

平成 22 年 5 月 27 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20870003

研究課題名（和文） 分裂酵母テロメアクラスタリング機構の解析

研究課題名（英文） Study of telomere clustering in fission yeast

研究代表者

杉山 梨恵 (SUGIYAMA RIE)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・研究員

研究者番号：10503899

研究成果の概要（和文）：減数分裂期に観察されるテロメア領域同士の対合（テロメアクラスタリング）は、この時期における相同染色体の対合促進等に重要であり、酵母からヒトまで高度に保存されている。分裂酵母では、減数分裂期のみならず体細胞分裂間期にもテロメアクラスタリングが観察され、このテロメアクラスタリングには RNAi が重要であることが報告されている。本研究では、テロメアクラスタリングの意義およびその機構の更なる理解を目指し、分裂酵母を用いた遺伝学的スクリーニングを実施し、複数の候補クローンを単離した。

研究成果の概要（英文）：It has been reported that meiotic telomere clustering, conserved from yeast to human, is important for meiotic chromosome recombination and segregation. In addition, telomere clustering is observed during mitosis in fission yeast. However, the detailed mechanism remains unclear. Genetic screening was performed to identify new factors involved in telomere clustering, and several candidate clones were obtained in this screening.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：遺伝・ゲノム動態

キーワード：分裂酵母、テロメア

## 1. 研究開始当初の背景

染色体は、遺伝子発現、組換え、複製、分配、ヘテロクロマチン形成等多くの機能を有

し、それぞれの過程で染色体高次構造がダイナミックに変化していると考えられている。これまでに高等動物を用いた研究により、染

染色体内もしくは染色体間で形成される高次構造が遺伝子発現制御機構に重要であることを示唆する結果が報告されている。例えばマウスにおいて、グロビン遺伝子が発現している臓器と発現していない臓器の間で、グロビン遺伝子座における染色体高次構造が異なることが確認されている。また、ショウジョウバエにおいて、PRE (Polycomb-response element) を介した染色体対合に RNA interference (RNAi) が関与することを示唆する論文も報告されている。しかしながら、染色体高次構造形成機構や、RNAi がどのような形で染色体高次構造形成に寄与しているのか、さらにその他の染色体機能における高次構造形成の生理的な重要性等については不明な点が多く残されている。

染色体間で形成される高次構造として代表的なもの1つとして、減数分裂期に観察されるテロメアクラスターリングが挙げられる。分裂酵母では、第一減数分裂前期に、染色体末端に存在するテロメア領域が Spindle Pole Body (SPB; 高等動物の中心体に相当する構造体) 近傍にクラスターを形成し、SPB およびテロメアクラスターリング部位を先頭に核が細胞極間を複数回往復運動するホーステール運動が観察される。減数分裂期テロメアクラスターリングは、減数分裂期における相同染色体の対合促進や相同組換え、2 回連続で起こる染色体の分配等に重要であると考えられている。分裂酵母の減数分裂期テロメアクラスターリングに関与している因子として代表的なものに Taz1 や Rap1 が挙げられる。Taz1 は、DNA 結合ドメインである Myb ドメインを有し、ホモダイマーを形成して2本鎖テロメアリピートに結合することが報告されている。Rap1 は Taz1 との結合を介して、テロメア領域にリクルートされると考えられている。taz1 破壊株や rap1 破壊株では、減数分裂期テロメアクラスターリングに異常を呈し、染色体分配が正常に行なわれない。その結果、胞子の生存率が著しく低下する。減数分裂期テロメアクラスターリングは、酵母からヒトまで高度に保存されており、Taz1 や Rap1 もヒトまで高度に保存されている。

近年、分裂酵母を用いた研究において、テロメアクラスターリングが減数分裂期のみならず、体細胞分裂間期にも観察されることが報告された。さらに、RNAi machinery の component である rdp1 (分裂酵母 RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ) 欠損株や、dcr1 (分裂酵母 Dicer ホモログ) 欠損株等において、減数分裂期および体細胞分裂間期テロメアクラスターリングに異常を呈することから、分裂酵母テロメアクラスターリングには RNAi が関与していることが示唆された。しかしながら、RNAi がどのようにしてテロメアクラスターリング形成制御機構に関与しているのか、また、

