

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目： 基盤研究 (B)
研究期間： 2006 ~ 2009
課題番号： 18370006
研究課題名 (和文) テロメア機能を担うタンパク質複合体の統合的制御システムの解明
研究課題名 (英文) Regulatory mechanism of the protein complex involved in the integrity of telomere functions
研究代表者
松浦 彰 (MATSUURA AKIRA)
千葉大学・大学院融合科学研究科・教授
研究者番号： 10272692

研究成果の概要 (和文) : テロメアは染色体末端を構成する DNA-タンパク質複合体であり、染色体インテグリティの維持に必須な機能エレメントである。テロメアの機能は、DNA 損傷等によって生じる二重鎖切断末端と真の染色体末端とを区別すること(末端保護機能)、および染色体末端をテロメラーゼに依存的に複製させること(末端複製機能)である。本研究は、細胞周期において、テロメアのもつ二つの拮抗的機能が調整される分子機構の解明を通じて、テロメア機能を担うタンパク質複合体が秩序だてて制御される分子機構 (統合的制御システム) を明らかにすることを目的とした。

出芽酵母の CST (Cdc13-Stn1-Ten1) 複合体はテロメア末端 DNA に結合し、両機能に関与することが知られている。我々は、CST 複合体が細胞周期短縮を感知する ATM キナーゼと、細胞周期における複製制御に関与する Cdk の連携により順次リン酸化され、これにより短縮したテロメアに特異的なテロメア伸長が活性化されてテロメア定常長が維持されることを示した。また、Stn1 が、複製阻害剤の添加により複製フォークが停止したのちの複製再開過程を調整する活性をもつことを示唆した。さらに、新規突然変異の解析から、Stn1 の N 末のもつ末端保護機能と、C 末の末端複製機能との連携により細胞の増殖が維持されていることを明らかにした。本研究により、CST タンパク質がシグナルを受容し、自身の機能を変化させてテロメア恒常性維持に関与する分子機構が明らかにすることができた。

研究成果の概要 (英文) : Telomere is an essential chromosomal element that composes of the end of eukaryotic linear chromosome and plays a role in the maintenance of its integrity. Dual functions of the telomere are to discriminate normal chromosomal ends from abnormal damaged ends, and to provide the field to replicate the end through the specific telomerase-mediated system. In this study, we aim to elucidate how the two antagonistic functions of the telomere are coordinated during the cell cycle.

CST (Cdc13-Stn1-Ten1) complex of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* has been shown to associate with the telomeric DNA ends and to be involved in the both functions of the telomere. We found that the CST complex was phosphorylated orderly by ATM kinases, that detect shorter telomeres, and by Cdk, that regulates cell cycle events. Moreover, we found that Stn1 was important for modulation of replication restart after replication forks arrested by the addition of hydroxyurea. Finally, we identified a novel alleles of *STN1* whose product was defective in its protective role, and showed that coordination of N-terminal protective function with C-terminal replicative function was pivotal for cell viability in this mutant. Together, our results indicated that CST was regulated by a variety of signaling cascades to modify the function of the complex, thereby maintaining the integrity of the telomeres.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2007年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2008年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：ゲノム恒常性、染色体、テロメア、細胞周期、出芽酵母

1. 研究開始当初の背景

テロメアは染色体末端を構成する DNA-タンパク質複合体であり、染色体インテグリティの維持に必須な機能エレメントである。テロメアの最も重要な機能は、DNA 損傷等によって生じる二重鎖切断末端と真の染色体末端とを区別することにある。テロメア末端はテロメラーゼの作用により複製が行われ、これにより線状 DNA のもつ末端複製問題が回避されている。テロメラーゼ活性を持たない哺乳類の体細胞ではテロメアは複製毎に短縮し、テロメア短縮がある限界点まで達すると細胞の増殖は停止し、特徴的な細胞形態変化を呈する。このように細胞老化を迎えた細胞のテロメアには DNA 損傷を認識する因子が局在化し、損傷の存在を示すシグナル（チェックポイントシグナル）が活性化されている。このことは、短縮して機能を喪失したテロメアは末端保護機能を失い、DNA 損傷として認識されることを意味する。

しかし、正常なテロメアも細胞周期を通じて常に「保護」の構造をとっているわけではないと考えられる。我々は、複製中間体状態にあるテロメアには DNA 損傷チェックポイントの最上流で働く ATM ファミリーキナーゼ Mec1(ATR)が結合していること (Mol. Cell 2004)、さらに Mec1 が結合する時期のテロメアには末端プロセシング酵素複合 MRX(Mre11-Rad50-Xrs2)が共局在することを見出した (Mol. Cell 2005)。このことから、テロメアが細胞周期特異的な「保護」と「非保護」の二つのテロメアクロマチン構造を繰り返していること、そのうち「非保護」の時期を利用してテロメア複製反応が進行していること、が明らかになった。つまり、テロ

