

令和 3 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03606

研究課題名(和文)染色体末端ドメインの機能・構造維持メカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of the maintenance of functions and structure of chromosome ends

研究代表者

加納 純子 (Kano, Junko)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：10323809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：染色体の最末端に存在するドメインであるテロメアは、特殊な繰り返しDNA配列を持ち、染色体末端の保護や細胞寿命制御など、生命維持に必須の役割を果たしている。一方、テロメアに隣接するサブテロメアは、DNA配列が完全に決定されていない、長大な重複配列を含むことから個々のサブテロメアの解析ができないなどの実験手法的困難から、その機能解析がほとんど進まなかった染色体の未開の地である。そこで本研究では、(1) 分裂酵母のサブテロメアクロマチン構造形成、および(2) サブテロメアとユークロマチン領域との境界決定の分子メカニズムを探った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年飛躍的に知見が蓄積したテロメア研究とは対照的に、サブテロメア研究はまだ黎明期に留まっている。本研究は、遺伝学的解析が容易な分裂酵母の利点を活かし、世界に先駆けてサブテロメアの制御や機能を明らかにするものである。また、サブテロメア構造の異常によってサブテロメア微細構造異常症や筋ジストロフィが発症することが知られている。いずれの場合もサブテロメアに存在する遺伝子の発現量の異常が直接的原因とされるが、現在のところ、この病気に対する根本的な治療法はない。本研究によって、サブテロメアにおけるクロマチン構造や遺伝子発現維持機構の詳細が明らかになり、治療法の開発につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Telomeres at chromosome ends possess repetitive DNA sequences and play essential roles in life maintenance, such as protection of chromosome ends and regulation of cell senescence. Subtelomere, a telomere-adjacent domain, is a uncultivated land in chromosomes due to various technical difficulties due to its incomplete DNA sequence information and its complex mosaic structure with multiple long common sequences. In this study, we investigated the molecular mechanisms for (1) how subtelomeric chromatin structure is formed and (2) how the boundary between a subtelomere and its adjacent euchromatin is regulated.

研究分野：染色体生物学

キーワード：テロメア サブテロメア 染色体 クロマチン

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報の担い手である DNA は、タンパク質などと結合して染色体と呼ばれる構造体を形成する。染色体には様々なドメインがあり、それぞれが独自の役割を果たすことによって染色体全体の機能が維持されている。染色体の最末端に存在するドメインであるテロメアは、特殊な繰り返し DNA 配列を持ち、染色体末端の保護や細胞寿命制御など、生命維持に必須の役割を果たしている。一方、テロメアに隣接してサブテロメアと呼ばれるドメインがある。サブテロメアは、テロメアの繰り返し配列とは異なる DNA 配列を持ち、各生物種のサブテロメア間で相溶性が非常に高く長大な共通配列（以下、SH 配列と呼ぶ）を含んでいる。サブテロメアは、真核生物において広く保存されている染色体ドメインであるにも関わらず、DNA 配列が完全に決定されていない、長大な重複配列を含むことから個々のサブテロメアの解析ができない、染色体から簡単に取り除くことができないなどの実験手法的困難から、その機能解析がほとんど進まなかった染色体の未開の地である。しかし最近、医学的および進化的観点から、サブテロメアへの関心が高まってきている。

2. 研究の目的

分裂酵母の SH 配列領域（約 50 kb）では、ヒストン H3 タンパク質の 9 番目のリジン残基（H3K9）のメチル化修飾を介した高度に凝縮したヘテロクロマチン構造が形成される。一方、サブテロメアの SH に隣接するユニークな DNA 配列からなる約 50 kb の領域では、ヒストンの修飾（メチル化、アセチル化など）レベルが非常に低く抑えられており、前述のヘテロクロマチンよりさらに高度に凝縮した Knob と呼ばれるクロマチン構造が形成される。これまでに我々は、細胞分裂期にセントロメアに局在して正確な染色体分配に重要な機能を果たす Shugoshin 2 (Sgo2) タンパク質が、間期（細胞周期の M 期以外）にサブテロメアに局在を変え、Knob 構造の形成を誘導し、サブテロメア遺伝子群の発現量の維持やサブテロメア領域の DNA 複製のタイミング維持に寄与していることを発見した（Tashiro et al., Nature Commun., 2016）。

