

令和元年5月18日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K14450

研究課題名(和文) 間期染色体の核内ダイナミクス決定機構の解明に向けて

研究課題名(英文) Mechanism of intra-nuclear localization of fission yeast chromosome

研究代表者

升方 久夫 (Masukata, Hisao)

大阪大学・その他部局等・名誉教授

研究者番号：00199689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：真核細胞核では遺伝情報を担う染色体はダイナミックに形や位置を変えながら、生命の維持と継承に必要な様々な生命反応を行う。我々は、核内の染色体空間配置が果たす役割を明らかにしようと考え、DNA複製反応に重要な複製開始点の核内局在を解析した。単細胞真核生物である分裂酵母で、蛍光を発するLacI-GFPを複製開始点近傍に結合させ生細胞内で蛍光イメージを解析した。その結果、一群の複製開始点は、複製プログラムが決定されるG1/S期にだけ、複製開始を遅らせる要素を集積したテロメアに近接することによって、S期後期に複製するよう制御されることを発見した。特異的核内配置が複製制御に必要であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで複製開始制御と核内配置の関係は明らかにされていなかったが、目印となる蛍光タンパク質を特定の複製開始点に結合させることにより、生きた酵母細胞で複製開始点の高解像度観察が可能になった。本研究は、染色体末端テロメアが遠く離れた染色体内部とコミュニケーションするしくみを明らかにしたことになり、将来テロメアが遠隔制御する疾患原因遺伝子の発見ならびに疾患の予防につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：For faithful duplication of genetic information, DNA replication initiates from many distinct sites on eukaryotic chromosomes in a manner to be regulated by a spatiotemporal program, although the molecular mechanisms of regulation has not been uncovered. We discovered that the higher-order chromatin communication of the telomeres and internal late replication origin plays important role in replication-timing control. Using LacI-GFP fluorescent protein bound to lacO repeat inserted nearby replication origins in fission yeast *Shizosaccharomyces pombe*, we found that late replication origins are localized at the nuclear periphery and adjacent to telomeres especially in G1/S phase when replication-timing is determined. Telomere-binding protein complex “shelterin” is required for telomere-association of the internal replication origins, although the nuclear peripheral localization is not important. These finding provide insight into a novel mechanism of replication control by telomeres.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：テロメア 複製開始点 複製タイミング 分裂酵母 shelterin

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

### 1. 研究開始当初の背景

真核生物では、遺伝情報を担う DNA の複製や遺伝情報を読み取る転写などの生命維持に必須の反応は細胞核の中で行われる。これらの反応では、細胞核中に収められた染色体 DNA の特定領域と特異的タンパク質の相互作用が主要な役割を果たす。近年、chromatin conformation capture (3C)などの手法により、染色体の遠隔領域同士が近接した空間配置を取ることが明らかになっている。しかしながら、核内染色体は細胞周期によってダイナミックに変動しながら機能しており、セントロメアやテロメア以外の個別の染色体領域の機能と核内配置の関係はほとんど明らかになっていない。

いっぽう、DNA 複製は細胞分裂に先だってゲノム全体を完全に倍加する反応である。興味深いことに、染色体上のどの場所がいつ複製されるかは厳密に決まっており、複製タイミングを制御するしくみや意義はまだ十分に解明されていない。我々は、分裂酵母染色体の全複製開始点を同定し、遅い時期に複製する複製開始点の近傍に 2 コピーのテロメア配列があり、そこにテロメア結合タンパク質 Taz1 が結合することがタイミング制御に重要であることを見いだした。本研究では、染色体内部の複製開始制御に特異的な空間配置が関与するのではないかと考え、そのしくみを解明しようとした。