メアの複製は末端の構造を細胞周期の時期特異的に変換する分子装置によって厳密に制御され、異常な伸長や過度の短縮が防止されている。しかし、その詳細な分子機構はまだ解明されていなかった。

2. 研究の目的

テロメアのもつ二つの必須機能、すなわち末端保護機能と末端複製機能は相互に拮抗した活性であると考えられ、この二つの機能を時と場に応じて調節することで、テロメアとしての構造・機能が維持されているものと考えられる。しかしながら、その制御の実体はまだ不明である。本研究は、これまでの我々の研究を発展的に展開し、細胞周期におけるテロメア構造変換の分子機構とそのテロメア複製における機能、およびその破綻による染色体構造異常の発生機序を中心命題に、**テロメア機能を担うタンパク質複合体が秩序だって制御される分子機構（統合的制御システム）**を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

出芽酵母のテロメア関連因子の構造遺伝子にタグを付加し、内在性プロモーターから融合タンパク質を発現する株を構築した。細胞周期制御、DNA 損傷応答などに関わる遺伝子の欠損した細胞における、タグタンパク質の挙動を追跡した。見いだしたリン酸化サイトに対する特異的抗体は、合成ペプチドをウサギに免疫することにより得た。

細胞内でタンパク質断片を発現させるためには、GAL1 プロモーターの下流に当該遺伝子断片を挿入し、そのプラスミドを酵母細胞に導入した。細胞をラフィノース培地からガ

ラクトース培地に移して発現を誘導し、表現型の解析を行った。

STN1 の新規変異の単離は、error-prone PCR により行い、過剰生産により増殖を阻害する活性をもつ変異を探索することにより行った。

4. 研究成果

①テロメア伸長活性のテロメア長依存的、細胞周期依存的制御

出芽酵母のテロメア一本鎖 DNA 末端に結合するタンパク質として CST(Cdc13-Stn1-Ten1) 複合体が知られている。これらは、RPA(Replication protein A) 様の三量体を形成し、テロメアの保護とテロメラーゼ依存的伸長に関与することが知られている。

我々は、Cdc13 および Stn1 が細胞周期の S 期から G2/M 期に進行する際に電気泳動度の遅い分子種が出現することを見いだした。ホスファターゼをもちいた脱リン酸化実験によりこれらの変化はリン酸化修飾であることが示された。近縁の酵母において保存されている Ser、Thr 残基を系統的に Ala に置換した変異 *STN1* 遺伝子を作成した結果、2 カ所の Thr がリン酸化されている可能性が示唆され、当該部位のリン酸化ペプチド特異的抗体の作成により、細胞内で実際にその残基がリン酸化されていることを証明した。

テロメア伸長に関与する種々のプロテインキナーゼの変異株を用いて、そのリン酸化に必要なプロテインキナーゼを探索した結果、ATM ファミリータンパク質 Tel1 と Mec1、および Cdk である Cdc28 が関わっていることを見いだした。Tel1/Mec1 によるリン酸化は細胞周期の G1 期においても存在し、テロメア複製が進行する S 期において増加する。一方、Cdk によるリン酸化は細胞周期の S 期以降で観察された。これらのリン酸化はテロメア伸長に正的作用をもつことがわかった。これらの結果から、CST 複合体は細胞周期短縮を感知する ATM キナーゼと、細胞周期における複製制御に関与する Cdk の連携により調節され、これにより短縮したテロメアに特異的にテロメア伸長が活性化されてテロメア定常長が維持されているものと考えられる。

②テロメアタンパク質のもつチェックポイント抑制機構

網羅的 two-hybrid 解析の結果から、Stn1 がチェックポイントキナーゼ Rad53 と相互作用することが示唆されている。我々は、*STN1* の過剰生産により細胞の DNA 傷害感受性が昂進することを見いだした。Rad53 タンパク質の SDS-PAGE 上の電気泳動度を指標に、*STN1* の過剰生産のチェックポイントに対する影

響を検討した。その結果、フレオマイシン処理による DNA 損傷時と、ヒドロキシウレア処理による複製阻害時とで、Rad53 の挙動が異なることが見いだされた。ヒドロキシウレアの添加および除去における Rad53 の挙動の解析から、Stn1 が、複製阻害剤の添加により複製フォークが停止したのちの複製再開過程を調整する活性をもつことが示唆された。この活性は、Stn1 の C 末端領域によって行われていることが、部分欠失タンパク質の作成により明らかとなった。

③テロメアタンパク質を介した末端保護と末端複製の連携メカニズム

アリル特異的変異を用いた遺伝学的解析により、出芽酵母の Stn1 タンパク質はテロメアのもつ末端保護機能と末端複製機能の両方に関与することが示されている。我々は、末端保護機能に関わることがわかっている Stn1 の N 末端領域の、新たな変異を単離した。この変異により、CST 複合体を形成する Ten1 との結合能力は減弱しており、この変異を *GAL1* プロモーターにより過剰生産した場合、細胞の生育の悪化が見られた。

