

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06505

研究課題名(和文)テロメアブーケ形成開始機構の構造生物学的研究

研究課題名(英文)Structural-biology study on initiation mechanism of telomere bouquet formation

研究代表者

田中 勲 (Tanaka, Isao)

北海道大学・先端生命科学研究院・名誉教授

研究者番号：70093052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：高等生物では、遺伝情報の継承と発現を担うDNAは染色体として折り畳まれており、細胞分裂の際にそのすべての情報が娘細胞に伝承される。有性生殖細胞の減数分裂において、テロメアブーケという染色体の集合体の形成開始にリボソーム生合成因子Rrs1、Ebp2が必須因子として関与している。本研究では、リボソーム生合成因子Rrs1、Rpf2 (Rrs1のパートナー)、Ebp2、Brx1 (Ebp2のパートナー)とテロメアアンカータンパク質Mps3の相互作用の詳細を解析し、Rrs1-Rpfが介入したEbp2とMps3の核内ドメインとが結合することによって染色体テロメアの集合が開始されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リボソームと染色体は、それぞれ全く異なる2つの研究分野として、長い研究の歴史を持つ。本研究で得られた成果は、時間的・空間的に全く異なる2つの生命現象であるリボソームの生合成と染色体形成の接点を解明することに繋がり、それによって生命進化の理解が一段と進むものと期待される。

また、ヒトを含む哺乳動物テロメアブーケの形成に異常が生じると、染色体の分配異常に起因する不妊症に繋がることから、テロメアブーケ形成の分子機構の解明は、医薬分野の研究に対する基盤情報となりうる。

研究成果の概要(英文)： In eukaryotic organisms, the DNA responsible for the inheritance and expression of genetic information is folded as chromosomes. All information on chromosomes should be passed on to daughter cells from a parent cell during cell division. It has been found that the ribosome biogenesis factors Rrs1 and Ebp2 are involved as essential factors in the initiation of the telomere bouquet formation (chromosomal assembly) during the early phase of meiotic cell division.

In this study, we analyzed the details of the interactions between the ribosomal biosynthesis factors Rrs1, Rpf2 (partner of Rrs1), Ebp2, Brx1 (partner of Ebp2) and the telomere anchor protein Mps3. Taken the results together, we understood that Ebp2 binds to the N-terminal domain (nuclear domain) of Mps3 through the Rrs1-Rpf complex and then initiates the formation of the telomere bouquet.

