

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570165

研究課題名(和文) 姉妹染色体分離期において染色体末端テロメアが果たす機能の解明

研究課題名(英文) Functions of telomere in chromosome segregation

研究代表者

加納 純子 (KANO JUNKO)

大阪大学・蛋白質研究所・特任准教授

研究者番号：10323809

研究成果の概要(和文)：細胞分裂期(M期)における染色体末端テロメアの機能を探るため、核膜崩壊を伴わない closed mitosis を行う分裂酵母のテロメアのM期における制御機構を調べた。分裂酵母のテロメアは間期では核膜近傍に局在しているが、M期に一時的に核膜から離れ、その解離は染色体の安定性に重要であることがわかった。さらに、その解離にはテロメア中核タンパク質 Rap1 のリン酸化による核膜タンパク質(Bqt4)との解離が寄与していることも明らかになった。M期におけるテロメアと核膜の解離は closed mitosis, open mitosis に共通のメカニズムであるモデルが提唱された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the functions of telomere in mitosis, we analyzed the regulatory mechanisms of telomere in fission yeast, which undergoes closed mitosis without the nuclear envelope breakdown. Fission yeast telomeres were anchored to the NE in interphase, whereas they were transiently released from the NE in M phase, which was important for the chromosome stability. Furthermore, the Rap1 protein, one of the central telomere proteins, was phosphorylated in mitosis, which induced the detachment of Rap1 from a nuclear membrane protein Bqt4. We proposed the model that the detachment of telomeres from the NE is a common mechanism for both closed and open mitoses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物

科研費の分科・細目：分子生物学

キーワード：テロメア、細胞分裂、染色体

1. 研究開始当初の背景

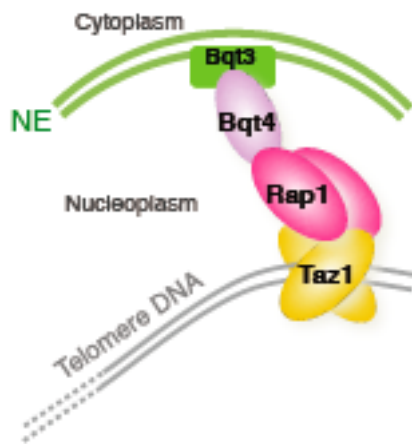
線状染色体末端に存在する特殊な構造体であるテロメアは、ゲノム維持、減数分裂、正常な老化などの様々な生命現象に深く関わっていることが知られている。一方、細胞周期の細胞分裂期においては、染色体のセントロメアと呼ばれる領域が重要な役割を果

たしていることが明らかにされている。しかし、テロメアが細胞分裂期においてどのような機能を果たしているのかについては、ほとんど明らかにされていなかった。また、細胞周期の間期において、染色体の多くのドメインが核膜と結合していることが明らかにされている。しかし、M期において、その相互

作用がどのように変化し、どのような制御を受けているのかについてはほとんど明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、核膜崩壊を伴わない closed mitosis において、間期に核膜と相互作用している染色体がどのような制御を受け、どのようにして安定な染色体分配を行うのかを探ることを目的とした。具体的には、分裂酵母のテロメア結合タンパク質が細胞分裂期においてどのような制御を受け、それが細胞分裂期の進行にどのように関わっているかを明らかにすることを旨とした。



3. 研究の方法

1) 分裂酵母におけるテロメアの動態解析。細胞周期を通じてテロメアの動態を解析するため、テロメア結合タンパク質 Taz1 に mCherry タグを、さらに核膜タンパク質 Ish1 に GFP タグを付加して可視化し、生細胞における顕微鏡観察を行った。コントロールとして、非テロメア領域である cut3 座位を GFP で標識し、その動態も調べた。

2) M 期におけるテロメア-核膜解離の生理学的意義の検証を行うため、Taz1 と Bqt4 との融合タンパク質を細胞内で発現させて強制的にテロメアを核膜に局在させて表現型を観察した。



