

令和元年6月2日現在

機関番号：34504

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04630

研究課題名(和文) SUMO化修飾による非コードDNA領域の機能制御機構の解明

研究課題名(英文) Functional regulation of non-coding DNA region by SUMO modification

研究代表者

田中 克典 (Tanaka, Katsunori)

関西学院大学・理工学部・教授

研究者番号：60273926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞分裂において、染色体を安定に維持し、正確に分配することがゲノムの安定な継承に重要である。真核生物の染色体上のセントロメアおよびテロメア領域は、染色体の安定維持・分配に極めて重要な役割を果たす。今回筆者らは、分裂酵母をモデル系に用い、ユビキチン様タンパク質SUMOによる翻訳後修飾が、セントロメアおよびテロメア領域の機能を制御する分子機構の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回筆者らは、分裂酵母をモデル系に用い、ユビキチン様タンパク質SUMOによる翻訳後修飾が、セントロメアおよびテロメア領域の機能を制御する分子機構の一端を明らかにした。セントロメアおよびテロメア機能はがんとも密接に関わっており、その関係に注目が集まっている。セントロメアおよびテロメア研究は基礎分野のみならず臨床応用分野にも大きな展開を見せている。本研究成果は、将来的には応用分野にも資する重要な基盤を構築するものと期待する。

研究成果の概要(英文)：In cell division, the stable maintenance and accurate distribution of chromosomes are important for stable inheritance of genomes. The centromere and telomere regions on the eukaryotic chromosome play an extremely important role in stable maintenance and distribution of the chromosome. Here, we used a fission yeast as a model system and clarified one of the molecular mechanisms by which post-translational modification with the ubiquitin-like protein SUMO controls the functions of the centromeric and telomeric regions.

研究分野：分子生物学

キーワード：非コードDNA 染色体 セントロメア テロメア タンパク質翻訳後修飾 分裂酵母 SUMO

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

1. 研究開始当初の背景

真核生物のゲノム DNA の大半はタンパク質をコードしていない非コード DNA 領域で占められている。この非コード DNA 領域は、遺伝子発現、DNA 複製や染色体分配など、染色体上で起こるすべてのイベントを制御、維持する機能を担っている。中でも、テロメア、セントロメア、ヘテロクロマチンの各領域は染色体の安定維持や分配に極めて重要な役割を果たす。

筆者らは分裂酵母をモデル系として、SUMO 化修飾が染色体分配やテロメア長制御等の染色体やクロマチン動態に深く関わることを世界に先駆けて発見してきた⁽¹⁾。SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier) とは、ユビキチンに類似のタンパク質で、ユビキチンと同様に標的タンパク質と共有結合し、そのタンパク質の働きをコントロールする。しかし、その機能はユビキチンとは大きく異なる。これはまさに、SUMO 化修飾が代表的な非コード DNA 領域であるテロメアやセントロメアの機能制御に深く関与することを意味する。特に、SUMO の機能を欠失した分裂酵母株ではテロメアが異常に伸長している点は多くの研究者の興味を惹いた。しかし、それから十数年以上経過しても誰もこの現象を分子レベルで理解・説明できていなかった。筆者は諦めることなくその解明に挑戦し続け、近年、「テロメア長制御において、分裂酵母シェルタリン複合体構成因子 Tpz1 タンパク質の SUMO 化修飾がシェルタリン複合体と Stn1-Ten1 複合体の連携を制御する重要な機構である」という結論に達した (図 1)⁽²⁾。

以上のように、SUMO 化修飾による非コード DNA 領域の制御は、テロメアに関してはその全体像が見えつつある。しかし、Tpz1 の SUMO 化修飾の時空間的な制御や SUMO 化修飾によって誘発されるイベントの詳細等については未解明な部分が多く残っている。一方、セントロメアやヘテロクロマチンに至っては、筆者らは「SUMO 分子がセントロメア局在を示す」ことを見出しているが、未だその全体像が見えてない。

