

## 発がんにおけるテロメア機能 Telomere Functions in Cancer Development

石川 冬木 (ISHIKAWA FUYUKI)

京都大学・大学院生命科学研究所・教授



### 研究の概要

テロメア機能異常による異常染色体形成機構の解明、その発生頻度の測定を行った。テロメレーズがテロメア DNA にリクルートされるために、テロメア蛋白質のリン酸化が重要であることを明らかにした。分裂酵母において、HIRA ヒストンシャペロンが、低容量ストレスに対する抵抗性獲得に重要であることを示した。

研究分野：腫瘍学

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：ゲノム不安定性、テロメア

### 1. 研究開始当初の背景

近年のがんゲノム研究によって、染色体異常が発がん過程に重要な役割を果たしていることが明らかにされたが、染色体異常が形成される分子機構は十分に明らかではない。がん細胞が、生存して増殖しつつ悪性形質を獲得するためには、適度なゲノム不安定性が必要であり、その程度はがん細胞が置かれている環境やその変化速度によると推測されるが、哺乳類細胞の発がん過程で染色体不安定性を定量化する試みはなされていない。

### 2. 研究の目的

染色体テロメアは、生理的なゲノム DNA 末端が DNA 修復や DNA 損傷チェックポイントを活性化することを防ぎ、染色体の安定な維持に必須である。また、種々のテロメア機能異常が発がん過程においてどの程度貢献をするのかを明らかにするためには、染色体不安定性を定量的に測定する技術を確立し、それをマウス発がんモデルに応用して体内における染色体不安定性の意義を解析する必要がある。さらに、がん細胞は、個体内において、その増殖、浸潤、転移過程にわたって様々な環境の変化を経験し、それぞれに応じた適度なゲノム不安定性を能動的に獲得すると推測されるが、そのような分子機構はほとんど知られていない。そこで、本研究では、以下の目的を設定する。

- ①テロメア機能異常による異常染色体形成機構の解明と染色体不安定性に基づくマウス発がんモデルの確立
- ②テロメア機能異常による染色体不安定性の定量的解析技術の開発
- ③個体内におけるがん細胞の生存環境とゲノム不安定性の相関解析

### 3. 研究の方法

テロメア DNA は、グアニンに富んだ短い繰り返し配列と結合する蛋白質によってヘテロクロマチンを形成し、DNA 複製フォークの進行が停止しやすいことが知られている。フォークの進行停止は、DNA 二重鎖切断をもたらす染色体異常の原因となるため、テロメア DNA 複製を保証する仕組みを明らかにする必要がある。既に、我々は、テロメア DNA 複製に必要な新規一本鎖 DNA 結合 Ctc1-Stn1-Ten1 蛋白質複合体 (CST 複合体) を同定しており (*Mol. Cell*, 2009)、本研究では、その染色体複製および安定性における役割を明らかにする。

テロメレーズは、短小化したテロメア DNA 末端を伸長させるのみならず、効率は劣るものの、グアニンに富んだ配列をもつ DNA 末端に新規にテロメア DNA を付加し、異常染色体形成を促進する。テロメレーズがテロメア DNA あるいは非テロメア DNA にリクルートされる分子機構を解明する。

染色体転座などの構造変化を伴う染色体

異常は、Gross Chromosomal Rearrangement (GCR)と呼ばれ、Kolodnerらによって出芽酵母において、その発生頻度を測定する系が開発されてきた。同様の方法によって、哺乳類細胞においてGCR発生頻度を測定する系を開発し、最終的にマウスなどの生体内におけるGCRの発がん過程における役割を定量的に明らかにする。

細胞死をもたらさない低容量ストレスに感受性を示す分裂酵母変異株を取得し、責任遺伝子を同定する。その哺乳類ホモログをノックダウンあるいはノックアウトすることで、外部環境の変化が発がん過程に及ぼす影響を明らかにする。

#### 4. これまでの成果

1) ヒト CST 複合体と物理的相互作用をするヒト蛋白質を免疫沈降・質量分析解析によって、複数同定した。これまでに CST 複合体との関連が知られていない DNA 修復関連因子が同定された(未発表)。ヒト細胞に DNA 損傷を与えることで、CST 複合体がそれらの修復蛋白質と共局在することを示した。CST 複合体は、DNA 複製のみならず、DNA 修復に関与する可能性が示唆された。

2) *Xenopus* CST 複合体を同定し、哺乳類 CST 複合体と同様の一本鎖 DNA 結合能をはじめとする生化学的特性を示すことを明らかにした。抗 *Xenopus* Stn1 抗体を作成し、*Xenopus* 卵抽出液の CST 複合体を不活化した。CST 不活化卵抽出液中で、二本鎖環状プラスミド DNA もしくは一本鎖環状プラスミド DNA を複製させたところ、半保存的複製反応は対照抽出液と同程度に進行したが、新規 RNA プライマー合成を必要とする一本鎖 DNA を鋳型とした DNA 合成が著しく阻害されることを見いだした。CST 複合体は一般的な複製蛋白質ではなく、特殊な状況下でおこる DNA 合成に必要であることが示唆された (*JBC*, 2011)。

3) 分裂酵母において、テロメレーズのテロメアへのリクルートに、テロメア蛋白質 Ccq1 の ATM および ATR によるリン酸化が重要であることを示した (*Genes Dev*, 2012)。

4) Kolodner によって開発された出芽酵母における GCR 発生頻度測定系を哺乳類細胞に応用する前段階として、分裂酵母 GCR 発生頻度測定系を樹立した (未発表)。1 番染色体末端より約 130 kb の領域にマーカー遺伝子を挿入し、その欠失頻度を測定した。野生型細胞では、1 細胞分裂あたり、約  $1 \times 10^{-10}$  回の割合で当該部位を含む GCR が起こることが明らかになった。分裂酵母テロメア蛋白質である Taz1 あるいは Rap1 の欠損株では、その頻度が野生株と比較して数十倍増加したことから、テロメアクロマチン異常が GCR 頻度を有意に増加させることが明らかとな

った。

5) 分裂酵母にランダム突然変異を導入し、熱、浸透圧などの低容量ストレスに特異的に感受性を示す変異株を複数同定した。その一つの責任遺伝子が HIRA ヒストンシャペロン構成因子をコードする *slm9* 遺伝子であることを示した。*slm9* 欠失細胞は、低容量ストレスに特異的に感受性を示し、それは、ストレス反応遺伝子の転写誘導能の低下によるものであることが強く示唆された (*JBC*, 2012)。

#### 5. 今後の計画

これまでの本研究によって、高等真核生物における CST 複合体の機能の全貌を明らかにする手がかりが得られた。すでに、*Ctc1* ノックアウトマウスを作出済みであるので、それをを用いて詳細な生理機能を明らかにし、発がん過程における役割を解析する。分裂酵母において GCR 発生頻度を測定する系が完成したので、同様の系を培養哺乳類細胞やマウス個体で樹立する。HIRA ノックアウトマウスを既に作出済みであるので、哺乳類細胞における HIRA の低容量ストレス反応および発がん過程における役割を明らかにする。

#### 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Chujo, M. Tarumoto, Y. Miyatake, K. Nishida, E., and Ishikawa, F. HIRA, a conserved histone chaperone plays an essential role in low-dose stress response via transcriptional stimulation in fission yeast. *J Biol Chem* 287, 23440-23450, (2012)
2. Yamazaki, H., Tarumoto, Y., and Ishikawa, F. Tel1/ATR phosphorylate the telomere protein Ccq1 to recruit telomerase and elongate telomeres in fission yeast. *Genes Dev* 26, 241-246, (2012)
3. Nakaoka, H., Nishiyama, A., Saito, M., and Ishikawa, F. *Xenopus laevis* Ctc1-Stn1-Ten1 (xCST) complex is involved in priming DNA synthesis on single-stranded DNA template in *Xenopus* egg extract. *J Biol Chem* 287, 619-627, (2011)

ホームページ等

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/fish/>