

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 31 日現在

機関番号：34504

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570186

研究課題名（和文）Tel2 ファミリータンパク質による PI3K 様キナーゼ(PIKK) 制御機構の解明

研究課題名（英文）The analysis of the regulation of PIKK by Tel2 family protein

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

研究成果の概要（和文）：

真核生物間で高度に保存された PIKK ファミリータンパク質(PIKKs)の相互作用因子である Tel2 が複数の異なる PIKKs をどのように区別してそれぞれ制御するのかを明らかにするために、分裂酵母をモデル系に用いてそれぞれの PIKKs が関与する経路に特異的な欠損を示す *tel2* の条件致死変異株の取得及び解析を行った。その結果、*tel2* 変異株の条件致死性の原因は Tel1^{ATM}/Rad3^{ATR} 及び Tor1/Tor2^{TOR} の不安定化によるものではないと考えられた。これらの結果は先行研究によるモデルと合致せず、新たな制御機構の存在を強く示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：

To understand how Tel2 protein regulates the PIKK family proteins conserved among eukaryotes, we tried to isolate conditionally lethal *tel2* mutants of fission yeast and analyzed. We found that Tel1^{ATM}/Rad3^{ATR} or Tor1/Tor2^{TOR} were not destabilized in *tel2* mutants defective in Tel1^{ATM}/Rad3^{ATR} or Tor1/Tor2^{TOR} pathway, suggesting that Tel2 is not involved in the stability of PIKKs and has a novel function in the regulation of PIKKs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：DNA複製・DNA損傷・チェックポイント・細胞応答・PIKKキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

PIKK は、真核生物の様々な細胞機能に重要な役割を果たし、DNA複製・損傷応答における ATM/ATR、細胞増殖因子と栄養源にตอบสนองして細胞成長と増殖を制御する TOR (target of rapamycin)、そしてヒストンアセチル化

(HAT)酵素複合体の構成要素としてクロマチン構造制御を介した転写制御に機能する TRRAP (transformation/transcription domain-associated protein) の3種類に分類される。ATM/ATR は多くのがん患者でその機能の欠損がみられ、TOR も新規の抗がん剤の標的として注目を集めている。また、ヒト

TRRAP は c-Myc により誘発される細胞のがん化に必要な因子である。

近年、PIKK 機能制御に関して、「Tel2 ファミリータンパク質が全ての種類の PIKK に直接結合する能力を有し、それらのキナーゼ群の機能を統一的に制御する」という驚くべき知見が国内外の複数のグループから相次いで報告された。

Tel2 は、元々出芽酵母のテロメア長に関与する因子として Tel1 と共に同定されたが、他の生物ではテロメア機能への関与は明らかにされておらず、分裂酵母やヒト細胞では DNA 複製・損傷応答に関与することが報告されている。また、線虫では寿命に関与する因子として解析され Clk-2/Rad-5 と名付けられている。このような状況下に於いて、ごく最近まで Tel2 の機能の実体は謎のままであった。PIKK 全般に対する Tel2 による機能制御に関するこれらの新たな知見により、Tel2 機能についての一見一貫性のないこれまでの報告結果に対する説明がある程度可能となった。しかし同時に、「Tel2 が一体どのようにして時間的・空間的にその機能が大きく異なる 3 種類の PIKK を制御するのか」という新たな命題が発生した。

申請者は分裂酵母をモデル生物として、ATM/ATR による DNA 複製・損傷チェックポイント応答機構の解明を精力的に行ない、チェックポイントメディエーター Mrc1 の発見とその分子機構解明を中心に、同研究分野の研究推進に貢献してきた。そのような研究の流れにおいて、今回 ATM/ATR の制御を司る Tel2 の機能に着目し、その分子機構を明らかにし新たなブレークスルーを目指した。

2. 研究の目的

「Tel2 が一体どのようにして時間的・空間的にその機能が大きく異なる 3 種類の PIKK を制御するのか」という命題に対して、特定の種類の PIKK の制御に欠損を示す *tel2* 変異株を取得・解析することにより、その制御の分子機構の解明が可能であると考えた。本計画を開始する準備として、*tel2* 条件致死変異株の取得を試み、既に幾つかの複製・損傷チェックポイントのみに欠損を示す変異株の取得に成功していた。本研究では、これらの *tel2* 変異株を用いた分子遺伝学的及び生化学的解析により、Tel2 による ATM/ATR の機能制御の分子機構を解明することを目的とした。そして、その成果を手がかりにして、Tel2 による PIKK の制御機構の謎の全貌解明に挑戦する。

3. 研究の方法

既に取得済みの複製・損傷チェックポイント

トのみに欠損を示す分裂酵母 *tel2* 変異株の機能欠損の原因を分子遺伝学的及び生化学的に解析を行う。変異株の機能欠損の実体を理解することが、目的達成のための最重要課題となる。それにより、Tel2 による ATM/ATR (分裂酵母では Tel1/Rad3) の機能制御の分子機構の特異性、普遍性を見だし、他の PIKK の制御との相違点・共通点を明確にする。

