

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450517

研究課題名(和文) テロメアの異常が微小管阻害剤感受性を高める機構とその応用

研究課題名(英文) Mechanism that telomere defect make cell sensitive to anti-microtubule drug and their application

研究代表者

上野 勝 (Ueno, Masaru)

広島大学・先端物質科学研究科・准教授

研究者番号：90293597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：分裂酵母Pot1はテロメア結合蛋白質で、Rqh1はDNA組換え中間体を解消するヘリケースである。我々はpot1破壊とRqh1ヘリケース活性変異株(rqh1-hd)を組み合わせたpot1 rqh1-hd株では、微小管阻害剤に高い感受性を示すこと、テロメアに組換え中間体が蓄積することなどを報告している。本研究では、pot1 rqh1-hd株は、スピンドルチェックポイント(SAC)依存的なプロメタフェーズでの細胞分裂停止の頻度が高いことを発見した。この結果とその他の結果から本研究では、組換え中間体の蓄積が、SAC依存的なプロメタフェーズでの細胞分裂停止を引き起こすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Fission yeast Pot1 binds telomere DNA, and Rqh1 is required for resolution of recombination intermediate. We have shown that the double mutant between pot1 and the helicase-dead point mutant of the RecQ helicase Rqh1 (rqh1-hd) is sensitive to microtubule drug and accumulates recombination intermediates at telomeres. In this research, we found that Spindle assembly checkpoint (SAC)-dependent prometaphase arrest occurred frequently in pot1 rqh1-hd double mutants. Our results indicate that the accumulation of recombination intermediates induces SAC-dependent prometaphase arrest.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：テロメア スピンドルチェックポイント 分裂酵母 微小管阻害剤 抗がん剤

1. 研究開始当初の背景

染色体末端テロメアの維持は、がん細胞の無限増殖に必須である。ヒト正常細胞ではテロメアは細胞分裂ごとに短くなるのに対して、約8割のがん細胞のテロメアはテロメラーゼによって維持され、残りの約2割は、DNA組換えによって維持される。複数のテロメラーゼ阻害剤が抗がん剤候補として開発されているが、即効性がないことなどから、実用化には至っていない。組換えによるテロメアの維持は正常細胞では行われていないことから、組換えによるテロメア維持の阻害は、抗がん剤治療の標的としての大きな可能性を秘めている。

微小管阻害剤は、染色体分配時に形成される微小管(紡錘系)の機能を阻害することで、染色体分配を阻害する。微小管阻害剤は、抗がん剤として悪性リンパ腫や小児白血病の治療に用いられているが、副作用が強いという問題がある。本研究の最終目的は、分裂酵母におけるテロメアでの組換え中間体の蓄積が微小管阻害剤の感受性を高める機構の解明とそのがん治療への応用である。

分裂酵母の Pot1 はテロメアに結合する蛋白質である。分裂酵母の Rqh1 は DNA 組換えに関係するヘリケースである。我々は分裂酵母 *pot1*破壊と Rqh1 のヘリケース活性を持たない点変異 (*rqh1-hd*) を組み合わせた二重変異株(*pot1 rqh1-hd*株)では、テロメアが組換えで維持されることを報告している (Mol.Cell.Biol.2011)。さらにこの二重変異株では、Rqh1 が欠損していることで、テロメアでの組換えが正常に行えず、テロメア間で組換え中間体を持ったまま染色体分配が進行することや、微小管阻害剤に対して高い感受性を示すことも報告している (Mol.Cell.Biol.2011)。しかし、テロメア間で組換え中間体の蓄積が、微小管阻害剤感受性を高める機構はわかっていなかった。

2. 研究の目的

*pot1 rqh1-hd*株が微小管阻害剤に感受性になる機構のモデルとして、テロメア間の組換え中間体の蓄積による姉妹染色分体のテロメアのつながりと微小管阻害剤による染色体分配阻害の相乗効果で染色体分配が強く阻害されると考えているが、そのモデルの実証には至っていない。さらに、この機構がヒトのがん細胞で保存されているかは不明である。もしヒトのがん細胞でも、分裂酵母と同様にテロメアでの組換え中間体の蓄積が微小管阻害の感受性を高めれば、微小管阻害剤とテロメアでの組換え中間体蓄積の促進を組み合わせた新しい効果的な抗がん剤治療法の開発に繋がる可能性がある。そこで本研究の目的は、分裂酵母においてテロメアでの組換え中間体の蓄積が微小管阻害の感受性を高める機構の解明すること、とした。

