

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570006

研究課題名（和文）テロメアとヘリケースの染色体維持における新規関係機構の解明

研究課題名（英文）Understanding the novel interplay between telomere and helicase in chromosome maintenance

研究代表者

上野 勝（MASARU UENO）

広島大学・大学院先端物質科学研究科・准教授

研究者番号：90295397

研究成果の概要（和文）：分裂酵母テロメア結合蛋白質 Pot1 とヘリケース Rqh1 の二重変異株や、テロメラーゼ Trt1 とヘリケース Rqh1 の二重変異株が微小管阻害剤 TBZ に感受性になる機構の解明を試みた結果、pot1 rqh1 二重変異株や trt1 rqh1 二重変異株では、テロメアでの組換え中間体が蓄積したまま、染色体分配が進行することで、染色体分配が阻害されることが TBZ 感受性の原因であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The double mutants between fission yeast telomere binding protein Pot1 and Rqh1 helicase and the double mutant between fission yeast telomerase Trt1 and Rqh1 helicase are sensitive to microtubule drug TBZ. We found that the reason for the TBZ sensitivity is due to the accumulation of recombination intermediates at telomere in M phase, which inhibits chromosome segregation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：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：テロメア、分裂酵母、RecQ ヘリケース、

## 1. 研究開始当初の背景

染色体末端テロメアの維持は、がん細胞の無限増殖に必須である。そこでテロメアをターゲットにした新しいがん治療法の確立を目指して、テロメラーゼ阻害剤の開発などが行われている（Harley ら、Nat. Rev. Cancer. 2008）。微小管阻害剤は、近年、抗がん剤として非常に注目されており、紡錘体の機能を阻害することで染色体分

配を阻害し、がん細胞を死滅させる（Schmidt ら、Drug Resist. Updat. 2007）。しかし、テロメラーゼ阻害剤は即効性がないことが問題であり、微小管阻害剤は副作用が強いという問題がある。これらの問題を克服する新しい技術を開発するためには、テロメア維持機構や微小管阻害剤に関する更なる研究を行うことが必要不可欠である。

我々は、分裂酵母を用いてテロメア維持に関わる因子の探索とその機能解析を行ってきた。Pot1 はテロメア DNA の一本鎖突出に結合する蛋白質で、分裂酵母からヒトまで広く保存されている。分裂酵母の *pot1* 破壊株は、テロメア DNA が急激に消失し、染色体が環状化した株が生き残ることが報告されているが、急激なテロメア消失の機構は解明されていない (Baumann ら、Science. 2001)。RecQ ヘリケースは大腸菌からヒトまで広く保存された蛋白質で、ヒトの RecQ ヘリケース WRN の変異は早老症を引き起こす。ヒト WRN はテロメア維持に関係することが報告されているが、WRN のテロメアにおける役割は、ほとんどわかっていない (Crabbe ら、Science. 2004)。分裂酵母の RecQ ヘリケースは Rqh1 と名付けられており、その破壊株や変異株の解析が行われているが、Rqh1 のテロメアにおける機能はわかっていない。

## 2. 研究の目的

我々は、分裂酵母の Pot1 と RecQ ヘリケース Rqh1 のテロメアにおける機能解明を目指して研究を行ったところ、分裂酵母 *pot1* 破壊株のテロメア DNA 消失が *rqh1* の破壊によって抑圧されること、*pot1 rqh1* 二重変異株のテロメアが相同組換えで維持されていること、*pot1 rqh1* 二重変異株は微小管阻害剤に感受性になること、などを発見している (特定領域研究 (公募研究) 「染色体サイクルの制御ネットワーク」 (H18~19) と (H20~21) の成果)。更に *pot1* 破壊株と同様に、破壊するとテロメア DNA を消失する *trt1* 破壊株と、*rqh1* との二重変異株も、微小管阻害剤に感受性になることを発見している。これらの発見は、テロメアと微小管阻害剤の関係を示唆した世界で初めての例であり、その機構を解明することで、テロメア維持に関係する蛋白質 (Pot1 や Trt1) と RecQ ヘリケース Rqh1 の染色体維持における新しい機能が発見できることが期待できる。更に本研究の成果は、ヒトテロメアーゼと RecQ ヘリケースの両方を阻害することで、低濃度の微小管阻害剤で高い抗がん活性を得る新しい手法の開発につながることを期待できる。

そこで、本研究の目的は、分裂酵母のテ

ロメア関連因子 (Pot1 や Trt1 など) と RecQ ヘリケース Rqh1 が同時に機能出来ないときに、微小管阻害剤に感受性になる機構を解明することとした。