(1) *tel2* 変異株の特性の決定

各変異の特性を正確に理解することは、欠損している機能を把握する上で重要である。各変異株の複製及び損傷チェックポイント能をエフェクターキナーゼ (Cds1 及び Chk1) の活性化能で評価する。

(2) *tel2* 変異株の変異部位の特定

変異 *tel2* 遺伝子の塩基配列決定により機能欠損の原因となる変異部位を特定することは、以降の解析結果を Tel2 の機能ドメインの側面から解釈する上で極めて重要である。

(3) 変異 Tel2 と各 PIKK (分裂酵母 Tel1/Rad3, Tor1/Tor2, Tral/Tra2) の結合の評価

in vitro 及び *in vivo* で変異 Tel2 と各 PIKK の結合を生化学的に評価することにより、各 *tel2* 変異体で欠損している機能と各 PIKK との結合能との相関関係があるかどうかを解析する。変異株の表現型と結合能の消失との間に相関関係があれば、Tel2 と各 PIKK との結合の特異性で、それぞれ独立的な制御機構の一端が説明可能となる。

(4) *tel2* 変異が Tel1/Rad3 キナーゼ活性に与える影響の解析

tel2 変異株の表現型の特異性は、各 PIKK のキナーゼ活性に及ぼす効果で説明可能と考えた。分裂酵母においては Tel1/Rad3 のキナーゼ活性の変動を評価する系が不十分である。そこで、目的達成のために、これまでの解析から、下流でメディエーターとして働く Mrc1 が Tel1/Rad3 の極めていい基質であるという知見を得ており、Mrc1 を基質とした Tel1/Rad3 キナーゼ活性評価系を構築し、活用する。

(5) *tel2* 変異株での各 PIKK のタンパク質の安定性の解析

ヒト細胞の系では Tel2 が PIKK 全般のタンパク質の安定化に働くことが報告されているが、それと合致しない報告もあり論争中である。取得済みの多種類の変異株を用いて各 PIKK タンパク質の安定性の変化を解析することで、一定の結論を導くことが可能である。

(6) Tel2結合タンパク質Tti1との結合状態の検証

Tel2はTti1タンパク質とヘテロ二量体を形成する可能性が報告されている。しかし、Tti1は未解析の機能未知のタンパク質である。そこで、Tti1の機能を遺伝学的及び生化学的に検証することで、Tel2の理解を深める。さらに、Tel2変異がTel2-Tti1結合にどのような影響を与えるのかを免疫沈降法やグリセロール密度勾配分離などにより評価する。

4. 研究成果

(1) *tel2*変異株の特性の決定

複数単離した *tel2* 条件致死変異株のうち、Tel1^{ATM}/Rad3^{ATR} が関与する DNA 複製及び損傷チェックポイントに欠損を示す変異株 (*tel2-F187*)、Tor1/Tor2^{TOR} が関与する高温及び Rapamycin に感受性を示す変異株 (*tel2^{Δ815P}*) の特徴付けに成功した。

(2) *tel2*変異株の変異部位の特定

Tel1^{ATM}/Rad3^{ATR} が関与する DNA 複製及び損傷チェックポイントに欠損を示す変異株 (*tel2-F187*) と Tor1/Tor2^{TOR} が関与する高温及び Rapamycin に感受性を示す変異株 (*tel2^{Δ815P}*) の両変異株のアミノ酸置換部位の同定に成功した。

(3) 変異 Tel2 と各 PIKK (分裂酵母 Tel1/Rad3, Tor1/Tor2, Tra1/Tra2) の結合の評価

Tel1^{ATM}/Rad3^{ATR} が関与する DNA 複製及び損傷チェックポイントに欠損を示す *tel2-F187* 変異株において、Tel2 と Rad3^{ATR} との結合に異常は見られなかった。変異 Tel2 と Tel1^{ATM} との結合に関しては、抗体の関係で評価に至らなかった。また、Tor1/Tor2^{TOR} が関与する高温及び Rapamycin に感受性を示す変異株 *tel2^{Δ815P}* における Tel2 と Tor1/Tor2^{TOR} 結合の評価に関しては、現在解析中である。

