

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25年5月20日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570002

研究課題名（和文） テロメア恒常性に関与する多面的シグナルの統合・応答メカニズム

研究課題名（英文） Integration of pleiotropic signals involved in the telomere integrity

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

研究成果の概要（和文）：出芽酵母のCST (Cdc13-Stn1-Ten1) 複合体はテロメア末端 DNA に結合し、テロメアの複製及び保護に関与する。我々は、CST 複合体の Cdk による細胞周期依存的なリン酸化により、テロメア伸長が負に制御されることを見いだした。また、*stn1* のテロメア保護機能の欠損変異株では、組換え因子、テロメラーゼの両者に依存したテロメア恒常性異常が生じることを見いだした。一方、テロメア短縮条件で誘導される細胞老化において、DNA 損傷シグナルの他に通常栄養飢餓状態でのみ誘導されるオートファジーが誘導されることを見いだした。この誘導には TOR 経路およびテロメア結合タンパク質 Rap1 が関わっており、このことから、テロメラーゼ欠損によりテロメアタンパク質の発現量が低下し、これが引き金となって栄養応答シグナルの活性が変化する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：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 telomere replication and protection. Stn1 was phosphorylated by Cdk during specific times during the cell cycle, and the phosphorylation regulated telomere elongation negatively. In addition, we found that an *stn1* mutant defective in its protective function resulted in telomere elongation via the recombination- and telomerase-dependent mechanisms. Moreover, we found that telomere shortening-mediated cellular senescence induced autophagy by regulating the TOR-signaling pathway and the telomere-binding protein Rap1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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、テロメア、細胞周期、チェックポイント、シグナル伝達、細胞老化

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。実際、テロメアの短小化により細胞老化を迎えたヒト繊維芽細胞では、テロメアに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、損傷として認識されるようになることを意味する。

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ている。我々は最近、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体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可能性が示唆された。テロメアのもつ末端保護機能と末端複製機能は拮抗関係にあり、過剰な保護機能は不完全な複製によりテロメア短縮表現型を示すこと、また保護機能のhypomorph変異体では、テロメアの過剰伸長が見られることが知られている。したがって、上記の構造変化は、テロメアの機能変換と共役して起きる現象と考えることができる。

生体内ではテロメア長はある一定長に保たれる制御がなされており、極度な短縮や伸長が防止されている。テロメラーゼ依存的なテロメアの伸長反応は細胞周期のS期におきること、またテロメラーゼの作用は*cis*のテロメアの長さによって負に制御されていることが、最近国外の複数のグループにより明らかにされた。我々は出芽酵母のテロメア保護タンパク質 Stn1 が細胞周期依存的にリン酸化されること、またそのリン酸化がATM ファミリーのTel1およびMec1、さらにCDKにも依存していることを見いだしている。このような多重なシグナルにより染色体末端の機能変換が制御され、末端の恒常性が保たれていることが強く示唆されるが、現在までのところその分子機構の詳細は理解されていない。

2. 研究の目的

これまで、出芽酵母をモデルに、細胞周期、特に複製期におけるテロメア機能変換メカニズムについての解析を推進してきた。本研究では、申請者のこれまでの研究を発展的に展開し、テロメア機能制御に関わる分子の側からの解析と、それを制御する細胞周期シグナルからの解析を行うことを目的とした。すなわち、細胞周期におけるテロメア末端複合体動態変化の分子機構を、機能複合体を構成する因子の翻訳後修飾と複合体の集合離散制御という視点から解析し、テロメア恒常性が世代を超えて維持される分子機構に迫る。加えて、テロメア異常を感知して誘導される多様な生理応答反応を解析する。これにより、テロメア異常により誘導される多様な細胞内変化の分子機構の解明を目指した。具体的な研究項目は以下の通りである。

- 1) Stn1の細胞周期依存的リン酸化によるテロメア制御機構
- 2) テロメアにおけるテロメラーゼ依存的テロメア複製経路と相同組換え経路の相互作用
- 3) 過剰短縮テロメアに対する細胞応答機構

3. 研究の方法

出芽酵母のテロメア関連因子の変異株を作成し、テロメア長、細胞増殖能に対する影響を検討した。

Stn1の各種変異の解析には、基本的にはゲノム上のSTN1遺伝子座から変異遺伝子、mycタグ付加遺伝子を発現させて行った。

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。

Stn1 の Cdk によるリン酸化部位をアラニンに置換した変異株を作成し、テロメア長を観察したところ、テロメア長が過剰に伸長していることが観察された。反対に、リン酸化型を模倣するグルタミン酸に置換した株は正常に近いテロメア長を示した。また、アラニン置換変異によるテロメア長過剰伸長はテロメラーゼ依存的であり、野生型 *STN1* に対して劣性の形質であることが示された。Stn1 はテロメア伸長を負に制御していることが知られており、これらの結果から Stn1 の細胞周期依存的なリン酸化によりテロメア伸長の負の制御が行われていることが考えられる。

②テロメラーゼと相同組換えによるテロメア伸長制御

テロメアのもつ末端保護機能により、テロメア間の組換えは抑制されているが、テロメアが短縮した異常な条件においては、組換えが活性化される現象がみられる。また、多細胞生物の発生初期や ES 細胞においても組換え依存的経路が活性化することが知られている。しかしテロメアの組換え依存的維持の分子機構は未だ明らかでない。我々は出芽酵母のテロメアタンパク質をコードする *STN1* の特異的変異を持つ細胞が、過剰なテロメア長を保持して増殖することを見いだした。組換え関連因子の遺伝子破壊との二重変異株を作成して解析した結果、*stn1* 変異株の出現には type I テロメア組換え因子が必要であることが示唆された。しかし組換えはテロメア反復配列のみでおきており、より内側のサブテロメア配列には構造的変化はみられなかった。

さらに詳細にテロメア伸長機構を解析したところ、野生型のテロメア伸長から *stn1* 変異株型へのテロメア伸長への切り替えの時期には組換え因子が必要であるものの、テロメアが伸長した後のテロメア維持にはテロメラーゼが関わっていることが明らかになった。このことから、*stn1* 変異株では末端保護機能の低下が起こることで組換えが起

こりやすくなり、その結果テロメアにおいてクロマチン状態の変化が誘導され、テロメラーゼによるテロメアの過剰伸長が引き起こされる、というモデルを提唱した。

③テロメア短縮への応答機構

テロメア短縮条件で誘導される細胞老化状態では、テロメア末端からの DNA 損傷シグナルの他に付随的な経路が活性化していることが示唆されている。我々は、老化している細胞において、通常栄養飢餓状態でのみ誘導されるオートファジーが誘導されることを見いだした。オートファジーを誘導するシグナルには TOR 経路およびテロメア結合タンパク質 Rap1 が関わっていることが示唆された。このことから、テロメラーゼ欠損によりテロメアタンパク質の発現量が低下し、これが引き金となって栄養応答シグナルの活性が変化する可能性が示された。さらに、テロメア短縮細胞の生存率を低下させる因子をゲノムワイド探索した結果、4 個の候補遺伝子を単離することに成功した。解析の結果、ミトコンドリア機能が老化細胞の生存に関与している可能性が示唆された。

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 7 件)

Matsui, A., Kamada, Y., and Matsuura, A. (2013) The role of autophagy in genome stability through suppression of abnormal mitosis under starvation. *PLOS Genetics*, **9**: e1003245

Sun, K., Cao, S., Pei, L., Matsuura, A., Xiang, L., and Qi, J. (2013) A steroidal saponin from *Ophiopogon japonicus* extends the lifespan of yeast via SOD and *UTH1*. *Int. J. Mol. Sci.*, **14**: 4461-4475

Sun, K., Xiang, L., Ishihara, S., Matsuura, A., Sakagami, Y., and Qi, J. (2012) Anti-aging effects of hesperidin on *Saccharomyces cerevisiae* via inhibition of reactive oxygen species and *UTH1* gene expression. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**: 640-645

Weng, Y., Lu, J., Xiang, L., Matsuura, A., Zhang, Y., Huang, Q., and Qi, J. (2011) Ganodermasides C and D, two new anti-aging ergosterols from the spores of a medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**: 800-803

Xiang, L., Nakamura, Y., Lim, Y.M., Yamasaki,

Y., Kurokawa-Nose, Y., Maruyama, W., Osawa, T., Matsuura, A., Motoyama, N., and Tsuda, L. (2011) Tetrahydrocurcumin extends life span and inhibits the oxidative stress response by regulating the FOXO forkhead transcription factor. *Aging* **3**: 1098-1109

Matsui, A. and Matsuura, A. (2010) Cell size regulation during telomere-directed senescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**: 195-198

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

[学会発表] (計 15 件)

松井愛子、鎌田芳彰、松浦 彰 The role of TORC1 in autophagy-dependent cell cycle progression during nutrient starvation. 第 35 回日本分子生物学会年会、ワークショップ「オートファジーによる分解の諸相」、福岡、2012 年 12 月

Aiko Matsui, Yoshiaki Kamada, and Akira Matsuura The mechanism of autophagy-dependent cell cycle progression and its role in genome stability under nutrient starvation. 8th 3R Symposium, Awaji, November 2012

松井愛子、鎌田芳彰、松浦 彰 オートファジー依存的な細胞周期進行機構とそのゲノム安定性への関与 酵母遺伝学フォーラム第 4 5 回大会、京都、2012 年 9 月

Kazuki Ochiai, Takuya Tominaga, and Akira Matsuura Analysis on molecular mechanism of cellular senescence induced by expression of a mutant lamin A protein, progerin. Joint meeting of the 45th annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists and the 64th annual meeting of the Japanese Society for Cell Biology、神戸、2012 年 5 月

松井愛子、鎌田芳彰、松浦 彰 Autophagy regulates cell cycle progression under nitrogen starvation in budding yeast. 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、2011 年 12 月

酒井裕介、松浦 彰 Suppression of telomerase by CST complex is required for recombination-mediated telomere elongation.

第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、2011 年 12 月

松浦 彰 酵母が増えるとき、増えないとき～細胞の成長と分裂を調整するメカニズム 酵母細胞研究会 1 8 1 回例会、横浜、2011 年 12 月

松井愛子、鎌田芳彰、松浦 彰 栄養飢餓条件下での細胞周期進行におけるオートファジーの役割 酵母遺伝学フォーラム第 44 回大会、福岡、2011 年 9 月

Akira Matsuura and Takuya Tominaga Analysis of cellular response to lamin A abnormality using a mutant lamin A induction system. International Symposium on Physicochemical Field for Genetic Activities, Awaji, January 2011

Akira Matsuura Control of cell size in response to genome instability and altered ploidy. BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会)、Symposium “What happens when genome component(s) are overlapped?”, 神戸、2010 年 12 月

富永卓弥、松浦 彰 核構造異常に伴う細胞老化機構の解析: Hutchinson-Gilford 早期老化症をモデルとして 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、神戸、2010 年 12 月

松井愛子、富永卓弥、松浦 彰 テロメア機能欠損によって誘導される多様な細胞応答 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、ワークショップ「テロメア研究の最前線-様々な生命現象との接点の解明-」、神戸、2010 年 12 月

松井愛子、松浦 彰 テロメア短縮により誘導される細胞応答の分子機構の解析 酵母遺伝学フォーラム第 43 回大会、奈良、2010 年 9 月

松浦 彰 細胞の生死とテロメア恒常性—出芽酵母を用いた解析 第 19 回酵母合同シンポジウム「イノベーションを推進する酵母研究」、東京、2010 年 6 月

松井愛子、松浦 彰 Mechanism of cell expansion during telomere-driven senescence in *Saccharomyces cerevisiae*. 第 62 回細胞生物学会大会、大阪、2010 年 5 月

〔図書〕（計2件）

Akira Matsuura and Aiko Matsui. (2011) Control of telomere DNA replication: genetics, molecular biology, and physiology. DNA Replication; Current Advances, pp.305-322, Intech.

松浦 彰 (2010) 生物学辞典 古典遺伝学に関する項目を執筆 東京化学同人

〔その他〕

ホームページ等

<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