### 2. 研究の目的

核内空間配置の意義を明らかにしようとするとき、全体を包括的に解析することも重要であるが、具体的に個別領域の機能と配置を結びつけて理解することは欠かせない。我々は、分裂酵母で S 期後期に複製するよう制御されている複製開始点の制御にテロメア因子 Taz1 が関与することに着目し、この制御機構にテロメアや核内空間配置が関与するのではないかと考えた。これまで、ほ乳類細胞や出芽酵母では、S 期初期に核の中央部が複製し、核膜周辺は中期後期に複製することが知られているが、実際に核内配置が複製タイミングを制御するかどうかは明らかではない。本研究では、分裂酵母を用いて、複製タイミングと核内配置に特異的関連があるかを明らかにし、複製制御における核内空間配置の意義を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 分裂酵母第 2 染色体上にある後期複製開始点 (*AT2088*, *ori2100*, *ars727*) と初期複製開始点 (*ars2004*, *ori2024*, *ori2123*) の近傍 (500-1000 bp) に 64 コピーの LacO リピート配列を挿入し、*his3* 座位から LacI-GFP を発現させて、LacO に結合した LacI-GFP の蛍光イメージを生細胞で観察した。細胞核内の位置を比較するため、核膜内構成因子である *Ish1* に mCherry を融合した *Ish1*-mCherry を発現させ同時に解析した。

(2) いっぽうテロメアと複製開始点の核内配置を可視化し比較するため、Taz1-mCherry を発現させ、LacI-GFP との距離を計測した。

(3) 複製タイミングを解析する方法として、DNA 合成基質チミンの類似物質である 5-bromodeoxyuridin (BrdU) を分裂酵母細胞で利用するために、動物ウイルス由来の thymidine kinase を発現させた。細胞周期同調し、DNA 合成を阻害するヒドロキシ尿素を加えて S 期初期に合成される DNA を標識し、CsCl 密度勾配遠心法で、複製した重い DNA と未複製 DNA を分離した。各染色体領域を増幅するプライマーを用いた定量 PCR 法により、複製量を算出した。

(4) 上記(1)(2)(3)の手法により得られる複製開始点の核内配置と複製タイミングがどのようなくみにより制御されるかを明らかにするため、テロメアを核膜につなぎ留める役割を持つ Bqt4、テロメアで Taz1 と相互作用しつつ Shelterin を構成する Rap1 と Poz1 などの遺伝子破壊株を用いた。

### 4. 研究成果

(1) Taz1 依存後期複製開始点は高頻度で核膜近傍に局在する。複製開始点の核内配置を同定するため、複製開始点の LacO-LacI-GFP シグナルが核膜因子 *Ish1*-mCherry のリング状シグナルに重なる状態 (Peripheral) と両者が離れた状態 (non-peripheral) の細胞数を計測し、Fisher 検定で統計的解析を行った。その結果、Taz1 に依存して後期タイミングに制御される (以下 Taz1 依存開始点) *AT2088* と *ori2100* は 80% 以上の細胞で核膜に局在した (図 1)。それに対し、初期開始点 (*ars2004*, *ori2024*, *ori2123*) は有意な頻度の核膜局在は見られなかった。また Taz1 に依存しない後期開始点 *ars727* も特異的局在を示さなかった。*AT2088* の核膜局在は *AT2088* 近傍のテロメアリピートと Taz1 に依存した。

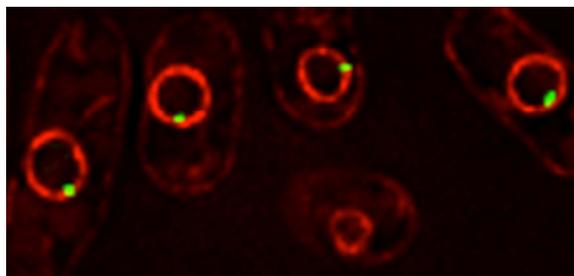


図 1. 後期複製開始点の核膜局在  
Taz1 依存性の後期複製開始点 *AT2088* (LacO-LacI-GFP; 緑) は高頻度で核膜 (*Ish1*-mCherry; 赤) に局在する

