

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：34504

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15094

研究課題名(和文)染色体末端テロメア長維持の新奇バックアップ機構の探索

研究課題名(英文)The search for the novel safeguard system to maintain the telomere length

研究代表者

田中 克典(Tanaka, Katsunori)

関西学院大学・理工学部・教授

研究者番号：60273926

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)：テロメアは真核生物の染色体末端部にある特殊構造であり、染色体末端を保護する役目をもつ。テロメアの長さは細胞の分裂回数を測る尺度としてもはたらき、テロメア長の制御は真核生物の個体の生命維持や種の保存にとって極めて重要である。本研究結果により「テロメア長制御の新奇バックアップ機構」にRif1の機能が深く関わっていることを明らかにした。特に、Rif1によるPP1のリクルート機能が重要であるという結果は、PP1による脱リン酸化を受ける標的タンパク質の重要性を強く示唆する。これらの成果により、高等真核生物のテロメア長制御機構の理解につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Telomeres protect the DNA ends of linear eukaryotic chromosomes from degradation and fusion, as well as ensure complete replication of the DNA terminal through recruitment of telomerase. The regulation of telomerase is a critical area in telomere research in mammals and fission yeast. SUMOylation is known involving in the negative regulation of telomere extension by telomerase. We identified a novel safeguard system to maintain the telomere length. We found that SUMOylation and Rif1 function in a coordinated manner for this safeguard system. Rif1 is a conserved protein that regulates telomere length, replication timing, and repair of double-stranded DNA breaks. Protein phosphatase 1 (PP1) that interacts with Rif1 is known as a key factor for some of Rif1 functions. Furthermore, we have shown the requirement of the PP1 domain of Rif1 for this safeguard system, suggesting that the involvement of dephosphorylation of unknown target protein by Rif1.

研究分野：分子生物学

キーワード：染色体 テロメア 分裂酵母 タンパク質翻訳後修飾 SUMO Rif1

1. 研究開始当初の背景

テロメア(telomere)は真核生物の染色体末端部にある特殊構造であり、染色体末端を保護する役目をもつ。細胞が分裂する度にテロメア配列が少しずつ失われていくので、テロメアの長さは細胞の分裂回数を測る尺度としてはたらし、「分裂時計」や「老化時計」とも呼ばれる。よって、テロメアの長さの制御は真核生物の個体の生命維持や種の保存にとって極めて重要である。我々はかつて、分裂酵母においてタンパク質翻訳後修飾機構の一つである SUMO (Small ubiquitin-like modifier) 化修飾がテロメア長の制御に重要であることを発見した。しかしそれから 15 年以上経過しても、誰もこの現象を分子レベルで理解・説明する事ができていなかった。我々は最近、「分裂酵母のテロメア複合体構成タンパク質の 1 つである Tpz1 が SUMO 化修飾を受け、その修飾がテロメラーゼの働きを制御する」ことを分子レベルで解明することに成功した(図 1) (Miyagawa *et al.*, *PNAS*, 2014)。

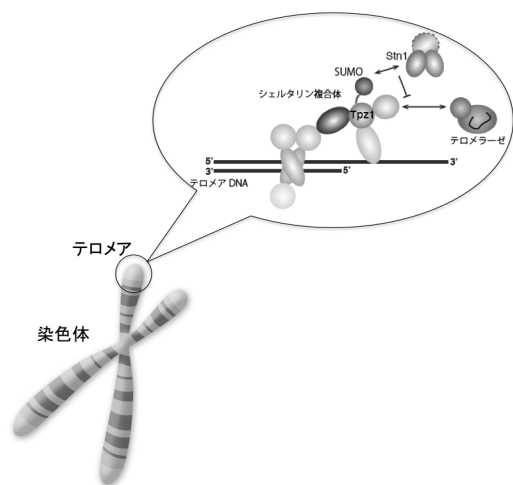


図 1: テロメアの構造とテロメアの長さを制御する仕組み

その過程で、「SUMO 化修飾が消失するとテロメアは明らかに伸長するが、それでもある一定の長さに収束する」ことに着目した。例えば、テロメラーゼの働きを負に制御するシェルタリン複合体因子の破壊株ではより著しくテロメアが伸長する事が知られている (*poz1* Δ 株や *rap1* Δ 株等)。そこで、テロメアの長さを維持する新奇のバックアップ機構の存在を想定し、SUMO 化欠損によるテロメア長を相乗的に伸長させる変異体の探索を行った。その結果、シェルタリン複合体と相互作用する因子の一つであり、且つごく最近、DNA 複製開始のタイミングや DNA 修復においてもその重要性が相次いで報告された Rif1 タンパク質の遺伝子破壊株の単離に成功した。驚いたことに、Tpz1 の SUMO 化修飾を消失した株 (*tpz1-KR*) 株と

rif1 破壊株の二重遺伝子破壊株では、テロメラーゼの働きを負に制御するシェルタリン複合体因子の破壊株と同程度にまでテロメアが伸長した。これらの事実は、テロメア長を維持する未知のバックアップ機構の存在を強く示唆するものである。

