

平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書

◆記入に当たっては、「平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書記入要領」を参照してください。

ローマ字		ISHIKAWA FUYUKI					
①研究代表者氏名		石川 冬木			②所属研究機関・部局・職		京都大学・大学院生命科学研究科・教授
③研究課題名	和文	テロメア維持機構の分子生物学的解明					
	英文	Molecular Biology of Telomere Maintenance					
④研究経費 金額単位：千円	平成13年度	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	総合計	
	18,800	19,000	19,000	19,000	19,000	94,800	
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者） *平成18年3月31日現在							
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）				
石川 冬木	京都大学・ 大学院生命科学研究科・教授	分子生物学	分裂酵母と脊椎動物を用いた生化学的解析 および全体のまとめ				
加納 純子	京都大学・ 大学院生命科学研究科・助手	分子生物学	分裂酵母を用いた遺伝学的解析				
鍋谷 彰	京都大学・ 大学院生命科学研究科・助手	分子生物学	脊椎動物を用いた生化学的解析				
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>本研究では、テロメアの維持機構を分子レベルで解析することを目的とする。テロメアは、多数種の分子から構成される複雑な複合体である。そのような構造体を理解するためには、複数のモデル生物を用いて異なる角度から解析を行い、その結果を総合させる必要がある。また、テロメアのように基本的な構造体の維持機構は、種を越えて保存されている場合が多いので、一つのモデル生物で得られた結果は、他の生物でも成立することが十分に期待され、複数のモデル生物のそれぞれの利点を生かすことで、研究が相乗的に展開しうる。そこで、本研究では、最も単純で遺伝学的な解析が可能かつヒトと類似点の多い分裂酵母を一つのモデル生物とする。一方、生化学的な解析が容易なほ乳類および <i>Xenopus</i> を第二のモデル系として解析する。このような研究によってテロメアの分子維持機構の理解を深めると共に、次に、どのような局面でテロメア機能に確率論的な多様性が生まれるかを明らかにする。そうして得られた知見の一部は、細胞のがん化や老化に関して有用な情報を与え、その治療法を考える際に役立つものと期待される。</p>							

⑦ 研究成果の概要 (研究目的に対する研究成果を必要に応じて図表等を用いながら、簡潔に記入してください。)

1) 分裂酵母を用いたテロメア研究

本研究開始時には、分裂酵母 2 本鎖テロメア DNA 結合蛋白質として Taz1 が、1 本鎖結合蛋白質として Pot1 が知られていたが、本研究により、Taz1 結合蛋白質として Rap1 および Rif1 を (文献 5)、Pot1 結合蛋白質として Ccq1 および Poz1 を同定した (未発表) (図 1)。特に、Rap1 はテロメア長、減数分裂前期におけるテロメアの核内再配置、テロメアヘテロクロマチン形成に重要な役割を果たす。Poz1 と Ccq1 はともにテロメア長およびテロメアヘテロクロマチン形成に関わる。一般に、テロメアのような染色体機能ドメインは、テロメア繰り返し配列のようなシス配列とそれを認識する Taz1 のような結合蛋白質が複合体を作り、蛋白質間相互作用によりさらに大きな複合体形成をすることで形作られるものと信じられている。しかし、我々は分裂酵母染色体が環状化してテロメア配列を失う過程で、少なくとも一部のテロメア機能が維持されることを見いだした (文献 16)。このことは、シス配列が失われても機能を維持するエピジェネティックな機構の存在を示唆している。さらに、そのようなテロメア配列非依存的なテロメア維持機構の可能性のひとつとして、RNA を介した機構を同定した (文献 23)。

