裂酵母において第一減数分裂の制御にフォークヘッド型転写因子であるMei4は中心的な役割を果たしている。しかし、この制御は長い間未解明であった。申請者は、第一減数分裂の進行には、Cdk1の15番目のチロシン残基のリン酸化制御が主要な制御機構であり、Mei4がCdk1の活性化因子であるcdc25遺伝子の発現を活性化することが必須であることを明らかにし、さらにwee1遺伝子もMei4の第一減数分裂の進行に必要なターゲットであることを解明した。

研究成果の概要(英文)：In eukaryotes, the cyclin-dependent kinase Cdk1p (Cdc2p) plays a central role in entry into and progression through nuclear division during mitosis and meiosis. Cdk1p is activated during meiotic nuclear divisions by dephosphorylation of its tyrosine-15 residue. The phosphorylation status of this residue is largely determined by the Wee1p kinase and the Cdc25p phosphatase. In fission yeast, the forkhead-type transcription factor Mei4p is essential for entry into the first meiotic nuclear division. We recently identified cdc25+ as an essential target of Mei4p in the control of entry into meiosis I. Here, we show that wee1+ is another important target of Mei4p in the control of entry into meiosis I. The results we obtained suggest that repression of wee1+ expression is primarily owing to Mei4p-mediated transcriptional interference.

研究分野：分子生物学

キーワード：減数分裂 細胞周期 Cdk1 Cdc25 Wee1 転写因子

1. 研究開始当初の背景

減数分裂は父親由来と母親由来の2つの異なるゲノムを組換えることにより、新たなゲノムを持つ子孫を生み出し、生物学的多様性を生み出す原動力になっている。減数分裂では、[DNA複製] [遺伝子組み換え] [第一減数分裂(還元分裂)] [第二減数分裂(均等分裂)]という一連のイベントを協調して行うことが不可欠である。減数分裂の過程に異常が生じると、ヒトではダウン症や不妊の原因となる。しかしながら、減数分裂の細胞周期制御機構や遺伝子組み換えの開始の制御機構についてはまだ明らかになっていない点が多く、これらの機構の解明は基礎生物学のみならず、不妊原因の特定及び治療法の開発などにも必要な研究であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、減数分裂に特有の現象を協調的に行う制御機構の解明を目指す。特に、(1)DNA複製と遺伝子組み換えの開始の制御機構、(2)DNA複製と第一減数分裂開始の制御機構及び(3)Mei4による第一減数分裂開始の制御機構を研究することにより、第一減数分裂までの細胞周期制御機構を明らかにする。

(1)DNA複製と遺伝子組み換えの開始の制御機構

申請者は分裂酵母を用いて減数分裂におけるDNA合成と遺伝子組換え開始との関係の概略を明らかにした(Murakami and Nurse, *Nat Genet*, 28,290,2001)。具体的には、*cdc18*(その他の生物ではCDC6)などのDNA複製変異株を用いてDNA合成を阻害しても遺伝子組換え開始に不可欠な二重鎖切断が生じることを見出した。すなわち、DNA合成と遺伝子組み換えの開始は独立に制御されているということである。申請者はその後二重鎖切断が起こらない複製変異株を探し、ribonucleotide reductase (RNR)変異をみつけた。さらに、RNRを阻害した場合には、DNA合成と遺伝子組み換え開始の間に新規の細胞周期チェックポイント機構が存在することを発見した(Tonami *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 5797, 2005)。他のグループも同様の機構を報告している(Ogino and Masai, *J Biol Chem*, 281, 1338, 2006)。具体的には、[RNRによる複製阻害]

[複製チェックポイント因子Cds1キナーゼの活性化] [遺伝子組換え開始の抑制]という機構である。本申請課題はこの情報伝達機構の分子レベルでの解明を目的の一つとする。このシグナル伝達は出芽酵母には存在しないと考えられているため(Borde *et al.*,

Science 290, 806, 2000)、分裂酵母がこの制御において重要なモデル生物のひとつになると考えられる。

一方、出芽酵母では、RNR阻害剤を用いてDNA合成を阻害すると、二重鎖切断が阻害されることから、DNA合成が行われて初めて二重鎖切断が生じると考えられていた(Borde *et al.*, *Science* 290, 806, 2000)。しかし、その後、出芽酵母においてもCDC6の変異株をもちいてDNA合成を阻害しても二重鎖切断が生じる事が報告された(Hochwagen *et al.*, *Cell* 122, 861, 2005)。

すなわち、分裂酵母においても出芽酵母においても、RNRの阻害では二重鎖切断が起こらないが、その他の方法(CDC6などのDNA複製変異株)でDNA複製を阻害すると二重鎖切断が多くの場合起こる。現時点で明らかにされていないのは、RNRとその他の変異株で何が違うかという点である。一つの可能性は、その違いが二重鎖切断部位でのDNA合成量の差である。そこで、局所的なDNA合成の測定方法を開発してこの研究課題を解決したいと考えている。