テロメアクラスターリングに関与する因子の同定等の解析が進んでおらず、不明な点が多い。したがって、テロメアクラスターリングにおける RNAi の機能解析、テロメアクラスターリングに関与する因子の単離と解析等を行なうことは、染色体機能における高次構造形成の意義を理解する上で必須と考え、本研究の開始に至った。

## 2. 研究の目的

本研究は、真核生物のモデル系である分裂酵母を用いて、染色体高次構造のひとつであるテロメアクラスターリングについて研究を進める。本研究では、(1)体細胞分裂間期テロメアクラスターリングにおける RNAi と cohesin の関連性について検討するとともに、(2)遺伝学的スクリーニングを実施し、テロメアクラスターリングに関与すると示唆される候補因子の単離および解析を行なうことにより、テロメアクラスターリングの分子機構を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、遺伝学的操作が容易な分裂酵母を用いて以下に述べる2つの研究テーマに沿って実験を進めた。

### (1)体細胞分裂間期テロメアクラスターリングにおける RNAi と cohesin の関連性検討

本研究テーマでは、RNAi がクラスターリング因子をテロメア領域にリクルートすることによりテロメアクラスターリングが起こるのではないかという仮説を立てた。クラスターリング因子の有力な候補として、染色体対合に必須の複合体 cohesin が挙げられる。ここでは mitotic cohesin サブユニットの1つである分裂酵母 Rad21 を対象にして以下の実験を遂行した。

#### ①RNAi 破壊株における Rad21 のテロメア局在化への影響

セントロメア領域への Rad21 の局在化は RNAi 依存的事であることが知られている。そこで、Rad21 のテロメア領域への局在化が RNAi 依存性か否かを検討した。具体的には、Rad21-myc を発現する野生型株または rdp1 破壊株を作製し、クロマチン免疫沈降 (ChIP) を行なった。

#### ②rad21 温度感受性変異による体細胞分裂間期テロメアクラスターリングへの影響

分裂酵母 HP1 ホモログ Swi6 やテロメア結合タンパク質 Taz1 は、核内に2~4個のドッ

トとして局在し、これらのドットは主にテロメア領域由来のシグナルであることが知られている。RNAi 変異株において、体細胞分裂間期および減数分裂期における Swi6 や Taz1 の核内ドット数が野生型株に比べて増加することが報告されている。この核内ドット数の増加は、テロメアクラスタリングが崩壊したことを指しているのではないかと提唱されている。ここでは、*rad21* 温度感受性変異が、体細胞分裂間期テロメアクラスタリングに影響を及ぼすか否かを検討した。具体的には、Taz1-GFP を発現する野生型株または *rad21* 温度感受性変異株を作製し、*rad21* 変異により Taz1-GFP の核内ドット数が増加するか否かを、蛍光顕微鏡下で観察した。

## (2) テロメアクラスタリングに関与する因子の遺伝学的スクリーニング

本研究では、テロメアクラスタリングに関与する新規候補因子を単離するために、遺伝学的スクリーニングを実施した。

本研究で実施したスクリーニング系を(図1)に示す。ゲノム上へのランダム変異導入には、ハイグロマイシン耐性遺伝子 (*Hyg<sup>r</sup>*) の両末端に各々 18bp のランダム塩基配列を PCR で付加したカセット (*Hyg<sup>r</sup>* カセット) を使用した。両末端にランダム塩基配列を付加することで、組換えによりゲノム上へランダムに変異を導入できる。この変異導入法を用いることにより、ゲノム上のどの部位に変異導入されたかを、inverse PCR により特定することが可能である。まず、Taz1-GFP を発現し、セントロメアとテロメアにそれぞれ栄養マーカー遺伝子 *ade6* と *ura4* が挿入された株を作製した。Taz1-GFP はテロメアクラスタリングの可視化、*ade6* および *ura4* は、それぞれセントロメアおよびテロメアサイレンシングをモニタリングするためである。まず、上述の株を *Hyg<sup>r</sup>* カセットで形質転換した後、*Hyg<sup>r</sup>* カセットが染色体上に安定に組み込まれたものを、*Hyg* を含むプレート上で選別し、以下に述べる 3 つを指標として、スクリーニングを行なった。