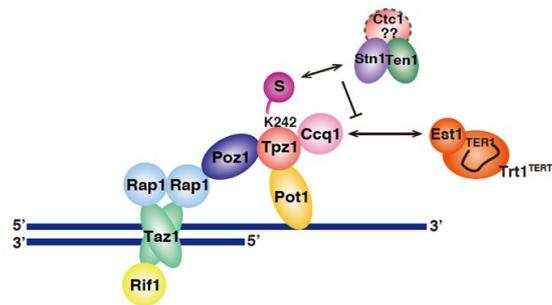


図 1 : Tpz1 の SUMO 化修飾によるテロメア長制御モデル⁽²⁾

2. 研究の目的

上記の背景をもとに、本研究では SUMO 化修飾が非コード DNA 領域であるテロメアとセントロメアの各機能をどのように制御するかを分子レベルで解明することを目的とした。具体的には、分裂酵母をモデル系に用い、テロメア長制御における SUMO 化修飾の果たす役割の分子機構の解明、およびセントロメア機能における SUMO 化修飾の意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) SUMO 化修飾システムによるテロメアの機能の動的な制御の解明

これまでに筆者らは、SUMO 化修飾システムはテロメアを構成するシェルタリン複合体の構成因子の 1 つである Tpz1 を標的とする。そして、Tpz1 は細胞周期の S/G2 期に一過的に SUMO 化修飾を受け、それにより Stn1-Ten1 (CST) 複合体との相互作用が可能となり、その結果テロメラーゼの作用が制限される、ことを提唱してきた (図 1)⁽²⁾。しかし、Tpz1 が SUMO 化修飾を受けることで引き起こされるイベントの詳細な分子機構に関して不明な点も多い。本研究ではこの点を解明すべく、分子遺伝学的手法により下記の研究計画を遂行した。

Tpz1 の SUMO 化修飾によるシェルタリン複合体と CST 複合体の相互作用の分子機構の解明

Tpz1 の SUMO 化修飾の細胞周期依存性を規定する分子機構の解明

(2) SUMO 化修飾システムによるセントロメア/キネトコア機能の動的な制御の解明

これまでに筆者らは、分裂酵母をモデル系にして SUMO 化修飾システムがセントロメア/キネトコア機能に重要な役割を果たすことを見出している。具体的には、SUMO の機能を欠失した分裂酵母株では染色体分配異常を示すこと、および SUMO がセントロメア/キネトコア領域に局在すること、を明らかにしてきた⁽¹⁾。しかし、SUMO が「何を」「どのように」制御してセントロメア/キネトコア機能を動的に調節しているのか、分裂酵母においてその分子機構ははまだ全く不明である。そこで、この点を解き明かすために、まず「何を」という大問題、つまりセントロメア機能における SUMO 化修飾の基質タンパク質の同定に取り組んだ。

4. 研究成果

(1) SUMO 修飾システムによるテロメアの機能の動的な制御の解明

Tpz1 の SUMO 化修飾によるシェルタリン複合体と CST 複合体の相互作用の分子機構の解明

テロメアの長さは主にテロメラーゼの働きにより制御を受ける。これまでに、シェルタリン複合体ともう一つ別のテロメアタンパク質複合体である CST (Ctc1-Stn1-Ten1) 複合体との連携が、テロメラーゼ作用の制御に重要であることが知られている。分裂酵母 CST 複合体である Stn1-Ten1 複合体は、テロメア伸長の終結時にテロメアに結合して、テロメラーゼの働きを阻害すると考えられているが、その分子機構の詳細は未解明のままである。筆者らはこれまでに、

シエルタリン複合体の構成成分である Tpz1 が SUMO 化修飾を受けることで、CST 複合体の構成成分である Stn1 タンパク質との SUMO 分子と SIM 配列間の相互作用を介した新たな相互作用を生じするという作業仮説を提唱し、その相互作用の実体の解明を行った。

