

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：34504

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02952

研究課題名(和文) SUMO修飾システムによる染色体セントロメアおよびテロメア機能の動的な制御

研究課題名(英文) Dynamic control of centromere and telomere function by the SUMO modification system

研究代表者

田中 克典(Tanaka, Katsunori)

関西学院大学・生命環境学部・教授

研究者番号：60273926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞分裂において、染色体を安定に維持し、正確に分配することがゲノムの安定な継承に重要である。真核生物の染色体上のセントロメアおよびテロメア領域は、染色体の安定維持・分配に極めて重要な役割を果たす。

今回、分裂酵母をモデル系に用い、SUMOによる翻訳後修飾が、セントロメアおよびテロメア領域の機能を制御する分子機構の一端を明らかにした。さらに、病気と深く関わる環状染色体細胞の生育にSUMO修飾が必要であることも見出した。セントロメアおよびテロメア研究は基礎分野のみならず臨床応用分野にも大きな展開を見せている。本研究成果は、将来的には応用分野にも資する重要な基盤を構築するものと期待する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セントロメアおよびテロメア機能はがんとも密接に関わっており、セントロメアおよびテロメア研究は基礎分野のみならず臨床応用分野にも大きな展開を見せている。今回、分裂酵母をモデル系に用い、SUMOによる翻訳後修飾が、セントロメアおよびテロメア領域の機能を制御する分子機構の一端を明らかにした。本研究成果は、将来的には応用分野にも資する重要な基盤を構築するものと期待する。

研究成果の概要(英文)：In cell division, stable maintenance and accurate distribution of chromosomes are critical for stable inheritance of the genome. The centromere and telomere regions on eukaryotic chromosomes play a crucial role in the stable maintenance and distribution of chromosomes.

In this study, using fission yeast as a model system, we revealed one aspect of the molecular mechanism by which post-translational modifications by SUMO regulate the function of centromere and telomere regions. Furthermore, we found that SUMO modifications are required for the growth of circular chromosome cells, which are closely related to the disease. Research on centromeres and telomeres has been greatly expanding not only in the basic field but also in the field of clinical application. We expect that the results of this research will establish an important foundation that will contribute to applied fields in the future.

研究分野：分子生物学

キーワード：タンパク質翻訳後修飾 SUMO セントロメア テロメア 染色体機能 分裂酵母

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノム情報の安定な維持・継承には、細胞分裂の際に染色体を安定に維持し、正確に分配することが肝心である。真核生物では、染色体分配に重要な機能領域としてセントロメア配列が各染色体に1か所存在し、分裂期には紡錘体微小管が結合する動原体を構築する。また、染色体の末端を維持するための特殊な構造としてテロメアがある。テロメアDNAには特有のタンパク質が結合し、染色体の末端を保護する。生殖細胞や一部の幹細胞などでは、テロメラーゼが活性化されており、テロメアの長さがほぼ一定に保たれている。テロメアの長さが適切に制御される事は、個体の生命維持や種の保存に極めて重要な事象である。

本研究の中心課題であるセントロメアやテロメアに関する研究は、その重要性から古くから多様なモデル生物を用いて盛んになされてきた。両分野とも、歴史こそ古いながら、構成因子の同定がなされたのはわずかに約10数年前のことであり、多様な手法を用いて、多角的なアプローチで研究が遂行されるようになったのは比較的最近のことである。セントロメアやテロメアの機能調節には、細胞周期を通してタンパク質複合体の集積と発散あるいは相互作用が繰り返される、可逆的变化を必要とする。しかしながら、この可逆的变化がどのようなきっかけで起きるのかは不明な部分が多く、解決すべき課題である。