3. 研究の方法

まず、*pot1 rqh1-hd*株が微小管阻害剤感受性になる原因の解析を行うために、*pot1 rqh1-hd*株のM期の表現型の詳細な解析を行った。次に、*pot1 rqh1-hd*株のスピンデルチェックポイント活性化の原因の解析を行った。さらに、テロメア以外の場所での組換え中間体蓄積がスピンデルチェックポイントを活性化するかどうかの解析を行った。また、*pot1 rqh1-hd*株が微小管阻害剤感受性になる原因の解析を行うために、*pot1 rqh1-hd*株の微小管阻害剤感受性を抑圧する因子のさらなる探索を行った。また、*pot1 rqh1*(完全欠損)は合成致死であるのに対して、*pot1 rqh1-hd*(ヘリケースドメインの点変異)株はテロメアが組換えで維持されて生育可能であることの機構を解明するために、*pot1*の機能をシャットオフした状態での、*rqh1*(完全欠損)と *rqh1-hd*(ヘリケースドメインの点変異)の違いの詳細な解析を行った。最後に、*pot1 rqh1-hd*株の微小管阻害剤感受性が *chk1*破壊で抑圧されたことから、Chk1 以外に DNA ダメージチェックポイント活性化に関

与する *rad9* の破壊が *pot1 rqh1-hd* 株の微小管阻害剤感受性が抑圧されるかどうかを調べる過程で、*pot1 rad9* 株が 5-fluorodeoxyuridine (Fudr) を含む培地で合成致死になることを発見したので、その機構の解析も行った。

4. 研究成果

(1) *pot1 rqh1-hd* 株が微小管阻害剤感受性になる原因の解析

pot1 rqh1-hd 株が微小管阻害剤感受性になる原因を解明するために、*pot1 rqh1-hd* 株の M 期の表現型の詳細な解析を行った。まず、*pot1 rqh1-hd* 株は、M 期の進行がプロメタフェーズで停止する頻度が高いことを発見した。次にこのプロメタフェーズの停止がスピンドルチェックポイント因子に依存するかどうかを調べた。その結果、スピンドルチェックポイント因子 Bub1 や Mad2 を破壊すると、プロメタフェーズでの停止が抑圧されることを発見した。このことから、*pot1 rqh1-hd* 株のプロメタフェーズでの停止は、スピンドルチェックポイントに依存していることを明らかにした。次に、*pot1 rqh1-hd* 株でスピンドルチェックポイントが活性化される機構の解析を行った。スピンドルチェックポイントの活性化は、キネトコアと微小管の結合異常を Bub1 や Mad2 が感知し、それらのタンパク質がキネトコアに長期間結合する。そこで、スピンドルチェックポイントが活性化された *pot1 rqh1-hd* 株における Bub1 や Mad2 タンパク質の挙動を観察するために、蛍光顕微鏡を用いたライブ観察をおこなった。スピンドルチェックポイントが活性化された *pot1 rqh1-hd* 株では、キネトコアと微小管の結合が正しく行われるまでキネトコアに局在する Mad2 や Bub1 のフォーサイがコントロール株に比べて長く観測された。このことから、*pot1 rqh1-hd* 株におけるスピンドルチェックポイント活性化の原因として、キネトコアと微小管の結合異常が示唆された。

(2) *pot1 rqh1-hd* 株のスピンドルチェックポイント活性化の原因の解析

pot1 rqh1-hd 株のスピンドルチェックポイント活性化の原因を調べるために、スピンドルチェックポイント活性化を抑圧する因子の探索を行った。その結果、*chk1* の破壊や *chk1* のキナーゼドメインの変異が *pot1 rqh1-hd* 株のスピンドルチェックポイント活性化を抑圧することを発見した。また、*chk1* の破壊や *chk1* のキナーゼドメインの変異を持つ *pot1 rqh1-hd* 株では、テロメアにおける組換え中間体の蓄積も減少し、さらに微小管阻害剤感受性も抑圧された。これらのことから、テロメアでの組換え中間体の蓄積が、何らかの機構により、キネトコアと微小管の結合に悪影響を与えることで、スピンドルチェックポイントが活性化されたり、微小管阻害剤感受性を高めることが示唆された。

