

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14785

研究課題名（和文）CDKとTORによる減数分裂制御ネットワークの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the meiotic regulatory network by CDK and TOR

研究代表者

松田 真弥（Matsuda, Shinya）

筑波大学・生命環境系・特任助教

研究者番号：40805488

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：減数分裂は、遺伝情報に多様性をもたらす重要な分裂様式である。その最大の特徴は、染色体の相同組換えにより異性の遺伝子と混ざり合うことであり、これにより次世代に多様な遺伝的特徴が継承され、環境変化への対応や進化を可能にしている。分裂酵母において減数分裂の新たな制御系として Pef1-TORC1 経路が見出されたが、Pef1 に関する研究報告は極めて少なく、特に下流シグナル伝達経路の解析は十分に進められていない。そこで本研究では、リン酸化プロテオミクス解析を活用して Pef1 の基質を探索し、Pef1-TORC1 シグナル伝達系による減数分裂制御機構の解明を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、分裂酵母を用いて減数分裂の開始・進行の制御に関わる新たなシグナル伝達機構の解明を目指した挑戦的な研究である。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するうえでの基盤的な研究であり、本研究を皮切りに高等生物の減数分裂の仕組みについて研究が進めば、卵子の老化診断技術や、抗老化薬の開発が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Meiosis is a specialized cell division process that mediates genetic information transfer to the next generation. The most important feature of meiosis is the mixing of genes of different cell by homologous recombination, which allows the inheritance of diverse genetic characteristics to the next generation, enabling evolution and adapt to environmental changes. The Pef1-TORC1 pathway has been identified as a novel regulator for meiosis in fission yeast, but downstream signaling pathways of Pef1 remain unclear. This study aimed to clarify the substrate of Pef1 among the candidate substrates identified by phospho-proteomic analysis and to elucidate the meiotic regulatory mechanism by Pef1-TORC1 signaling.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：CDK cyclin 分裂酵母 TOR オートファジー

### 1. 研究開始当初の背景

減数分裂は、染色体数を半減させる特殊な細胞分裂であり、遺伝子を次世代に継承するための極めて重要なプロセスである。単細胞性の真核生物である分裂酵母は、一倍体で細胞分裂を行うが、栄養が枯渇すると接合し、減数分裂を経て孢子を形成する。栄養源の認識と有性生殖開始をつなぐ制御系では TORC1 (Target of rapamycin complex 1) - Ste11 経路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。

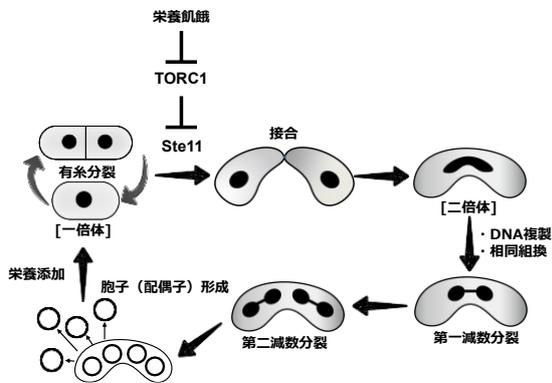


図 1. 分裂酵母の生活環

TORC1 の阻害剤である Rapamycin は接合や孢子形成を抑制することが示されてるが<sup>1)</sup>、減数分裂期における TORC1 の役割については十分な解析が行われていなかった。興味深いことに、栄養飢餓時に TORC1 の活性は大幅に減少するが、減数分裂期に移行すると再度その活性は上昇し、減数分裂を促進する (unpublish data)。その再活性化の仕組みを明らかにするために、減数分裂が DNA 複製期で停止する *pef1* 遺伝子破壊株<sup>2)</sup> を用いて減数分裂期の TORC1 活性を調べた結果、*pef1* 欠損によりは TORC1 の再活性化を顕著に抑制された。このことから、減数分裂期における TORC1 の再活性化は DNA 複製後に引き起こされると予想される。一方で、栄養飢餓時ではオートファジーによる栄養供給により TORC1 の再活性化が引き起こされるが<sup>3,4)</sup>、*pef1* 欠損株ではオートファジーの制御系に異常が生じるため<sup>4)</sup>、減数分裂期における TORC1 の再活性化にはオートファジーの働きも寄与していると考えられる。あるいは、Pef1 が TORC1 活性を直接的に制御している可能性もある。このように、Pef1 は TORC1 制御の上位階層に位置するが、その分子機構の実態は未だ把握できておらず、解析は難航している。特に、Pef1 に関する先行研究は極めて少ないため、Pef1 - TORC1 間の仲介分子を見つけ出すことは極めて挑戦的な課題である。

### Reference

- 1) Weisman, R., M. Choder, and Y. Koltin. "Rapamycin specifically interferes with the developmental response of fission yeast to starvation." *Journal of bacteriology* 179.20 (1997): 6325-6334.
- 2) Matsuda, Shinya, Ushio Kikkawa, and Akio Nakashima. "The *S. pombe* CDK5 orthologue Pef1 cooperates with three cyclins, Clg1, Pas1 and Psl1, to promote pre-meiotic DNA replication." *Biomolecules* 11.1 (2021): 89.
- 3) Yu, Li, et al. "Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR." *Nature* 465.7300 (2010): 942-946.
- 4) Matsuda, Shinya, et al. "The *S. pombe* CDK5 ortholog Pef1 regulates sexual differentiation through control of the TORC1 pathway and autophagy." *Journal of cell science* 133.17 (2020): jcs247817.

