

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2012

課題番号：20579004

研究課題名（和文） 電子顕微鏡法によるテロメア超構造の解析

研究課題名（英文） Structure analysis of *S. cerevisiae* Rap1-telomeric DNA complex by electron microscopy.

研究代表者

眞木 さおり (MAKI SAORI)

独立行政法人理化学研究所・タンパク質結晶構造解析研究グループ・研究員

研究者番号：20513386

研究成果の概要（和文）：

真核生物の染色体末端に存在するテロメアは、テロメア DNA と様々なタンパク質から構成され、染色体の安定化、保護に関わっている。出芽酵母のテロメア DNA に結合する Rap1 および緑色蛍光タンパク質（GFP）を融合させた Rap1 を単離精製し、電子顕微鏡による観察と電子線トモグラフィ法による三次元構造解析、蛍光顕微鏡法による高分解能画像解析から、Rap1 がフィラメント状の複合体を形成することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Telomeres are specialized nucleoprotein complexes that cap the ends of eukaryotic linear chromosomes, stabilizing them and protecting their integrity. In budding yeast major telomere binding protein Rap1 controls telomere length. We prepared Rap1 and GFP fusion Rap1, and analyzed their structures by electron microscopy. Electron tomography and high resolution fluorescence microscopy revealed three-dimensional structures of unique filaments made of Rap1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	800,000	0	800,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,300,000	750,000	4,050,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：・生物物理学

キーワード：テロメア タンパク質複合体 出芽酵母 電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

真核生物の染色体末端に存在するテロメアは、細胞が分裂を繰り返すごとに短縮される。一方、生殖細胞は細胞分裂を繰り返してもテロメアは短縮されない。生殖細胞では、テロメア DNA を維持する酵素テロメラーゼが働いているからである。ヒトのテロメアに

は、「シェルタリン」とよばれるタンパク質複合体が結合している。長いテロメアでは、多くのシェルタリン複合体が結合することで、テロメラーゼが負のフィードバックを受けてテロメア伸長反応が起こりにくくなる。一方、短いテロメアでは、シェルタリン複合体が少なくテロメラーゼが結合しやすくなる。テロメラーゼの活性は、細胞のがん化に

も密接な関係がある。正常な細胞では、テロメアがある程度短くなると、がん抑制遺伝子が働いて、分裂を停止するが、ほとんどのがん細胞では、テロメラーゼが活性化されていて、細胞は無限に増殖することができる。

細胞の老化やがん化とテロメアの長さは密接な関連があり、その制御機構の解明は重要な課題である。

2. 研究の目的

テロメアの長さは、テロメラーゼによる伸長と種々の関連タンパク質による制御機構により、種や細胞ごとにある一定の範囲内に保たれている。

ヒトのテロメアに結合するシェルタリン複合体は、TRF1、TRF2、TIN2、Rap1、TPP1、POT1 から構成されている。一方、出芽酵母では、テロメアに結合するタンパク質複合体は、Rap1、Rif1、Rif2 から構成され、Rap1 は、ヒトの Rap1 と異なりテロメア DNA に直接結合する。出芽酵母テロメアにおいてもヒトテロメアと同じようにテロメアに結合するタンパク質複合体の数がテロメア長制御に重要であるというモデルが提唱されている。

本研究では、出芽酵母テロメア DNA とその結合タンパク質複合体を *in vitro* で再構成し、電子顕微鏡による観察および構造解析を行い、テロメア長の違いによるテロメアの超構造を明らかにすることからテロメア長制御機構に関わるテロメア構造の役割を解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) タンパク質、DNA の調製

Rap1 の大量発現系は、共同研究者の Tanya Williams から提供されたものを使用した。新たに蛍光顕微鏡観察用に GFP 融合 Rap1 の大量発現系と精製を行った。DNA は、Tanya Williams から提供されたもの他、短いテロメア DNA (80 bp 程度) を人工合成した。

(2) *in vitro* 再構成実験

精製した Rap1 とさまざまな長さのテロメア DNA の結合実験を行った。結合反応条件(溶液、温度、時間)を検討した。

(3) 電子顕微鏡による構造解析

精製した Rap1、Rap1 とテロメア DNA 複合体の構造解析を電子顕微鏡を使って行った。均一な試料には単粒子像解析法を、ヘテロな複合体構造には電子線トモグラフィ法を