① Taz1-GFP の核内ドット数：体細胞分裂間期において、Taz1-GFP は核内に 2~4 個のドットとして局在することが報告されている。しかし、テロメアクラスタリングに関与すると報告されている RNAi 変異株では、Taz1-GFP の核内ドット数が 5~8 個に増加することが報告されている。

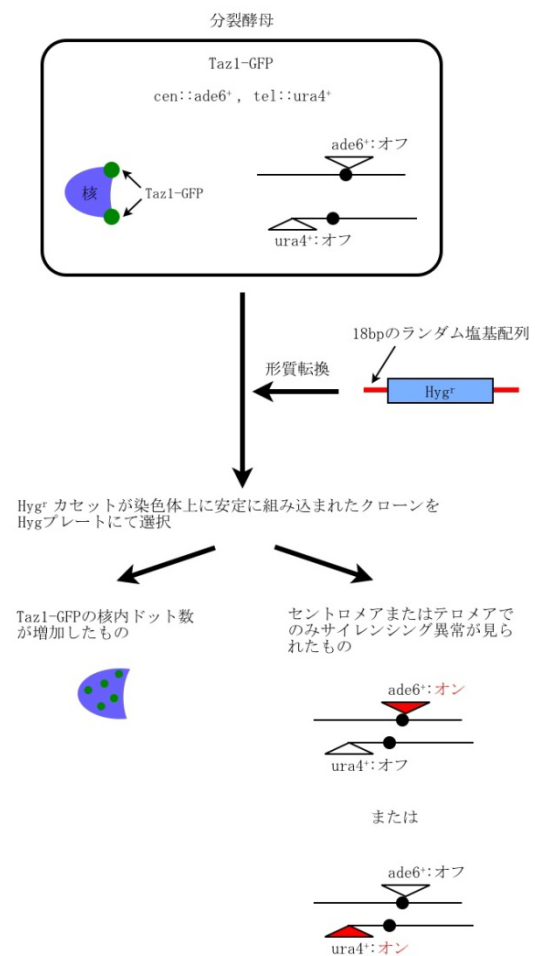
② セントロメア領域のサイレンシング異常：テロメアクラスタリングに関与すると報告されている RNAi 変異株では、セントロメア領域のみサイレンシング異常を呈することが報告されている。

③ テロメア領域のサイレンシング異常：テロ

メア結合タンパク質であり、減数分裂期テロメアクラスタリングに関与する Taz1 の遺伝子破壊株ではテロメア領域のみサイレンシング異常を呈することが知られている。

本スクリーニングでは、テロメアクラスタリングに関与すると報告されている上述の既知因子の遺伝子破壊株が示す表現型を利用し、Taz1-GFP の核内ドット数が増えたもの、セントロメア領域のみサイレンシング異常を示したもの、テロメア領域のみサイレンシング異常を示したもの、のいずれかの表現型を呈したクローンを分離することにした。

また上述のスクリーニングに加えて、逆遺伝学的手法を用いたスクリーニングも実施した。



## 4. 研究成果

(1) 体細胞分裂間期テロメアクラスタリングにおける RNAi と cohesin の関連性検討

①RNAi 破壊株における Rad21 のテロメア局在化への影響

Rad21 のテロメア領域への局在に対する RNAi 欠損の影響を調べるために、Rad21 のクロマチン免疫沈降を行なった。その結果、セントロメア領域への Rad21 の局在は野生型株と *rdp1* 破壊株の間で差が認められたものの、テロメア領域への局在については、顕著な差は観察されなかった。したがって、本実験系の結果からはテロメアクラスタリングにおける RNAi と Rad21 の関係について、関連性は認められなかった。