以上の結果から、Taz1 依存開始点が高頻度で核膜近傍に局在すると結論した。(小川志帆; 日本分子生物学会第 40 回年会発表 2017 年)。

(2) Taz1 依存後期複製開始点は細胞周期 G1-S 期にテロメアに近接する。垂直軸の単一切片上で複製開始点 Lac0-LacI-GFP と最も近いテロメア Taz1-mCherry シグナルの距離を計測し、統計的解析を行った。Taz1 依存後期複製開始点 AT2088 は、G1-S 期細胞特異的にテロメアに近接したが G2 期細胞では距離が増大した ( $p < 0.0001$ , Kruskal-Wallis test) (図 2)。いっぽう、初期開始点 *ars2004* や、Taz1 に依存しない *ars727* は G1-S 期にもテロメアに近接しなかった。よって、テロメアへの近接は Taz1 依存後期複製開始点に特有の性質と考えられる(小川志帆; 日本分子生物学会第 40 回年会発表 2017 年)。

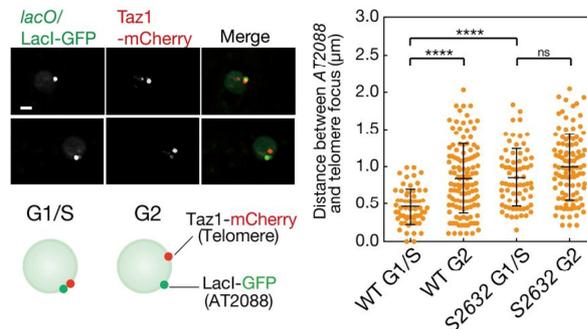


図 2. 後期複製開始点のテロメアへの近接  
Taz1 依存性の後期複製開始点 AT2088 は G1/S 期特異的にテロメアに近接した局在を示す

(3) 複製タイミング制御に核膜局在は関与しない。テロメアは Rap1 と Bqt3/4 の相互作用を介して核膜に繫留されている。テロメアの核膜繫留が、後期複製開始点のテロメア

との近接や後期タイミング制御に関与するかどうかを明らかにするため、Bqt4 を欠失させた細胞で後期複製開始点の核内局在を解析した。その結果、*bqt4* 欠失細胞では、テロメアだけでなく後期複製開始点も核膜から離れて内部に局在したことから、後期複製開始点の核膜局在は Bqt4 に依存することが示された。興味深いことに、内部に移動したテロメアと後期複製開始点は G1/S 期での近接は維持され、さらに後期複製タイミングも野生株同様維持されていた。これらの結果から、核膜局在は後期複製タイミングに関与しないと結論した。

(4) Shelterin は後期複製タイミング制御と複製開始点のテロメア近接に関与する。テロメアタンパク質 shelterin 複合体の構成因子 Rap1 あるいは Poz1 を欠失した細胞では、染色体内部の Taz1 依存後期開始点が S 期初期に複製するようになり、またテロメアとの隣接も消失した。

Shelterin は遠く離れた染色体内部に結合した Taz1 と協調して複製開始点をテロメアに近接させる役割を担うと考えられる(城戸; 日本分子生物学会第 40 回年会発表 2017 年、Ogawa et al, EMBO Journal, 2019)。

(5) Shelterin 機能を部分的に回復する Tpz1-Taz1 融合タンパク質を発現させることにより、Rap1, Poz1 の無い条件でも後期複製開始点のタイミング制御とテロメア隣接が回復した(図 3)。しかし、核膜への局在は失われたままであった。以上の結果から、shelterin は染色体内部の複製開始点をテロメアに近接させる役割を持ち、テロメアへの近接が複製タイミング制御に必要であることが示唆された。

(6) 以上の結果から、染色体内部の後期複製開始点に結合した Taz1 は shelterin との相互作用を介して、複製開始点を核膜にあるテロメアに近接させ、テロメアに集積する Rif1-PP1 脱リン酸化酵素が複製開始に必要な複製因子リン酸化を阻害することにより、後期複製タイミングに制御すると推論した(図 4)。以上の結果は、テロメア近接という核内配置が染色体内部の複製制御に重要な役割を果たすことを示す最初の発見であり、EMBO Journal (2018) に掲載され、掲載号の表紙に採用された。