我々は、サブテロメアの数の少なさ（haploid あたり 4-6 箇所）と遺伝学的操作が容易であるという圧倒的な有利性を利用して、分裂酵母のすべての SH 配列（この場合 5 箇所）をマーカー遺伝子によって置き換えて削除した haploid 株（SD5 株と呼ぶ）の作製に成功した（Tashiro et al., Nucleic Acids Res., 2017）。興味深いことに、SD5 株では、サブテロメアヘテロクロマチンが SH 隣接領域（Knob 領域）に侵入しており、その領域の遺伝子発現が著しく抑制されていたことから、SH 領域はヘテロクロマチンを Knob 領域まで広げないために必要であることがわかった。また、Knob 領域の一部（約 25 kb）を SD5 株において削除したところ、ヘテロクロマチンが Knob 領域からさらに内側に侵入することはなかったことから、Knob 領域の端（セントロメア側）には、ヘテロクロマチンの広がりをブロックする仕組みがある可能性が示唆された。

以上のように、分裂酵母のサブテロメアには二つのクロマチン領域があり、Sgo2 が Knob の形成やサブテロメア遺伝子群の発現維持、サブテロメアの DNA 複製タイミング維持に重要であること、SH 領域やサブテロメアの端にはヘテロクロマチンの広がりを抑制する仕組みがあることが明らかになった。しかし、これらの具体的な分子メカニズムは不明であった。そこで本研究では、以下のことを解析することにより、サブテロメア機能の全体像を明らかにすることを目的とした。

(1) どのようにしてサブテロメア機能（Knob 形成、遺伝子発現維持、DNA 複製タイミング維持）は制御されているのか？

Sgo2 を間期にサブテロメアに局在させる因子や、Sgo2 とは独立にサブテロメア機能に寄与する因子を変異株スクリーニングによって同定し、その機能解析を行うことにより、サブテロメア機能維持メカニズムの全体像を明らかにする。

(2) サブテロメアクロマチンの border を決める仕組みはどのようなものか？

サブテロメア領域の boundary が異常になった変異株をスクリーニングして、原因遺伝子を同定・解析することにより、サブテロメアバウンダリーを決定する分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) どのようにしてサブテロメア機能は制御されているのか？

これまでの研究により、Sgo2 がサブテロメアの Knob の形成に必須であることがわかっている。Knob は高度に凝縮したクロマチン構造をとっており、凝縮したクロマチン構造は一般的に周辺の遺伝子発現を抑制する効果を持つことから、Sgo2 は Knob の形成を介してサブテロメア遺伝子群の発現を制御している可能性が高いと考えられる。Sgo2 による Knob 形成あるいはサブテロメア遺伝子発現制御メカニズムを探るため、まず、異なる染色体腕の Knob 領域に *ade6⁺*, *his5⁺*, *ura4⁺* マーカー遺伝子を挿入した株を作製した。この株では、Knob 構造によって転写が抑制されるため、各マーカー遺伝子を選択する培地上においてはコロニー形成できない。次に、

PCR 法によって *sgo2*⁺ 遺伝子にランダムに変異を導入し、Knob 構造が壊れるなどの理由によりマーカー遺伝子の発現抑制がなくなり、コロニー形成できるようになった変異株を取得する(3種のマーカー遺伝子の使用は、単独のマーカー遺伝子の代謝経路に変異が入るなどのゴミを除くため)。それらの変異株の変異原因遺伝子を同定し、それらの遺伝子破壊株の表現型や遺伝子産物の細胞内局在などを詳しく解析する。

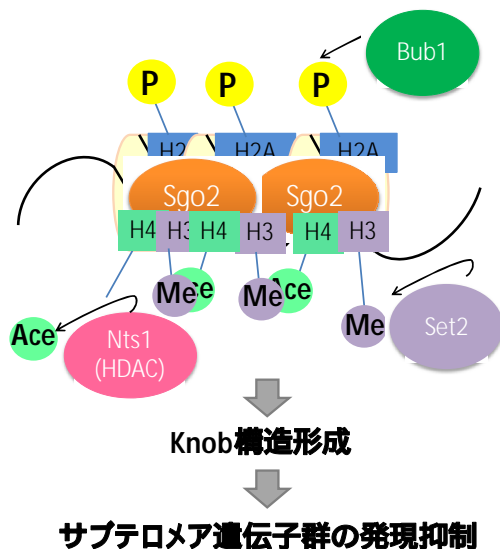
(2) サブテロメアクロマチンの border を決める仕組みはどのようなものか？

これまでの我々の研究成果より、サブテロメア末端にはそれ以上染色体内部にヘテロクロマチンが侵入しないようにブロックするシステムが存在していることが示唆されている。その分子メカニズムを探るため、2種類のマーカー遺伝子をサブテロメア領域のすぐ外側に挿入し、ハイグロマイシン耐性遺伝子カセットをゲノムにランダムに挿入することによる変異株スクリーニングを行い、変異原因遺伝子を同定する。それらの遺伝子破壊株の表現型や遺伝子産物の細胞内局在などを詳しく解析する。

4. 研究成果

(1) どのようにしてサブテロメア機能は制御されているのか？

サブテロメア領域に挿入した3種のマーカー遺伝子の発現が異常上昇したことにより、それらを選択する培地でコロニー形成した変異株を約400株取得した。さらにそれらの中から、*Sgo2*のタンパク質発現自体にほとんど影響のない約60株を選別した。現在までに、幾つかの重複した変異が見つかった。上記の選択培地で安定な増殖を示した変異株について、既知の多数の変異株の変異部位との遺伝学的距離を解析することにより、当該変異株の変異部位を同定した。その結果、ヒストンアセチル化酵素 (HDAC) 複合体のサブユニットが複数種類同定された。中でも、*Nts1* というサブユニットについて解析を進めた。*nts1*⁺ 遺伝子の破壊株を作製して様々な表現型を解析した結果、*Nts1* は少なくともサブテロメアにおけるヒストン H4K5 や H4K12 残基の脱アセチル化に重要であり、また *Sgo2* のサブテロメア局在に重要ではあるが必須ではないことがわかった。興味深いことに、ヒストン H3K36 メチル化酵素である *Set2* と *Nts1* の両方を欠損させると、*Sgo2* のサブテロメア局在はほとんど見られなくなった。また、これまでの我々の研究成果により、*Sgo2* のクロマチン局在には *Bub1* キナーゼによるヒストン H2AS121 のリン酸化が重要であることもわかっている。これらのことから、間期における *Sgo2* のサブテロメア局在には、3種類のヒストンの異なる翻訳後修飾が関与していることが示唆された(下図)。今後は、*Nts1* の局在制御、*Sgo2* のサブテロメア局在の細胞周期依存的な制御などについて解析を進めて、サブテロメアにおける Knob 構造形成の分子メカニズムの全体像を明らかにする。



(2) サブテロメアクロマチンの border を決める仕組みはどのようなものか？

ヘテロクロマチンがサブテロメアの外に流出することにより、サブテロメア領域のすぐ外側に挿入した2種類のマーカー遺伝子の発現が抑制された変異株を約60株取得した。それらの中から特に遺伝子発現抑制の表現型が安定している株13株を選別した。それらのすべての株において、実際にヘテロクロマチン (H3K9 メチル化) がサブテロメアの外側の約50 kb にわたって流出していることがわかった。それらのうちの一つの変異株(#36株)について解析を進めたところ、ハイグロマイシン耐性遺伝子が *red1*⁺ 遺伝子座位に挿入されていることがわかった。*red1*⁺ 遺伝子の破壊株を作製したところ、ヘテロクロマチンがサブテロメアの外側に流出していた。このことから、*Red1* はサブテロメアの boundary に関与していることが明らかになった。今後、*Red1*