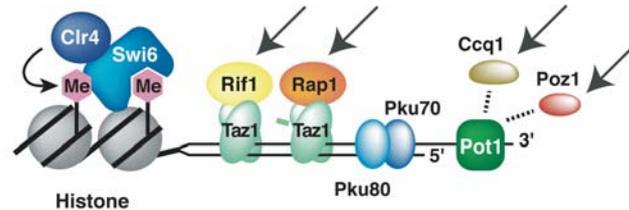


図 1 : 分裂酵母のテロメア分子構造、矢印は本研究であらたに同定された新規因子

(2) Xenopus 卵抽出液を用いたテロメア研究

最近までテロメアは細胞周期にわたってその構造を変えることのない静的な構造物であると信じられてきた。我々は、カエル卵抽出液中でのテロメア構造の細胞周期にわたる変化を観察する系を確立し、テロメア結合蛋白質 TRF1 が M 期テロメアクロマチンには結合するものの、S 期クロマチンから解離すること、TRF2 は細胞周期を通じて結合していること、テロメラーゼは TRF1 と反対に S 期クロマチンに結合することを見いだした (文献 25、図 2)。このような細胞周期にわたる動的なテロメアクロマチン構造の変化が明らかとなったのは本研究が初めてである。

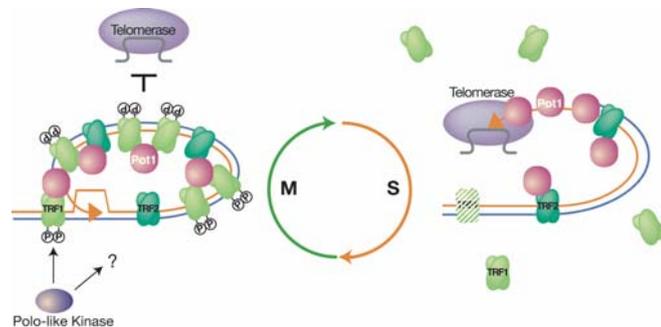


図 2 : カエル卵抽出液中におけるテロメア構造の細胞周期依存的な動的変化

(3) ほ乳類細胞を用いたテロメア研究

SV40 試験管内複製系は、DNA 複製の基本反応の解明に貢献した歴史をもつ。本研究では、この系をテロメア複製という座位特異的な複製反応の解析に応用した。まず、SV40 線状 DNA を試験管内複製させる系を確立し、従来細胞内で観察されていたのみであった末端複製問題の試験管内再構成に成功した (文献 3)。次に、本系を用いてテロメア DNA 自身が複製反応のよい基質ではないこと、TRF1、TRF2 と結合したテロメアクロマチンはさらに複製が困難で、フォーク停止が高頻度で起こることを見いだした (文献 20)。このことを細胞内で観察するために、DNA 合成酵素 α の温度感受性突然変異をもつマウス細胞 tsFT20 を用いて同酵素の機能を低下させたところ、テロメア機能構造の変化とテロメア機能喪失に基づくと思われる特徴的な染色体異常が起こることが分かった (文献 24)。以上のことから、テロメアはゲノム内でも最も複製が困難な「アキレス腱」に相当することが示唆された。

⑧特記事項 (この研究において得られた独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、当該研究分野及び関連研究分野への影響等、特記すべき事項があれば記入してください。)

(1) 複数のモデル生物を用いたメタ生物学の有用性

本研究を遂行する過程で明らかとなったことは、染色体機能のように真核生物を通して保存されている生命現象の解明には、1 研究室内で複数のモデル生物を同時に並行して取り扱い、それぞれのモデル生物の特徴を生かした研究を相互補完的に行うことで、スピーディーな研究の進展を期待できることである。近年の質量分析を初めとする技術の飛躍的進展により、蛋白質複合体の構成成分の同定は、ほ乳類細胞のみならず従来生化学的解析が困難と言われていた酵母においても格段に容易になった。しかし、生化学的に得られた候補因子が本当に当該現象に関わるかどうかを検証するには多くの場合時間を要する。そこで、ある蛋白質と結合する因子の候補を生化学的に酵母とほ乳類生物で平行して同定し、まず、遺伝学的解析が容易な酵母を用いて遺伝子破壊株を解析することで候補蛋白質の当否を明らかにする。その後、当該蛋白質のホモログがほ乳類細胞で候補として得られている場合には、それに集中して研究を進める。このような経緯で明らかにされた新規テロメア因子が本研究では複数存在する。

