

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：33101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870849

研究課題名(和文) 増殖停止細胞のテロメア維持機構の解析

研究課題名(英文) Telomere maintenance in quiescent cells

研究代表者

山崎 晴丈 (Yamazaki, Harutake)

新潟薬科大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：20456776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：窒素源枯渇で誘導された分裂酵母G0期細胞のテロメアDNA長は、窒素源枯渇後20日までは増殖細胞と同程度に維持されていた。窒素源枯渇後1日目のシェルタリン構成因子のテロメア局在を検討したところ、Pot1, Tpz1, Taz1の局在量に変化はなかったが、Rap1, Poz1, Ccq1のテロメア結合量は、増殖細胞に比べG0細胞で増加していた。このことからG0細胞では増殖細胞よりテロメアは凝縮している可能性が考えられた。しかしG0期特異的にシェルタリン構成因子をシャットオフしても生存率に影響はなかったことから、シェルタリン構成因子はG0期のテロメアDNAの維持に必須ではないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The length of telomere DNA of G0 cells of *Schizosaccharomyces pombe* induced by nitrogen starvation was same as that of logarithmically growing cells. Next, we investigated the amount of the six components of shelterin complex at telomere at G0 cells. The telomere localization of Pot1, Tpz1, and Taz1 of G0 cells was same as that of growing cells. On the other hand, the telomere localization of Rap1, Poz1, and Ccq1 of G0 cells was increased compared to that of growing cells, suggesting that telomere of G0 cells is highly condensed. To evaluate the biological significance of telomere condensation of G0 cells, we constructed a system in which a target protein is specifically eliminated in G0 cells. The viability and telomere DNA length was not affected when each shelterin component was eliminated in G0 cells by using this system. These results suggest that shelterin is not essential for telomere maintenance in G0 cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：テロメア ゲノム チェックポイント 分裂酵母 G0細胞

1. 研究開始当初の背景

真核生物は線状染色体を有しているため、環状染色体を持つ原核生物にはない2つの問題に直面する。1つは、染色体複製に際して通常のDNAポリメラーゼだけでは完全な末端の複製を行うことが出来ない、いわゆる末端複製問題である。2つ目として、染色体二本鎖切断により損傷末端が生じた場合に備えて、細胞はそれを感知・修復する機構を備えているが、正常末端もその機構により感知されて、DNA損傷チェックポイントの活性化や染色体末端融合を引き起こしてしまう可能性が考えられる。線状染色体を持つ真核生物は、染色体末端にテロメアと呼ばれるDNA・RNA・蛋白質複合体を有することで、これらの問題を回避する機構を得たと考えられている。テロメア維持に中心的な役割を果たす蛋白質複合体(シェルタリン)が、テロメアDNA合成の逆転写酵素テロメラーズの制御を行うと同時に、DNA損傷応答機構からの感知を防いでいる。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のテロメア維持機構はほ乳類と異なる部分が多いが、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* とほ乳類のテロメア結合蛋白質の相同性が非常に高いこと(図1)から、同じようなモデル酵母の中でも、分裂酵母でのテロメア研究はほ乳類のテロメア機構の解明に直結すると考えられる(図1)。

これまでのテロメア研究は増殖する細胞を対象に精力的に行われてきた。しかしヒトをはじめ、多細胞生物を構成する細胞のほとんどは分化後に分裂(増殖)しない状態で機能している。また、野生の酵母自身も生涯のほとんどを栄養飢餓のため増殖できない状態で生存し続ける。そのような細胞ではテロメアを保護する必要がないという可能性もあるが、近年になり窒素源枯渇によって増殖が停止した細胞でも、DNA損傷修復機構を含め、各種代謝が活発に行われていることが複数報告されていることから、増殖停止細胞でもテロメアは何らかの形で保護されている必要があると考えられる。

2. 研究の目的

遺伝情報が安定的に継承される機構の理解のために、増殖停止細胞でのテロメア維持機構の解明は、増殖細胞のテロメア維持機構の解明と同等に重要だと考えられるが、これまでは焦点が当てられてこなかった。そこで本研究では、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* において窒素源枯渇により増殖を停止したG0細胞でのテロメアの維持機構を明らかにすることを目的とした。分裂酵母の窒素源枯渇状態が、必ずしもヒト分化細胞(長期に増殖しない細胞)の状態に当てはまるとは限らない。しかし増殖細胞におけるテロメア維持に関する因子・機構が、分裂酵母とヒトでは高度に保存されていることから、本研究はヒト分化細胞でのテロメア維持機構の

