

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 4 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650010

研究課題名(和文)染色体複製制御におけるフォスファターゼの役割の解析

研究課題名(英文) Roles of protein phosphatases in regulation of chromosome DNA replication

## 研究代表者

升方 久夫 (Masukata, Hisao)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00199689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：染色体DNA複製開始制御へのタンパク質脱リン酸化酵素PP1, PP2Aの関与を明らかにするため、分裂酵母で最近開発したオーキシン依存タンパク質分解系(AID; auxin-inducible degradation)を用いて、PP1あるいはPP2Aを細胞から完全に除去し、複製への関与を解析した。その結果、PP1は複製タイミング制御に必須であるが、PP2Aは関与しないことが明らかとなった。さらに、PP1はテロメア結合因子Rif1と相互作用してテロメアに局在することがタイミング制御に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Chromosomal DNA replication initiates at many loci called replication origins on the chromosome, and individual replication origins are activated at specific timing in S phase. Since the process of initiation requires phosphorylations of initiation factors by protein kinase, such as cyclin-dependent kinase (CDK) and Dbf4-dependent kinase (DDK), we asked whether protein phosphatase, such as PP1 and PP2A, are involved in the control. Using the auxin-induced protein degradation system (AID) in fission yeast, we found that PP1 is essential for the control of replication timing, whereas PP2A is not required.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：PP1 PP2A Rif1 テロメア 複製開始点 染色体 分裂酵母

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報を正しく継承するために必要な DNA 複製反応は、開始の段階から終了まで巧妙に制御されている。複製制御の破綻は、単細胞では致死となり多細胞では遺伝病やガンの要因となり得るため、そのしくみの解明は重要である。近年、DNA 複製研究は、出芽酵母を中心とした細胞内・試験管内での研究によりめざましく進展した。国内では荒木ら、国外では Diffley らによって、細胞周期の主要制御因子であるサイクリン依存キナーゼ(CDK)と Dbf4 依存キナーゼ(DDK)が複製因子をリン酸化して複製開始に必要なタンパク質複合体を形成するしくみが明らかにされた(Tanaka et al.,2006; Sheu & Stillman,2006)。我々は、出芽酵母とは大きく異なる性質を持つ分裂酵母でリン酸化による制御のしくみが保存されていることを明らかにしている(Yabuuchi et al.,2006; Fukuura et al.,2011)。キナーゼによるリン酸化は、常にフォスファターゼによる脱リン酸化反応とのバランスによって成り立っている。例えば、M-CDK 活性の Cdc2 リン酸化による制御や、減数第一分裂でのセントロメアコヒーシオンの保護などがある(Kitajima et al.,2006)。しかしながら、複製制御にフォスファターゼが関与する可能性についてはまったく明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

複製開始にはサイクリン依存キナーゼ

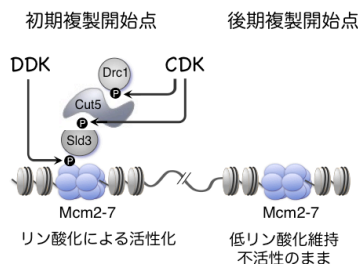


図1. 複製開始のリン酸化制御

(CDK)と Dbf4 依存キナーゼ(DDK)による複製因子のリン酸化が必須である(図1)。キナーゼによるリン酸化はフォスファターゼによる脱リン酸化と表裏一体であり、複製制御においてもカウンターフォスファターゼが存在するはずである。しかしながら、細胞分裂をはじめ多様な反応に必要なフォスファターゼである PP2A, PP1 などが複製制御に関与するかどうかは不明である。本研究では、分裂酵母で最近開発したオーキシンドグロン(AID; auxin-inducible degradation)系を用いて、G1 期あるいは S 期に特定フォスファターゼを細胞から完全に除去し、複製とその関連反応への関与を明らかにする。特に、

テロメア結合因子 Taz1 と Rif1 によって染色体各領域の複製タイミングが制御される(Tazumi et al.,2012)しくみに、フォスファターゼが関与するか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究の鍵は、特定の細胞周期にある分裂酵母細胞から、オーキシンドグロン(AID)法を用いて、触媒活性を持つタンパク質をほぼ完全に除去することにある(図2)。PP1, PP2A

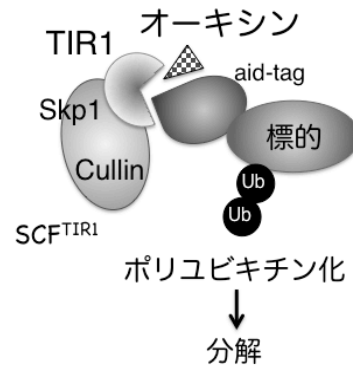


図2. AID法

ともに複数の遺伝子が重複機能を持ち、両者を破壊すると致死となるため、片方を破壊した株で残った遺伝子産物を AID 法で分解除去する。また、PP1, PP2A ともにM期で必須機能を持つ因子であるため、M 期スピンドルチェックポイント機構を無効にする *mad2Δ* 破壊株を用いて、G2/M 期で細胞周期を同調し、標的タンパク質除去後に、複製開始、複製タイミングを解析する。

4. 研究成果

(1) PP2A の複製開始制御への寄与を明らかにするため、PP2A 複合体の骨格を形成する必須サブユニットである Paa1 に AID タグを付加し、さらに発現を抑制するためチアミン添加で転写を Off にできる *Pnmt81* プロモーターに置き換えて、Paa1 タンパク質を除去した。細胞周期再開と同時にオーキシンを添加して分解を誘導し、S 期初期での複製開始を解析した結果、腕部後期複製開始点である AT2088 やサブテロメア後期開始点である TAS21 は野生株と同様に S 期初期に複製しなかった。また、PP2A 制御サブユニットを複数同時に破壊した条件でも、タイミングの変化は見られなかった。以上の結果から、PP2A は複製タイミング制御に関与しないと結論した。

(2) PP1 の複製開始制御への寄与を明らかにするため、重複機能を持つ *sds21<sup>+</sup>* 遺伝子を破壊し、さらに *dis2-AID* 株を作成した。M 期での欠損を回避するため、*mad2Δ* 破壊株を用いて、G2/M 期同調後に Dis2 タンパク質を分解除去し、再開した細胞周期の S 期初期で

の複製を解析した。その結果、AT2088をはじめとする腕部後期複製開始点ならびに TAS21 などのサブテロメア後期開始点が S 期初期に初期開始点に匹敵するほど効率よく複製した。dis2, sds21 のいずれか片方の破壊では複製への影響は見られなかった。これらの結果から、PP1 活性を持つ Dis2, Sds21 の両者が互いに補完的に働きながら、複製タイミング制御に必須の役割を果たすと結論した。

(3) これまでの解析から、複製タイミング制御にはテロメア結合因子 Taz1, Rif1 が関与することを示している (Tazumi et al, 2012)。また、最近、Hiraga ら (Hiraga et al, 2014) によって出芽酵母 Rif1 が PP1 結合モチーフを持ち、テロメアの複製に両者の結合が必要であることが報告された。分裂酵母複製タイミング制御において、PP1 が Rif1 と結合することが必要であることを明らかにするため、PP1 結合モチーフをアミノ酸置換変異で破壊した rif1 変異株を用いたところ、腕部やサブテロメアの後期複製開始点が初期に効率よく複製するようになり、(2) での PP1 タンパク質分解誘導株の結果ときわめて類相の結果を得た。また、テロメア局在を失う rif1 変異株において複製タイミング異常が見られた。よって、PP1 は Rif1 に結合してテロメアに局在することがタイミング制御に重要であると結論した。

#### 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 2 件)

- ① 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, 2015, 20(3), pp160-172, DOI: 10.1111/gtc.12207
- ② Nanbu, T., Takahashi, K., Murray, IM., Hirata, N., Ukimori, S., Kanke, M., Masukata, H., Yukawa, M., Tsuchiya, E., Ueno, M. “Fission yeast RecQ helicase Rqh1 is required for the maintenance of circular chromosomes.” *Mol. Cell. Biol.* 査読有, 33(6), 2013, pp1175-1187, DOI: 10.1128/MCB.01713-12.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 升方 久夫 “分裂酵母 Replication origin の活性化を制御するしくみ” 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25 日-27 日、横浜
- ② 升方 久夫 “Control of DNA replication and nuclear localization by

chromatin proteins.” The 9th 3R symposium 2014 年 11 月 17 日-21 日 御殿場高原ホテル、静岡県

- ③ 升方 久夫 “Regulation of replication program in fission yeast: replicator, initiator and regulators.” Eukaryotic DNA replication and genome maintenance, 2013 年 12 月 3 日-6 日、神戸
- ④ 升方 久夫 “Replication timing control by chromatin proteins.” 第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 9 月 9 日-13 日、Cold Spring Harbor, USA
- ⑤ 升方 久夫 “Replication timing control by centromere and telomere binding proteins.” 酵母エピジェネティックミーティング、2013 年 9 月 2 日-4 日、福井県あわら市
- ⑥ 升方 久夫 “Replication timing program in fission yeast.” 第 7 回分裂酵母国際学会、2013 年 6 月 24 日-29 日、London, UK
- ⑦ 升方 久夫 “Replication timing control by telomere proteins.” 第 21 回国際遺伝学会、2013 年 4 月 12 日-15 日、Singapore

[図書] (計 1 件)

升方久夫、米崎哲朗、金澤浩  
化学同人 ベーシック分子生物学 2014 年 10 月、277 ページ

[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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等  
大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻分子遺伝学研究室  
<http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/dbs01/re-aper-temp.php?id=14>

分子遺伝学（升方）研究室  
[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) 研究代表者

升方 久夫 (MASUKATA Hisao)  
大阪大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号：00199689

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：