(2) 高次構造体のロバストネス

テロメアを初めとする染色体機能ドメインは、シス DNA とそれに特異的あるいは非特異的に結合する蛋白質、さらにそれらの蛋白質によってリクルートされる蛋白質からなる巨大複合体である。これらの構成因子の相互作用では多価結合に基づく協調的結合を示す場合が多いため、たとえある因子の不足、欠失が一時的に起きても複合体が安定に維持されうる可能性は古くより指摘されていた。このことは、生命の継承維持に必須な染色体機能の安定性(ロバストネス)に貢献するものと考えられる。本研究で明らかになったエピジェネティックな機構によるテロメアシス配列喪失時のテロメア機能維持は、このような予想を実験的に証明したものとして大きな意義をもつ。テロメラーゼ阻害剤は抗がんとして興味を持たれているが、その作用機構としてテロメア配列喪失が想定されている。本研究で示唆されることは、そのような薬剤は、エピジェネティックな維持機構を阻害する薬剤(たとえば、TSA 類似体)を併用することで、より大きな薬効を持つであろうことである。

(3) 複製反応のゲノム内座位特異性

従来、複製反応について、SV40 のような単純化された系、あるいは複製開始などの特定の素過程の研究が主流であり、ゲノム内の特定の座位における複製反応の特徴については議論されることが少なかった。本研究により、ゲノム内においてテロメア領域が特に複製ストレスに脆弱であり、染色体異常の原因となりうることが明らかにされた。がん細胞はその増殖中に様々な複製ストレスを受けるものと想像される。そのような複製ストレスがテロメアを介した染色体不安定化の原因のひとつとなる可能性がある。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

発表論文

1. Hoque, T., and F. Ishikawa. Human chromatid cohesin component hRad21 is phosphorylated in M phase and associated with metaphase centromeres. **J. Biol. Chem.**, 276:5059-5067 (2001)
2. Ohno, J., Y. Horio, Y. Sekido, Y. Hasegawa, M. Takahashi, J. Nishizawa, H. Saito, F. Ishikawa and K. Shimokata. Telomerase activation and p53 mutations in urethane-induced A/J mouse lung tumor development. **Carcinogenesis**, 22:751-756 (2001)
3. Ohki, R., T. Tsurimoto, and F. Ishikawa. *In vitro* reconstitution of the end-replication problem. **Mol. Cell. Biol.**, 21:5753-5766 (2001)
4. Kuramoto, M., K. Ohsumi., T. Kishimoto, and F. Ishikawa. Identification and analyses of the *Xenopus* TERT gene that encodes the catalytic subunit of telomerase. **Gene**, 277:101-110 (2001)
5. Kanoh, J., and F. Ishikawa. SpRap1 and spRif1, recruited to telomeres by Taz1, are essential for telomere function in fission yeast. **Curr. Biol.**, 11:1624-1630 (2001)
6. Yago, M., R. Ohki, S. Hatakeyama, T. Fujita, and F. Ishikawa. Variant forms of upstream stimulatory factors (USFs) control the promoter activity of *hTERT*, the human gene encoding the catalytic subunit of telomerase. **FEBS Letters**, 520:40-46 (2002)
7. Kanzaki Y, F. Onoue, F. Ishikawa and T. Ide. Telomerase rescues the expression levels of keratinocyte growth factor and insulin-like growth factor-II in senescent human fibroblasts. **Exp. Cell Res.**, 279:321-329 (2002)
8. Saito, M. and F. Ishikawa. The mCpG-binding domain of human MBD3 does not bind to mCpG but interacts with NuRD/Mi2 components HDAC1 and MTA2. **J. Biol. Chem.**, 277: 35434-35439 (2002)
9. Hoque, Md. T. and F. Ishikawa. Cohesin defects lead to premature sister chromatid separation, kinetochore dysfunction and spindle-assembly checkpoint activation. **J. Biol. Chem.**, 277:42306-42314 (2002)
10. Sakai, H., T. Urano, K. Ookata, M.-H. Kim, Y. Hirai, M. Saito, Y. Nojima, and F. Ishikawa. MBD3 and HDAC1, two components of the NuRD complex, are localized at Aurora-A-positive centrosomes in M phase. **J. Biol. Chem.**, 277:48714-48723 (2002)
11. Nakayama, J. and F. Ishikawa. (Review) Stretch PCR assay. **Methods Mol. Biol.**, 191:125-136 (2002)
12. Miyoshi, T., M. Sadaie, J. Kanoh and F. Ishikawa. Telomeric DNA ends are essential for the localization of Ku at telomeres in fission yeast. **J. Biol. Chem.**, 278:1924-1931 (2003)
13. Iwasa, H., J. Han and F. Ishikawa. Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. **Genes to Cells**, 8: 131-144 (2003)
14. Takata, T. and F. Ishikawa. Human Sir2-related protein SIRT1 associates with the bHLH repressors HES1 and HEY2 and is involved in HES1- and HEY2-mediated transcriptional repression. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 301: 250-257 (2003)
15. Kanoh, J., S. Francesconi, A. Collura, V. Schramke, F. Ishikawa, G. Baldacci and V. Geli. The Fission yeast spSet1p is a histone H3-K4 methyltransferase that functions in telomere maintenance and DNA repair in an ATM kinase Rad3-dependent pathway. **J. Mol. Biol.**, 326: 1081-1094 (2003)
- ⑩ 16. Sadaie, M., T. Naito and F. Ishikawa. Stable inheritance of telomere chromatin structure and function in the absence of telomeric repeats. **Genes Dev.**, 17: 2271-2282 (2003)
17. Kanoh, J. and F. Ishikawa. (Review) Composition and conservation of the telomeric complex. **Cell. Mol. Life Sci.**, 60: 2295-2302 (2003)
18. Ishikawa, F. (Review) Cellular senescence, an unpopular yet trustworthy tumor suppressor mechanism. **Cancer Sci.**, 94: 944-947 (2003)
19. Yoshimura, S.H., H. Maruyama, F. Ishikawa, R. Ohki and K. Takeyasu. Molecular mechanisms of DNA end-loop formation by TRF2. *竹安研究室との共同研究, **Genes to Cells**, 9:205-218 (2004)
20. Ohki, R. and F. Ishikawa. Telomere-bound TRF1 and TRF2 stall the replication fork at telomeric repeats. **Nucl. Acids Res.**, 32: 1627-1637 (2004)

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

21. Nabetani, A., O. Yokoyama and F. Ishikawa. Localization of hRad9, hHus1, hRad1, and hRad17 and caffeine-sensitive DNA replication at the alternative lengthening of telomeres-associated promyelocytic leukemia body. **J. Biol. Chem.**, 279:25849-25857 (2004)
22. Okumura-Nakanishi, S., M. Saito, H. Niwa and F. Ishikawa. Oct-3/4 and sox2 regulate oct-3/4 gene in embryonic stem cells. **J. Biol. Chem.**, 280:5307-5317 (2005)
- 23. Kanoh, J., M. Sadaie, T. Urano and F. Ishikawa. Telomere-Binding Protein Taz1 Establishes Swi6 Heterochromatin Independently of RNAi at Telomeres. **Curr. Biol.**, 15:1808-1819 (2005)
24. Nakamura, M., A. Nabetani, T. Mizuno, F. Hanaoka and F. Ishikawa. Alterations of DNA and Chromatin Structures at Telomeres, and Genetic Instability in Mouse Cells Defective in DNA Polymerase α . **Mol. Cell. Biol.**, 25:11073-11088 (2005)
- 25. Nishiyama, A., K. Muraki, M. Saito, K. Ohsumi, T. Kishimoto and F. Ishikawa. Cell-cycle-dependent *Xenopus* TRF1 recruitment to telomere chromatin regulated by Polo-like kinase. **EMBO J.**, 25:575-584 (2006)

国際会議・学会での発表状況（抜粋）

1. Rieko Ohki, Toshiki Tsurumoto and Fuyuki Ishikawa: Analysis of the Effect of Telomere Binding Proteins on Telomere Replication Using in Vitro System for Linear DNA Replication. Cold Spring Harbor Meeting: Eukaryotic DNA Replication (NY, U.S.A.) Sep, 2001
2. Fuyuki Ishikawa: Identification of Telomere Reverse Transcriptase in *Xenopus*. VRIA(Virtual Research Institute of Aging) Annual Meeting 2001 (Tokyo) Oct, 2001
3. Fuyuki Ishikawa: Telomere, Stress Responses and anti-tumor effects. International Symposium on Tumor Biology (Kanazawa) March, 2002
4. Robin Allshire, Yuji Chikashige, Julia P. Cooper, Karl Ekwall, Shiv Grewal, Fuyuki Ishikawa, Osami Niwa, Kohta Takahashi, Yoshinori Watanabe: Fission Yeast Telomere Components. The 2nd Internationals Fission Yeast Meeting: POMBE 2002 (Kyoto) March, 2002
5. Fuyuki Ishikawa: Telomerase in *Xenopus*. VRIA(Virtual Research Institute of Aging) Annual Meeting 2002 (Tokyo) Sep, 2002
6. Hiroaki Iwasa and Fuyuki Ishikawa: Mitogen-Activated Protein Kinase P38 Defines The Common Senescence-Signaling Pathway. Cold Spring Harbor Meeting: Molecular Genetics of Aging (NY, U.S.A.) Oct, 2002
7. Fuyuki Ishikawa: Telomere-binding proteins and telomeric DNA replication. The 19th RBC International Symposium: Crisis Control in the Cell Cycle (Kyoto) Nov, 2002
8. Fuyuki Ishikawa: Cellular Stress, Senescence and Anticancer Effects. 18th Bristol-Myers Squibb Nagoya International Cancer Treatment Symposium & Meet the Expert (Nagoya) Nov, 2002
9. Fuyuki Ishikawa: p38MAPK Induces Cellular Senescence in Response to Variety of Cellular Stresses. The 67th Annual Meeting of the Japanese Circulation Society (Fukuoka) March, 2003
10. Atsuya Nishiyama, Rieko Ohki and Fuyuki Ishikawa: XENOPUS TRF1 Associates with Chromatin in a Cell-Cycle Dependent Manner. Cold Spring Harbor Meeting: Telomere and Telomerase (NY, U.S.A.) April, 2003
11. Atsuya Nishiyama, Rieko Ohki and Fuyuki Ishikawa: XENOPUS TRF1 Associates with Chromatin in a Cell-Cycle Dependent Manner. Fifty-Sixth Annual Meeting of The Japan Society for Cell Biology (Otsu) May, 2003
12. Fuyuki Ishikawa: Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signaling pathway. XIX International Congress on Genetics Genomes (Melbourne, Australia) July, 2003
13. Fuyuki Ishikawa: Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signaling pathway. UK-Japan Conference 'Horizons in Aging and Health: New Targets for Therapies' (Newcastle, UK) July, 2003

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

14. Atsuya Nishiyama and Fuyuki Ishikawa: XENOPUS Telomere Binding Factor1(xTRF1) Associates with Chromatin in Cell-Cycle- Dependent Manner. Cold Spring Harbor Meeting: Eukaryotic mRNA Processing (NY, U.S.A.) Nov, 2003
15. Fuyuki Ishikawa: Functional studies on human Sir2. VRIA(Virtual Research Institute of Aging) Annual Meeting 2003 (Kyoto) Sep, 2003
16. Fuyuki Ishikawa: Cellular senescence as a physiological response to stresses. The 76th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society (Yokohama) Oct, 2003
17. Fuyuki Ishikawa: XENOPUS Telomere Binding Factor1(xTRF1) Associates with Chromatin in Cell-Cycle- Dependent Manner. The 4th International 3R Symposium (Awaji, Hyogo) Nov, 2003
18. Fuyuki Ishikawa: Stable inheritance of telomere chromatin structure and function in the absence of telomeric repeats. International Symposium: Genome Stability and Mechanism of Chromosome Segregation (Otsu) Dec, 2003
19. Fuyuki Ishikawa: Dynamic behaviors of telomere chromatin structures during the cell cycle. The 26th Annual Meeting the Molecular Biology Society of Japan (Kobe) Dec, 2003
20. Fuyuki Ishikawa: Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signaling pathway. The 6th Japan- Korea Workshop on Cancer and Aging Research (Tokushima) Feb, 2004
21. Fuyuki Ishikawa: Life and Death at Telomeres. International Workshop for Integrated Yeast Sciences (Naha, Okinawa) March, 2004
22. Fuyuki Ishikawa: Cell cycle-dependent controls of telomeres. 5th UK-Japan Cell Cycle Workshop (Nara) April, 2004
23. Fuyuki Ishikawa: Replication at Telomeres. The 3rd International Fission Yeast Meeting: POMBE 2004 (San Diego, U.S.A.) Aug, 2004
24. Fuyuki Ishikawa: Replication of Telomeric Heterochromatin. The 77th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society (Yokohama) Oct, 2004
25. Fuyuki Ishikawa: Replication of Telomeric Heterochromatin. AACR Conference: The Role of Telomeres and Telomerase in Cancer (San Francisco, U.S.A) Nov, 2004
26. Atsuya Nishiyama and Fuyuki Ishikawa: Dynamic Behaviors of Telomeric Chromatin Structures during Cell Cycle. International Cell Cycle Symposium: Cell Death, Cell Cycling, Cell Senescence (Kisarazu, Chiba) Nov, 2004
27. Fuyuki Ishikawa: Telomeres, the Heels of Achilles in Chromosomes. Kyoto University-Nus International Symposium (The 5th Kyoto University International Symposium): Regulation of cell fate and cell function (Singapore) Jan, 2005
28. Fuyuki Ishikawa: Dynamic Behaviors of Telomeric Chromatin Reconstituted in Xenopus Egg Extracts. Cold Spring Harbor Meeting: Telomere and Telomerase (NY, U.S.A.) April, 2005
29. Junko Kanoh, Mahito Sadaie, Takeshi Urano and Fuyuki Ishikawa: TAZ1 ans RNAi Independently Establish Telomere Heterochromatin. Cold Spring Harbor Meeting: Telomere and Telomerase (NY, U.S.A.) April, 2005
30. Fuyuki Ishikawa: Stress Responses at Telomeres. International Symposium on Ran and Cell Cycle (Awaji, Hyogo) Oct, 2005
31. Fuyuki Ishikawa: Cell-cycle-dependent Modification of Telomere Chromatin Structure. Japan-Taiwan Symposium on Cell Signaling and Gene Expression (Kobe) Nov, 2005
32. Fuyuki Ishikawa: Telomere Functions In DNA Replication And End Protection. Cancer Research in Korea and Japan – the Past and Coming Decade (Tokyo) Dec, 2005
33. Fuyuki Ishikawa: Reproduction Strategies And Configurations Of Genetic Materials. The 52nd NIBB Conference: Reproductive Strategies (Tokyo) Jan, 2006