理解に繋がることも期待された。

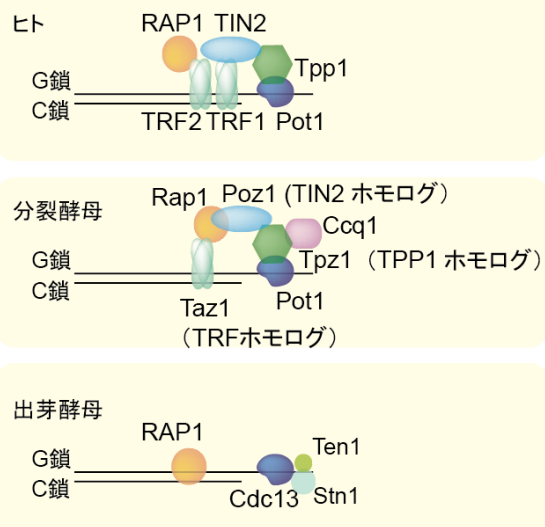


図1 酵母とヒトのテロメア構造とシェルタリン

テロメアDNAは、3'末端方向へ向かうグアニンを多く含むG鎖と、その相補鎖であるC鎖で構成される。G鎖は末端が一本鎖となっており、Gテイルと呼ばれる。このように分裂酵母とヒトでは、テロメア結合蛋白質シェルタリンが高度に保存され、一本鎖と二本鎖DNAに渡りブリッジ構造を取る。一方、出芽酵母にはシェルタリン相当因子はRap1しか存在せず、ブリッジ構造も取らないと考えられている。

3. 研究の方法

分裂酵母 *S. pombe* は培地から窒素源を枯渇させると、G0期に移行し、長期にわたり生存可能であることが知られている(J Cell Sci. 1996)。そこで増殖停止細胞としてG0期の分裂酵母を用い、テロメア長の経時変化、テロメア結合蛋白質(シェルタリン構成因子)の発現量、テロメア結合量について検討した。また増殖停止細胞でのテロメア研究が進展しなかった理由として、その時期にのみテロメア維持・保護機構を欠損させる系が採用されてこなかったことが挙げられる。従来製の製法で遺伝子破壊株を得て、細胞増殖が停止した細胞に持ち込み解析をするまでに、早くとも必ず数十サイクルの細胞周期をまわす必要がある。結果として増殖細胞のテロメア維持機構の破綻の影響を大きく受けるため、増殖停止期特異的なテロメア維持機構の解明はできなかった。本研究では、薬剤を添加によって転写レベルでは発現量を抑え、蛋白質レベルでは分解を促進して、シェルタリン因子を細胞からシャットオフする系を構築することにより、この問題を解決した。具体的には、目的蛋白質をコードする遺伝子の上位に「Tet-OFFシステム」を導入することで、転写レベルで発現を抑制する系を導入した。また「オーキシン誘導性デグロンシステム」は、ユビキチン-プロテアソーム機構によって認識・分解されるデグロン配列を標的蛋白質に融合させ、オーキシンを培地に添加したと

きにのみ標的蛋白質が分解されるシステムである。このシステムを Tet-OFF システムと融合させ、増殖停止期のテロメア維持について、既知のテロメア関連蛋白質の欠損の影響をその時期特異的に調べることが出来る株を構築した。これを用いて G0 期特異的に目的蛋白質をシャットオフすることで、G0 期におけるシェルタリンの機能の検討を行った。

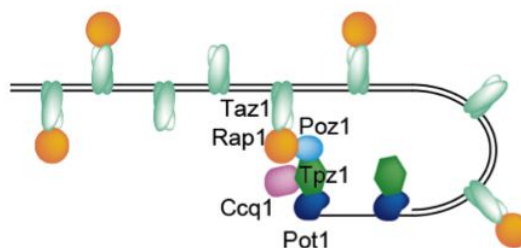
4. 研究成果

まず G0 期で長期に培養した際、テロメア DNA の長さについて検討したところ、窒素源枯渇から 8 日、もしくは 20 日が経過しても、対数増殖期の細胞とテロメア長に違いはなかった。