-1: Stn1 タンパク質内に存在する SIM 配列の特定

上記の作業仮説に基づき、Stn1 タンパク質内に SIM 機能を有する配列の存在を想定した。SIM 配列にはある程度の多様性があるものの、タンパク質の構造中に (V/I/L/F/Y)(V/I)X(V/I/L) という配列が存在すると SIM として機能する可能性が高いと考えられている。SIM 配列としての保存性および Stn1 の立体構造予測情報により、Stn1 内の L₍₂₀₈₎HVIF₍₂₁₁₎ 配列(207 番目から 211 番目のアミノ酸配列)を SIM 配列の有力候補とした。そこで、208 番目の V (バリン) を A (アラニン) に置換した Stn1^{V208A} 変異体および 211 番目の F (フェニルアラニン) を S (セリン) に置換した Stn1^{F211S} 変異体を作製し SUMO 分子との相互作用を酵母スリーハイブリッド法により検証した。筆者らはすでに、同法により Ten1 タンパク質共存下において Stn1 と SUMO の相互作用の検出に成功している。その結果、Stn1^{V208A} 変異体および Stn1^{F211S} 変異体のどちらも、SUMO との相互作用能を消失していることが分かった。一方、Stn1^{V208A} 変異体および Stn1^{F211S} 変異体のどちらも Ten1 タンパク質との相互作用には影響を及ぼさないことが分かった(図2)。これらの結果より、Stn1 内の L₍₂₀₈₎HVIF₍₂₁₁₎ 配列が SUMO 化修飾を受けた Tpz1 が作用する SIM 配列であることが強く示唆された。

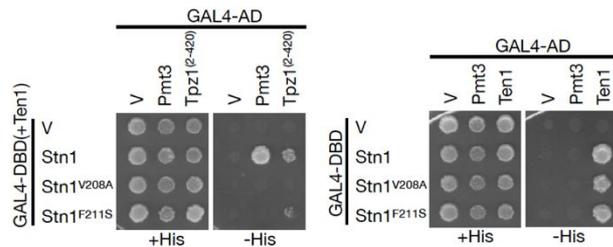


図2: 酵母スリーハイブリッド法およびツーハイブリッド法による Stn1 タンパク質内の SIM 配列の同定

-2: Stn1 タンパク質の SIM 配列変異がテロメア長に及ぼす影響

SUMO 化修飾によるテロメア長制御に重要な SIM 配列としての機能が Stn1^{V208A} 変異体および Stn1^{F211S} 変異体により消失する場合、これらの変異がテロメア伸長に与える影響は SUMO 破壊株や Tpz1 の SUMO 化消失変異体と同程度であるべきである。そこで、Stn1^{V208A} 変異体および Stn1^{F211S} 変異体がテロメア長制御に与える影響を調べた。Stn1^{V208A} 変異体および Stn1^{F211S} 変異体を分裂酵母染色体上に導入し、分裂酵母 Stn1^{V208A} 変異体および Stn1^{F211S} 変異体を作製し、テロメア長に及ぼす影響を評価した。その結果、両変異体において SUMO 破壊株や Tpz1 の SUMO 化消失変異体と同程度のテロメア伸長が見られた。よって、Stn1 内の L₍₂₀₈₎HVIF₍₂₁₁₎ 配列が、機能的にも SUMO 化修飾によるテロメア長制御に重要な SIM 配列であることが強く示唆された。

昨年、海外の他グループが筆者らの同定した配列とは別の配列を SIM 配列として報告した⁽³⁾。しかし、他グループが提唱する SIM 配列の変異体では、Tpz1 の SUMO 化消失変異体の示す表現型に加えて、他の機能欠損も有していることが分かった。一方、我々が提唱する SIM 配列の変異体は Tpz1 の SUMO 化消失変異体の示す表現型と全く同一であることが分かった。よって、我々が同定した SIM 配列が、機能的にも SUMO 化修飾によるテロメア長制御に直接関与するものであることが強く示唆された。

Tpz1 の SUMO 化修飾の細胞周期依存性を規定する分子機構

筆者らは、Tpz1 の SUMO 化修飾が細胞周期進行の S 期後期から G2 期移行の時期に顕著に上昇することを見いだしている⁽²⁾。この Tpz1 の SUMO 化修飾のタイミングは、テロメラーゼによるテロメア伸長の終了時期と非常によく一致している。つまり、Tpz1 の SUMO 化修飾のタイミングがテロメラーゼの作用の制御に重要であることが強く示唆されている。しかし、細胞周期の特定の時期のみに Tpz1 の SUMO 化を生じさせる仕組みに関しては全く不明である。そこで今回、その仕組みの解明を試みた。