2. 研究の目的

最近我々は、分裂酵母を用い「ユビキチン様タンパク質である SUMO がテロメア構成タンパク質を翻訳後修飾することでテロメア長を制御する」ことを分子レベルで明らかにした。

本研究では、その過程で見出した「テロメア長維持・制御の新奇バックアップ機構」の存在の可能性を探求する事を目的とした。その分子機構が明らかになれば、新奇なテロメア長維持・制御機構の発見・提唱へと発展が期待できる。

3. 研究の方法

本研究では、テロメアの長さを維持する新奇バックアップ機構を見出すために、2 種類のアプローチを計画している。以下では、(1) Rif1 が関与する経路の解析と、(2) 未知なる経路の探索、の二つに分け、それぞれを追求するための具体的な計画を以下に示す。

(1) Rif1 が関与する経路の解析

まず、テロメア長制御の新奇バックアップ機構の中心因子候補としての Rif1 タンパク質の機能を追求することを目的とする。Rif1 の機能として、DNA 複製開始のタイミングを制御する PP1 フォスファターゼ作用の足場としての機能、染色体の核内配置での機能、DNA 修復における機能、テロメアにおける機能、等が挙げられる。近年、Rif1 は俄然注目を浴びており、生物種を問わずその機能解明が世界中で精力的に行われている。

①テロメア長制御のバックアップに必要な Rif1 の機能ドメインの同定:

Rif1 は多機能なタンパク質で、複数の機能ドメインを有する。例えば、DNA 複製開始のタイミング決定には、PP1 フォスファターゼ結合ドメインによる PP1 フォスファターゼの呼び込みが必須である。各種機能ドメイン欠損 Rif1 タンパク質を発現させ、テロメア長制御のバックアップに必要な機能ドメインを特定する。

②テロメア領域の DNA 複製開始のタイミングによる影響の検討:

Rif1 は染色体の核内配置を制御することでも、DNA 複製のタイミングを制御している。そこで、*rif1* 破壊株で生じるテロメア領域の複製開始タイミングの早期化が本現象に関与している可能性を検討する。具体的には、Dfp1-CD 株 (DDK-tethering to heterochromatin; DDK キナーゼをテロメア

ヘテロクロマチン領域に強制的に配置することでテロメア領域の DNA 複製開始のタイミングを早期化させた変異体) (Hayashi, *et al.*, *Nat. Cell Biol.*, 2009) を用いて Tpz1 の SUMO 化を消失した *tpz1-KR* 株と二重変異株を作製し、テロメア長に与える影響を調べる。それにより、テロメア領域の DNA 複製開始のタイミングがテロメア長制御のバックアップ機能に関与するのかが明らかにする。

③バックアップ機構とシェルタリン複合体の関係の解明：

Tpz1 の SUMO 化を消失した株 (*tpz1-KR*) と *rif1* 破壊株の二重遺伝子破壊株では、テロメラーゼの働きを負に制御するシェルタリン複合体因子の破壊株と同程度にまでテロメアが伸長する (*rif1Δ tpz1-KR, poz1Δ*、および *rap1Δ*)。テロメア長制御のバックアップ機能とシェルタリン複合体形成の関係を明らかにするために、*rif1Δ tpz1-KR* 株におけるテロメア-シェルタリン複合体形成の状態を調べる。方法として、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法により、各シェルタリン構成因子のテロメアへの結合状態を *rif1Δ tpz1-KR* 株で検討する。

(2) 未知なる経路の探索

上記の Rif1 の経路とは別の新奇バックアップ経路を探索するために、遺伝学的スクリーニングを行う。可能性の一つとして、「新奇バックアップ経路が破綻すると、もはや Tpz1 の SUMO 化を消失した株 (*tpz1-KR*) はテロメアが消失し生存不可能になる」と考えた。そこで、*tpz1-KR* 株と合成致死性を示す変異体の取得を行い、新奇バックアップ経路で働く因子の取得を目指す。遺伝学的手法が駆使できる酵母の系では、合成致死性を示す変異体のスクリーニングは常法手段であり、申請者らの最近の論文でも実践済みである (Santosa, V., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2013)。