STN1 としてこの変異のみをもつ株は増殖の能力が低下し、テロメアが異常に伸長することを見いだした。この効果はテロメラーゼ依存的であることがわかった。この変異株の増殖にはテロメア伸長活性が重要であり、さらに正常 *STN1* では必須でない領域である C 末端領域が、この変異の増殖には必須であった。このことは、Stn1 の N 末のもつ末端保護機能と、C 末の末端複製機能との連携により細胞の増殖が維持されていることを意味している。

本研究の解析結果から、テロメアタンパク質が細胞内の多面的なシグナルにより制御を受け、その結果テロメア機能に寄与する種々の活性が変化して染色体末端の恒常性が維持されていることが分子レベルで明らかになった。その制御には、複合体を形成している因子間の相互作用の変化も含まれると考えられるが、その詳細はまだ不明である。今後の解析においては、その点を明らかにすることが必要であると思われる。

また、本研究の過程で、テロメア複製状態を検出するための新たなリン酸化特異的抗体の作成に成功した。今後この抗体がテロメアの複製状態をモニターするプローブとして使用できる可能性がある。可能性を示唆している。このような解析から、これまで明らかにされていなかった新規の制御経路の存在が浮かび上がりつつある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

Akio Nakashima, Yoshiko Maruki, Yuko Imamura, Chika Kondo, Tomoko Kawamata, Ipei Kawanishi, Hideki Takata, Akira Matsuura, Kyung S. Lee, Ushio Kikkawa, Yoshinori Ohsumi, Kazuyoshi Yonezawa, and Yoshiaki Kamada. (2008) The yeast Tor signaling pathway is involved in G2/M transition via Polo-kinase. *PLoS ONE* **3**: e2223

Aiko Matsui and Akira Matsuura. (2010) Cell size regulation during telomere-directed senescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **74**: 195-198

Yufang Weng, Lan Xiang, Akira Matsuura, Yang Zhang, Qianming Huang, and Jianhua Qi. Ganodermasides A and B, two novel anti-aging ergosterols from spores of a medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* on yeast via *UTH1* gene. (2010) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **18**: 999-1002

松浦 彰 (2006) テロメア複製の分子機構: DNA 損傷修復過程との類似性とその意味 蛋白質核酸酵素 51:162-168

松浦 彰 (2006) テロメア研究の今-末端の複製は危険な橋 総研大ジャーナル 9: 11

松浦 彰 (2007) テロメア構造の細胞周期制御-複製後に起こるテロメア構造変化の分子機構 実験医学増刊「染色体サイクル」25: 175-180

松浦 彰 (2007) テロメアの構造変換を介した染色体末端の保護と複製の統合的制御機構 遺伝 別冊「日本の遺伝学の潮流」21: 164-166

松浦 彰 (2009) テロメア機能構造の時空間的制御機構 実験医学増刊「細胞核-遺伝情報の制御機構と疾患」27: 66-71

[学会発表] (計24件)

(主要な発表のみ記載)

Akira Matsuura and Satoshi Asano. Regulation of telomere homeostasis by ATM

family proteins. *Telomeres and Genome Stability* 2006, Villars-sur-Ollon, Switzerland, Sept. 1, 2006.

松浦 彰、浅野 敏 テロメアの構造変換を介した染色体末端の保護と複製の統合的制御機構、日本遺伝学会第78回大会ワークショップ「染色体動態とエピジェネティクス」、筑波、2006年9月25日

Akira Matsuura. Regulation of replicative life span by multiple factors: lessons from molecular studies by the use of model systems. 8th Asia/Oceania regional congress of gerontology and geriatrics, Beijing, China, Oct. 25, 2007.

松浦 彰 染色体の恒常性と細胞の増殖・老化: 出芽酵母のテロメア制御を例にして 平成21年度千葉大学COEスタートアッププログラム「発生システムの分子基盤解析拠点の構築」第1回シンポジウム「細胞と個体をつなぐメカニズム」、千葉、2010年2月15日

松浦 彰 出芽酵母の寿命制御の化学遺伝学 第6回真菌分子細胞研究会、千葉、2010年3月19日

[図書] (計2件)

松浦 彰 (2007) テロメア 下田親、大隅良典編「酵母のすべて」日本シュプリンガー・フェアラーク pp. 37-42

松浦 彰 (2009) 酵母を用いた老化研究 大澤俊彦、丸山和佳子監修「脳内老化制御とバイオマーカー-基盤研究と食品素材」、シーエムシー出版 pp. 23-32

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計1件)

名称: 抗老化転写因子活性化剤及びその利用

発明者: 大澤俊彦、向 蘭、丸山和佳子、松浦 彰、津田玲生

権利者: 国立大学法人名古屋大学、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

種類: 特許

番号: 特開 2008-120726

取得年月日: 平成 20 年 5 月 29 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ

<http://life.s.chiba-u.jp/matsuura/HP/matsuura.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 彰 (Akira Matsuura)

千葉大学・大学院融合科学研究科・教授
研究者番号：10272692

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし