

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26290061

研究課題名(和文) テロメア隣接領域の未知なる機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of functions of telomere-adjacent regions

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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：染色体末端テロメアに隣接するサブテロメア、特にサブテロメア相同(SH)配列の機能はほとんど明らかになっていない。そこで我々は分裂酵母においてすべてのSH配列を削除した株の作製を行った。その株の解析を行った結果、SH配列は通常の細胞増殖やテロメアDNA長制御には必要ないことがわかった。しかし、SH配列はヘテロクロマチン形成を緩衝することにより、サブテロメア領域の遺伝子発現の維持に重要であり、テロメア欠損時には危険な異染色体間末端融合を防ぐといった、複合的防御機構を備えていることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Functions of subtelomeres, particularly subtelomeric homologous (SH) sequences, remain elusive. Complete removal of SH sequences from the genome revealed that they are dispensable for mitosis, meiosis, and telomere length control. However, SH sequences prevent deleterious inter-chromosomal end fusion by facilitating intra-chromosomal circularization. Surprisingly, SH-deleted cells sometimes survive telomere loss through inter-chromosomal end fusions via homologous loci such as LTRs, accompanied by centromere inactivation of either chromosome. Moreover, SH sequences function as a buffer region against the spreading of subtelomeric heterochromatin into the neighboring gene-rich regions. Furthermore, we found a nucleosome-free region at the subtelomeric border, which may be a second barrier that blocks heterochromatin spreading into the subtelomere-adjacent euchromatin. Thus, our results demonstrate multiple defense functions of subtelomeres in chromosome homeostasis and gene expression.

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

## 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。

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ことを明らかにした (Kano et al., *Curr. Biol.*, 2005)。しかし、サブテロメア相同配列の生理学的意義や制御機構については、まだほとんど明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

そこで我々は、細胞に複数コピー存在するサブテロメア相同配列の詳しい生理学的機能、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、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

テロメアは各染色体両末端に存在し、サブテロメアはテロメアに隣接して存在する。染色体数の約 2 倍の数のサブテロメア相同配列の生理学的機能を探るためには、すべてのサブテロメア相同配列をゲノムから削除して細胞機能への影響を解析することが最善の方法である。しかし、ほとんどの実験モデル生物は、細胞あたり多くの染色体を持ち、サブテロメアの数も多い。そのため、すべてのサブテロメア相同配列をゲノムから削除することは非常に困難である。ところが、分裂酵母の染色体数は 3 本と例外的に少なく、さらに、1 倍体で安定に生育し、あらゆる遺伝学を使える。したがって本研究では、分裂酵母の有利性を最大限駆使して、サブテロメア相同配列の完全削除株の作製を行い、その表現型を様々な角度から解析することにした。

## 4. 研究成果

### (1) 分裂酵母のサブテロメア相同配列 (SH 配列) の完全欠失株の作製

分裂酵母は 3 本の染色体を持ち、1 番、2 番染色体のテロメアに隣接して、約 50 kb の SH 配列が存在することが明らかになっている。一方、3 番染色体ではテロメアに隣接して約 15 kb の SH 配列の一部が株によって存在する場合と存在しない場合がある。そこで、すべての SH 配列を削除するにあたり、本研究で用いる株における SH 配列の個数を調べた。その結果、3 番染色体の左腕にのみ SH 配列が存在することがわかった。

次に、相同組換えによって各 SH 配列をマーカー遺伝子と置き換えた株を作製した。引き続き、それらの株を掛け合わせることによって、最終的にすべての SH 配列を削除した株 (SD5 株) の作製に成功した。

### (2) SH 配列は細胞増殖、様々なストレス反応、テロメア DNA 長制御に必要なではない

次に、SD5 株の様々な表現型を解析した。まず、通常の栄養条件において野生株と同様の増殖速度、細胞形態、体細胞分裂、減数分裂を示したことから、SH 配列は通常の細胞増殖には必要ないことがわかった。さらに、様々なストレス (ヒドロキシウレアによる DNA 複製障害、カンプトセシンや紫外線による DNA 障害、微小管重合障害、高温、低温) に対して、野生株と比べて高い感受性を示さなかったことから、SH 配列はこれらのストレス応答に必要なことがわかった。また、SD5 株は野生株とほぼ同じ長さのテロメア DNA を保持していたことから、テロメアに隣接する SH 配列の存在は、テロメア DNA 長制御に必要なことがわかった。