用いて構造解析を行った。

(4) 蛍光顕微鏡による複合体構造の解析

精製した Rap1 を電子顕微鏡で観察するとフィラメント状の複合体が数多く存在していることがわかった。このフィラメント状の複合体が Rap1 から構成されているのかを確認するために、GFP を融合させた Rap1 の大量発現系を構築し、精製後、蛍光顕微鏡による観察を行った。Rap1 複合体は、100 nm 程度の大きさなので、通常の顕微鏡観察では、1 分子を特定できないため、高分解能 1 分子蛍光画像解析を行った。

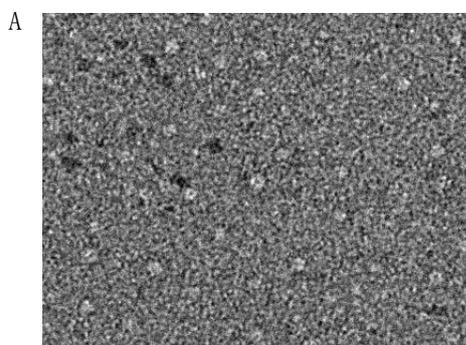
4. 研究成果

(1) Rap1 精製、電子顕微鏡観察

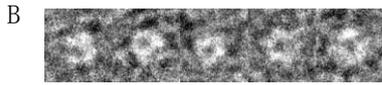
Rap1 は、大腸菌による大量発現系を使用した。これまでは、超音波による細胞破碎処理を行っていたが、熱発生の伴わない界面活性剤、DNA 切断酵素等を含む溶液による細胞破碎を行い、タンパク質分解酵素阻害剤、Ni キレートカラム等の検討により精製の純度を改善することができた。

精製した Rap1 をゲルろ過カラムにかけると単一ピーク画分として分離してくるが、このピーク前半画分には、長さの異なるフィラメント状の複合体が存在していた。精製した Rap1 溶液を MALDI-TOF MS による PMF (Peptide mass fingerprinting) 分析を行った結果、大量発現系に使用した大腸菌由来の DnaK がわずかに混在していることがわかったが、これまでに DnaK がフィラメント状の複合体を形成するという報告はされていない。また、溶液中に混在する DNA の影響を排除するために DNase による DNA 切断処理を行っても同様な複合体が観察された。

単分散した Rap1 分子の負染色像

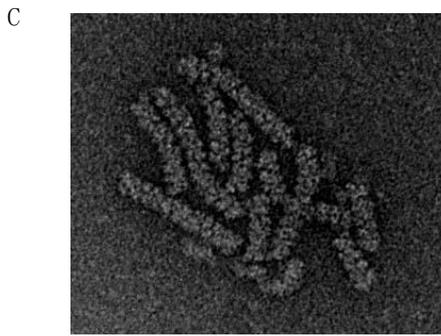


約 130 Å のドーナツ状分子。
(Tanya Williams et al., 2010)



B
A の画像 (1 分子) を拡大
(Tanya Williams et al., 2010)

このフィラメント状複合体は、精製初期段階において超遠心 (30,000 x g, 60 分) を行うことにより除去でき、単分散した Rap1 分子を電子顕微鏡観察で確認した。この Rap1 単量体の試料を様々な条件下でフィラメント再構成実験を行ったが、フィラメント状の複合体は形成できなかった。また、テロメア DNA との結合実験も行ったが、フィラメント状の複合体は形成されていなかった。

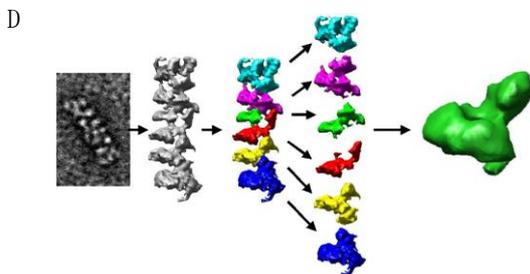


100 nm

精製した Rap1 分画中に含まれるフィラメント状の複合体。長さは異なり、長いものは曲がりやすい傾向がある。

(2) 電子線トモグラフィー法による Rap1 フィラメントの構造解析

トモグラフィーの自動撮影プログラム (Serial EM) を使ってトモグラム作成に必要な傾斜像の組を撮影後、個々の画像は、コントラスト伝達関数 (CTF) を補正後、IMOD tomography package を使って像を整列化し、三次元像を再構成した。