-1: Tpz1 の SUMO 化修飾の細胞周期依存性を規定する因子の探索

筆者らは、Tpz1 の SUMO 化修飾に中心的に働く PIAS 型 E3 リガーゼとして Pli1 タンパク質を同定している⁽²⁾。今回、クロマチン免疫沈降法により Pli1 がテロメア DNA 領域に特異的に結合することを見いだした。この事実、Tpz1 の SUMO 化修飾が Pli1 依存的にテロメア領域で起こることを強く示唆する。そこで、SUMO 化修飾 E3 リガーゼである Pli1 が Tpz1 の SUMO 化修飾の細胞周期依存性を規定する因子である可能性を検討した。その結果、Pli1 のテロメア領域への結合のタイミングが Tpz1 の SUMO 化修飾のタイミングと非常に類似していることが明らかとなった。これらの結果から、SUMO 化修飾 E3 リガーゼである Pli1 の挙動が Tpz1 の SUMO 化修飾のタイミングを規定している可能性が示唆された。

-2: Pli1 と相互作用するテロメア関連因子の同定

Pli1 がテロメア領域に局在する仕組みを明らかにするために、Pli1 タンパク質と相互作用するテロメア関連因子を検索した。酵母ツーハイブリッド法により既知のテロメア関連因子群と Pli1 の結合の可能性を検証した結果、Pli1 が Rif1 タンパク質と相互作用することを見いだした。Rif1 はテロメア領域に結合し、テロメア長制御に関与することが知られている。そこで、Pli1 と Rif1 の相互作用の生物学的意義を明らかにする為に、両者の相互作用に必要なそれぞれのタンパク質領域の特定を行った。その結果、Pli1 と Rif1 の相互作用に必要な領域はそれ

それぞれのC末端側領域であることが分かった。

(2) SUMO 修飾システムによるセントロメア/キネトコア機能の動的な制御の解明

今回筆者らは、GFP-SUMO の共焦点レーザー顕微鏡観察により、SUMO のセントロメア/キネトコア局在を高感度で簡便に評価可能なシステムの構築に成功した(図3)。このシステムにより、SUMO のセントロメア/キネトコア局在が G1/S 期付近で発生し、その修飾には主として Pli1 の E3 リガーゼ機能が関与することを見いだした。

現在このシステムを駆使して、「セントロメア/キネトコアに局在する特定のタンパク質が G1/S 期に SUMO 化を受ける」という観点から、SUMO 修飾の基質タンパク質の特定を行っている。セントロメア/キネトコアの構成やその機能は、複数の階層の機能複合体から成り立っており、それぞれの階層には依存性がある。そこで、各機能複合体の構成因子の条件致死(主に温度感受性)変異株を用いて、各変異が GFP-SUMO のセントロメア/キネトコア局在性にどのような影響を与えるかを指標に、SUMO のセントロメア/キネトコア局在の足場となる機能複合体を特定を行っている。直接の足場となる機能複合体を特定できれば、その上の階層(上流)に位置する機能複合体の中に SUMO 化基質タンパク質が存在すると判断可能となる。分裂酵母のセントロメア/キネトコアを構成する因子群の 1/3~1/4 程度に関しては、温度感受性変異等の変異株が入手可能である。

また、酵母ツーハイブリッド法により Pli1 と結合する因子として Cnp3^{CENP-C} の同定に成功した。古くから SUMO 修飾システムと CENP-C との接点が提唱されている。しかし、その実体はいまだ謎のままである。申請者らは、Cnp3^{CENP-C} は Pli1 だけでなく、SUMO E2 結合酵素である Hus5、そして SUMO 自体とも全て、Cnp3^{CENP-C} の C 末端側領域を介して相互作用することを見いだした。これらの発見を手掛かりに、Cnp3^{CENP-C} が SUMO 化基質タンパク質である可能性、およびセントロメア/キネトコア領域の SUMO 化反応の足場として機能している可能性、を追求していく準備は整った。