次に窒素源枯渇後 1 日目のシェルタリン構成因子 (Pot1, Tpz1, Taz1, Rap1, Poz1, Ccq1) について mRNA 量を検討したところ、すべての因子において、対数増殖期に比べ G0 期の方が mRNA 量が多かった。次にこれらの因子に Flag タグを付加した融合蛋白質を発現する細胞を用いて、抗 Flag 抗体を用いてウェスタン解析を行ったところ、少なくとも Rap1, Poz1, Tpz1, Ccq1 では、対数増殖期と G0 期で蛋白質量に変化がないことが明らかとなった。次にこれらシェルタリン構成因子のテロメア局在をクロマチン免疫沈降法 (ChIP) を用いて解析した。その結果、テロメアに直接結合する Pot1-Tpz1 複合体や Taz1 のテロメア結合量は、対数増殖期と G0 期で変化がなかったが、Pot1-Tpz1 と Taz1 の架け橋となる Rap1, Poz1, Ccq1 のテロメア結合量は対数増殖期に比べ G0 期で増加していた。このことから G0 細胞では増殖細胞よりテロメアが凝縮して存在している可能性が考えられた (図 2)。

次にシェルタリン構成因子を細胞からシャットオフする系を構築した。シェルタリン構成因子をコードする遺伝子のプロモーターを *tetO* 配列に置換し、さらにドキシサイクリン (DOX) を添加すると *tetO* に結合することが知られている TetR' と転写抑制因子の Tup11 の融合蛋白質を発現させ、DOX を添加したときに当該遺伝子の転写が抑制される系を構築した。この際、*tetO* 配列を連続して 2 つ挿入した場合には、転写の抑制効果が 1/2 程度であったが、7 つ挿入した場合には 1/30~1/90 にまで転写量を減らすことに成功した。また同時に当該蛋白質に AID (Auxin-inducible degron) 配列を付加した融合蛋白質を野生型の代わりに発現させた。この際、親株には AID 融合蛋白質をオーキシン (NAA) を添加した時に効率的にユビキチン-プロテアソーム機構によって分解できる株を導入した (BMC Cell Biology 2011 12:8)。また *tetO* 配列や TetR' 配列は共同研究先から分与されたものを使用した (Yeast 2015 32:8)。その結果、DOX と NAA を添加した際に、効率的に蛋白質が分解されていることを確認した。この系を用いて G0 期に誘導した後、

栄養増殖



G0

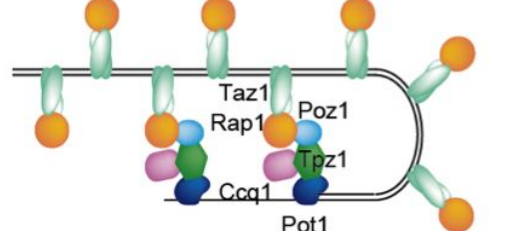


図 2 増殖細胞と G0 細胞でのテロメア構造
シェルタリン因子の中で、Pot1-Tpz1 複合体はテロメア一本鎖 DNA である G-テイル部分に結合し、Taz1 はテロメア二本鎖繰り返し部分に結合している。その両者を Poz1, Rap1 が仲介することで、テロメアは一本鎖 DNA 部分と二本鎖 DNA 部分が閉じた構造をとることができる。Ccq1 は Tpz1 に結合している。栄養増殖細胞に比べ G0 細胞では Ccq1, Poz1, Rap1 のテロメア局在が増えることにより、よりコンパクトなテロメア構造をとっている可能性がある。

DOX と NAA を添加することで G0 期特異的にシェルタリン構成蛋白質をシャットオフして 1 日培養後、窒素源含有培地でスポットアッセイを行うことにより G0 細胞の生菌率について検討したが、薬剤の有無で生菌率に変化はなかった。また同様の実験でテロメア DNA 長についても検討したが、薬剤の有無で変化はなかった。以上のことからシェルタリン構成因子は G0 期のテロメア DNA の維持に必須ではないことが示唆された。

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 1 件)

山崎晴文, 石川冬木. 2014. DNA 損傷認識機構を巧みに利用したテロメア維持戦略. 生化学査読無, 79:812-816

〔学会発表〕(計 1 件)

丸山雅也, 山崎晴文, 高久洋暁 「分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* のテロメア維持におけるシェルタリンの機能解析」ソイルエンジニアリングシンポジウム in 長岡, 2015 年 12 月 17 日, 新潟県長岡市, 長岡グランドホテル

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nupals.ac.jp/~oubi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 晴丈 (YAMAZAKI HARUTAKE)

新潟薬科大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：20456776

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし