

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401
研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)
研究期間：2011～2015
課題番号：23114009
研究課題名(和文)テロメア構成因子による染色体の統合的制御機構

研究課題名(英文)Elucidation of functions of chromosome ends

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) 65,100,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物の染色体末端領域であるテロメアやサブテロメアに着目し、その新規機能や新規制御のメカニズムを探った。その結果、テロメアタンパク質Rap1が細胞分裂期にCdc2によってリン酸化され、それによってテロメアが核膜から一時的に解離し、染色体が正常に分配されることを明らかにした。また、Rap1を中心としたテロメア結合タンパク質複合体の形成メカニズムや、その生理学的意義についても解析を行った。一方、テロメアに隣接するサブテロメアに関する解析も行った。シュゴシンタンパク質Sgo2が細胞周期の間期特異的にサブテロメアに局在し、複製タイミング制御など様々な機能を果たしていることを発見した。

研究成果の概要(英文)：I investigated the mechanisms of novel functions and novel regulations of telomeres and subtelomeres at chromosome ends in eukaryotes. I found that Rap1, a telomere-binding protein, is phosphorylated by Cdc2 at M phase, which induces transient release of telomeres from the nuclear envelope, ensuring proper chromosome segregation. I also analyzed the mechanisms of formation of telomere protein complexes and their physiological importance. Furthermore, I investigated the functions of Sgo2, a shugoshin-family protein, at subtelomeres. Sgo2 is localized at subtelomeres only at interphase and plays various roles, such as replication timing control.

研究分野：分子生物学

キーワード：染色体 テロメア サブテロメア クロマチン 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報を担う DNA は、ヒストンタンパク質などの様々な物質と相互作用することによって、「染色体」と呼ばれる構造体を形成する。真核生物は線状の染色体を持ち、その最末端には「テロメア」と呼ばれるドメインが存在する。テロメアは、特殊な繰り返し配列からなる DNA と、それを基にして集合する様々なタンパク質から構成される。テロメアは、染色体構造維持、細胞寿命制御、生殖細胞の永続的維持など、生命にとって重要な役割を果たしていることが知られている。しかし、テロメア結合タンパク質の機能、テロメアタンパク質複合体形成の詳しいメカニズムや、各々の相互作用の生理学的意義などについて、まだ不明な点が多く残されている。

一方、テロメアに隣接して、「サブテロメア」と呼ばれる染色体ドメインが存在する。サブテロメアは、テロメア繰り返し配列とは異なる DNA からなるが、サブテロメア間で非常に高い相同性を有する領域を含む。分裂酵母では、その相同配列領域を中心として、ヒストン H3-K9 残基のメチル化を介したヘテロクロマチン構造が形成される。しかし、サブテロメアの生理学的意義や制御機構、相同配列以外の領域の機能については、謎に包まれている。

2. 研究の目的

そこで我々は、テロメア結合タンパク質の新規機能、テロメアタンパク質複合体形成の詳しいメカニズムや生理学的機能、サブテロメアの新規機能を明らかにすることを目的として、テロメアおよびサブテロメア研究の優れたモデル生物である分裂酵母を用いて解析を行った。

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 や Bqt4 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 (1~2 : テロメア) では、特に Rap1 に着目し、その翻訳後修飾などを解析し、様々なテロメア機能への影響を調べるとともに、新規テロメア機能を明らかにすることを目指した。

また、本研究 (3 : サブテロメア) では、

未知なるサブテロメア機能を探るため、細胞分裂期 (M 期) において染色体のセントロメアに局在して正確な染色体分配に寄与しているシュゴシンタンパク質 Sgo2 に着目した。Sgo2 はサブテロメアにも局在することが示唆されていたため、その詳しい局在メカニズムを探るとともに、サブテロメアにおける機能を探った。

4. 研究成果

(1) テロメア結合タンパク質 Rap1 の細胞分裂期におけるリン酸化は正常な染色体分配を保障する

分裂酵母において Rap1 はテロメアタンパク質複合体の中心的役割を果たしている。テロメアの細胞分裂期 (M 期) における機能を明らかにするため、Rap1 の M 期における制御に着目した。

まず、分裂酵母のテロメアは細胞周期の間期において Rap1 と核膜タンパク質 Bqt4 との相互作用などによって核膜近傍に配置されていることが知られている。蛍光顕微鏡観察によって M 期におけるテロメアの動態を解析した結果、テロメアは M 期において一時的に核膜から離れることがわかった。テロメア DNA に直接結合する Taz1 と Bqt4 の融合タンパク質を発現し、強制的にテロメアを核膜に配置したところ、異常な染色体分配が観察されるようになった。このことから、M 期におけるテロメアの核膜からの一時的な解離は、染色体の安定性に重要であることがわかった。

次に、mass 解析や *in vitro* kinase assay によって、M 期において Rap1 の 5 カ所のアミノ酸残基がリン酸化されることがわかった。それらのうち、3 つのアミノ酸は細胞周期制御因子である Cdc2 によってリン酸化されることがわかった。それらのアミノ酸残基を非リン酸化型のアラニンに置換すると、Rap1 と Bqt4 との相互作用が増強され、テロメアと核膜との距離が非常に短くなり、逆にリン酸化ミミック型のグルタミン酸などに置換すると、Rap1 と Bqt4 との相互作用が阻害され、テロメア-核膜間距離が長くなった。また、非リン酸化型の Rap1 を発現すると、正常に染色体維持ができなくなった。このことから、Rap1 の Cdc2 によるリン酸化は核膜からのテロメアの解離を促し、それが正常な染色体分配に寄与していることが明らかになった。

(2) Rap1 を中心としたテロメアタンパク質複合体形成メカニズムの解明

Rap1 は Taz1 を足場としてテロメアに結合するが、他の様々なタンパク質と相互作用することによって、様々なテロメア機能を果たしている。そこで、Rap1 のどのドメインが相

相互作用に重要なのか、その相互作用が生理学的機能に重要なのかを探った。その結果、Rap1 の C 末端側半分に集中して他のタンパク質が結合し、N 末端側は既知のテロメア機能には重要ではないことがわかった。また、Taz1 と Rap1 との相互作用ドメインの構造解析を行ったところ、分裂酵母からヒトまで 3 次元構造は似ていることがわかった。

(3) シュゴシンタンパク質 Sgo2 はサブテロメアの特異的なクロマチン構造形成、遺伝子発現制御、複製タイミング制御に重要である

分裂酵母 Sgo2 の詳しい局在を探るため、ChIP-on-Chip 解析を行ったところ、サブテロメア全域(約 100 kb)に渡って局在することがわかった。

次に、Sgo2 が細胞周期のどの時期にサブテロメアに局在するのか調べた。同調細胞を用いたクロマチン免疫沈降法により、Sgo2 は、セントロメアには細胞分裂期に局在し、サブテロメアには細胞周期の間期、中でも特に G2 期に局在することがわかった。

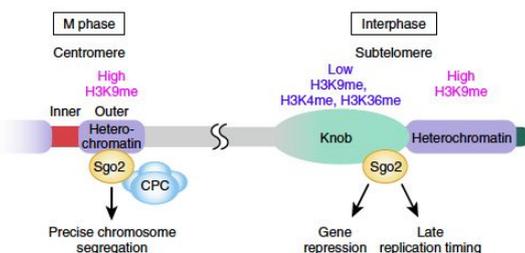
次に、Sgo2 のサブテロメア局在に必要な条件を明らかにするため、様々な変異株における Sgo2 の局在を解析した。その結果、ヒストン H2A の Ser121 残基をリン酸化する Bub1 キナーゼの欠損株や、H2A の Ser121 残基を非リン酸化型アミノ酸のアラニンに置換した株において、Sgo2 のサブテロメア局在がほとんど見られなくなった。このことから、H2A-Ser121 のリン酸化が Sgo2 のサブテロメア局在に必要であることがわかった。

次に、Sgo2 のサブテロメアにおける機能を探った。分裂酵母細胞の染色体 DNA を DAPI によって染色したものを超高解像度顕微鏡 (3DSIM) で観察すると、間期のサブテロメア付近に 1~2 点強いシグナル、すなわち高度の凝縮したクロマチン構造が検出される。これは knob と呼ばれている。Sgo2 を欠損させると、knob が全く観察されなくなったことから、Sgo2 は knob 構造形成に必須であることがわかった。

Sgo2 による knob 形成の意義を調べるため、マイクロアレイ解析によってゲノムワイドな転写状態を調べたところ、Sgo2 欠損株では元々 Sgo2 が局在していたサブテロメア領域においてのみ遺伝子発現量が顕著に増加していた。このことから、Sgo2 はサブテロメア遺伝子群の転写を抑制する機能を果たしていることがわかった。

サブテロメア領域の DNA 複製は細胞周期の S 期 (DNA 合成期) の最も遅い時期に開始されるようにプログラムされている。興味深いことに、Sgo2 欠損株ではサブテロメアの DNA 複製開始が早くなっていた。従って、Sgo2 はサブテロメア領域の DNA 複製タイミング維持に重要であることがわかった。

本研究により、Sgo2 タンパク質が細胞周期依存的にセントロメアとサブテロメアを行き来し、各領域において異なる機能を果たしていることが明らかになった。



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 12 件)

Inoue, H., Sugimoto, S., Takeshita, Y., Takeuchi, M., Hatanaka, M., Nagao, K., Hayashi, T., Kokubu, A., Yanagida, M. and Kanoh, J. CK2 phospho-independent assembly of the Tel2-associated stress-signaling complexes in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells*, 1: 59-70, (2017). 査読有 DOI: 10.1111/gtc.12454.

加納純子 「シュゴシンタンパク質が染色体末端で果たす意外な機能」生化学・vol. 89: 73-76, (2017). 査読無

加納純子 「サブテロメアはテロメアのサブじゃない」BioResource Now! 12 (6), (2016). 査読無

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

Fujita, I., Tanaka, M. and Kanoh, J. Identification of the functional domains of the telomere protein Rap1 in *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS ONE*, 7: e49151, (2012). 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0049151.

Fujita, I., Nishihara, Y., Tanaka, M., Tsujii, H., Chikashige, Y., Watanabe, Y., Saito, M., Ishikawa, F., Hiraoka, Y. and Kanoh, J. Telomere-nuclear envelope dissociation promoted by Rap1 phosphorylation ensures faithful chromosome segregation. *Curr. Biol.*, 22: 1932-1937, (2012). 査読有 DOI: 10.1016/cub.2012.08.019.

[学会発表](計 37 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. 1st 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, プリュッセル、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).

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

田代 三喜 (TASHIRO, Sanki)
藤田 生水 (FUJITA, Ikumi)
西原 祐輝 (NISHIHARA, Yuki)
井上 春奈 (INOUE, Haruna)
坂 琢人 (BAN, Takuto)
宮里 和実 (MIYASATO, Kazumi)

田中 麻紀子 (TANAKA, Makiko)
竹下 由美子 (TAKESHITA, Yumiko)
竹内 美穂 (TAKEUCHI, Miho)
杉本 静香 (SUGIMOTO, Shizuka)