(3) テロメア以外の場所での組換え中間体蓄積がスピンドルチェックポイントを活性化するかどうかの解析

次に、テロメア以外の場所で組換え中間体が蓄積した時に、スピンドルチェックポイントが活性化されるかどうかを調べた。Rqh1 が変異した状態で、DNA 複製を停止させたのち、DNA 複製を再開させると、染色体に組換え中間体が蓄積することが報告されている。そこで、この条件でプロメタフェーズでの停止の頻度が上昇するかどうかを調べた。その結果、この条件でプロメタフェーズでの停止の頻度が上昇することを明らかにした。この条件でプロメタフェーズでの停止がスピンドルチェックポイント因子に依存するかどうかを調べた。その結果、Bub1 や Mad2 を破壊すると、プロメタフェーズでの停止が抑圧されることを発見した。さらにこの条件で、Mad2 や Bub1 のキネトコアにおけるフォーサイがコントロール株に比べて長く観測された。こ

のことから、テロメア以外の染色体に組換え中間体が蓄積しても、キネトコアと微小管の結合異常がスピンドルチェックポイントを活性化する示唆された。

次に、Rqh1 が変異した状態で、DNA 複製を停止させたのち、DNA 複製を再開させることで染色体に蓄積した組換え中間体によるスピンドルチェックポイントの活性化を抑圧する因子を探索した。その結果、リボソーム DNA に結合することで片方から来る複製フォークを停止させる Reb1 を破壊すると、スピンドルチェックポイントの活性化が抑圧されることがわかった。このことから、リボソーム DNA 領域にできる組換え中間体の蓄積によってもスピンドルチェックポイントが活性化することを発見した。

(4) *pot1 rqh1-hd* 株の微小管阻害剤感受性を抑圧する因子のさらなる探索

pot1 rqh1-hd 株が微小管阻害剤感受性になる機構をさらに詳細に解明するために、*pot1 rqh1-hd* 株の微小管阻害剤感受性を抑圧する因子のさらなる探索を行った。その結果、*wee1* と *mik1* の二重変異、あるいは、*cdc2* の変異も *pot1 rqh1-hd* 株の微小管阻害剤感受性を抑圧することを発見した。*wee1* と *mik1* の二重変異、あるいは *cdc2* の変異は、ともに、G2 期を短くする。このことから、*pot1 rqh1-hd* 株のテロメアでの DNA 組換え中間体の蓄積や微小管阻害剤感受性の増大は、G2 期遅延が原因であることを明らかにした。

(5) *rqh1*(完全欠損)と *rqh1-hd*(ヘリケースドメインの点変異)の違いの解析

pot1 rqh1(完全欠損)二重変異株は合成致死であることは報告されていたが、我々は、*pot1 rqh1-hd*(ヘリケースドメインの点変異)株はテロメアが組換えで維持されて生育可能であることを発見していた。しかし、*rqh1*(完全欠損)と *rqh1-hd*(ヘリケースドメ

インの点変異)の違いによる *pot1* との遺伝学的相互作用の違いの機構は解明されていない。そこで *rqh1*(完全欠損)と *rqh1-hd*(ヘリケースドメインの点変異)の違いを解明することを試みた。我々はすでに *pot1* の機能を薬剤によってシャットオフできる株を報告していた。そこで *rqh1*(完全欠損)と *rqh1-hd*(ヘリケースドメインの点変異)のバックグラウンドで *pot1* の機能を薬剤によってシャットオフした時の表現型を詳細に解析した。その結果、*rqh1*(完全欠損)のバックグラウンドで *pot1* の機能をシャットオフした時の方が、*rqh1-hd*(ヘリケースドメインの点変異)のバックグラウンドで *pot1* の機能をシャットオフした時よりも、テロメアの削り込みが激しく起こり、生育の低下の度合いも大きいことを発見した。このことから、ヘリケース活性のない Rqh1 タンパク質がテロメアに結合することで、ヌクレアーゼによるテロメアの削り込みを抑制し、それがテロメアでの組換えを可能にしていることが示唆された。一方、*rqh1* 完全欠損の場合は、ヌクレアーゼによる急激なテロメアの削り込みが起こることで、テロメアでの組換えを起こすことができないか、SSA による末端融合が促進されると考えられた。

