

令和元年6月11日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15065

研究課題名(和文) TRF2依存性ORCリクルートによるテロメア維持機構の特異的変異体創出による解明

研究課題名(英文) Roles of TRF2-dependent recruitment of ORC in the telomere homeostasis: analysis by generation and characterization of the separation-of-function mutants

研究代表者

吉田 和真 (Yoshida, Kazumasa)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：80715392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト細胞の増殖に必須である染色体末端テロメアは、DNA複製が困難な領域である。本研究では、テロメア結合タンパク質TRF2と複製開始点制御タンパク質ORCの結合様式およびテロメアの安定性維持におけるその意義の解明を目的とし、ORCとの結合能を特異的に欠損したTRF2変異体を作製した。TRF2変異体置換型ヒト培養細胞を解析した結果、ORCとTRF2の結合がテロメアへのORCリクルートおよびテロメア染色体の安定性に重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1) TRF2-ORC結合様式を詳細に解析した結果、ORC結合能を特異的に欠損したTRF2変異体の創出に成功した。2) 変異体の置換型ヒト培養細胞株を樹立することで、テロメアへのORCリクルートを特異的に阻害し、その生理的重要性を厳密に解析した。その結果、TRF2依存性ORCリクルートがテロメア染色体の安定性に寄与することを世界で初めて明らかにした。3) ORCリクルートとテロメア恒常性制御の密接なつながりを示唆したこれらの成果は、ゲノム不安定性を示すがん等の疾患の原因究明および治療法開発の強化につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：Telomeres are essential structures that protect the ends of human chromosomes but are also known as “difficult-to-replicate” regions. In this study, we aimed to clarify the mechanism by which origin recognition complex (ORC) binds to telomeric repeat binding factor 2 (TRF2) and to assess the biological significance of the ORC-TRF2 interaction using a separation-of-function mutant of TRF2. Our study using cells harboring the TRF2 E111A/E112A mutant deficient only in the ORC-binding suggests that TRF2 binding to ORC contributes to the ORC recruitment and chromosomal stability at telomeres.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA複製 テロメア ORC TRF2 染色体安定性 複製ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) テロメアは直鎖状染色体の維持に必須の領域であり、その機能不全は **DNA 損傷**、染色体不安定性、細胞の老化・がん化等を誘導し、種々の疾患の一因となる (**Higa, Fujita, and Yoshida*, Genes, 8: 112, 2017, *corresponding author**)。ヒト細胞では、テロメア結合/保護因子 **TRF1** および **TRF2** を含むシェルタリン複合体が結合し、特殊な高次クロマチン構造テロメアループを形成することによって染色体末端を保護している。テロメア **DNA** の大部分は通常の **DNA** 複製装置によって半保存的に複製されると考えられている。テロメア長の恒常性維持には **DNA** 複製が重要であることが示唆されているが、そのつながりの分子機構は明らかではない。また、テロメアでは **DNA** 複製装置が崩壊しやすく、複製が困難であることも知られている。したがって、細胞増殖に欠かせない末端配列を安定に保持するために、テロメア **DNA** を効率よく複製する仕組みが重要であると予想されるが、テロメアでの **DNA** 複製開始がどのように制御されているのかはほとんど解明されていない。

(2) 真核生物ゲノムの **DNA** 複製は、染色体上の多数の複製開始点から始まる。複製開始の際、まず **ORC1-6** からなる複製開始点制御タンパク質 **ORC** が染色体に結合し、**CDC6** および **Cdt1** と協調して、**MCM2-7** ヘリカーゼ複合体を染色体に装着する。これを **pre-replication complex (pre-RC)** 形成という。**pre-RC** の位置は複製開始制御において重要であるが、ヒト細胞における複製開始点決定機構には未だ一定の見解がなく、**ORC** 結合制御の全貌も明らかではなかった。

(3) 我々は、**TRF2** が **ORC1** を介して **ORC** と直接結合し、テロメアでの **pre-RC** 形成に寄与することを見出していた。他の研究グループの結果と合わせ、**TRF2** 依存性 **ORC** リクルートがテロメアの複製開始制御およびテロメア長恒常性の維持に関わることが示唆されていた。しかし、**TRF2** はテロメアの末端保護にも必須であるため、これまでの **RNAi** 法による発現抑制解析では、その結果が **ORC** リクルートへの直接的影響なのか、あるいはテロメア構造の崩壊による間接的影響なのかを区別できないという大きな問題があった。