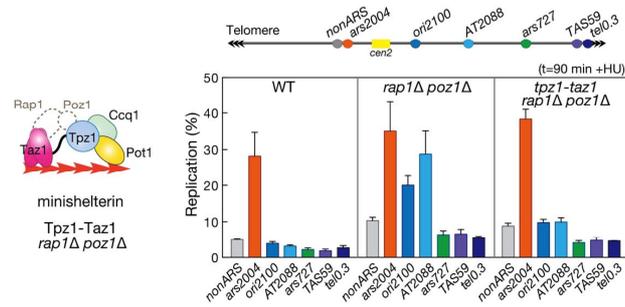


図 3. Tpz1-Taz1 融合タンパク質は複製制御における Rap1 と Poz1 の役割をバイパスする  
*rap1Δ poz1Δ* 株で Tpz1-Taz1 融合タンパク質の発現は、内部の後期開始点(青色バー)の初期複製を抑制した。

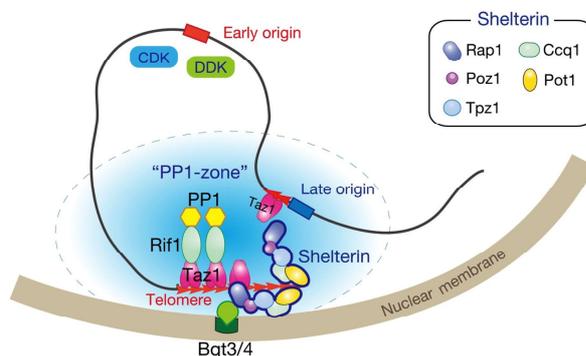


図 4. Shelterin を介したテロメアへの近接が染色体内部の複製開始を抑制する

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 8 件)

Ogawa, S., Kido, S., Handa, T., Ogawa, H., Asakawa, H., Takahashi, TS., Nakagawa, T., Hiraoka, Y., **Masukata, H.** Shelterin promotes tethering of late replication origins to telomeres for replication-timing control. *EMBO J*, 査読有、37 (15) e98997 doi: 10.15252/embj.201898997 (2018).

Terui, R., Nagao, K., Kawasoe, Y., Taki, K., Higashi, TL., Tanaka, S., Nakagawa, T., Obusae, C., **Masukata, H.**, Takahashi, TS. Nucleosomes around a mismatched base pair are excluded via an Msh2-dependent reaction with the aid of SNF2-family ATPase Smrcad1. *Genes. Dev.* 査読有、32(11-12):806-821. doi: 10.1101/gad.310995.117. (2018).

Zafar, F., Okita, AK., Onaka, AT., Su, J., Katahira, Y., Nakayama, J. Takahashi, TS., **Masukata, H.**, Nakagawa, T. Regulation of mitotic recombination between DNA repeats in centromeres. *Nucle. Acids Res.*、査読有、44(22),11222-11235, doi.org/10.1093/nar/gkx763 (2017).

Onaka, AT., Toyofuku, N., Inoue, T., Okita, AK., Sagawa, M., Su, J., Shitanda, T., Matsuyama, R., Zafar, F., Takahashi, TS., **Masukata, H.**, Nakagawa, T. Rad51 and Rad54 promote noncrossover recombination between centromere repeats on the same chromatid to prevent isochromosome formation. *Nucle. Acids Res.*、査読有、44(22),10744-10757, doi:10.1093/nar/gkw874 (2016).

Kawasoe, Y., Tsurimoto, T., Nakagawa, T., **Masukata, H.**, Takahashi, TS. MutS maintains the mismatch repair capability by inhibiting PCNA unloading. *eLIFE*、査読有、12;5. pii: e15155. doi:10.7554/eLife.15155(2016).

Tashiro, S., Handa, T., Matsuda, A., Ban, T., Takigawa, T., Miyasato, K., Ishii, K., Kugou, K., Ohta, K., Hiraoka, Y., **Masukata, H.** and Kanoh, J. Shugoshin forms a specialized chromatin domain at subtelomeres that regulates transcription and replication timing. *Nature Communications*、査読有、7 (3), Article number: 10393. doi: 10.1038/ncomms10393 (2016).

