

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650012

研究課題名(和文)テロメアタンパク質による新規ゲノムオーガニゼーションメカニズム

研究課題名(英文) Novel genome-organization mechanism by telomere-binding proteins

研究代表者

加納 純子 (Kano, Junko)

大阪大学・たんぱく質研究所・准教授

研究者番号：10323809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：染色体DNAの複製は、origin(複製開始点)と呼ばれる部位から各々に決められたタイミングで起こることが知られている。本研究では、テロメア異常がゲノム全体の複製タイミングに及ぼす影響を探った。分裂酵母のテロメア結合タンパク質であるRap1やPoz1を欠損させてテロメアDNA長を通常より長くしたところ、一部のlate originの複製のタイミングがearly originのように早くなっていた。さらに、late originで複製開始を阻害するPP1フォスファターゼの局在が異常になっていた。以上のことから、テロメアDNA長の維持は正常な複製タイミングの維持に重要であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Replication of chromosomal DNA starts at the replication origins at fixed timing during S phase. In this study, we investigated the effect of telomere defects in genome-wide replication timing. We observed the accelerated replication at some late origins when the telomere DNA was abnormally elongated by the Rap1 or Poz1 deletions. Furthermore, we found that the localization of PP1 phosphatase was decreased at the late origins in those mutants. Our results indicated that the telomere length maintenance is important for the normal replication timing of chromosome DNA.

研究分野：分子生物学、分子遺伝学

キーワード：テロメア DNA複製 ゲノム 複製開始点

## 1. 研究開始当初の背景

染色体 DNA の複製は、ランダムな場所から起こるのではなく、origin (複製開始点) と呼ばれる特定の部位から各々に決められたタイミングで起こることが知られている。細胞周期の S 期 (DNA 合成期) の比較的早い時期に複製が開始される origin は early origin、遅い時期に複製が開始される origin は late origin と呼ばれている。複製タイミングは発生過程で変化することが知られているだけでなく、複製タイミング異常が細胞のがん化につながることも示唆されている。しかし、複製タイミング制御のメカニズムはまだあまり明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、線状染色体末端の構造体であるテロメアがゲノム全体の複製タイミング制御に及ぼす影響を探った。また、その詳しいメカニズムを解析した。

## 3. 研究の方法

テロメアは、特殊な繰り返し配列からなる DNA (テロメア DNA) とそれを基にして集合する様々なタンパク質群から構成される。分裂酵母のテロメア DNA には Taz1 タンパク質が結合し、Taz1 に Rap1 タンパク質が結合する。さらに Rap1 が Poz1 などの様々なタンパク質と相互作用することにより、様々なテロメア機能が遂行される。従って、Rap1 は分裂酵母のテロメア複合体において中心的な役割を果たしていると言える。本研究では、特にテロメア DNA 長制御と複製タイミング制御との関係を探るため、テロメア DNA 長制御因子である Rap1、Poz1 に着目し、それらを欠損させた株を作製して複製タイミングへの影響を調べた。

DNA 複製タイミングの解析のために、cdc25-22 変異によって S 期に同調でき、BrdU (チミジンのアナログ) を DNA の新生鎖に取り込むことができるように細工した株を用いた。そして、BrdU と取り込んだ DNA 鎖を短く断片化したものを抗 BrdU 抗体で免疫沈降して精製し、そこに含まれる DNA の割合を real-time PCR によって定量した。

また、origin 近傍におけるタンパク質の局在を解析するため、それぞれのタンパク質に Flag タグを付加したものを発現させ、それを抗 Flag 抗体によって免疫沈降した。各タンパク質と共沈した DNA を精製して、real-time PCR によって定量することによって、ゲノム全体に対する割合 (enrichment)

を算出した。

## 4. 研究成果

最近の報告により、分裂酵母の Taz1 や Rif1 (Taz1 に結合するタンパク質) がゲノムワイドな複製タイミング制御に寄与していることが知られているが、Taz1 や Rif1 と同様にテロメア複合体において重要な機能を果たしている Rap1 が複製タイミング制御に寄与しているのかどうか不明であった。そこで Rap1 欠損株における DNA 複製タイミングを解析したところ、Rif1 や Taz1 が制御する late origin の一部 (テロメアから離れているもの) について異常 (早期複製) が見られたが、テロメア近傍の late origin の複製タイミングは正常であった。さらに、その異常は Taz1 をさらに欠損させると、見られなくなった。このことから、Rap1 欠損による複製タイミング異常は、Taz1 依存的事であることがわかった。