2. 研究の目的

本研究では、我々が見いだした **TRF2-ORC** 相互作用に注目し、テロメアの複製開始制御および染色体安定性維持におけるその意義の解明を目的として、以下の3つの課題に取り組んだ。

(1) **TRF2-ORC1** 結合様式の詳細な解析を行い、結合メカニズムを明らかにする。(2) その結合特異的な機能分離型欠損変異体(**ORC**をリクルートできないがテロメア結合/保護能は保持する**TRF2**)を創出する。(3) 同定した変異体をゲノム編集技術によってヒト培養細胞に導入し、**TRF2**を介したテロメアへの**ORC**リクルートの生理的意義を検証する。

3. 研究の方法

(1) **TRF2-ORC1** 結合様式を理解し、またテロメアへの**ORC**リクルートを特異的に抑制するために、**ORC1**との相互作用にのみ欠損がある特異的変異型**TRF2**を探索した。本研究期間の直前に我々は、**TRF2**の**ORC**リクルート活性を細胞内で再構成する系を確立し、生化学的な解析法等と合わせて、**TRF2**の**TRFH (TRF homology)**ドメインの二量体形成が**ORC**リクルートに重要であることを明らかにしていた(**Higa et al., BBA Mol. Cell Res., 1864: 191, 2017**)。さらに、**TRF2**と極めて類似している**TRF1**は**ORC**と結合しないことや、**TRF2**の**TRFH**ドメインの結晶構造情報 (**PDB code: 1H6P**)等に基づき、**ORC1**結合に関わると推定したアミノ酸を置換することで、変異体(候補)を作製した。本研究では、**TRF2**変異体が**ORC**リクルート以外の機能は保持していることが重要になる。そこで、テロメア保護に重要なホモ二量体の形成やシェルタリン因子および他の**TRF2**結合蛋白質(末端維持に関連するヌクレアーゼ等)との結合が妨げられていないことを免疫沈降法等により検証した。

(2) **ORC1**と結合できない特異的**TRF2**変異体のテロメア長恒常性・染色体安定性等への影響を調べるために、**CRISPR/Cas9**ゲノム編集技術を用いてヒト子宮頸癌由来**HeLa**細胞への変異遺伝子の導入ならびに内在性野生型遺伝子の破壊を行い、変異体置換型細胞株を樹立した。得られた細胞において、下記の表現型解析を進めた。①テロメアへの**ORC**結合の解析:**TRF2-ORC1**結合が阻害された細胞株において、**ORC**のテロメア結合が抑制されているかをクロマチン免疫沈降-定量**PCR (ChIP-qPCR)**法により検証した。②テロメア長恒常性への影響解析:**qPCR**法によりテロメア長を解析した。③テロメアの染色体脆弱性への影響:テロメア**DNA**複製の効率低下がテロメアの染色体脆弱性を誘導することが知られている。複製ストレス(複製装置の進行停止や崩壊)時にテロメアの**pre-RC**が予備の複製開始点として重要となる可能性を検討するために、**ORC**結合阻害のテロメア染色体安定性への影響を検討した。変異体置換型細胞株を複製阻害剤ヒドロキシウレア(**HU**)で処理し、微小核(染色体異常のマーカー)の出現頻度を調べた。蛍光顕微鏡観察を行い、核近傍に存在するテロメア**FISH (fluorescence in situ hybridization)**シグナルを含んだ小さな**DNA**塊をテロメア含有微小核とし、これを計数した。また、テロメア染色体損傷について、テロメアへの**53BP1(DNA 損傷マーカー)**の集積を**FISH**と免疫染色による検出系を用いて調べた。

4. 研究成果

(1) TRF2-ORC 相互作用の解析に基づく ORC 結合特異的欠損型 TRF2 変異体の探索:

これまでの我々の知見 (Higa et al., *BBA Mol. Cell Res.* **1864**, 191-201, 2017) 等をふまえて、TRF2 の TRFH ドメイン内で、ORC1 結合への関与が予想される複数のアミノ酸を置換した変異型タンパク質をいくつか作製した。それらの機能解析の結果、ORC リクルート活性を著しく欠損した変異型 TRF2 (E111A/E112A) (以下、EE と呼ぶ)を得ることができた。EE 変異体は、テロメア保護に重要なホモ二量体の形成、シェルタリン因子 Rap1 との結合、および末端維持に関連する他の TRF2 結合蛋白質 (RTEL1 と Apollo) との結合を維持していた。したがって、ORC との相互作用にのみ欠損がある TRF2 変異体を創出できたと考えている。

(2) 遺伝子編集による TRF2 (EE)変異体置換型 HeLa 細胞株の樹立:

TRF2-ORC1 結合のヒト細胞での重要性を明らかにするために、CRISPR-Cas9 システムを利用して、HeLa 細胞において野生型 TRF2 を ORC1 結合能を特異的に欠損した EE 変異体に置き換えた。TRF2 をコードする *TERF2* 遺伝子を標的とする gRNA および Cas9 ヌクレアーゼの発現ベクターと目的の変異配列をもつ編集用一本鎖オリゴ DNA を一過的にトランスフェクションし、変異遺伝子の導入ならびに内在性野生型遺伝子の破壊を行なった。スクリーニングの結果、少なくとも 1 アレルが目的の配列に編集された複数の細胞クローン TRF2 (EE)株を得ることができた(他アレルは Indel)。コントロール細胞株として、同様の編集操作を施したクローン TRF2 (WT)株も作製した(少なくとも 1 アレルが野生型、他は Indel)。

(3) TRF2 (EE)変異体置換型細胞株の表現型解析:

① 樹立した TRF2 (EE)変異体置換型細胞株において、テロメアへの ORC1 結合量が変化しているかどうかを調べた。TRF2 (WT)株および TRF2 (EE)株に Flag-ORC1 発現ベクターをトランスフェクションし、抗 Flag 抗体を用いた ChIP を行い、共沈降したテロメア DNA 量を qPCR 法で解析した。その結果、Flag-ORC1 のテロメア結合量は、TRF2 (WT)株と比較して TRF2 (EE)株において有意に低下していた。したがって、テロメアへの ORC1 結合に TRF2-ORC1 タンパク質間結合が重要であり、TRF2 (EE)株ではテロメアへの ORC 結合量が減少していることが示唆された。② テロメアへの ORC リクルートが阻害された際のテロメア長恒常性への影響を調べるため、上記細胞株のゲノム DNA を精製し、qPCR 法によりテロメア DNA 量を測定した。インターナルコントロールとして *GAPDH* 遺伝子の DNA 量も解析し、補正を行うことでテロメア長を評価した。その結果、TRF2 (WT)株と TRF2 (EE)株の間でテロメア長の違いは認められなかった。③ 我々の仮説では、テロメアに結合した ORC が、テロメアの複製開始点の形成を促進することでテロメアの完全な複製を保証し、染色体安定性に寄与するのではないかと考えている。そこで、染色体不安定性の指標として、上記細胞株においてテロメア配列を含む微小核の出現頻度を解析した。正常時(外因性複製ストレス非誘導時)には TRF2 (WT)株と TRF2 (EE)株の間でテロメア含有微小核の頻度に有意な違いはなかった。一方、複製ストレス誘導剤 HU (0.1 mM)の存在下では、テロメア含有微小核の頻度が TRF2 (WT)株に比べて TRF2 (EE)株において有意に上昇した。また、HU 処理下でのテロメア損傷の指標として TIFs (telomere dysfunction-induced foci)の頻度を 53BP1 の免疫染色により調べたところ、TRF2 (WT)株と比較して TRF2 (EE)株において有意に増加していた。これらの結果は、ORC のテロメア結合が効率的な複製を保証し、テロメアの染色体安定性に寄与しているという仮説に一致する。

(4) TRF2-ORC1 結合を阻害する ORC1 フラグメントの探索 :