ゲノム解読の結果、ヒトの遺伝子数は予想よりずっと少ないことが分かった。これは1つの遺伝子が複数の働きをしようことを示す。その機構の1つがタンパク質の化学修飾である。その中で、SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) は、ユビキチンと同様に標的タンパク質に共有結合し、その働きを制御する。しかし、その機能はユビキチンとは大きく異なる。SUMO修飾によって、個々の標的因子はそれぞれに特有の機能変換や立体構造の変化を誘発し、細胞内での局在や機能に変化を与える。また、細胞内の多くのタンパク質中に、SUMO分子と結合する能力を有するアミノ酸配列であるSIM (SUMO-Interacting Motif) が存在する。SIMを含むタンパク質は、SUMO修飾を受けたタンパク質と相互作用する。つまりSUMO修飾に依存した複合体形成の誘発が生じる。一般に、細胞内のタンパク質はタンパク質同士が集合したり、会合したりすることで複合体を形成する。また、集合した複合体は分散もする。SUMO-SIMの相互作用は、こうした動的な平衡状態をどちらか一方に傾かせることに役立つと考えられている。ごく最近、SUMO-SIMの相互作用が液相分離現象の一端を担う可能性も提唱されている。細胞周期を通じて、動的な変化を常に必要とする染色体において、SUMO化修飾は最適な分子スイッチとして機能すると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、SUMO修飾システムがセントロメアおよびテロメア機能をどのように動的に制御するのかを分子レベルで解明することを到達目的とする。セントロメア機能の制御については、SUMO修飾を受ける標的因子の同定を第一の目的とした。一方、テロメア機能の制御については、同定済みの標的因子である Tpz1 の SUMO修飾が引き起こすイベントの分子機構の全貌の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) SUMO化修飾システムによるセントロメア機能の動的な制御の解明

これまでに筆者らは、分裂酵母をモデル系にSUMO修飾がセントロメア機能に重要な役割を果たすことを見出している。具体的には、SUMOを欠損すると染色体分配異常を示すこと、およびSUMOがG1/S期特異的にセントロメアに局在すること、を明らかにしてきた<sup>(1)</sup>。しかし、SUMOが「何を」「どのように」制御してセントロメア機能を動的に調節しているのか、その分子機構はいまだ全く不明である。そこで、まず「何を」という大問題に取り組み、その次に「どのように」という命題に取り組んだ。具体的には、下記の3つのアプローチにより、セントロメア機能に関与するSUMO修飾の標的因子の探索を行った。

セントロメア機能の変異株を用いた遺伝学的手法によるSUMO修飾の標的因子の探索

SUMOのセントロメア局在を指標としたSUMO修飾の標的因子の探索

近位依存的ラベリング技術 (BioID法) を用いたセントロメア機能に関与するSUMO修飾の標的因子の探索

### (2) SUMO修飾システムによるテロメア機能の動的な制御の解明

これまでに筆者らは、テロメアを構成するシェルタリン複合体の構成因子の1つである Tpz1 がS期後期に一過的にSUMO修飾を受け、それにより Stn1-Ten1 (CST) 複合体との相互作用が誘発され、その結果、テロメラーゼの作用が制限されることを提唱してきた<sup>(2)</sup>。しかし、Tpz1のSUMO修飾により引き起こされるイベントの詳細な分子機構に関して不明な点も多い。そこでこの点を解明すべく下記の2つのアプローチにより、SUMO修飾システムによるテロメア機能の動的な制御の解明に取り組んだ。

SUMO修飾を受けた Tpz1 が作用するSIM配列の特定

SUMO修飾を受けた Tpz1 とSIMの相互作用のタンパク質の立体構造的側面からの理解

## 4. 研究成果

### (1) SUMO 化修飾システムによるセントロメア機能の動的な制御の解明

セントロメア機能の変異株を用いた遺伝学的手法による SUMO 修飾の標的因子の探索

SUMOの基質タンパク質の候補を絞り込むため、まずSUMO化経路がセントロメア機能のどの部分に関与するのかを遺伝学的に明らかにすることを試みた。具体的には、セントロメア機能の変異株とSUMO修飾経路のE3リガーゼの変異株との二重変異株を作製し、表現系の評価を行った。その結果、SUMO化は分裂期にセントロメアと微小管の接着に関与するDASH複合体と協調してM期の染色体分配を制御することが示唆された。また、SUMOとMis6は染色体分配において同経路で働き、DASH複合体と協調的に染色体分配を保証する可能性が考えられた。