### (3) SH 配列非存在下におけるテロメア短小化による染色体末端融合

テロメラーゼを欠失させてテロメア DNA を短小化させると、染色体末端が保護されないことによる DNA 損傷チェックポイントの活性化、異染色体末端融合による M 期の染色体分配の異常などによって、多くの細胞は死に至る。しかし、低頻度に生き残る細胞が見られる。分裂酵母の場合、そのメジャーな生存方法は染色体自己環状化である (ごくわずかに相同組換えなどによる生存方法を使う)。染色体自己環状化のためには、SH 配列が重要な役割を果たしている。SH 配列に仕込まれている、自己環状化した際に同方向になる相同性の極めて高い DNA 配列において、single-strand annealing 反応が起きて、染色体が自己環状化する。

それでは SD5 株では、テロメアが短小化す

ると自己環状化による生存ができなくなるのであろうか？そこで、SD5株においてテロメラーゼを欠失させてみたところ、意外なことにサバイバーが多数取得できた。それらのサバイバーの染色体の形態を調べたところ、ほとんど細胞で染色体環状化が見られた。SH配列が存在している場合は、染色体が環状化する場合、すべてのケースで自己環状化であったが、SD5株の場合（SH配列が存在しない場合）、30%程度の頻度で異染色体間末端融合が見られた。このことから、SH配列は本来、テロメアが短小化した際、染色体分配に支障をきたす、危険な異染色体間末端融合を起こさないようにする機能があることがわかった。ただし、3番染色体はすべてHAATIと呼ばれる組換えによって線状形態を維持していることがわかった。

次に、SD5株が染色体のどの部分で末端融合しているのか調べた。その結果、SD5株では、サブテロメア領域内外の相同配列（レトロトランスポゾンのLTR配列や4コピー存在する *L-asparaginase* 遺伝子座位など）において融合していることがわかった。

#### (4) 異染色体間末端融合に伴う片方のセントロメアの不活性化

SD5株でテロメアを短小化させると、1番、2番染色体が融合し、環状化した染色体が得られた。すなわち、一つの染色体に2つのセントロメアが存在することになり、dicentric chromosomeは染色体分配に支障をきたすことが知られている。それではどのようにして、SD5由来の細胞は生存できているのだろうか。そこで、セントロメアの状態を調べた結果、興味深いことに、1番染色体あるいは2番染色体のうち、どちらか片方のセントロメアにおいてCENP-Aタンパク質（キネトコア形成の基盤となるヒストンH3バリエーション）が完全に消失していた。さらに、その不活性化されているセントロメアのコア領域には、通常は見られないヘテロクロマチンが侵入しており、セントロメアの不活性化状態を維持していることが示唆された。

#### (5) サブテロメアバウンダリー機構の存在

サブテロメアのSH配列にはヘテロクロマチンが形成される。SD5株では、ヘテロクロマチンがSHに隣接するサブテロメア領域全域に局在をシフトしていた。このことから、SH領域は普段ヘテロクロマチンを緩衝する役割を果たしていることがわかった。

さらにSH隣接領域を削ったところ、ヘテロクロマチンはサブテロメア末端より外側に局在をシフトすることはなかった。このことから、サブテロメアの末端には、ヘテロクロマチン構造を外に広げないためのバウンダリー機構が備わっていることが示唆された。その領域について解析した結果、驚いた

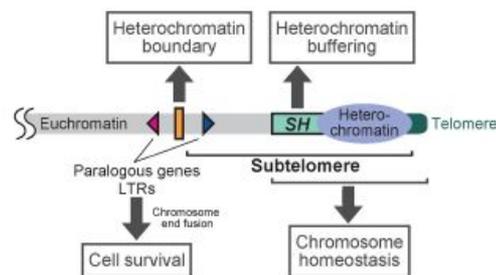
ことに境界部位においてヒストンの局在が欠落しており、ヌクレオソーム構造が形成されていないことがわかった。このことから、ヒストン局在のギャップを設けることによってヘテロクロマチンの浸潤を防いでいる可能性が示唆された。

#### (6) SH 隣接領域へのヘテロクロマチンの侵入によるサブテロメア遺伝子群の転写の抑制

SD5株においてヘテロクロマチンがSH隣接領域に侵入してきたことにより、その領域全体において遺伝子発現が著しく抑制されていることがマイクロアレイ解析により明らかになった。さらに、そのことによりLiClやNaClなどに高感受性を示すようになった。

#### (7) まとめ

以上の結果より、サブテロメアは染色体の恒常性、遺伝子発現、生命を維持するための防御機構を幾重にも備えていることがわかった。



#### 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10件)

Kanoh, J. Telomeres and subtelomeres: new insights into the chromatin structures and functions of chromosome ends. *Genes Genet Syst.*, 92:105, (2018). 査読無 DOI: 10.1266/ggs.17-10001.

Kanoh, J. Unexpected roles of a shugoshin protein at subtelomeres. *Genes Genet Syst.*, 92: 127-133, (2018). 査読有 DOI: 10.1266/ggs.17-00016.

Xue, J., Chen, H., Wu, J., Takeuchi, M., Inoue, H., Liu, Y., Sun, H., Chen, Y., Kanoh, J. and Lei, M. Structure of the fission yeast *S. pombe* telomeric Tpz1-Poz1-Rap1 complex. *Cell Res.*, 27: 1503-1520, (2017). 査読有 DOI: 10.1038/cr.2017.145.

Tashiro, S., Nishihara, Y., Kugou, K., Ohta,

K. and Kanoh, J. Subtelomeres constitute a safeguard for gene expression and chromosome homeostasis. *Nucleic Acids Res.*, 45: 10333-10349, (2017). 査読有 DOI: 10.1093/nar/gkx780

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

[学会発表] (計 24 件)

加納純子. 真核生物における染色体の線状形態の意義. 染色体研究の最前線 2018, 東京工業大学、横浜 (2018.3.15-16).

長谷川雄大、宮森純輝、加納純子. テロメア DNA 長は染色体腕部の DNA 複製タイミングの維持に重要である. 第 35 回染色体ワークショップ、グリーンホテル三ヶ根、愛知 (2017.12.20-22).

竹下由美子、杉本静香、井上春奈、加納純子. Tel2 は PIKK タンパク質群の発現を維持し正常なストレス応答を保障する. 酵母遺伝学フォーラム第 50 回研究報告会、東京大学、東京 (2017.9.11-13).

Kanoh, J. Telomere length-dependent regulation of DNA replication timing at non-telomeric regions. 3<sup>rd</sup> Trilateral workshop for frontier protein studies, National Center for Protein Science in Shanghai, Shanghai, China (2017.8.31-9.2).

Kanoh, J. Subtelomeres constitute a safeguard for gene expression and chromosome homeostasis. 9<sup>th</sup> International Fission Yeast Meeting, Banff, Alberta, Canada. (2017.5.14-19).

Tashiro, S., Nishihara, Y., Kugou, K., Ohta, K. and Kanoh, J. Subtelomeres constitute a safeguard for gene expression and chromosome homeostasis. Telomeres and Telomerase, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA. (2017.5.2-6).

加納純子. サブテロメアの機能解明. ワークショップ “染色体研究の最前線”, 大阪大学、大阪 (2017.1.17).

加納純子. 染色体末端危機に対する複合的防御機構. 第 39 回日本分子生物学会年会ワークショップ, 横浜、神奈川 (2016.12.2).

加納純子. 分裂酵母のサブテロメア全破壊から見てきた染色体維持システム. 酵母研究ルネッサンス 2016, 東京大学、東京 (2016.11.29).

Kanoh, J. Robustness of chromosomes revealed by the complete deletion of subtelomeres. 10<sup>th</sup> 3R symposium, 松江、島根 (2016.11.14).

加納純子. 染色体末端領域の機能解明. 日本遺伝学会第 88 回大会奨励賞受賞講演, 日本大学、静岡 (2016.9.8).

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).

⑳ 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).

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).

㉒ 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).

㉓ 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).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホ ム ペ ー ジ 等 :  
<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/icr/network/>

## 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