TRF2-ORC1 結合様式の理解を深めるために、ORC1 側の TRF2 結合に必要なドメインの決定にも取り組んだ。結合に必要な十分な領域を 186 アミノ酸まで絞り込み、過剰発現により TRF2-ORC1 結合を競合的に阻害できる ORC1 フラグメントを作製した。これがゲノムワイドな複製活性は阻害しないことを、Cdt1 と ORC1 の過剰発現による再複製誘導系を用いて示した。当該フラグメントは、テロメアの ORC 結合を特異的に阻害することが期待できるので、今後、TRF2 変異体による成果を相補することによりテロメア維持機構とその生物学的意義のさらなる解明に貢献できると考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

- (1) Morii, I., Iwabuchi, Y., Mori, S., Suekuni, M., Natsume, T., **Yoshida, K.**, Sugimoto, N., Kanemaki, M. T., Fujita, M. (2019) Inhibiting the MCM8-9 complex selectively sensitizes cancer cells to cisplatin and olaparib, *Cancer Science*, **110**: 1044-1053 査読あり | doi: 10.1111/cas.13941
- (2) Sugimoto, N., Maehara, K., **Yoshida, K.**, Ohkawa, Y., and Fujita, M. (2018) Genome-wide analysis of the spatiotemporal regulation of firing and dormant origins in human cells, *Nucleic Acids Research*, **46**: 6683-6696 査読あり | doi: 10.1093/nar/gky476

〔学会発表〕(計 9 件)

- (1) **吉田 和真**, 石本 理子, 都築 洋太, 松村 友輝, 比嘉 允宣, 松田 侑大, 杉本 のぞみ, 藤田 雅俊, リピート配列における **DNA**-タンパク質複合体がヒト染色体上で誘導する複製ストレス応答の解析, 第 41 回日本分子生物学会年会 (2018)
- (2) 石本 理子, 都築 洋太, 杉本 のぞみ, **吉田 和真**, 藤田 雅俊, ヒト染色体上の“複製が困難な領域”における複製フォーク異常停止によって誘導される **DNA** 損傷応答と染色体異常の **lacO-LacI** システムを利用した解析, 第 41 回日本分子生物学会年会 (2018)
- (3) 比嘉 允宣, 松田 侑大, 杉本 のぞみ, **吉田 和真**, 藤田 雅俊, **TRF2-ORC** 結合およびテロメア内複製開始点の重要性の解析, 第 35 回日本薬学会九州支部大会 (2018)
- (4) 岩淵 有希子, 杉本 のぞみ, **吉田 和真**, 鐘巻 将人, 藤田 雅俊, **Inhibiting the MCM8-9 selectively sensitizes cancer cells to DNA-crosslinking agent and PARP inhibitor**, 第 77 回日本癌学会学術総会 (2018)
- (5) 杉本 のぞみ, 前原 一満, **吉田 和真**, 大川 恭行, 藤田 雅俊, ヒト細胞における **firing** および **dormant origin** の時空間的制御のゲノムワイド解析, 第 40 回日本分子生物学会年会 (2017)
- (6) **吉田 和真**, 都築洋太, 串山辰徳, 石本理子, 杉本 のぞみ, 藤田 雅俊, **lacO-LacI** がヒト染色体において誘導する **DNA** 損傷応答経路の解析, 第 40 回日本分子生物学会年会 (2017)
- (7) 都築洋太, 石本理子, 串山辰徳, 杉本 のぞみ, **吉田 和真**, 藤田 雅俊, ヒト細胞における複製フォークの異常停止に対する **DNA** ダメージ応答機構の **lacO-LacI** システムを利用した解析, 第 40 回日本分子生物学会年会 (2017)
- (8) **吉田 和真**, 都築洋太, 串山辰徳, 石本理子, 杉本 のぞみ, 藤田 雅俊, **lacO-LacI** 結合がヒト染色体において誘導する複製ストレス応答の解析, 第 24 回 **DNA** 複製・組換え・修復ワークショップ (2017)
- (9) 串山辰徳, 都築洋太, 石本理子, 杉本 のぞみ, **吉田 和真**, 藤田 雅俊, ヒト染色体上の **lacO-LacI** 複合体が誘導する **DNA** 損傷応答への **HP1** タンパク質の寄与の解明, 第 34 回日本薬学会九州支部大会 (2017)

〔その他〕

ホームページ:

<http://tansaku.phar.kyushu-u.ac.jp/saito/top.html>

6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。