Ruan, K., Yamamoto, TG., Asakawa, H., Chikashige, Y., Kimura, H., **Masukata, H.**, Haraguchi, T., Hiraoka, Y. Histone H4 acetylation required for chromatin decompaction during DNA replication. *Scientific Reports*、査読有、5, 12720. doi: 10.1038/srep12720 (2015).

Ruan, K., Yamamoto, TG., Asakawa, H., Chikashige, Y., **Masukata, H.**, Haraguchi, T., Hiraoka, Y. Meiotic nuclear movements in fission yeast are regulated by the transcription factor Mei4 downstream of a Cds1-dependent replication checkpoint pathway. *Genes Cells*、査読有、20 (3), 160-172. doi: 10.1111/gtc.12207, (2015).

### 〔学会発表〕(計 27 件)

城戸沙友里、小川志帆、高橋達郎、中川拓郎、**升方久夫**、分裂酵母シェルタリンによる複製開始タイミング制御機構、第 40 回日本分子生物学会年会、(神戸、2017 年)。

小川志帆、半田哲也、中村優太、高橋達郎、中川拓郎、小川英知、浅川東彦、平岡泰、**升方久夫**、テロメア結合タンパク質およびシェルタリン構成因子による DNA 複製の時空間的制御機構の解明、第 40 回日本分子生物学会年会、(神戸、2017 年)。

小川志帆、城戸沙友里、小川英知、浅川東彦、高橋達郎、中川拓郎、平岡泰、**升方久夫**、Spatial and temporal control of chromosome DNA replication by telomere binding proteins. Eukaryotic DNA Replication and Genome Maintenance (Cold Spring Harbor, NY USA, 2017 年)(国際)。

**升方久夫**、Spatial and temporal control of chromosomal DNA replication by telomere sequence and telomere binding proteins in the fission yeast nucleus、The 9th International Fission Yeast Meeting. (Banff, Canada, 2017 年)(国際)。

申麗紅、菅家舞、高橋達郎、中川拓郎、**升方久夫**、複合体構造変化を介した分裂酵母 Mcm2-7 ヘリカーゼ活性化機構、第 39 回日本分子生物学会年会(横浜、2016 年)。

林みず紀、**升方久夫**、分裂酵母 Sld3-N 末端領域の効率的複製開始に果たす役割、第 39 回日本分子生物学会年会(横浜、2016 年)。

小川志帆、半田哲也、中村優太、高橋達郎、中川拓郎、小川英知、浅川東彦、平岡泰、**升方久夫**、Temporal and spatial regulation of replication by telomere binding proteins in fission yeast. 第 10 回 3R Symposium(松江、2016 年)(国際)。

**升方久夫**、Control of DNA replication timing and location by telomere-binding proteins in fission yeast. 第 10 回 3R Symposium(松江、2016 年)(招待、国際)。

**升方久夫**、Control of subnuclear localization and replication timing by telomere binding proteins in fission yeast、FASEB Science Research Conferences, Yeast Chromosome

Structure, Replication and Segregation, (Snowmass, Colorado, USA, 2016 年)(招待、国際).

**升方久夫**, Control of replication timing and subnuclear localization by telomere binding proteins in fission yeast, DNA Metabolism, Genomic Stability and Disease, Cold Spring Harbor Asia, (Suzhou, China, 2016 年)(招待、国際).

沖慶太郎、豊福直子、高橋達郎、**升方久夫**、中川拓郎、セントロメア領域での染色体再編に必要な新規因子の同定、第 38 回日本分子生物学会年会 (神戸、2015 年).

中村優太、半田哲也、高橋達郎、中川拓郎、**升方久夫**、Rif1 と PP1 による分裂酵母染色体の複製タイミング制御機構、第 38 回日本分子生物学会年会 (神戸、2015 年).

織田里美、照井利輝、鐘巻将人、中川拓郎、**升方久夫**、高橋達郎、MutS / 依存的に DNA に呼び込まれる新規ミスマッチ修復関連因子、第 38 回日本分子生物学会年会 (神戸、2015 年).