②*rad21* 温度感受性変異による体細胞分裂間期テロメアクラスタリングへの影響

*rad21* 温度感受性変異が、体細胞分裂間期テロメアクラスタリングに影響を及ぼすか否かを Taz1-GFP の核内ドット数を指標に、解析を行なった。Taz1-GFP 核内ドット数が 5 個以上だったものは、野生型株では全体の 12.7%であったのに対し、*rad21* 温度感受性変異株では、25.6%であった。しかしながら、制限温度下で培養した *rad21* 温度感受性変異株では、染色体が不均一に分配した細胞や、姉妹染色体が完全に分離できずに引き伸ばされたような細胞等が観察される。このため、一部の細胞で、Taz1-GFP の核内ドット数をカウントするのが困難なものもあり、最終的な結論には至っていない。

(2) テロメアクラスタリングに関与する因子の遺伝学的スクリーニング

ハイグロマイシンカセットのランダム挿入を利用した変異導入によるスクリーニングを行なった。その結果、複数の候補クローンが得られた。候補クローンにおけるハイグロマイシンカセット挿入部位の決定を、inverse PCR により試みた。しかしながら、inverse PCR を行なう際の条件が適切ではなく、未だ決定には至っていない。したがって、inverse PCR の条件検討が必要である。

また、逆遺伝学的スクリーニングにより、2 つの候補クローンを取得した。これらを Tcc1 (Telomere clustering candidate 1), Tcc2 と命名した。これら遺伝子破壊株では、テロメアサイレンシングは正常だったが、セントロメアにおけるサイレンシングに異常をきたすといった RNAi 様の表現型を呈した。*tcc1*, *tcc2* はいずれも新規遺伝子であり、その機能は明らかにされていない。さらに、これら遺伝子破壊株では、野生型株に比べ、増殖速度の遅延が観察された。以上の結果より、Tcc1, Tcc2 は RNAi によるテロメアクラスタリング形成機構に関与している可能性が示唆される。次に、*tcc1* 欠損株や *tcc2* 欠損株における体細胞分裂間期および減数分

裂期テロメアクラスタリングへの影響、また、既知テロメアタンパク質のテロメア領域局在化への影響について検討することを試みた。そこで、既知テロメアタンパク質のエピトープタグ融合発現株を作製した。これらの発現株を *tcc1* 欠損株や *tcc2* 欠損株で形質転換することを試みたが、研究期間内に目的の株を取得することができなかった。

また、本研究では Tcc1 や Tcc2 がテロメア領域に局在しているか否か、また、局在している場合、*taz1* 欠損株や *dcr1* 欠損株等による局在化への影響、さらに、既知テロメアタンパク質と結合しているかを検討するための Tcc1-FLAG と Tcc2-FLAG 発現株を作製した。そして、これらエピトープタグ融合発現株が functional であることを確認した。また、Tcc1-FLAG または Tcc2-FLAG を発現する *taz1* 欠損株を作製した。

これまでに報告されたテロメアクラスタリング関与因子のみで、テロメアクラスタリング形成機構の詳細な分子メカニズムを説明することが困難であることから、遺伝学的手法を用いた本スクリーニングを実施し、関与因子候補クローンを取得したことは非常に意味があったと言える。本スクリーニングで取得したテロメアクラスタリング関与因子候補が実際にテロメアクラスタリングに関与しているか検討し、さらに詳細な解析を進めることで、テロメアクラスタリング機構解明のみならず、他の染色体機能における高次構造形成機構解明にもつながるものと期待される。

## 5. 主な発表論文等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉山 梨恵 (SUGIYAMA RIE)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・研究員

研究者番号：10503899