SUMOのセントロメア局在を指標としたSUMO修飾の標的因子の探索

「ある特定の基質タンパク質がG1/S期にSUMO化を受けることで一過的にセントロメアに局在可能となる」という観点からの基質の同定を試みた。細胞周期をG1/S期に同調し、Flagタグを付加したSUMOを発現・精製し、質量分析により標的因子の同定を行った。しかし、G1/S期に特異的に精製される因子の同定には至っていない。そこで、更にタンパク質精製の各種条件、スケールの再検討を行い、目的のSUMO修飾の標的因子の探索を継続中である。

一方で、SUMOのセントロメア局在に必要な因子の探索を行った。具体的には、セントロメア機能の変異株を用いて、それらの変異がSUMOのセントロメア局在に与える影響を評価した。これまでに、幾つかのセントロメア機能の変異株で、SUMOのセントロメア局在に影響が生じることを見出している。

近位依存的ラベリング技術 (BioID法) を用いたセントロメア機能に関与するSUMO修飾の標的因子の探索

上記の遺伝学的解析により、SUMO化は分裂期にセントロメアと微小管の接着に関与するDASH複合体と協調してM期の染色体分配を制御すること、さらにSUMOとMis6は染色体分配において同経路で働き、DASH複合体と協調的に染色体分配を保証する可能性が考えられた。そこで、分裂酵母において近位依存的なラベリング技術 (BioID法) を用いたタンパク質標識の系を確立し、SUMOおよびDASH複合体の近接タンパク質の取得に成功している。現在、それらの中から、SUMO化の標的因子の絞り込みを進めている。

### (2) SUMO 修飾システムによるテロメアの機能の動的な制御の解明

SUMO 修飾を受けた Tpz1 が作用する SIM 配列の特定

分裂酵母では、シェルタリン複合体構成因子 Tpz1 の SUMO 化修飾に依存して、Stn1 Ten1 複合体がテロメア領域に結合し、テロメラーゼの作用を抑制する。これまでに、Tpz1 の SUMO 化消失変異と *stn1<sup>ts</sup>* 変異の二重変異体では、テロメアが消失し染色体が自己環状化することが知られている。

今回筆者らは、SUMO 修飾を受けた Tpz1 と Stn1 との間の SIM 配列を介した相互作用に必要な Stn1 上の SIM 配列が、先行研究<sup>(3)</sup>で報告されている配列でなく、筆者らが提唱した配列が真の SIM であることを遺伝学的な解析により明らかにすることに成功した。

Stn1 の SIM 配列の確定の最終段階として、化学的架橋による直接的な検証を試みている。大腸菌で発現・精製した SUMO および Stn1 タンパク質を、化学的架橋剤 BS3 存在下で混合し、架橋された SUMO-Stn1 複合体を単離し、質量分析により両者の架橋部位を特定し、実際に SIM 候補配列に SUMO が結合している直接的な証拠を得る。現時点で、Stn1 タンパク質の精製に難航しており、その問題を解決できれば一気に解析を進めることができる状況にまで到達している。

SUMO 修飾を受けた Tpz1 と SIM の相互作用のタンパク質の立体構造的側面からの理解

SUMO 修飾を受けた Tpz1 と SIM の相互作用のタンパク質の立体構造的側面からの解析に関しては、SUMO 修飾を受けた Tpz1 タンパク質の調整がかなり困難を極めたため、上記の架橋による SUMO-Stn1 複合体の解析を優先させることとした。