⑭ 粥川太貴、東寅彦、中川拓郎、**升方久夫**、高橋達郎、コヒーシスが複製後の DSB 修復に機能する機構の新規試験管内系による解析、第 38 回日本分子生物学会年会 (神戸、2015 年).

豊福直子、高橋達郎、**升方久夫**、中川拓郎、分裂酵母セントロメアで起こる染色体再編の分子メカニズム、第 38 回日本分子生物学会年会 (神戸、2015 年).

蘇傑、沖田暁子、高橋達郎、**升方久夫**、中川拓郎、Fission yeast CENP-T nucleosomes promote the isochromosome formation in centromere., 第 38 回日本分子生物学会年会 (神戸、2015 年).

照井利輝、滝佳菜恵、長尾恒治、田中誠司、久保田弓子、中川拓郎、滝澤温彦、小布施力史、**升方久夫**、高橋達郎、MutS はクロマチンリモデリング因子やヒストンシャペロンを呼び込むことでミスマッチ塩基周辺のヌクレオソーム排除を促進する、第 38 回日本分子生物学会年会 (神戸、2015 年).

小川志帆、中村優太、高橋達郎、中川拓郎、小川英知、浅川東彦、平岡泰、**升方久夫**、テロメア結合タンパク質による DNA 複製の時空間的制御機構、第 38 回日本分子生物学会年会ワークショップ (神戸、2015 年).

高橋達郎、河添好孝、釣本敏樹、中川拓郎、**升方久夫**、DNA 複製とミスマッチ修復の機能的相関、第 38 回日本分子生物学会年会ワークショップ (神戸、2015 年).

高橋達郎、河添好孝、釣本敏樹、中川拓郎、**升方久夫**、The mechanism of the MutS -dependent strand memory reaction in Xenopus egg extract. Eukaryotic DNA Replication and Genome Maintenance (Cold Spring Harbor, NY USA, 2015 年)(国際).

⑮ 小川志帆、中村優太、半田哲也、小川英知、浅川東彦、高橋達郎、中川拓郎、平岡泰、**升方久夫**、Replication timing control by telomere-adjacent nuclear localization. Eukaryotic DNA Replication and Genome Maintenance (Cold Spring Harbor, NY USA, 2015 年)(招待、国際).

⑯ 蘇傑、高橋達郎、**升方久夫**、中川拓郎、CENP-T histone-fold protein suppresses translocation in fission yeast. 第 8 回 International Fission Yeast Meeting (神戸、2015 年)(国際).

⑰ 大仲惇司、片平泰弘、沖田暁子、浅井麗伊、高橋達郎、**升方久夫**、中川拓郎、Rad51-independent recombination between centromere repeats causes gross chromosomal rearrangement in fission yeast. 第 8 回 International Fission Yeast Meeting (神戸、2015 年)(国際).

⑱ 小川志帆、中村優太、高橋達郎、中川拓郎、小川英知、浅川東彦、平岡泰、**升方久夫**、Temporal and spatial regulation of replication in fission yeast. 第 8 回 International Fission Yeast Meeting (神戸、2015 年)(国際).

⑳ 中川拓郎、沖田暁子、高橋達郎、**升方久夫**、H3K9 methylation in heterochromatin suppresses gross chromosomal rearrangement in centromere in mitotic cells. 第 8 回 International Fission Yeast Meeting (神戸、2015 年)(国際).

㉑ 田代三喜、半田哲也、松田厚志、坂琢人、瀧川徹、宮里和実、石井浩二郎、久郷和人、太田邦広、平岡泰、**升方久夫**、加納純子、Shugoshin forms a specialized chromatin domain at subtelomeres, repressing transcription and replication. 第 8 回 International Fission Yeast Meeting (神戸、2015 年)(国際).

㉒ **升方久夫**、中村優太、小川英知、浅川東彦、高橋達郎、中川拓郎、平岡泰、小川志帆、Replication timing control by telomere-adjacent nuclear localization in fission yeast. 第 8 回 International Fission Yeast Meeting (神戸、2015 年)(招待、国際).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio\\_web/lab\\_page/masukata/](http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/masukata/)

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

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。