Rap1 が 6 個結合している。個々の分子を切り出し足し合わせたのが、一番右の分子 (緑色)。

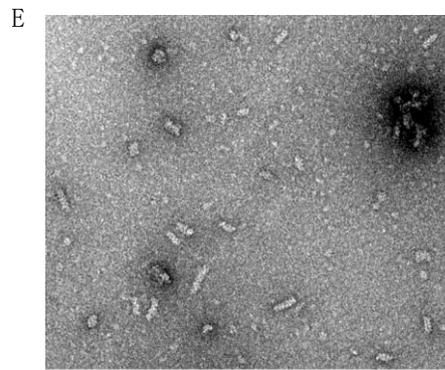
フィラメントの三次元再構成から、Rap1 一

分子に相当する部分を切り出し、整列化後平均することで、信頼性を改善することができた。得られた構造から、2つの腕状ドメインが DNA に巻き付くように結合するというモデルを提案することができた。

(3) GFP 融合 Rap1 の作製

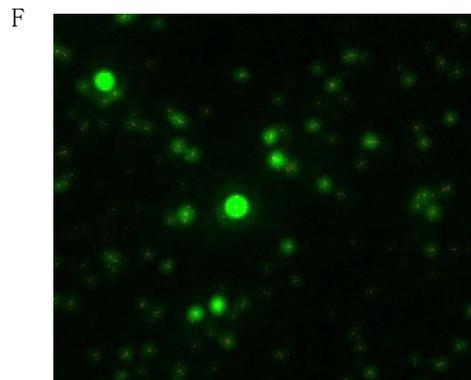
精製した Rap1 溶液中に存在するフィラメント状の複合体が、Rap1 から形成されていることを確かめるために、GFP を融合させた rap1 プラスミドを作製、発現系を構築し、C 末端側に GFP を融合させた Rap1 を発現、精製した。この試料を電子顕微鏡観察したところ、野生型 Rap1 と同じようなフィラメント状の複合体が多く観察された。

GFP 融合 Rap1 の負染色像



200 nm

(4) 蛍光顕微鏡による高分解能画像解析



F. 連続した 100 枚の CCD フレーム像を積算した画像。G. 新規アルゴリズムを使って個々の蛍光色素の像から中心座標を計算。白い点が GFP を融合した Rap1 一分子の蛍光に対応する。

GFP を融合した Rap1 を高分解能蛍光顕微鏡法により観察、画像解析を行った。その結果、Rap1 1 分子に相当する輝点の集合は、線状に分布していた。電子顕微鏡による観察および蛍光顕微鏡による高分解能画像解析結果より、GFP を融合した Rap1 は、フィラメント状構造を形成していることが示唆された。

これまでに Rap1 がフィラメント状の複合体を形成することは、報告されておらず、今回の結果は、テロメア長調節機構についての新しい知見に繋がる。Rap1 のフィラメント構造が、Rap1 のみから構成されるのか、DNA との結合によりフィラメントが形成されるのかはわかっていない。今後、さらなる高分解能構造解析を行い、DNA の有無、その結合様式を明らかにしたい。

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 1 件)

1. Tanya L. Williams, Daniel L. Levy, Saori Maki-Yonekura, Koji Yonekura and Elizabeth H. Blackburn
Characterization of the Yeast Telomere Nucleoprotein Core : Rap1 binds independently to each recognition site. *Journal of Biological Chemistry* **285** : 35814-35824 (2010) 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. Saori Maki-Yonekura, Michio Hiroshima, Tanya L. Williams, Yasushi Sako, Elizabeth H. Blackburn and Koji Yonekura. Structure analysis of *S. cerevisiae* Rap1-telomeric DNA complex by single molecule imaging and electron microscopy. Nagoya Symposium - Frontiers in Structural Physiology 2013 年 1 月 22 日-1 月 24 日 名古屋大学 豊田講堂(愛知県)
2. 眞木 (米倉) さおり, Tanya L. Williams, Elizabeth H. Blackburn, 米倉 功治 電子顕微鏡法による出芽酵母 Rap1 とテロメア DNA 複合体の構造解析 第 46 回日本生物物理学会年会 2008 年 12 月 4 日 福岡国際センター(福岡県)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

眞木 さおり (MAKI-YONEKURA SAORI)
独立行政法人理化学研究所・タンパク質結晶構造解析研究グループ・研究員
研究者番号：20513386

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

米倉 功治 (YONEKURA KOJI)
独立行政法人理化学研究所・米倉生体機構研究室・准主任研究員
研究者番号：50346144

佐甲 靖志 (SAKO YASUSHI)
独立行政法人理化学研究所・佐甲細胞情報研究室・主任研究員
研究者番号：2015700

廣島 通夫 (HIROSHIMA MICHIO)
独立行政法人理化学研究所・佐甲細胞情報研究室・研究員

Elizabeth H. Blackburn
University of California, San Francisco
Department of Biochemistry and Biophysics・教授

Tanya L. Williams
University of California, San Francisco
Department of Biochemistry and Biophysics・研究員