がどのようにしてサブテロメア boundary に寄与するのかを詳細に解析する。また、他の変異株についても、ハイグロマイシン耐性遺伝子がどの座位に挿入されているのか解析し、原因遺伝子を同定する。それぞれから同定された遺伝子のサブテロメア boundary における機能を解析し、サブテロメア boundary の分子メカニズムを解明する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Oizumi Y, Kaji T, Tashiro S, Takeshita Y, Date Y, Kanoh J.	4. 巻 12
2. 論文標題 Complete sequences of Schizosaccharomyces pombe subtelomeres reveal multiple patterns of genome variation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 611
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-20595-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hasegawa Y., Yamamoto M., Miyamori J., Kanoh J.	4. 巻 9
2. 論文標題 Telomere DNA length-dependent regulation of DNA replication timing at internal late replication origins.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 9946
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-46229-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Inoue H, Horiguchi M, Ono K, Kanoh J.	4. 巻 47
2. 論文標題 Casein kinase 2 regulates telomere protein complex formation through Rap1 phosphorylation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res.	6. 最初と最後の頁 6871-6884
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkz458.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hu C., Inoue H., Sun W., Takeshita Y., Huang Y., Xu Y., Kanoh J., and Chen Y.	4. 巻 47
2. 論文標題 Structural insights into chromosome attachment to the nuclear envelope by an inner nuclear membrane protein Bqt4 in fission yeast.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res.	6. 最初と最後の頁 1573-1584
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gky1186	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Hu C., Inoue H., Sun W., Takeshita Y., Huang Y., Xu Y., Kanoh J., and Chen Y.	4. 巻 27
2. 論文標題 The Inner Nuclear Membrane Protein Bqt4 in Fission Yeast Contains a DNA-Binding Domain Essential for Telomere Association with the Nuclear Envelope.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 3350343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2018.10.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計14件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 加納純子
2. 発表標題 Complete sequences of <i>S. pombe</i> subtelomeres reveal multiple patterns of genome vari
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加納純子
2. 発表標題 サブテロメアはゲノム進化のホットスポットである
3. 学会等名 第53回酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加納純子
2. 発表標題 サブテロメアはゲノム進化のホットスポットである
3. 学会等名 第38回染色体ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Junko Kanoh
2. 発表標題 Casein kinase 2 (CK2) regulates telomere protein complex formation through Rap1 phosphorylation.
3. 学会等名 Pombe 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加納純子
2. 発表標題 染色体末端サブテロメア領域の新規機能制御
3. 学会等名 蛋白研セミナー「細胞運命を決定する核空間制御」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加納純子
2. 発表標題 サブテロメアクロマチン構造の形成機構
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会ワークショップ(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加納純子
2. 発表標題 サブテロメア全DNA配列決定によって見えてくるサブテロメアDNA構造のダイナミズム
3. 学会等名 酵母ルネッサンス2019(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加納純子
2. 発表標題 サブテロメア全DNA配列決定により明らかになった2つのsequence variationモード
3. 学会等名 第37回染色体ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yudai Hasegawa, Junki Miyamori, and Junko Kanoh
2. 発表標題 Telomere length-dependent regulation of DNA replication timing at non-telomeric regions.
3. 学会等名 Telomere biology in health and human disease (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加納純子
2. 発表標題 染色体末端領域の新規機能を探る
3. 学会等名 蛋白研セミナー「細胞核とクロマチン構造が操る高次生命現象」(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Junko Kanoh
2. 発表標題 Elucidation of subtelomere functions using <i>S. pombe</i>
3. 学会等名 日本遺伝学会第90回大会(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加納純子
2. 発表標題 染色体末端による染色体全体の構造・動態制御
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Junko Kanoh
2. 発表標題 New insights into telomeres and subtelomeres in <i>S. pombe</i>
3. 学会等名 Regulation of Quiescent and Proliferative <i>Pombe</i> Chromatin and Genome（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加納純子
2. 発表標題 サブテロメアクロマチン構造形成の分子機構
3. 学会等名 染色体研究の最前線2019（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
中国	上海国立蛋白質科学研究所			