

受賞者

加納 純子

京都大学・大学院生命科学研究科・細胞周期学分野

研究テーマ

テロメア結合タンパク質のM期染色体分離における役割の解明

1. はじめに

真核生物の線状染色体の末端には、テロメアとよばれる構造体が存在している。テロメアは、特殊な繰り返し配列からなるテロメアDNAとそれに結合する様々なタンパク質群からなり、染色体末端の保護、テロメラーゼ（テロメアDNA伸長酵素）によるテロメアDNA伸長、正常な減数分裂などに必要とされる重要な機能領域である。従って、テロメア機能の異常は、がん、細胞死、不妊、異常な老化などを引き起こすと考えられている。

一方、細胞周期の細胞分裂期（M期）における姉妹染色分体の正確な分配は、細胞増殖の安定性に必須である。この分配に何らかの異常があると、遺伝情報の大量欠失あるいは重複を招き、染色体数に異常のある異数体細胞を生み出す。多くの異数体細胞は死に至るが、一部の細胞はそのまま無限に増殖し、ガン化することもある。これまで、M期におけるセントロメア領域の機能については詳しく解析されてきた。しかし、テロメアのM期における機能に関しては、ほとんど明らかにされていない。本研究においては、生命維持に必須である正確な染色体分離が、テロメア結合タンパク質群によっても精巧に制御されていることを想定し、それらの機能を分子レベルで解明することを目的とした。本研究の成果は、癌、細胞死といった病態の治療の発展につながることで大いに期待される。

2. 方法

本研究では、真核生物の優れたモデル生物である分裂酵母を用いて、テロメアのM期における機能の解析を行った。Rap1タンパク質は真核生物において広く保存されたタンパク質であり、分裂酵母ではテロメアDNAに直接結合するTaz1タンパク質を介してテロメアに局在し、様々なテロメア機能に重要な役割を果たすことが明らかにされている（Kanoh et al., 2001, Chikashige et al., 2001, Kanoh et al., 2005, Chikashige et al., 2006, Miyoshi et al., 2008）。これまでの研究より、Rap1は機能ごとに結合パートナーを変化させることが明らかになりつつある。そこで、Rap1タンパク質のM期における制御機構について重点的に解析を行った。

3. 結果

同調細胞を用いて、細胞周期におけるRap1タンパク質の変化をウエスタン解析したところ、M期特異的なバンドシフトが観察された。フォスファターゼ処理によって、その修飾はリン酸化であることがわかった。M期に活性化されるCdc2 kinaseによってリン酸化される可能性を検討するため、in vitro kinase assayを行ったところ、Rap1は複数箇所においてCdc2によってリン酸化されることが明らかになった。それらのリン酸化部位アミノ酸をすべてアラニンに変換した株を作製してウエスタン解析を行ったところ、M期におけるバンドシフトは部分的にしか消えなかった。このことから、Cdc2によるもの以外のリン酸化部位が存在していることが示唆された。そこで、M期に同調した細胞から

Rap1を免疫沈降し、質量分析によってリン酸化部位を検索した。その結果、Cdc2によるリン酸化部位以外のリン酸化候補部位が複数同定された。それらをアラニンに変換した株を作製してウエスタン解析を行ったところ、一つについてはM期特異的なリン酸化部位であることが明らかになった。現在、これら以外のリン酸化部位について、さらに解析を進めている。これまでに同定されたリン酸化修飾部位を認識する抗体を作製し、Rap1タンパク質のウエスタン解析を行ったところ、いくつかの部位は *in vivo* でM期特異的にリン酸化されることが明らかになった。また、Rap1の高度にリン酸化される領域は、Rap1と相互作用するタンパク質が結合する領域とほぼ一致することが明らかになった。さらに、Rap1の細胞内局在を顕微鏡観察によって解析したところ、普段は核膜付近に局在しているRap1がM期においては核膜から離れる可能性が示唆された。

4. まとめ

テロメア結合タンパク質Rap1は、細胞周期のM期特異的にCdc2などのリン酸化酵素によってリン酸化修飾を受けることがわかった。高度にリン酸化される領域は、Rap1相互作用因子との結合領域とほぼ一致していた。また、M期特異的に細胞内局在を変化させることも示唆された。以上のことから、Rap1はリン酸化によって相互作用因子との結合状態を変化させ、M期特異的な染色体ダイナミクスに寄与している可能性が考えられた。現在、Rap1をリン酸化するすべてのリン酸化酵素の同定、リン酸化の生理学的意義について、さらに詳しく解析を行っている。

5. 参考文献

Miyoshi, T., Kanoh, J., Saito, M. and Ishikawa, F. Fission yeast Pot1-Tpp1 protects telomeres and regulates telomere length. *Science*, 320, 1341-1344 (2008).