環状染色体細胞における SUMO 修飾の役割

真核細胞において、染色体末端のテロメア構造の不安定化により同一染色体内の末端同士が融合した場合、環状化染色体が形成される。線状染色体の末端であるテロメアは、減数分裂における相同染色体間の対合に必須であり、テロメアを欠失した環状化染色体細胞は不稔となる。一方、体細胞分裂では、環状化染色体細胞は低頻度で染色体の分配異常を生じる。ヒトにおいて、環状化染色体を体細胞に有する環状染色体症候群が知られている。環状染色体症候群では、てんかんや発達の遅れなどの主症状を呈するが、患者によってその症状は多岐に渡ることが知られている。分裂酵母は染色体が3本しかなく、全ての染色体が自己環状化した細胞が生存可能であることから、環状化染色体細胞を理解する上で優れたモデル系である。筆者らは、上記(2)の解析の過程で、環状染色体状態で生育する分裂酵母細胞の生育に、SUMO修飾が必要であることを見出した。さらに、分裂酵母ではSUMO化が、染色体の自己環状化の過程には必要でなく、環状染色体維持の仕組みに重要な役割を果たしていることを見出した。

### (3) まとめ

細胞分裂において、染色体を安定に維持し、正確に分配することがゲノムの安定な継承に重要である。真核生物の染色体上のセントロメアおよびテロメア領域は、染色体の安定維持・分配に極めて重要な役割を果たす。今回筆者らは、分裂酵母をモデル系に用い、ユビキチン様タンパク質 SUMO による翻訳後修飾が、セントロメアおよびテロメア領域の機能を制御する分子機構の一

端を明らかにした。さらに、色々な病気と深く関連する環状染色体細胞の生育に SUMO 修飾が深く関与することも見出した。セントロメアおよびテロメア機能はがんとも密接に関わっており、セントロメアおよびテロメア研究は基礎分野のみならず臨床応用分野にも大きな展開を見せている。本研究成果は、将来的には応用分野にも資する重要な基盤を構築するものと期待する。

<引用文献>

- ( 1 ) K. Tanaka, *et al.*, *Mol Cell Biol*, 1999
- ( 2 ) K. Miyagawa, *et al.*, *PNAS*, 2014
- ( 3 ) S. Matmati, *et al.*, *Sci Ad.*, 2018