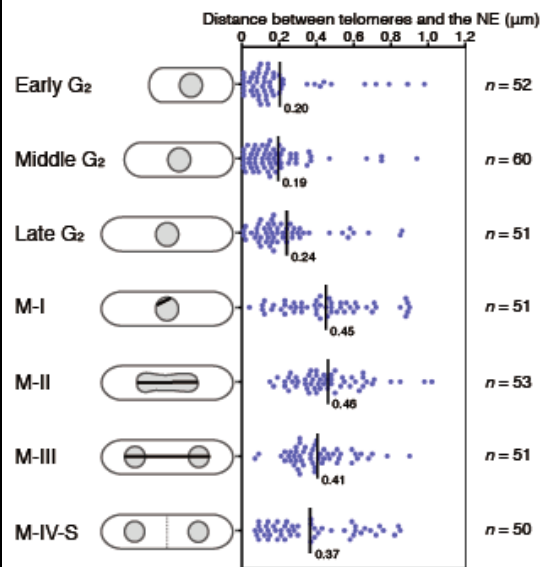
3) Bqt4 と直接結合するテロメアタンパク質

Rap1 の M 期における制御を解析するため、細胞周期における翻訳後修飾について in vitro kinase assay や質量分析などによって解析した。

4) Rap1 の翻訳後修飾の M 期制御における生理学的意義をさぐるため、翻訳後修飾部位に変異を導入して表現型を観察した。

4. 研究成果

1) 分裂酵母のテロメアは間期においては核膜近傍に配置されていることがほとんどであったが、M 期に一時的に核膜から離れることがわかった。一方、コントロールである cut3 座位は、間期においても核膜から離れていることが多く、逆に M 期の後期には SPB (スピンドル極体) に近い位置に配置されていた。

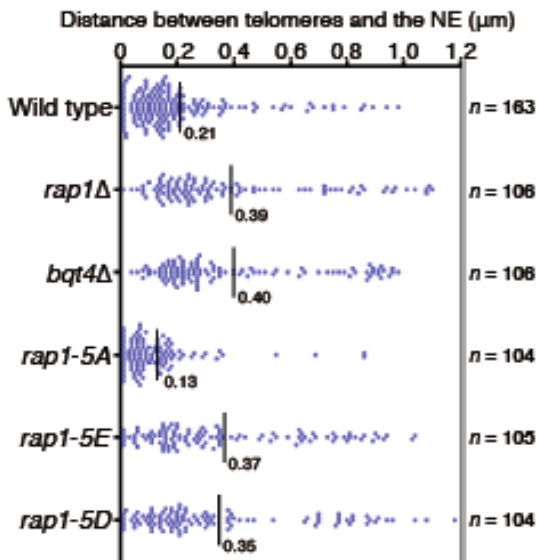


2) Taz1-Bqt4 融合タンパク質を発現させると、テロメア DNA 長やテロメア末端保護にはほとんど影響がなかったのに対して、染色体の脱落頻度が有意に上昇したことから、closed mitosis においてテロメアが核膜から解離することは染色体安定性に必要であることがわかった。

3) 質量分析や in vitro kinase assay、バンドシフトアッセイ、さらにリン酸部位を特異的に認識する抗体を用いたウエスタン解析などにより、Rap1 は M 期に少なくとも 5 カ所のアミノ酸部位においてリン酸化されることがわかった。それらのうち、3 カ所については Cdc2 キナーゼによってリン酸化されることが示唆された。

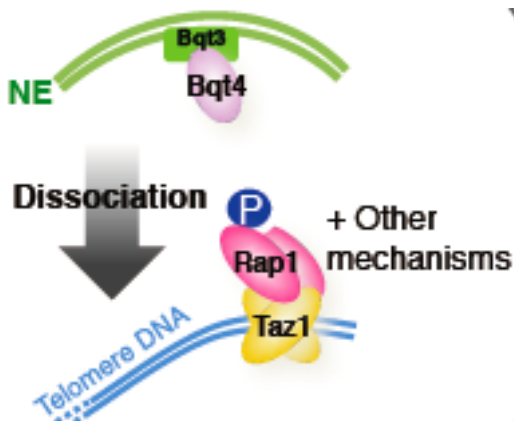
4) Rap1 のリン酸化部位をアラニンに置換した株では、Rap1 と Bqt4 との相互作用が強化され、逆に偽リン酸化型アミノ酸であるアスパラギン酸やグルタミン酸に置換した株で

は弱体化した。それと一致して、テロメアと核膜との相互作用もアラニン変異によって強化された。5つのリン酸化されるアミノ酸残基のうち、serine-513のリン酸化がRap1-Bqt4相互作用を阻害する効果を最も強く持つことがわかった。以上のことにより、核膜崩壊を伴わない closed mitosis においては、染色体から核膜を離すために、テロメア結合タンパク質のリン酸化を介して核膜タンパク質との相互作用を一時的に阻害しているというモデルが考えられた。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に)



は下線)

[雑誌論文] (計4件)