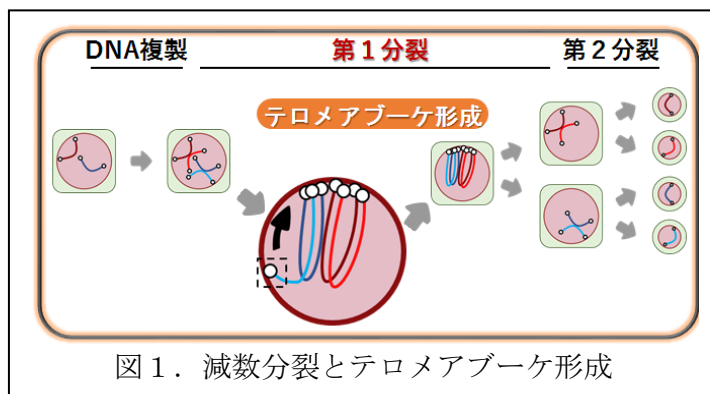
研究分野：構造生物化学関連

キーワード：テロメアブーケ形成 減数分裂 リボソーム生合成因子 Ebp2 Rrs1 染色体 構造解析

1. 研究開始当初の背景

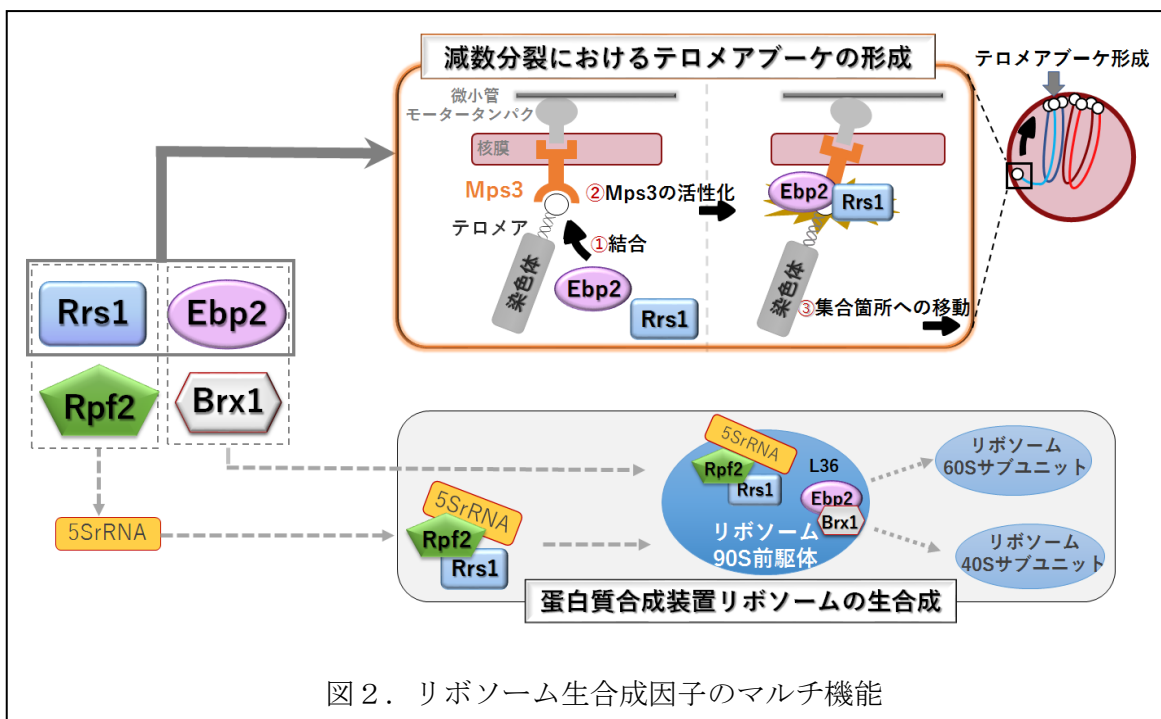
遺伝情報の継承と発現を担う DNA は、高等生物においては、染色体として折り畳まれており、細胞核に収納されている。染色体は高度に制御されたメカニズムによって多様な生命活動のプロセスと密接に関わっており、細胞分裂の際には、そのすべての情報が娘細胞に伝承される。有性生殖では、父母からの2セットの染色体(相同染色体)のそれぞれが複製され、次いで、二回連続して行う減数分裂によって生殖細胞が形成される(図1)。この減数第1分裂において、減数分裂の準備段階にある細胞が相同染色体を対合させるためには、染色体末端(テロメア)

が、運搬蛋白質によって核膜上の1箇所に集められたテロメアクラスター(テロメアブーケ)を形成しなければならない^[1]。医学的には、ヒトを含む哺乳動物テロメアブーケの形成に異常が生じると、染色体の分配異常に起因する不妊症に繋がること



から、新たな不妊治療のターゲットとして注目を集めている。しかし、その形成機構に関する分子論的な研究は、やっと端緒に就いたばかりである。第1分裂前期の染色体は、核膜上に存在するテロメアアンカー蛋白質 Mps3 の核内ドメイン (Mps3NTD) と相互作用することによって、核膜につなぎ止められている。最近の研究によれば、その相互作用部位に蛋白質 Ebp2 と Rrs1 が結合すると、Mps3 が活性化されて、テロメアブーケの集合箇所へと運搬が開始され、その結果、集合箇所にテロメアブーケが形成される^[2] (図2上)。この相同染色体が集合する仕組みは、染色体間コミュニケーションの第一歩と考えられる。

興味深いことに、Rrs1 と Ebp2 は、リボソームの生合成因子として同定された因子で、核内でリボソームの前駆体 90S に結合し、リボソームの成熟に関わることが知られている(図2下)。Ebp2 はパートナー Brx1 と一緒にリボソーム蛋白質 L36 とともに 35S pre-rRNA



の処理に關与する¹³⁾。また、Rrs1 は、もう一つの成熟因子 Rpf2 と結合し、5SrRNA を 90S へ運搬することで 60S の成熟に關わる。rRNA 構造の形成や安定化に關わるこれらの因子が時間的、空間的に全く異なる生命現象である減数分裂の第 1 分裂において、膜上にアンカーされた染色体の運搬開始のスイッチとなることは、Rrs1、Rpf2、Ebp2 が生命基幹を支えるマルチ機能を持つ基本因子として存在していることを示唆している。2つの生命基本現象に關与するこれらの因子は、どのようにしてマルチ機能を發揮しているのか、特に、染色体集合開始をどのように制御しているのか、生合成因子としての働きと共通する分子機構はあるか、なぜ同じ蛋白質が異なる生命現象に使われるようになったのか、本研究では、これらの「問い」に答えるために、生命の誕生初期に生まれた、これら古代の蛋白質による染色体テロメアの集合開始機構を解析する。