(2)DNA複製と第一減数分裂開始の制御機構

上述のDNA合成と遺伝子組換え開始を連携する情報伝達は、申請者が以前に解明したDNA複製と第一減数分裂を連携するチェックポイント機構とCds1の活性化までは共通である(Murakami and Nurse, *Genes Dev*, 13, 2581, 1999)。すなわち、[RNRによる複製阻害] [Cds1の活性化] [第一減数分裂開始の阻害]という機構である。Cds1の下流には、減数分裂特異的に第一分裂を制御する因子の存在が予想されるため、Cds1の下流を解析すれば、遺伝子組み換えと第一減数分裂開始に関与する機構を同時に解明できると思われる。

(3)Mei4による第一減数分裂開始の制御機構

第一減数分裂は、DNA複製が終了し、遺伝子組み換えが完了して初めて、相同染色体が分離するという様式をとる。減数分裂特異的なフォークヘッド型転写因子であるMei4は、第一減数分裂の開始に不可欠である(Horie *et al.*, *Mol Cell Biol* 18, 2118, 1998)。最近、申請者は、*mei4*変異で細胞周期が停止しているのはCdc2(CDK1、サイクリン依存性キナーゼ1)の15番目のチロシン残基(Y15)のリン酸化が原因であり、Mei4の第一減数分裂開始における必須のターゲットとしてこのY15を脱リン酸化する*cdc25*遺伝子を同定した(Murakami-Tonami *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 104,14688, 2007)。さら

にこの研究を進め、*cdc25* 遺伝子以外の重要なターゲットがこの Y15 をリン酸化する *wee1* 遺伝子であるという予備的な結果を得たので、これを分子レベルで解明する。

Mei4は、第一減数分裂の開始だけでなく、遺伝子組み換えの開始及び胞子形成に必要である。実際、ゲノム全体を調べた解析から Mei4は約300の遺伝子の転写に関与していると考えられている (Mata *et al.*, *Nat Genet.* 32,143, 2002)。また、Mei4は転写のみならずスプライシングにも関与していると報告されている (Malapeira *et al.*, *Mol Cell Biol.* 25,6330, 2005)。現在までに報告されている方法では、Mei4のターゲットとされている遺伝子のいくつかは、実際はターゲットでない可能性が多く残され、さらには多くのターゲットを見逃している可能性が高い。それは、*mei4*変異株は第一減数分裂の手前で細胞周期の進行が停止しているため、その後に発現する遺伝子がターゲットと混同される可能性と、現在まで報告されているDNAマイクロアレイの感度だとスプライシングの差異を検出できていないからである。申請者は*mei4*変異株において、Cdc2のY15を強制的に脱リン酸化することで減数分裂が進行することを見つけている。そこで、この株を用いて、イントロンの差を検出できる感度の高い方法を用いてMei4のターゲットを明らかにする。実際、東京工業大学の白髭博士との共同研究により、感度の高いタイリングアレイの実験から、Mei4の新しいターゲットやMei4に依存的なアンチセンス鎖の発現を予備的な実験結果ではあるが見出ししている。

また、Mei4は上述のように多くの減数分裂のイベントを協調的に遂行させているが、この機構は不明である。そこで、Mei4と相互作用する因子を同定することにより、Mei4の機能解析を行う。

3. 研究の方法

(1)DNA 複製と遺伝子組み換えの開始の制御機構

局所的 DNA 合成検出法の開発

1.RNR と他の複製変異株で局所的な DNA 合成に差があるかどうかを調べるために、局所的に DNA 合成が生じたか否かを明らかにできる系を開発する。このために、チミジンアナログでありこれより比重の大きな BrdU (Bromodeoxyuridine) を DNA 合成の際に取り込ませ、CsCl 密度勾配遠心法を用いて BrdU を取り込んだ DNA とそうでないものを超遠心で分離する。そして、

DNA 合成が生じたかどうかを部位特異的なプライマー (この場合は二重鎖切断形成部位に特異的な配列のプライマー) を使った PCR 法を用いて二重鎖切断部位で BrdU が取り込まれているかどうかを調べる。分裂酵母にはチミジン及び BrdU を核内に取り込むために必要なチミジンキナーゼが存在しないため、ウイルス由来の酵素を分裂酵母内で発現させることにより、BrdU を取り込ませる (Hayashi *et al.*, *EMBO J.* 26,1327, 2007)。この系は大阪大学の升方博士との共同研究で行い、予備的な実験では減数分裂時の DNA 合成においても BrdU が取り込まれる事を確認している。