次に、Rap1 欠損による複製タイミング異常のメカニズムを詳しく解析するため、Rap1 欠損と同様にテロメア DNA が非常に長くなる Poz1 欠損による影響を調べた。その結果、Poz1 欠損によって、Rap1 欠損時に影響があった late origin の複製タイミングが異常になっていた。さらに、Taz1 を同時に欠損させると、その異常は見られなくなった。以上のことから、テロメア DNA が通常より長くなると、そこに Taz1 が多く結合することによって一部の late origin の複製タイミングに異常が生じていると考えられた。

次に、Taz1 の過剰なテロメア局在がどのようにして複製タイミング異常を引き起こすのか探った。これまでに、分裂酵母および出芽酵母の Rif1 が PP1 phosphatase を late origin 付近にリクルートすることによって、DNA 複製開始に必須な DDK による複製因子のリン酸化を阻害しているのではないかというモデルが提唱されている。そこで、テロメア DNA 異常によって、Rif1 や PP1 の late origin 付近の局在にどのような影響が及んでいるのか解析した。その結果、Rif1 の局在には顕著な影響は見られなかったが、PP1 の一種である Sds21 の局在が有意に減少していた。

以上のことから、テロメア DNA 長が正常に維持されることは、ゲノムワイドな複製タイミング維持に重要であることがわかった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

Tashiro, S., Handa, T., Matsuda, A., Ban, T.,

Miyasato, K., Ishii, K., Kugou, K., Ohta, K., Hiraoka, Y., Masukata, H., and Kanoh, J. Shugoshin forms a specialized chromatin domain at subtelomeres that regulates transcription and replication timing. *Nature Commun.*, 7: 10393, (2016). 査読有 DOI: 10.1038/ncomms10393.

Deng, W., Wu, J., Wang, F., Kanoh, J., Dehe, P.M., Inoue, H., Chen, J., and Lei, M. Fission yeast telomere-binding protein Taz1 is a functional but not a structural counterpart of human TRF1 and TRF2. *Cell Res.*, 25: 881-884, (2015). 査読有 DOI: 10.1038/cr.2015.76.

加納純子 第8章ゲノムを支えるインターメアの機能 (2) -テロメア機能とサブテロメア- 「ゲノムを司るインターメア」 Dojin Bioscience, 23: 87-100, (2015). 査読無

Tarumoto, Y., Kanoh, J. and Ishikawa, F. Receptor for activated C-kinase (RACK1) homolog Cpc2 facilitates the general amino acid control response through Gcn2 kinase in fission yeast. *J. Biol. Chem.*, 288: 19260-19268, (2013). 査読有 DOI: 10.1074/jbc.M112.445270.

Kanoh, J. Release of chromosomes from the nuclear envelope: a universal mechanism for eukaryotic mitosis? *Nucleus*, 4: 100-104, (2013). 査読有 DOI: 10.4161/nucl.23984.

Tashiro, S., Asano, T., Kanoh, J. and Ishikawa F. Transcription-induced chromatin association of RNA surveillance factors mediates facultative heterochromatin formation in fission yeast. *Genes Cells*, 18: 327-339, (2013). 査読有 DOI: 10.1111/gtc.12038.

加納純子 第5章テロメア 「染色体と細胞核のダイナミクス」 Dojin Bioscience, 11: 63-77, (2013). 査読無

〔学会発表〕(計 18 件)

田代三喜、西原祐輝、久郷和人、太田邦史、加納純子. サブテロメア相同配列全破壊によって見えてくる染色体機能. 第33回染色体ワークショップ、松島一の坊、宮城(2016.1.12-14).

加納純子. サブテロメアの機能を探る. クロマチンデコーディング 2015 年度第1回研究会、国際高等研究所、奈良(2015.12.19-20).