4. 研究成果

(1) Rif1 が関与する経路の解析

①テロメア長制御のバックアップに必要な Rif1 の機能ドメインの同定：

Tpz1 の SUMO 化が消失した *tpz1-K242R* 株にて *rif1* 遺伝子を破壊すると、テロメアが過剰伸長する。この過剰伸長は相加的ではなく相乗的であったため、Tpz1 の SUMO 化によるテロメア長制御に、Rif1 が重要な役割を果たしているのではないかと考えた。

そこで、Rif1 のどの機能がこの現象に関与するのかを調べることにした。Rif1 は PP1 結合ドメインを有していたため、分裂酵母の PP1 である Sds21 及び Dis2 の遺伝子破壊を導入し、テロメア長に与える影響をサザンブロット法にて検証した。PP1 である Sds21, Dis2 を単独欠損しても、野生株とほぼ同程度のテロメア長を示した。一方、*tpz1-K242R* 変異との二重変異株では、*sds21*, *dis2* をそれ

ぞれ欠損させても *tpz1-K242R* 変異株と同程度のテロメア長 (約 800 bp) を示した。テロメア長に変化が見られなかった理由として、Sds21 と Dis2 がお互いに機能を補っているため、一方を破壊しても完全に PP1 としての機能を失わなかったのではないかと考えた。そこで、*sds21 dis2* 二重破壊株の作製を試みたが、両遺伝子を欠損すると致死となるため二重破壊株の作製を断念し、Rif1 の有する PP1 結合ドメインからのアプローチを試みた。

Rif1 タンパク質をプラスミドで発現させた状態では、Rif1 の C 末端を欠損させた時のみテロメアの過剰伸長が見られた。そこで、内在性レベルでも同様の結果が得られるかを検証するために、*rif1* の C 末端の 50 アミノ酸が欠損した株 (*rif1-Δ50*)、*rif1* の PP1 結合ドメインに変異が入った株 (*rif1-PP1aa*) を用いて、SUMO (*pmt3*) 破壊株と掛け合わせた株を作製し、テロメア長の検証を行った。

その結果、内在性レベルで *rif1* に変異を加えると、*tpz1-K242R rif1Δ* 株で見られたテロメアの過剰伸長 (約 4 kb) が、Rif1 の C 末端から 50 アミノ酸を欠損させた変異株と PP1 結合ドメインである RvXF/SILK モチーフをアミノ酸置換した変異株でも見られた (図 2)。

以上の結果より、内在性レベルでの検証では Rif1 の C 末端領域及び PP1 のリクルートがテロメア長制御のバックアップに必要な機能ドメインが重要であることが明らかとなった。

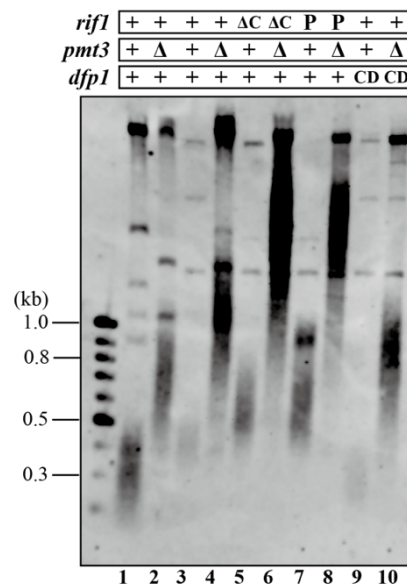


図 2：テロメア長制御のバックアップに必要な Rif1 の機能ドメイン

図中の ΔC は Rif1 の C 末端から 50a. a. を欠損していることを、P は Rif1 の PP1 結合ドメインである RvXF/SILK motif にアミノ酸置換を行っていることを、CD は *dfp1-CFP-2CD* を示している。

②テロメア領域の DNA 複製開始のタイミングによる影響の検討：

Rif1 は染色体の核内配置を制御することでも、DNA 複製のタイミングを制御している。そこで、*rif1* 破壊株で生じるテロメア領域の複製開始タイミングの早期化が本現象に関与している可能性を検討した。メチル化されたヒストン H3 の 9 番目のリジンに特異的に結合するクロモドメイン (CD) を用いて、DDK をテロメアに局在させ、テロメア複製のタイミングを早めた変異株 (*dfp-CFP-2CD*) を *pmt3* 破壊株と掛け合わせた株を作製し、テロメア長の検証を行った。その結果、テロメア複製のタイミングを早めた変異株では、*tpz1-K242R* 株と同程度のテロメア伸長 (約 800 bp) を示した (図 2 : レーン 10)。