2.この系が確立されたら、RNR 及びその他の DNA 複製阻害により、二重鎖切断部位で DNA 合成されているかを解明する。具体的には、DNA 複製を阻害させるために、*cdc2* (他の生物では CDK1)、*orp1* (Orc1)、*cdc18* (Cdc6)、*cdc21* (Mcm4)、*cdc19* (Mcm2)、*cdc23* (Mcm10) 及び *hsk1* (Cdc7) 温度感受性変異株などを用いる。

3.DNA 複製チェックポイント因子は RNR 阻害時における後期複製起点の不活性化に部分的に必要な事が体細胞分裂では知られているため (Hayashi *et al.*, *EMBO J.* 26,1327, 2007)、RNR 阻害時にチェックポイント因子が存在しない時 (*rad3* 変異株や *cds1* 変異株) に、局所的な DNA 合成が二重鎖切断部位で影響を受けるかどうかを調べる。

4.また、DNA 複製と二重鎖切断開始の機構をさらに調べるため、二重鎖切断部位近傍の DNA 複製起点を破壊あるいは効率の良い複製起点を導入し、二重鎖切断形成のタイミングが変化するかどうか調べる。

Cds1 のターゲットのスクリーニング

1.申請者は、減数分裂における DNA 複製と二重鎖切断形成開始を連携するチェックポイントのターゲットは Cdc2 でないことを予想している (Tonami *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 5797, 2005)。というのは、Cdc2 を不活性化しても二重鎖切断は生じ、そのタイミングも変化しないからである。そこで、この新規のターゲット

トを同定するため、減数分裂の mRNA から調製したライブラリーを用いて Cds1 と結合するタンパク質を two-hybrid 法でスクリーニングする。また、Cds1 と減数分裂時に結合しているタンパク質を免疫沈降法と質量分析法により同定する。このスクリーニングで、DNA 複製と第一減数分裂を連携する因子も同時に単離できる可能性がある (Murakami and Nurse, *Genes Dev*, 13, 2581, 1999)。

2 . 二重鎖切断形成に必要な因子(Rec12, Rec8, Mde2, Mei4)にタグをつけ、チェックポイント因子の有無で、翻訳後修飾が変化するかなどを調べる。

(2) DNA 複製と第一減数分裂開始の制御機構

上記のスクリーニングを行うことにより、Cds1 の第一減数分裂に関するターゲットも同時に取得する。

(3) Mei4 による第一減数分裂開始の制御機構

Mei4 のターゲットとしての *wee1* 遺伝子

1 .申請者は Mei4 の細胞周期での必須のターゲットとして *cdc25* 遺伝子を同定した (Murakami-Tonami *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 104,14688, 2007)。さらにこの研究を進め、*cdc25* 遺伝子以外の重要なターゲットが *wee1* 遺伝子であるという予備的な結果を得ている。すなわち、正常な減数分裂では *wee1* 遺伝子の mRNA 量やタンパク質量は第一減数分裂時に減少し、*mei4* 変異株では mRNA もタンパク質量も減少しない (未発表)。そこで、*wee1* 遺伝子の単独破壊株でも *mei4* 変異株で減数分裂が進行するか調べる。Mei4 過剰発現株での *wee1* 遺伝子の mRNA、タンパク質量を調べる。

2 . *wee1* 遺伝子の 5' 上流に Mei4 が結合するコンセンサス配列が 5 つ存在する。この部位に Mei4 が結合するかどうかをクロマチン免疫沈降法とゲルシフト法により調べる。また、この部位を破壊すると *wee1* 遺伝子の mRNA 量や減数分裂の進行がどのように変化するか調べる。

Mei4 の新規のターゲット

1 . Mei4 の新しいターゲットを同定するた

め、*mei4* 変異が存在していても減数分裂が進行する株などを用いて RNA 量の変化及びスプライシングの有無を解像度の高い方法(タイリングアレイ)によりゲノム全体で明らかにする。この系は、今年度から東京工業大学の白髭博士との共同研究で行っており、予備的な実験結果から、新規の Mei4 依存的に発現が上昇する遺伝子や Mei4 依存的に発現制御を受けているアンチセンス鎖の発現を確認している。このタイリングアレイの実験を完了し、詳細に解析を行う。

2 . 上記のタイリングアレイによりスクリーニングした Mei4 のターゲットの中から、Mei4 に依存して顕著に RNA 量やスプライシングが変化する因子について機能解析を行う。具体的には、Mei4 のターゲットであるかどうかを、ノーザンプロット法及びリアルタイム PCR 法で確かめる。また、Mei4 により制御されているアンチセンス鎖を見出しているため、プロモーターを改変し、アンチセンス特異的に発現を抑制あるいは過剰発現させて、センス鎖の発現やスプライシングに影響するかなど表現型の解析をする。