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9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 Teramura Hiroshi, Yamada Kazuma, Ito Kahori, Kasahara Keisuke, Kikuchi Tsubasa, Kioka Naoya, Fukuda Masato, Kusano Hiroaki, Tanaka Katsunori, Shimada Hiroaki	4. 巻 96
2. 論文標題 Characterization of novel SUMO family genes in the rice genome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 25-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1266/ggs.20-00034	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 Kazuki Ishida, Katsunori Tanaka, Kei Kawakami	4. 巻 10
2. 論文標題 Generation and characterization of a temperature-sensitive mutant allele of the second largest subunit of RNA polymerase I in Schizosaccharomyces pombe	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 microPublication biology	6. 最初と最後の頁 17912
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Pinotsi Dorothea, Tian Rui, Anand Pratyush, Miyanishi Koichiro, Boss Jens M., Chang Kevin Kai, Welter Pol, So Frederick T.-K., Terada Daiki, Igarashi Ryuji, Shirakawa Masahiro, Degen Christian L., Segawa Takuya F.	4. 巻 5
2. 論文標題 Distance measurements between 5 nanometer diamonds - single particle magnetic resonance or optical super-resolution imaging?	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nanoscale Advances	6. 最初と最後の頁 1345 ~ 1355
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D2NA00815G	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mahana Yutaka, Ohki Izuru, Walinda Erik, Morimoto Daichi, Sugase Kenji, Shirakawa Masahiro	4. 巻 7
2. 論文標題 Structural Insights into Methylated DNA Recognition by the Methyl-CpG Binding Domain of MBD6 from Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 3212 ~ 3221
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.1c04917	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujisaku Takahiro, So Frederick Tze Kit, Igarashi Ryuji, Shirakawa Masahiro	4. 巻 1
2. 論文標題 Machine-Learning Optimization of Multiple Measurement Parameters Nonlinearly Affecting the Signal Quality	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Measurement Science Au	6. 最初と最後の頁 20 ~ 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmesuresciau.1c00009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Igarashi Ryuji, Sugi Takuma, Sotoma Shingo, Genjo Takuya, Kumiya Yuta, Walinda Erik, Ueno Hiroshi, Ikeda Kazuhiro, Sumiya Hitoshi, Tochio Hidehito, Yoshinari Yohsuke, Harada Yoshie, Shirakawa Masahiro	4. 巻 142
2. 論文標題 Tracking the 3D Rotational Dynamics in Nanoscopic Biological Systems	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 7542 ~ 7554
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.0c01191	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Yuka, Morimoto Daichi, Walinda Erik, Sugase Kenji, Shirakawa Masahiro	4. 巻 529
2. 論文標題 Quantitative monitoring of ubiquitination/deubiquitination reaction cycles by 18O-incorporation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 418 ~ 424
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.06.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujisaku Takahiro, Igarashi Ryuji, Shirakawa Masahiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Nanometre-Scale Visualization of Chemical Parameter Changes by T1-Weighted ODMR Imaging Using a Fluorescent Nanodiamond	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemosensors	6. 最初と最後の頁 68 ~ 68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/chemosensors8030068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morimoto Daichi, Walinda Erik, Takashima Shingo, Nishizawa Mayu, Iwai Kazuhiro, Shirakawa Masahiro, Sugase Kenji	4. 巻 60
2. 論文標題 Structural Dynamic Heterogeneity of Polyubiquitin Subunits Affects Phosphorylation Susceptibility	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 573 ~ 583
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.0c00619	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 的野志帆、藤田紗瑛、川上慶、田中克典
2. 発表標題 分裂酵母においてモノSUMO化修飾がテロメア制御に与える影響
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 川上慶、上野由佳里、葉山菜央、田中克典
2. 発表標題 Mrc1claspinはヘテロクロマチン構造の維持・継承に重要である
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 藤田紗瑛、的野志帆、今野あや、川上 慶、田中克典
2. 発表標題 分裂酵母における染色体環状化へのSUMO翻訳後修飾経路の関与
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第53回研究報告会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田紗瑛、的野志帆、今野あや、川上 慶、田中克典
2. 発表標題 分裂酵母の染色体の環状化へのSUMO翻訳後修飾経路の関与
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田紗瑛、的野志帆、今野あや、川上 慶、田中克典
2. 発表標題 SUMO化修飾は分裂酵母の環状染色体の維持に必要である
3. 学会等名 第38回染色体ワークショップ・第19回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田紗瑛、月本慎也、的野志帆、今野あや、川上慶、田中克典
2. 発表標題 SUMO化修飾は分裂酵母の環状染色体の維持に必要である
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林 朋佳、中谷 文香、坂井 紫音、川上慶、田中克典
2. 発表標題 分裂酵母高温感受性変異体ライブラリーを用いた新規ヘテロクロマチン制御因子の探索・同定
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 川上慶、石田 和輝、田中克典
2. 発表標題 分裂酵母RNA polymerase Iによる遺伝子発現制御機構
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 的野志帆、川上慶、田中克典
2. 発表標題 分裂酵母の環状化染色体細胞を用いた遺伝子発現解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第55回研究報告会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田紗矢、川上慶、田中克典
2. 発表標題 分裂酵母でのBioID法の有効性の検討
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第55回研究報告会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤田紗瑛、月本慎也、今野あや、川上慶、田中克典
2. 発表標題 分裂酵母の環状染色体の維持にSUMO化修飾は必要である
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第55回研究報告会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

関西学院大学理工学部生命科学科 染色体機能学研究室 ホームページ  
<https://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~tanaka/achievement.html>

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	白川 昌宏  (Shirakawa Masahiro)  (00202119)	京都大学・工学研究科・教授    (14301)	

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