(4) *tel2*変異が Tel1/Rad3 キナーゼ活性に与える影響の解析

分裂酵母においては Tel1/Rad3 のキナーゼ活性の変動を評価する系として、Tel1/Rad3 のキナーゼの下流でメディエーターとして働き、直接リン酸化制御を受ける Mrc1 に着目した。Mrc1 のリン酸化レベルを指標にして、*in vivo* における Tel1/Rad3 のキナーゼ活性を評価したところ、Tel1^{ATM}/Rad3^{ATR} が関与する DNA 複製及び損傷チェックポイントに欠損を示す *tel2-F187* 変異株では、Tel1/Rad3 キナーゼによる Mrc1 のリン酸化能が低下している事が分かった。現時点では、Tel1/Rad3 キナーゼのキナーゼ活性自体が低下しているのか、基質の認識能が低下しているのか判別ができていない。しかし、いずれにしても

tel2-F187 変異株では Tel1/Rad3 キナーゼから Mrc1 へのシグナルの伝達過程に欠損があることが明らかとなった。

(5) *tel2*変異株での各PIKKのタンパク質の安定性の解析

ヒト細胞の系では Tel2 が PIKK 全般のタンパク質の安定化に働くと報告されているが、それと合致しない報告もあり論争中である。Tel1^{ATM}/Rad3^{ATR} が関与する DNA 複製及び損傷チェックポイントに欠損を示す変異株 *tel2-F187*、Tor1/Tor2^{TOR} が関与する高温及び Rapamycin に感受性を示す変異株 *tel2^{Δ815P}* の両方において、Rad3^{ATR} や Tel1^{ATM} 及び Tor1/Tor2^{TOR} タンパク質の安定性は野生株のものと同様な違いが見られなかった。このことから、*tel2* 変異株の条件致死性の原因は、Tel1^{ATM}/Rad3^{ATR} 及び Tor1/Tor2^{TOR} の不安定化によるものではないと考えられた。これらの結果は先行研究によるモデルと合致せず、新たな制御機構の存在を強く示唆するものである。

(6) Tel2結合タンパク質Tti1との結合状態の検証

免疫沈降法により、両方の *tel2* 条件致死変異株においても野生株と同様の Tel2 と Tti1 の結合を確認した。このことから、*tel2* 変異株の条件致死性の原因は Tel2 と Tti1 の相互作用の消失によるものではないと考えられる。

今後、*tel2* 変異が DNA 複製及び損傷チェックポイントの活性化のどの局面に欠損を示すのか更に詳細に解析を継続することで、Tel2 による PIKK の制御機構の謎を明らかにしたい。

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 3 件)

- ① Strzalka, W., Labecki, P., Bartnicki, F., Aggarwal, C., Rapala-Kozik, M., Tani, C., Tanaka, K., Gabrys, H. Arabidopsis thaliana proliferating cell nuclear antigen has several potential sumoylation sites. J Exp Bot. 2012.63(8): 2971-2983 (査読有)
- ② Tanaka, K., Multiple Functions of S-phase Checkpoint Mediator, Biosci. Biotechnol. Biochem.,2010, 74(12):2367-2373 (査読有)

- ③ Okada, S., Nagabuchi, M., Takamura, Y., Nakagawa, T., Shinmyozu, K., Nakayama, J., Tanaka, K. Reconstitution of *Arabidopsis thaliana* SUMO pathways in *E. coli*: functional evaluation of SUMO machinery proteins and mapping of SUMOylation sites by mass spectrometry. *Plant Cell Physiol.* 2009, **50**(6): 1049-1061 (査読有)

[学会発表] (計 12 件)

- ① 田中克典、分裂酵母Tel2によるPIKK制御機構の解明、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月15日、横浜市
- ② Venny Santosa、Biochemical and Genetical Relation of Fission Yeast MCM-binding Protein Mcb1 and MCM Complex、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月15日、横浜市
- ③ 田中克典、Fission yeast MCM-binding protein Mcb1 is biochemically and genetically related to MCM complex、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 23 日、京都市
- ④ 田中克典、The Loading of the S-phase Checkpoint Mediators on Replication Origins、The 6th International Fission Yeast Meeting、2011 年 6 月 28 日、Boston、USA
- ⑤ Venny Santosa、Fission yeast MCM-binding protein Mcb1 is biochemically and genetically related to MCM complex、The 6th International Fission Yeast Meeting、2011 年 6 月 26 日、Boston、USA
- ⑥ Venny Santosa、Characterization of Fission Yeast MCM-Binding Protein、International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities、2011年1月24日、淡路市
- ⑦ 田中克典、分裂酵母HP1ホモログSwi6のSUMO化修飾の意義の解明、第28回 染色体ワークショップ、2011年1月12日、加賀市
- ⑧ 山邊史貴、SUMO化修飾による分裂酵母 Swi6の機能制御機構の解明、第33回日本分子生物学会年会/第83回日本生化学会大会、2010年12月9日、神戸市

- ⑨ 坂井俊介、分裂酵母Mrc1のDNA複製開始複合体への結合様式の解明、第33回日本分子生物学会年会/第83回日本生化学会大会、2010年12月7日、神戸市

- ⑩ 田中克典、分裂酵母MCM-BPタンパク質の機能解析、第27回染色体ワークショップ、2010年1月21日、三島市

- ⑪ 坂井俊介、分裂酵母Mrc1のDNA複製フォークへの結合様式の解明、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月11日、横浜市

- ⑫ Katsunori Tanaka、THE MRC1 LOADING ONTO THE REPLICATION FORK IN FISSION YEAST、The 5th International Fission Yeast meeting Pombe2009、2009 年 10 月 29 日、Tokyo

[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