以上の結果より、Rif1 タンパク質が有するテロメア領域の DNA 複製開始のタイミングを制御する機能は、テロメア長制御のバックアップ機能に関与しないことが強く示唆された。

③バックアップ機構とシェルタリン複合体の関係の解明：

テロメア長制御のバックアップ機能とシェルタリン複合体形成の関係を明らかにするために、*rif1Δ tpz1-KR* 株におけるテロメア-シェルタリン複合体形成の状態を調べるべく、シェルタリン構成因子のクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法の条件検討を完了した。今後、各シェルタリン構成因子のテロメアへの結合状態を *rif1Δ tpz1-KR* 株で評価する。

一方、酵母ツーハイブリッド法により SUMO 化反応の中心的 E3 リガーゼである Pli1 タンパク質が Rif1 と相互作用する可能性を見いだした。この相互作用の生物学的意義の解析は今後の課題である。

(2) 未知なる経路の探索

上記の Rif1 の経路とは別の新奇バックアップ経路を探索するために、遺伝学的スクリーニングを行った。「新奇バックアップ経路が破綻すると、もはや Tpz1 の SUMO 化を消失した株 (*tpz1-KR*) はテロメアが消失し生存不可能になる」と考え、*tpz1-KR* 株と合成致死性を示す変異体の取得を試みた。しかし、現時点で目的の表現型を示す変異体の取得には至っていない。

(3) まとめ

テロメア長の制御は、細胞の老化とがん化に重要な役割を果たす。正常体細胞ではヒトテロメラーゼ活性はないかあるいは微弱であり、世代を経た老化細胞ではテロメアが短小化している。一方、多くのがん細胞で強いテロメラーゼ活性が細胞の維持に必須であることから、テロメアの長さが維持されている。よって、テロメラーゼはがん治療の有力な標的分子である。

分裂酵母はテロメア構造・機能において、高等真核生物の優れたモデルである。SUMO 化消失によるテロメア伸長現象から見えて

きた「テロメア長制御の新奇バックアップ機構」の分子機構の解明は、分裂酵母のみならず種間を超えたテロメラーゼ複合体とテロメラーゼ活性の制御について新たなブレークスルーが期待できる。具体的には、本研究結果により「テロメア長制御の新奇バックアップ機構」に Rif1 タンパク質の機能が深く関わっていることが明らかとなった。特に、Rif1 による PP1 のリクルート機能が重要であるという結果は、PP1 による脱リン酸化を受ける標的タンパク質の重要性を強く示唆する。それらを明らかにすることで、高等真核生物のテロメア長制御機構の理解につながり、がんや老化をはじめとする医療応用にも発展することが期待される。

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 1 件)

- ① Noguchi, C., Grothusen, G., Anandarajan, V., Martínez-Lage García, M., Terlecky, D., Corzo, K., Tanaka, K., Nakagawa, H., Noguchi, E. Genetic controls of DNA damage avoidance in response to acetaldehyde in fission yeast. *Cell Cycle*, 16(1):45-58. (2017) : 査読あり
DOI:10.1080/15384101.2016.1237326

[学会発表] (計 3 件)

- ① Mutiara P. Ningtyas、浅井拓馬、浅井駿祐、藤澤志帆、林 亜紀、田中克典：「分裂酵母 Rif1 と SUMO E3 リガーゼ Pli1 の相互作用」、第 35 回染色体ワークショップ・第 16 回核ダイナミクス研究会 (西尾市) 2017 年 12 月 (ポスター発表)
- ② Mutiara P. Ningtyas, Takuma Asai, Shunsuke Asai, Shiho Fujisawa, Aki Hayashi, Katsunori Tanaka : 「分裂酵母 Rif1 と SUMO E3 リガーゼ Pli1 の相互作用」、生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) (神戸) 2017 年 12 月 (ポスター発表)
- ③ 田中克典 : 「SUMO 翻訳後修飾による染色体末端テロメア長制御」、第 89 回 日本生化学会大会 (仙台) 2016 年 9 月 (招待シンポジウム講演)

[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]

ホームページ等

<http://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~tanaka/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 克典 (TANAKA, Katsunori)

関西学院大学・理工学部・教授

研究者番号：60273926

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

林 亜紀 (HAYASHI, Aki)

関西学院大学・理工学部・助教

研究者番号：80399534

(4) 研究協力者