- 1) Chen, Y., Rai, R., Zhou, Z-R., Kanoh, J., Ribeyre, C., Yang, Y., Zheng, H., Damay, P., Wang, F., Tsujii, H., Hiraoka, Y., Shore, D., Hu, H-Y., Chang, S. and Lei, M. (2011) A conserved motif within RAP1 plays diversified roles in telomere protection and regulation in

different organisms. *Nature Struct. Mol. Biol.*, 18: 213-221. (査読有)

- 2) Mikawa, T., Kanoh, J. and Ishikawa, F. (2010) Fission yeast Vps1 and Atg8 contribute to oxidative stress resistance. *Genes Cells*, 15: 229-242. (査読有)
- 3) Kanoh, J. and Yanagida, M. (2010) Structure of TOR complexes in fission yeast. *Enzymes*, 27: 271-284. (査読有)
- 4) Miyoshi, T., Kanoh, J. and Ishikawa, F. (2009) Fission yeast Ku protein is required for recovery from DNA replication stress. *Genes Cells*, 14: 1091-1103. (査読有)

[学会発表] (計22件)

- 1) Tsujii, H., Tanaka, M., Chikashige, Y., Watanabe, Y., Saito, M., Ishikawa, F., Hioraka, Y., and Kanoh, J. Roles of telomere in closed mitosis. The sixth international fission yeast meeting, Boston, USA, May 29, 2011.
- 2) Kanoh, J. M phase-specific regulations of telomere. International symposium on physicochemical fields for genetic activities, Awaji, Hyogo, Japan, January 24, 2011.
- 3) 辻井久代、近重裕次、田中麻紀子、渡邊祐三、齋藤基輝、石川冬木、平岡泰、加納純子「細胞分裂期においてテロメア-核膜ネットワークが果たす機能」第28回染色体ワークショップ、加賀、石川、2011年1月11日
- 4) 辻井久代、近重裕次、渡邊祐三、齋藤基輝、石川冬木、平岡泰、加納純子「細胞分裂期におけるテロメアと核膜のネットワーク機能」BMB2010、神戸、兵庫、日本、2010年12月7日
- 5) Tsujii, H., Chikashige, Y., Watanabe, Y., Saito, M., Ishikawa, F., Hiraoka, Y., and Kanoh, J. Regulations of telomere at M phase. Telomeres and the DNA damage response, Marseille, France, September 16, 2010.
- 6) 辻井久代、近重裕次、渡邊祐三、齋藤基輝、石川冬木、平岡泰、加納純子「テロメア-核膜ネットワークによるM期制御機構」第43回酵母遺伝学フォーラム、奈良、2010年9月9日
- 7) Kanoh, J. Regulations of telomere in cell division cycle. The joint symposium of the 5th international symposium of institute network, Kanazawa, Ishikawa, Japan, June 24, 2010.
- 8) 辻井久代、近重裕次、渡邊祐三、齋藤基

輝、石川冬木、平岡泰、加納純子「細胞分裂期における核膜とテロメアの機能」第9回核ダイナミクス研究会、修善寺、静岡、2010年5月29日

- 9) Kanoh, J., Chikashige, Y., Watanabe, Y., Saito, M., Hiraoka, Y., and Ishikawa, F. Regulations of telomeres at M phase. The fifth international fission yeast meeting, Tokyo, Japan, October 27, 2009.
- 10) 加納純子、近重裕次、渡邊祐三、齋藤基輝、平岡泰、石川冬木「細胞分裂期におけるテロメア結合タンパク質 Rap1 の制御機構」第42回酵母遺伝学フォーラム、つくば、茨城、2009年7月28日
- 11) 加納純子、石川冬木「細胞分裂期におけるテロメア結合因子 Rap1 の機能制御」第41回酵母遺伝学フォーラム、札幌、北海道、2008年9月11日

[図書] (計4件)

- 1) 加納純子 (2010) 「Tel2 蛋白質による PIKK ファミリー蛋白質の制御機構」共立出版・細胞周期フロンティア: 119-124.
- 2) 加納純子 (2010) 「PIKK ファミリータンパク質に結合する Tel2」生化学・vol. 82: 57-60.
- 3) 加納純子 (2009) 「テロメア特異的なクロマチン構造によるテロメア DNA 維持機構」共立出版・蛋白質核酸酵素増刊・染色体サイクル・vol. 54: 514-520.

[その他]

ホームページ等

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/icr/network/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加納 純子 (KANOH JUNKO)

大阪大学・蛋白質研究所・特任准教授

研究者番号: 10323809