## 3. 研究の方法

*pot1 rqh1* 二重変異株と *trt1 rqh1* 二重変異株の微小管阻害剤感受性の機構を解明するために以下のことを明らかにすることを試みた。我々は、*pot1 rqh1* 二重変異株と *trt1 rqh1* 二重変異株のテロメアが、相同組換えで維持されていることを示唆する幾つかの結果を得ている。そこで、(1) 相同組換えでテロメアが維持されていることが微小管阻害剤感受性と関係するかどうかを明らかにする。一方、これまでに微小管阻害剤に感受性になる原因としては、セントロメア異常、スピンドルチェックポイント異常、染色体コヒージョン異常、などが知られている (Ekwall ら、J. Cell. Sci. 1996、He ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1997、Tatebayashi ら、Genetics. 1998)。そこで、(2) 分裂酵母 *pot1 rqh1* 二重変異株と *trt1 rqh1* 二重変異株の微小管阻害剤感受性の原因がセントロメア構造、スピンドルチェックポイント、染色体コヒージョンの異常と関係しているかどうかを解明する。

## 4. 研究成果

2009 年度

我々は、分裂酵母 Pot1 と Rqh1 の二重変異株が微小管重合阻害剤に高感受性になることを発見している。しかし別の研究室から *pot1 rqh1* 二重破壊株が合成致死であるという論文が報告された。そこで 2009 年度はどのような時に *pot1 rqh1* 二重破壊株が合成致死になるのかを調べた。その結果、*pot1* 完全欠損と *rqh1* 完全欠損の二重変異株は合成致死であるが、*pot1* 完全欠損と *rqh1* ヘリケース欠損変異株 (以降 *rqh1-hd* 株) の二重変異株は生育可能であることを発見した。次に、*pot1* 挿入変異株と *rqh1* 完全欠損株との二重変異株の作成を試みた。*pot1* 挿入変異株とは、*pot1* 遺伝子の途中でマーカー遺伝子を挿入したことによって、*pot1* の機能が発揮できなくなる変異株のことである。この *pot1* 挿入変異株は *pot1* 完全欠損株と同様に、テロメアが消失して、染色体が環状化した株が生き残ることを確

認している。この pot1 挿入破壊株と rqh1 完全欠損株の二重変異株は生育可能であることを発見した。このことから pot1 挿入破壊株は何らかの断片が発現していることが示唆された。

次に pot1 と同様に破壊するとテロメアを急激に失うことが報告されている stn1 と rqh1-hd 株との二重変異株が作成可能であるのかを調べたところ、作成可能であることがわかった。さらにこの stn1 と rqh1-hd の二重変異株は pot1 rqh1-hd 二重変異株と同様に微小管重合阻害剤に高い感受性を示すことがわかった。Pot1 と同様に Stn1 もテロメアで機能することが報告されているが、Pot1 と Stn1 の機能の違いについては、ほとんどわかっていない。今回の結果から、rqh1 が変異した株のバックグラウンドにおいても、pot1 破壊と stn1 破壊の表現型が非常に似ていたので、Pot1 と Stn1 は一緒に機能していることが示唆された。我々の研究室で作成した pot1 挿入破壊株は、野生株のバックグラウンドでは、pot1 完全欠損株と同様に、テロメアを失い染色体が環状化した株が生き残るが、rqh1 完全欠損株のバックグラウンドでは、pot1 完全欠損株は生育不可能であるのに対して、pot1 挿入破壊株は、生育可能であることから、pot1 挿入破壊株では、pot1 の断片が発現し、それが rqh1 欠損株での生育を可能にしていると考えられる。今後は、どのような断片が発現しているのかを調べることで、pot1 の新しい機能の発見に繋がることを期待できる。

#### 2010 年度

2010 年度は、pot1 rqh1-hd 株が微小管阻害剤に高い感受性を示す機構の解析を試みた。その結果、テロメア間での相同組換え中間体が染色体分配時に存在することで姉妹染色分体がつながったまま染色体分配が進行することで、染色体分配を阻害することが微小管阻害剤感受性の原因となる可能性が考えられることが明らかとなった。

一方我々は、テロメラーゼをコードした遺伝子 trt1 の破壊と rqh1 との二重変異株も微小管阻害剤に感受性になることを発見しているがその原因はわかっていない。そこで pot1 rqh1 二重変異株と同様に trt1 rqh1 二重変異株においても組換え中間体

を持ったまま染色体分配がおこるかどうかを RPA フォーサイを追跡することで行った。その結果、pot1 rqh1 二重変異株と同様に trt1 rqh1 二重変異株も RPA フォーサイを持ったまま染色体が分配されることがわかった。このことから、trt1 rqh1 二重変異株が微小管阻害剤に感受性になる原因は、テロメア間で組換え中間体が蓄積した染色体が分配されることで、染色体分配が阻害されることであることが示唆された。テロメラーゼと Rqh1 はヒトにも保存されている。従って、がん細胞のテロメラーゼと Rqh1 ホモログである WRN や BLM を阻害することでがん細胞の微小管阻害剤の効果を高めることが期待できる。