(6) *pot1* と *rad9* の Fudr を含む培地での合成致死の機構の解析

pot1 rqh1-hd 株の微小管阻害剤感受性が *chk1* 破壊で抑圧されたことから、Chk1 以外に DNA ダメージチェックポイント活性化に関与する *rad9* の破壊が *pot1 rqh1-hd* 株の微小管阻害剤感受性が抑圧されるかどうかを調べることを試みるために、*pot1 rqh1-hd rad9* の三重変異株の作成を試みた。しかしこの株は取得できなかった。この原因を調べるために、*pot1 rad9* の二重変異株の作成を試みた。*pot1* を発現するプラスミドを持つ *pot1 rad9* 二重変異株は作成できたが、その株から *pot1*

を発現するプラスミドが抜けた株を選択するためのネガティブセレクションを Fudr という薬剤の存在下で行ったところ、*pot1* を発現するプラスミドを失った *pot1 rad9* 二重変異株は取得できなかった。このことから、*pot1 rad9* 二重変異株は Fudr を含む培地では合成致死になることを発見した。現在、この機構を解明するために、Fudr 存在化で *pot1* と合成致死になる因子、すなわち、環状染色体の形成および維持に必要な遺伝子の探索を行っている。Fudr は抗がん剤としても使用されているので、*pot1 rad9* 二重変異株の Fudr を含む培地での合成致死の原因解明は、抗がん剤の効率を高める新しい方法の開発につながることを期待できる。

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3件)

- 1) Habib, G., K., A., Masuda, K., Yukawa, M., Tsuchiya, E., and *Ueno, M. Long G2 accumulates recombination intermediates and disturbs chromosome segregation at dysfunction telomere in *S. pombe*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読あり、464. (2015).140-6.DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.06.098.
- 2) Nanbu, T., Nguyen, L. C., Habib, G., K., A., Hirata, N., Ukimori, S., Tanaka, D., Masuda, K., Takahashi, K., Yukawa, M., Tsuchiya, E., and *Ueno, M. Fission yeast Exo1 and Rqh1-Dna2 redundantly contribute to resection of uncapped telomeres. *PLoS One*. 査読あり、10. (2015). e0140456. DOI: 10.1371/journal.pone.0140456.
- 3) A. Nakano, K. Masuda, T. Hiromoto, K. Takahashi, Y. Matsumoto, G. K. A. Habib, A. G. G. Darwish, M. Yukawa, E. Tsuchiya, and *M. Ueno. Rad51-dependent aberrant

chromosome structures at telomeres and rDNA activate the spindle assembly checkpoint. *Mol. Cell. Biol.* 査読あり、34, (2014). 1389-1397. DOI: 10.1128/MCB.01704-13.

[学会発表](計9件)

(1) 上野勝、分裂酵母の環状染色体の形成および維持に係る遺伝子の探索、日本農芸化学会2016年札幌大会、2016年3月29日、札幌

(2) 上野勝、環状染色体の形成および維持に係る遺伝子の探索、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12日、宮城県宮城郡松島町

(3) 上野勝、環状染色体の形成および維持に必要な遺伝子の探索、酵母遺伝学フォーラム第48回研究報告会、2015年8月31日、広島

(4) 上野勝、Fission yeast *exo1* and *rqh1* contribute to degradation of uncapped telomere、EMBO Conference on DNA Replication, Chromosome Segregation and Cell Division、2015年7月29日、Egham(英国)

(5) 上野勝、Fission yeast *exo1* and *rqh1* contribute to degradation of uncapped telomere、The 8th international fission yeast meeting、2015年6月22日、神戸

(6) 上野勝、テロメアや rDNA における組み換え複製中間体の蓄積は M 期進行を阻害する、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月27日、横浜

(7) 上野勝、Rad51-dependent aberrant replication intermediates generated at rDNA loci activate spindle assembly checkpoint、3R Symposium、2014年11月18日、御殿場

(8) 上野勝、分裂酵母において組換え中間体はスピンドルチェックポイントを活性化する、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月5日、神戸

(9) 上野勝、Resection of uncapped telomere in fission yeast *S. pombe*、酵母エピジェネティクス国際会議、2013年9月3日、福井

〔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：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/scmueno/welcome.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 勝 (UENO MASARU)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・准教授

研究者番号：90293597