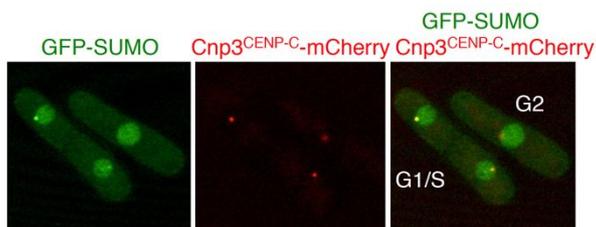


図3 : G1/S 期特異的な SUMO のセントロメア/キネトコア局在

(3) まとめ

細胞分裂において、染色体を安定に維持し、正確に分配することがゲノムの安定な継承に重要である。真核生物の染色体上のセントロメアおよびテロメア領域は、染色体の安定維持・分配に極めて重要な役割を果たす。今回筆者らは、分裂酵母をモデル系に用い、ユビキチン様タンパク質 SUMO による翻訳後修飾が、セントロメアおよびテロメア領域の機能を制御する分子機構の一端を明らかにした。セントロメアおよびテロメア機能はがんとも密接に関わっており、その関係に注目が集まっている。セントロメアおよびテロメア研究は基礎分野のみならず臨床応用分野にも大きな展開を見せている。本研究成果は、将来的には応用分野にも資する重要な基盤を構築するものと期待する。

<引用文献>

- (1) K. Tanaka, *et al.*, *Mol Cell Biol*, 1999
- (2) K. Miyagawa, *et al.*, *PNAS*, 2014
- (3) S. Matmati, *et al.*, *Sci Ad.*, 2018

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

Hayashi A, Tanaka K

Short-Homology-Mediated CRISPR/Cas9-Based Method for Genome Editing in Fission Yeast. *G3*. 9(4):1153-1163. (2019)

DOI: 10.1534/g3.118.200976

Fujiwara C, Muramatsu Y, Nishii M, Tokunaka K, Tahara H, Ueno M, Yamori T, Sugimoto Y, Seimiya H

Cell-based chemical fingerprinting identifies telomeres and lamin A as modifiers of DNA damage response in cancer cells. *Sci. Rep.* 8(1):14827. (2018)

DOI: 10.1038/s41598-018-33139-x.

Kotomura N, Tsunemine S, Kuragano M, Asanuma T, Nakagawa H, Tanaka K, Murakami Y

Sfh1, an essential component of the RSC chromatin remodeling complex, maintains genome integrity in fission yeast. *Genes Cells*, 23(9):738-752. (2018)

DOI: 10.1111/gtc.12629

Habib AGK, Sugiura K, Ueno M

Chromosome passenger complex is required for the survival of cells with ring chromosomes in fission yeast. *PLoS One*. 13(1). e0190523. (2018).

DOI: 10.1371/journal.pone.0190523.
Sugihara A, Nguyen LC, Shamim HM, Iida T, Mai T, Takegawa K, Senda M, Jida S, Ueno M. Mutation in fission yeast phosphatidylinositol 4-kinase Pik1 is synthetically lethal with defect in telomere protection protein Pot1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 496(4). 1284-1290. (2018). DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.02.001.
Noguchi C, Grothusen G, Anandarajan V, Martínez-Lage García M, Terlecky D, Corzo K, Tanaka K, Nakagawa H, Noguchi E. Genetic controls of DNA damage avoidance in response to acetaldehyde in fission yeast. *Cell Cycle*, 16(1):45-58. (2017) DOI: 10.1080/15384101.2016.1237326.
Shamim HM, Minami Y, Tanaka D, Ukimori S, Murray JM, Ueno M. Fission yeast strains with circular chromosomes require the 9-1-1 checkpoint complex for the viability in response to the anti-cancer drug 5-fluorodeoxyuridine. *PLoS One*. 12(11). e0187775. (2017). DOI: 10.1371/journal.pone.0187775
Pichugina T, Sugawara T, Kaykov A, Schierding W, Masuda K, Uewaki J, Grand RS, Allison JR, Martienssen RA, Nurse P, Ueno M, O'Sullivan JM. A diffusion model for the coordination of DNA replication in *Schizosaccharomyces pombe*. *Sci. Rep.* 6: 18757 (2016). DOI: 10.1038/srep18757.
Habib AG, Masuda K, Yukawa M, Tsuchiya E, Ueno M. Long G2 accumulates recombination intermediates and disturbs chromosome segregation at dysfunction telomere in *S. pombe*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 464(1):140-146. (2015). DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.06.098.
Imamura Y, Yu F, Nakamura M, Chihara Y, Okane K, Sato M, Kanai M, Hamada R, Ueno M, Yukawa M, Tsuchiya E. RSC Chromatin-Remodeling Complex Is Important for Mitochondrial Function in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*. 10(6). e0130397. (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0130397.
Wan K, Kawara H, Yamamoto T, Kume K, Yabuki Y, Goshima T, Kitamura K, Ueno M, Kanai M, Hirata D, Funato K, Mizuta K. The essential function of Rrs1 in ribosome biogenesis is conserved in budding and fission yeasts. *Yeast*. 32(9). 607-614. (2015). DOI: 10.1002/yea.3083.
Yu F, Imamura Y, Ueno M, Suzuki SW, Ohsumi Y, Yukawa M, Tsuchiya, E. The yeast chromatin remodeler Rsc1-RSC complex is required for transcriptional activation of autophagy-related genes and inhibition of the TORC1 pathway in response to nitrogen starvation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 464(4). 1248-1253. (2015). DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.07.114.
Nanbu T, Nguyễn LC, Habib AG, Hirata N, Ukimori S, Tanaka D, Masuda K, Takahashi K, Yukawa M, Tsuchiya E, Ueno M. Fission yeast Exo1 and Rqh1-Dna2 redundantly contribute to resection of uncapped telomeres. *PLoS One*. 10(10). e0140456. (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0140456.