#### 2011 年度

2011 年度は、pot1 rqh1-hd 株の M 期進行に異常があるのかどうかを調べた。そのために、微小管蛋白質に蛍光蛋白質を融合させて、微小管の伸長をライブ観察した。その結果、pot1 rqh1-hd 株では、M 期の進行がメタフェーズで停止する頻度が高いことがわかった。次に、M 期で停止している pot1 rqh1-hd 株でスピンドルチェックポイントが活性化されているかどうかを調べた。方法は、スピンドルチェックポイントが活性化されたら分解が阻害されるセキュリン蛋白質に蛍光蛋白質を融合させた株を用いた。その結果、M 期の進行がメタフェーズで停止している pot1 rqh1-hd 株では、セキュリンが分解されないままであることを発見した。また、pot1 rqh1-hd 株の M 期の進行がメタフェーズで停止する現象は、スピンドルチェックポイント因子である Mad2 や Bub1 の破壊で抑圧された。これらのことから、pot1 rqh1-hd 株は、スピンドルチェックポイントが活性化されることがわかった。スピンドルチェックポイントは、微小管とキネトコアの結合が正常に起こらなかったときに活性化される。これまでテロメアはキネトコアと微小管の結合には直接関係しないと考えられている。ところが、本研究結果では、テロメアの異常が直接または間接的に微小管とキネトコアの正常な結合を阻害している可能性が示唆された。今後はこの機構を解析していくことで、スピンドルチェックポイントやテロメアにおける新しい機能が発見されることが期待できる。

## 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4件)

1. Double mutant between fission yeast telomerase and RecQ helicase is sensitive to anti-microtubule drug., S. Ukimori, N. Kawabata, H. Shimada, Ryota Imano, K. Takahashi, M. Yukawa, E. Tsuchiya, and M. Ueno\*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**, 264-269. (2012) 査読あり
2. Fission yeast Pot1 and RecQ helicase are required for efficient chromosome segregation., K. Takahashi, R. Imano, T. Kibe, H. Seimiya, Y. Muramatsu, N. Kawabata, G. Tanaka, Y. Matsumoto, T. Hiromoto, Y. Koizumi, N. Nakazawa, M. Yanagida, M. Yukawa, E. Tsuchiya, M. Ueno\*. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 495-506. (2011) 査読あり
3. Expression of Mutant RPA in Human Cancer Cells Causes Telomere Shortening. Y. Kobayashi, K. Sato, T. Kibe, H. Seimiya, A. Nakamura, M. Yukawa, E. Tsuchiya, and M. Ueno\*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 382-385. (2010) 査読あり
4. Roles of DNA repair proteins in telomere maintenance. M. Ueno *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 1-6. (2010). 総説 査読あり

[学会発表] (計11件)

1. Roles of Fission Yeast Pot1 and RecQ Helicases in Telomere Protection M. Ueno  
*Cold Spring Harbor Laboratory Meeting Telomere and Telomerase*, 105 (2011) (New York, U. S. A.)
2. Entangled telomere activates both DNA damage checkpoint and spindle checkpoint M. Ueno  
*The 6th international fission yeast*

*meeting*, 114 (2011) (Boston, U. S. A.)

3. Dysfunctional telomere activates both DNA damage checkpoint and spindle checkpoint in fission yeast *S. pombe* M. Ueno  
*The 5th International Workshop on Cell Regulations in Division & Arrest*, 44 (2011) (Okinawa, Japan)
4. Role of RecQ Helicase at Dysfunctional Telomere M. Ueno  
*Cold Spring Harbor Laboratory Meeting Telomere and Telomerase*, 229 (2009) (New York, U. S. A.)
5. Roles of Pot1 and RecQ Helicases in Genome Stability M. Ueno  
*Switzerland-Japan Meeting on the Molecular Mechanisms Regulating Chromosome Dynamics and Genome Stability*, 38 (2009) (Villars, Switzerland)
6. Novel Roles of Telomere Proteins and RecQ Helicases in Genome Stability M. Ueno  
*The 5th international fission yeast meeting*, 325 (2009) (Tolyo, Japan)

[図書] (計1件)

タイトル DNA Repair 出版社 InTech  
ISBN 978-953-307-697-3 編集 Inna Kruman 2011  
597-612 ページ担当 担当部分のタイトル  
Roles of DNA Repair Proteins in Telomere Maintenance

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上野 勝 (UENO MASARU)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・准教授

研究者番号 : 90295397

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：