2. 研究の目的

リボソームを合成するための生合成因子は、生命を維持するための必須の因子である。私たちは、リボソームの前駆体 90S の成熟に關わる生合成因子 Rrs1 と Rpf2 の複合体の X 線構造解析を行い、それらが強固な結合をしていることを示した^[4,5]。一方、近年、Rrs1 がもう一つの生合成因子である Ebp2 とともに、有性生殖細胞の減数分裂においてテロメアブーケと呼ばれる染色体の集合体の形成に必須の因子であることが報告された。これらの事実をもとに、我々は、Rpf2 もこの過程に關与すると推測して予備実験を行い、その可能性が高いことを示した。これら 3つの因子は、さらに、Ebp2 のパートナー Brx1 を加えて、核膜に局在するテロメアアンカー蛋白質 Mps3 に結合して、染色体集合開始の制御をしていると考えられる。本研究では、リボソーム生合成因子とテロメアアンカー蛋白質 Mps3 との相互作用の詳細を解析し、これらの因子による染色体テロメアの集合開始の制御機構を解明する。

3. 研究の方法

リボソーム生合成因子 Rrs1、Rpf2、Ebp2 の相互作用によってテロメアブーケ形成開始を制御する機構を明らかにするため、まず、大腸菌発現系を用いて、Mps3(NTD)、Ebp2 のパートナー Brx1 を加えた各リボソーム生合成因子、およびその変異体の大量調製を行った。そして、得られたサンプルを用いてサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) や、Native-page、ピアコア (Biacore) を使った表面プラズモン共鳴 (SPR) などにより、タンパク質間の相互作用の詳細を解析した。また、Mass Photometer 法を利用して 4 者複合体 Rrs1-Rpf2-Ebp2-Mps3(NTD)の形成も明らかにし、小角 X 線散乱 SEC-SAXS を利用して溶液中の会合体の解析も行い、結合モデルを得た。さらに、構造情報の無い Mps3(NTD)については、核剤を用いて結晶化を試みた。

4. 研究成果

研究対象のサンプルの調製について

本研究の目的を達成するためには、サンプルの *in vitro* での大量調製が必須である。研究では、まず大腸菌発現系を用いて、リボソーム生合成因子 Rrs1、Rrs1(NTD)-Rpf2、Rrs1(NTD)-Rpf2(NTD)、Rrs1-Rpf2(NTD)、Rrs1-Rpf2、Ebp2、および核膜に局在するテロメ

アアンカー蛋白質 Mps3 の核内ドメイン (N 末端ドメイン) Mps3(NTD)について、相互作用および構造解析研究が可能になる程の大量調製に成功した。さらに、Ebp2 のパートナー Brx1 がテロメアの集合開始の制御に関与するかどうかを調べるため、Brx1 の大量調製も試みたが、発現量と可溶化に問題があり、精製に難航した。発現ホスト変更や、可溶化タグなど、いくつかの発現コンストラクトを構築し、最終的に Ebp2-Brx1 の共発現による大量調製に成功した。

各因子間の相互作用について

予備実験によって、Ebp2 が直接では無く、Rrs1-Rpf2 を介して Mps3NTD と結合することが示唆されたことに基づいて、その相互作用の詳細を解析した。まず、Rrs1、Rrs1 変異体を用いて、Ebp2 との相互作用を調べたところ、Rrs1 の N 末端欠損変異体 Rrs1(CTD) と Ebp2 と結合することが分かった (図 3 左)。次に、Rrs1(NTD)-Rpf2(NTD)、Rrs1-Rpf2(NTD)、Rrs1-Rpf2 と Mps3 (NTD) との相互作用を解析した結果、Rrs1(NTD)-Rpf2(NTD)が Mps3(NTD)と結合することが分かった (図 3 右)。精製に用いたサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を利用して (Rrs1-Rpf2-Mps3(NTD)複合体の形成も確認でき、Rrs1-Rpf2 と Mps3(NTD)が強く結合していることも示唆された。