Tashiro, S., Handa, T., Matsuda, A., Ban, T., Miyasato, K., Ishii, K., Kugou, K., Ohta, K., Hiraoka, Y., Masukata, H., and Kanoh, J. サブテロメアの新規機能の解明. BMB2015 ワークショップ、神戸ポートアイランド、神戸 (2015.12.1-4).

田代三喜、西原祐輝、久郷和人、太田邦史、加納純子. 分裂酵母サブテロメア相同 DNA 領域完全欠失株の作製と解析. 酵母遺伝学フォーラム第48回研究報告会、広島大学、広島 (2015.8.31-9.2).

Kanoh, J. Dissection of subtelomere functions. Forefront of chromosome biology, 京都大学、京都 (2015.8.10).

Tashiro, S., Handa, T., Matsuda, A., Ban, T., Miyasato, K., Ishii, K., Kugou, K., Ohta, K., Hiraoka, Y., Masukata, H., and Kanoh, J. Shugoshin forms a specialized chromatin domain at subtelomeres that regulates transcription and replication timing. 第8回国際分裂酵母会議、生田神社、神戸 (2015.6.21-26).

Tashiro, S., Handa, T., Matsuda, A., Ban, T., Miyasato, K., Ishii, K., Kugou, K., Ohta, K., Hiraoka, Y., Masukata, H., and Kanoh, J. Spindle assembly checkpoint protein Sgo2 regulates silenced chromatin formation and DNA replication timing at subtelomeres. Telomeres and Telomerase, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA. (2015.4.28-5.2).

Kanoh, J. Roles of protein complexes at chromosome end. 1<sup>st</sup> trilateral workshop for frontier protein studies, 北京大学、中国 (2015.4.23-25).

井上春奈、加納純子. テロメア結合タンパク質 Rap1 に CK2 によるリン酸化はテロメアの核内配置とヘテロクロマチン構造を制御する. 第32回染色体ワークショップ、安芸グランドホテル、広島 (2014.12.15-17).

Kanoh, J. Novel functions of shugoshin (Sgo2) at telomere-adjacent region in interphase. 3R symposium, 御殿場高原ホテル、静岡 (2014.11.17-21).

加納純子. サブテロメア領域の新規機能の解明. 日本遺伝学会第86回大会ワークショップ、長浜バイオ大学、滋賀 (2014.9.17-19).

加納純子. 染色体末端の神秘. 第21回

酵母合同シンポジウム、東京大学、東京  
(2014.9.3-4).

Tashiro, S., Nishihara, Y., Kugou, K., Ohta,  
K. and Kanoh J. Fission yeast without  
subtelomeres. EMBO conference, Telomeres,  
telomerase and disease, ブリュッセル、ベル  
ギー (2014.4.30-5.4).

加納純子. テロメア隣接領域の機能. 第  
36回日本分子生物学会年会ワークショ  
ップ、神戸ポートアイランド、神戸  
(2013.12.3-6).

加納純子. テロメア隣接領域の機能. 国  
立遺伝学研究所研究会「染色体 DNA の  
安定維持の分子メカニズム」, 国立遺伝学  
研究所、三島 (2013.9.27-28).

田代三喜、坂琢人、西原祐輝、宮里和実、  
平岡泰、石井浩二郎、加納純子. 分裂酵  
母のサブテロメア領域の機能解析. 酵母  
遺伝学フォーラム第46回研究報告会、  
東北学院大学、仙台 (2013.9.8-10).

Kanoh, J. Structure and functions of  
subtelomere. Message from yeast to  
epigenetics, Gandia Housen、福井  
(2013.9.2-4).

Kanoh, J. and Tanaka, M. Rif3, a novel  
Rap1-interacting factor in *S. pombe*.  
Telomeres and Telomerase, Cold Spring  
Harbor Laboratory, NY, USA.  
(2013.4.30-5.4).

〔図書〕(計1件)

加納純子他. 生物学辞典第5版、岩波書店  
(2013).

〔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

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・准教授  
研究者番号：10323809

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

長谷川雄大 (HASEGAWA, Yudai)