4 . 研究成果

分裂酵母において第一減数分裂の制御にフォークヘッド型転写因子である Mei4 は中心的な役割を果たしている。しかし、この制御は長い間未解明であった。申請者は、第一減数分裂の進行には、Cdk1 の 15 番目のチロシン残基のリン酸化制御が主要な制御機構であり、Mei4 が Cdk1 の活性化因子である *cdc25* 遺伝子の発現を活性化することが必須であることを明らかにしていた。この制御に加え、さらに *wee1* 遺伝子も Mei4 の第一減数分裂の進行に必要なターゲットであることを解明した。

Mei4 が *wee1* の mRNA 量を転写レベルで制御している可能性を検討した。野生株では *wee1* の mRNA 量が減数分裂が進行するに従って減少したが、*mei4* 破壊株でこの減少はみられなかった。また、*mei4* を過剰発現した株では *wee1* の減少が早期にみられた。このように Mei4 の活性と *wee1* の mRNA 量の相関がみられたことから、Mei4 が *wee1* の mRNA 量を負に制御していると結論した。また、この mRNA の減少の生理的重要性はタンパク質レベルでも同様の現象がみられたことにより実証された。

また、*wee1* 遺伝子の 5' 上流に Mei4 が認識するコンセンサス配列が存在していた。この部

読有り

9. Another way to induce synchronous meiosis.
Murakami H, Aiba H.
Cell Cycle. 2012 May 15;11(10):1874. Epub 2012 May 15 査読有り
10. Transient structure associated with the spindle pole body directs meiotic microtubule reorganization in *S. pombe*.
Funaya C, Samarasinghe S, Pruggnaller S, Ohta M, Connolly Y, Müller J, Murakami H, Grallert A, Yamamoto M, Smith D, Antony C, Tanaka K.
Curr Biol. 2012 Apr 10;22(7):562-74. Epub 2012 Mar 15. 査読有り
11. Chiasmata promote monopolar attachment of sister chromatids and their co-segregation toward the proper pole during meiosis I.
Hirose Y, Suzuki R, Ohba T, Hinohara Y, Matsuhara H, Yoshida M, Itabashi Y, Murakami H, Yamamoto A.
PLoS Genet. 2011 Mar;7(3):e1001329. Epub 2011 Mar 10. 査読有り
12. Ecl1, a regulator of the chronological lifespan of *Schizosaccharomyces pombe*, is induced upon nitrogen starvation.
Miwa Y, Ohtsuka H, Naito C, Murakami H, Aiba H.
Biosci Biotechnol Biochem. 2011;75(2):279-83. Epub 2011 Feb 7. 査読有り
13. hsf1 (+) extends chronological lifespan through Ecl1 family genes in fission yeast.
Ohtsuka H, Azuma K, Murakami H, Aiba H.
Mol Genet Genomics. 2011 Jan;285(1):67-77. Epub 2010 Nov 12. 査読有り
14. Mechanisms of dNTP supply that play an essential role in maintaining genome integrity in eukaryotic cells.
Niida H, Shimada M, Murakami H, Nakanishi M.
Cancer Sci. 2010 Dec;101(12):2505-9. 査読有り
15. Pma1, a P-type proton ATPase, is a determinant of chronological life span in fission yeast.

Ito H, Oshiro T, Fujita Y, Kubota S, Naito C, Ohtsuka H, Murakami H, Aiba H.
J Biol Chem. 2010 Nov5;285(45):34616-20. Epub 2010 Sep 9. 査読有り

16. Regulation of yeast forkhead transcription factors and FoxM1 by cyclin-dependent and polo-like kinases.
Murakami H, Aiba H, Nakanishi M, Murakami-Tonami Y.
Cell Cycle. 2010 Aug 15;9(16):3233-42. Epub 2010 Aug 2. 査読有り

17. Chk1-cyclin A/Cdk1 axis regulates origin firing programs in mammals.
Nakanishi M, Katsuno Y, Niida H, Murakami H, Shimada M.
Chromosome Res. 2010 Jan;18(1):103-13. 査読有り

〔学会発表〕(計 3 件)

第 5 回分裂酵母国際学会

ボストン・アメリカ

2011/6/25-30

Murakami H,

Regulation of *wee1⁺* expression during meiosis in fission yeast

PepCon

北京・中国

Murakami H,

2011/3/23-25

Role of CK2 on the cell cycle checkpoints in fission yeast

CK2 国際会議

ケルン・ドイツ

2009/9/7-10

Murakami H,

Role of CK2 on the cell cycle checkpoints in fission yeast

〔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〕

ホームページ等

<http://www.bio.chuo-u.ac.jp/murakami/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

村上 浩士 (MURAKAMI, hirosi)

中央大学・理工学部・生命科学科・教授

研究者番号：80262020