[学会発表](計 30 件)

今野あや、川上慶、林 亜紀、田中克典
「SUMO-SIM 相互作用を介した分裂酵母のテロメア長制御機構」
第 36 回染色体ワークショップ・第 17 回核ダイナミクス研究会 2019 年 1 月
林 亜紀、田中克典
「CRISPR/Cas9 システムを用いた分裂酵母の遺伝子改変手法の確立」
酵母遺伝学フォーラム 第 51 回研究報告会 (福岡市) 2018 年 9 月
Mutiar P. Ningtyas、浅井拓馬、浅井駿祐、藤澤志帆、林 亜紀、田中克典
「分裂酵母 Rif1 と SUMO E3 リガーゼ Pli1 の相互作用」
第 35 回染色体ワークショップ・第 16 回核ダイナミクス研究会 2017 年 12 月
Mutiar P. Ningtyas, Takuma Asai, Shunsuke Asai, Shiho Fujisawa, Aki Hayashi, Katsunori Tanaka
「分裂酵母 Rif1 と SUMO E3 リガーゼ Pli1 の相互作用」
生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017 年 12 月

田中克典

「SUMO 翻訳後修飾による染色体末端テロメア長制御」

第 89 回 日本生化学会大会（仙台）2016 年 9 月（招待シンポジウム講演）

Katsunori Tanaka

「Regulation of telomere by SUMOylation in fission yeast」

ICY2016(14th International Congress on Yeasts) 2016.9

Mutiara P.Ningtyas、藤澤志帆、在田朋晃、林亜紀、田中克典

「SUMO 化による分裂酵母テロメア長制御機構の解明」

第 33 回 染色体ワークショップ、第 14 回 核ダイナミクス研究会 2016 年 1 月

Mutiara P.Ningtyas, Shiho Fujisawa, Tomoaki Arita, Katsunori Tanaka

「Pli1, an E3 Ligase for Tpz1 SUMOylation in Telomere Regulation, Interacts with Rif1 In Fission Yeast」BMB2015 2015.12

Katsunori Tanaka, Keisuke Miyagawa, Tomoaki Arita, Shiho Fujisawa, Toru M. Nakamura

「SUMOylation regulates telomere length by targeting the shelterin subunit Tpz1」
The Eighth International Fission Yeast Meeting Pombe2015 2015.6

（他 21 件）

〔その他〕

ホームページ等

<https://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~tanaka/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：上野 勝

ローマ字氏名：UENO Masaru

所属研究機関名：広島大学

部局名：先端物質科学研究科

職名：准教授

研究者番号（8 桁）：90293597

(2)研究協力者

研究協力者氏名：山口 宏

ローマ字氏名：YAMAGUCHI Hiroshi

研究協力者氏名：林 亜紀

ローマ字氏名：HAYASHI Aki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。