## 2. 研究の目的

上述したように、TORC1 は Pef1 による制御を受けて減数分裂の開始・進行を制御していると考えられる。しかしながら、Pef1 に関する先行研究は極めて少なく、特に基質に関する情報が不足しているため、Pef1-TORC1 間のシグナル伝達経路を解明する手立てがない。この現状を打破するために、研究代表者はリン酸化プロテオミクス解析を行い、Pef1 の下流因子を数種類同定した。そこで本研究では、プロテオミクス解析により得られた情報を活用して Pef1 の基質を同定し、Pef1-TORC1 間のシグナル伝達経路解明の糸口を見出す。

## 3. 研究の方法

本研究では、(1) リン酸化プロテオミクス解析により得られた情報を活用し、減数分裂期における Pef1-TORC1 間のシグナル伝達機構を解明する。また、Pef1 と結合するサイクリンは3種類 (Psl1, Clg1, Pas1) が同定されているが、減数分裂期においてどのサイクリンが Pef1 の活性化因子として機能するかは不明である。そこで、(2) 生化学・計算科学の手法を用いて減数分裂期における Pef1 の活性化機構を解き明かす。

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

リン酸化プロテオミクス解析により同定された Pef1 の下流因子について *in vitro* kinase assay を実施し、Pef1 がこれらのタンパク質を直接リン酸化するか検証した。まず Strep タグを融合した基質候補を大腸菌を用いて発現・精製し、分裂酵母から精製した Pef1 と ATP 存在下で反応させ、抗リン酸化 CDK-motif 抗体を用いたウエスタンブロットにより基質候補のリン酸化レベルを評価した。

### (2) Pef1 の活性制御機構の解明

AlfaFold2 によるタンパク質構造予測とドッキングシュミレーションにより Pef1 とサイクリンの結合領域を予測した。シュミレーションに基づき、*in vitro* binding assay により Pef1 とサイクリンの結合部位の同定を試みた。

## 4. 研究成果

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

*In vitro* kinase assay により、Pef1 によってリン酸化されるタンパク質を1つ見出すことができた。現在、そのリン酸化部位の同定と、リン酸化の生理的意義について解析を進めている。また、*pef1* 遺伝子破壊により Atg13 の発現量が増加し、脱リン酸化が促進される傾向があるため、Pef1 が Atg13 のリン酸化制御に直接的に関与するか検証している。

(2) Pef1 の活性制御機構の解明

ドッキングシミュレーションにより、Pef1-Ps1 複合体の構造予測に成功し、Pef1 は Ps1 の cyclin box ドメインと相互作用することが予想された (図 2)。*In vitro* binding assay を行った結果、Pef1 と Ps1 は直接結合することが確認でき (図 3)、現在、その相互作用部位を特定するために点変異突然変異体や部位欠損変異体を用いて実験を進めている。一方で、Pas1 と Clg1 は天然変性領域を有するため、信頼度の高い構造予測データを得ることができなかったが、*in vitro* binding assay により Pef1 と直接結合することが確認できた。また、Pef1-サイクリン複合体が減数分裂のどの時期に、細胞内のどこで形成されるのか調べるために、BiFC (Bimolecular fluorescence complementation) の構築を進めている (図 4)。

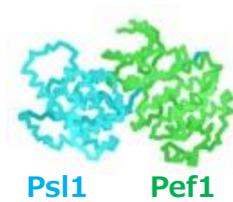


図 2. Pef1-Ps1 複合体の予想構造

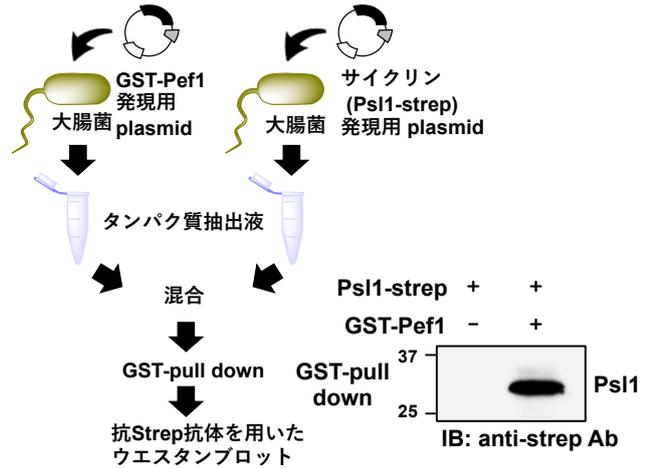


図 3. *In vitro* binding assay の概略図

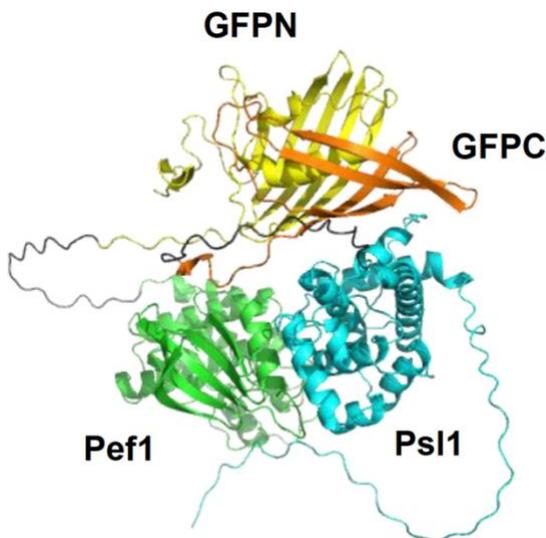


図 4. BiFC における Pef1-Ps1 複合体構造予想図。  
Pef1-Ps1 複合体が形成されると、GFP が再構築されて蛍光を発する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

筑波大学オルガネラ細胞生物学研究室 <a href="https://www.biol.tsukuba.ac.jp/organelle/">https://www.biol.tsukuba.ac.jp/organelle/</a>
--

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
---------	---------