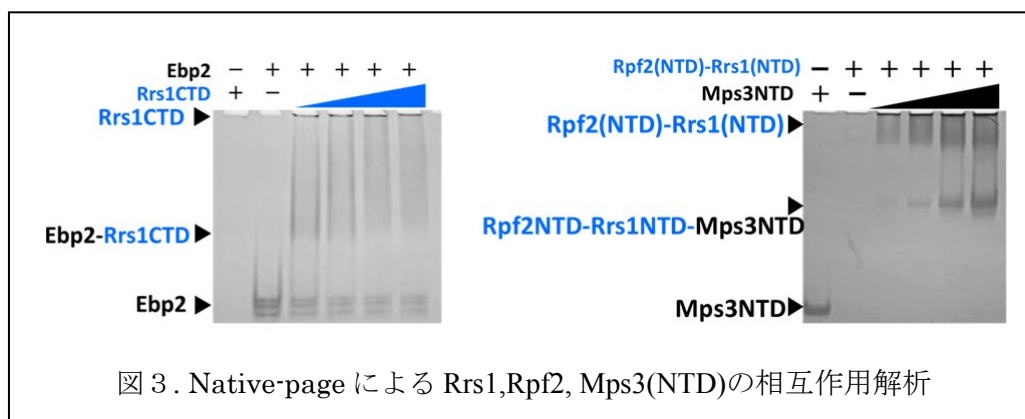


図 3. Native-page による Rrs1,Rpf2, Mps3(NTD)の相互作用解析

Rrs1-Rpf2、Ebp2、および Mps3(NTD)の 4 者複合体形成について、Native-page では、4 者複合体と思われるバンドと Rrs1-Rpf-Mps3(NTD) 3 者複合体のバンドが図 4 に示しているようにほぼ同じ位置にあるため、さらに 4 者複合体形成を検証する必要がある。ここで、サンプルのコンストラクトを再構築し、Ni アフィニティーカラムを利用して、3 者複合体 Rrs1-Rpf-Mps3(NTD)を精製した。そして、4 者の結合を調べたが、図 4 右のように、4 者複合体のバンドに曖昧さがあった。それをはっきり証明するため、ライフサイエンスソリューションズ株式会社の志波公平氏の協力をいただき、MP(Mass Photometer) 法を用いて (RefeynOne^{MP}) 3 者と 4 者のサンプルを測定し、それぞれ理論値の+10%程度の 109、149kDa の分子量の見積を得た(図 5)。Ebp2 のパートナー Brx1 について、Native-page を用いた相互作用の解析をした結果、Brx1 は Ebp2 と Rrs1-Rpf2 および Ebp2 と Mps3(NTD)の相互作用に影響を加えないことが示唆された。

また、リボソーム生合成因子、Rrs1、Rrs1-Rpf2、Ebp2、とテロメアアンカータンパク質

Mps3(NTD)の相互作用を定量的に解析するため、ビアコアを用いた SPR 解析も試みた。Ebp2 を固定した SPR の相互作用解析によって、Ebp2 と Rrs1-Rpf2 の結合の強さとして、 $K_d = 9.02 \text{ mM}$ を見積もることができた。

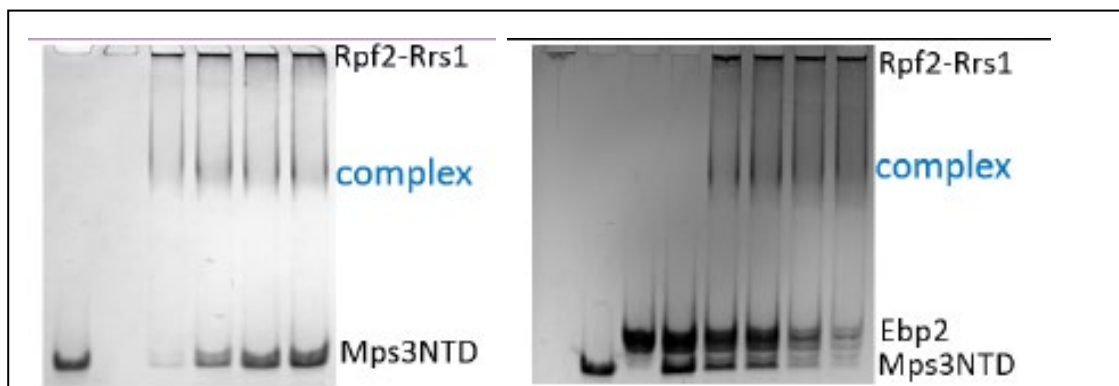


図4. 3者(左)、4者(右)複合体の相互作用の Native-page

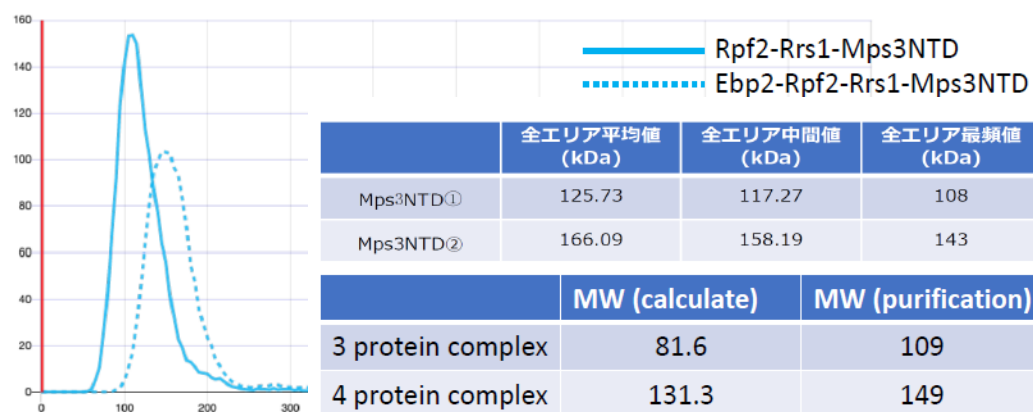


図5. 3者と4者複合体のMP測定

構造解析について

Mps3(NTD)については、核剤 Co-cage-1 を用いて初期結晶を得たが、構造解析のためには結晶化条件のさらなる最適化が必要である。Rrs1-Rpf2、Ebp2、Mps3(NTD) 4者複合体については、SEC-SAXS 測定を行い、複合体のモデルを得た。

参考文献

- [1] Ding, D. Q., *et al.*, *Dev. Cell* 6, 329-341 (2004)
- [2] Horigome, C., *et al.*, *Nucleus* 3, 22-28 (2016)
- [3] Wan, K., *et al.*, *Curr Genet* 61, 31-41 (2015)
- [4] Asano, N., *et al.*, *Acta Cryst. F* 70, 1649-1652 (2014)
- [5] Asano, N., *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 43, 4746-4757 (2015)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yu Jian, Shinoda Akira, Kato Koji, Tanaka Isao, Yao Min	4. 巻 76
2. 論文標題 A solution-free crystal-mounting platform for native SAD	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section D Structural Biology	6. 最初と最後の頁 938 ~ 945
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1107/S2059798320011584	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hao Li, Takuma Eguchi, Isao Tanaka, Toyoyuki Ose, Min Yao.
2. 発表標題 Binding relationships among Mps3, Rpf2-Rrs1 and Ebp2-Brx1 in telomere bouquet formation
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hao Li, Takuma Eguchi, Isao Tanaka, Toyoyuki Ose, Min Yao.
2. 発表標題 Study on the interaction of proteins involved in telomere bouquet formation in meiosis
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hao Li, Takuma Eguchi, Isao Tanaka, Toyoyuki Ose, Min Yao.
2. 発表標題 Study on the interaction of proteins involved in telomere bouquet formation in meiosis
3. 学会等名 第61回生命科学夏の学校
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 姚閔、北郷悠、田中勲
2. 発表標題 北海道大学でX線発生装置を使ったS-SAD法に取り組んでいた頃
3. 学会等名 シンクロトロン光研究センター特別シンポジウム"渡邊信久先生を偲んで" (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yu Jian, Kato Koji, Tanaka Isao, Yao Min
2. 発表標題 Structural analysis platform for Native-SAD
3. 学会等名 International Symposium on Diffraction Structural Biology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jian Yu, Koji Kato, Isao Tanaka, Min Yao
2. 発表標題 Platform for structural analysis by Native-SAD
3. 学会等名 日本結晶学会 2019年度年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hao Li, Takuma Eguchi, Isao Tanaka and Min Yao
2. 発表標題 Study on telomere bouquet assembly protein Ebp2, Rpf2, Rrs1 and Mps3 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3. 学会等名 7th International Life-Science Symposium(ILSS) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学 X線構造生物学研究室ホームページ
<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g6/>
研究室ホームページ
<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g6/>

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
研究分担者	姚 閔 (YAO MIN) (40311518)	北海道大学・先端生命科学研究院・教授 (10101)	

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
---------	---------