

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06052

研究課題名(和文) クロマチン制御因子TAF-Iによるヒトテロメアの構造と機能の制御機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of human telomere structure and function by chromatin remodeling factor TAF-I

研究代表者

加藤 広介 (Kato, Kohsuke)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：90466673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：多くのがん細胞では、一般的に染色体末端のテロメアDNAの長さが維持され、それによりがん形質を維持することが知られている。本研究では、クロマチン制御因子TAF-IがテロメアDNAの伸長を触媒するテロメラーゼの酵素サブユニットであるTERT遺伝子のエピジェネティックな発現制御を介して、ヒト細胞のテロメア長の制御に関わることを明らかとした。TERT遺伝子の発現亢進は多くのがん細胞で見られており、またTAF-Iもいくつかのがん細胞で発現亢進が観察されており、本研究結果によりTAF-Iによる細胞がん化の促進機構の一部を明らかに出来たと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の日本において、がんはまだまだ死亡原因の第一位となっている。そのため、細胞のがん化のメカニズムを明らかにし、それに基づいてがんを制圧するための薬剤や医療手法を開発することは非常に重要である。本研究で、研究代表者はクロマチン制御因子TAF-Iにより、細胞のがん化において重要なテロメアDNAが制御されることを新規に明らかにした。TAF-Iは多くのがん細胞でその発現が亢進していることから、TAF-IがテロメアDNAの制御を介して細胞がん化に関わっている可能性があり、将来的ながん治療の新たなターゲットとなり得る可能性を見いだした。

研究成果の概要(英文)：It is known that many cancer cells generally maintain telomeric DNA length at chromosome ends, thereby sustaining cancer traits. In this study, we found that the chromatin regulator TAF-I is involved in the regulation of telomere length in human cells through epigenetic regulation of the TERT gene, an enzymatic subunit of telomerase that catalyzes telomeric DNA elongation. The results of this study may provide a partial picture of the mechanism by which TAF-I promotes cellular oncogenesis.

研究分野：分子生物学

キーワード：がん テロメア 遺伝子発現 クロマチン エピジェネティクス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者らは、これまでにクロマチン制御因子 Template Activating Factor-I (TAF-I)の機能解析を中心に、哺乳類細胞におけるクロマチン構造とそれによる遺伝子の転写制御機構の解析を行ってきた。それにより、TAF-I がクロマチン構造を構成する因子の1つであるリンカーヒストン H1 と DNA の結合を制御する、ヒストン H1 シャペロンとして機能することを明らかにしていた。しかし、TAF-I の生理機能については不明な点が多かった。

(2) TAF-I の細胞内機能について、TAF-I により発現制御を受ける遺伝子の解析からアプローチした。その結果、染色体末端のテロメア DNA の伸長に關する TERT 遺伝子の転写が TAF-I により活性化されることを見いだした。TERT 遺伝子の活性化によるテロメア DNA の伸長は、がん細胞の形質維持に重要であることが知られている。しかし、TAF-I による TERT 遺伝子の発現調節機構や、TAF-I が実際にテロメア DNA 長の制御に關わるかは明らかでなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、TAF-I による TERT 遺伝子の転写を介したテロメア DNA 長の制御機構を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

TERT 遺伝子が高発現状態にあるヒト子宮頸がん由来の HeLa 細胞をモデルとして用いた。TAF-I 遺伝子を標的とする shRNA を恒常的に発現することにより、TAF-I の発現を抑制した HeLa 細胞株を樹立し、TERT 遺伝子の発現への影響や、TERT 遺伝子座のクロマチン構造 (エピジェネティック修飾) への影響などを解析した。また、TAF-I の発現抑制によるテロメア DNA 長への影響や、細胞の増殖での影響を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) TAF-I は TERT 遺伝子の転写活性化に關わる

研究代表者らは、以前にマイクロアレイ解析により、HeLa 細胞で TAF-I の発現を抑制 (KD) することにより TERT mRNA 量が低下することを見いだしていた<sup>1</sup>。しかし、それが転写レベルなのかあるいは転写後の mRNA の安定性によるものかは明らかでなかった。そこで、今回樹立した 2 系統の TAF-I KD HeLa 細胞で TERT 遺伝子の mRNA 量を測定したところ、野生型に比較して 20% 程度にまで減少していた。また、この細胞の抽出液を調製し、TRAP 法により試験管内でテロメラーゼ活性を測定したところ、TAF-I KD 細胞で実際にテロメラーゼ活性が減少していることが分かった。以前の報告より、TERT mRNA 量は転写による制御だけでなく、mRNA 分解速度によっても制御されることが明らかとされていた。そこで、TAF-I KD の TERT mRNA の安定性への影響を調べたところ、野生型と KD 細胞間で差は見られなかった。以上の結果より、TAF-I は TERT 遺伝子の転写活性化に關与することが明らかとなった。

#### (2) TAF-I KD HeLa 細胞ではテロメア DNA の短小化と細胞増殖速度の低下が起る

次に、TAF-I を KD した細胞で、テロメア DNA 長の減少が起っているかを調べた。Telo-FISH 法により相対的なテロメア長を計測したところ、野生型の細胞に比較して TAF-I KD 細胞でテロメア DNA が短小化している様子が観察された (図 1)。以上の結果より、TAF-I は HeLa 細胞において、実際にテロメア DNA 長の制御に關わっていることが明らかとなった。

さらに、細胞の増殖速度への影響についても調べたところ、TAF-I KD 細胞は野生型に比べて細胞の増殖速度が低下する様子が観察された。以上の結果より、HeLa 細胞において、TAF-I はテロメア DNA 長の維持と、それに伴うがん細胞の増殖亢進に關与する可能性が示唆された。

#### (3) TAF-I は TERT 遺伝子の転写開始点近傍の DNA メチル化を介して TERT の転写に關わる

約 90% のヒト由来がん細胞では TERT 遺伝子の発現が亢進してテロメア DNA 長を維持しており、これにより異常な細胞増殖が亢進される。がん細胞で TERT 遺伝子の転写が活性化されるメカニズムとして、Sp1 や Myc などの転写因子の活性化が知られている。さらに、近年転写因子のみならず、DNA メチル化などのエピジェネティック修飾を介した TERT 遺伝子の転写制御も、がん化において重要であることが明らかとされてきている。特に、TERT 遺伝子の上流約 150 bp から 600 bp の領域は、おおくのがん細胞で高い DNA メチル化レベルとなっていることが知られてお

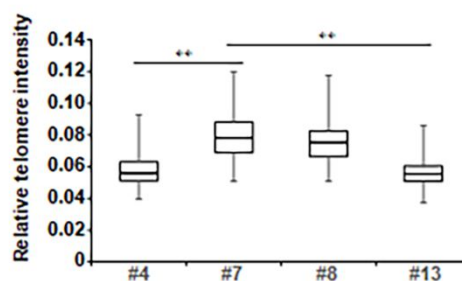


図1: 野生型細胞 (#7と #8) と TAF-I KD 細胞 (#4と #13) のテロメア長の比較

り、その領域は *TERT* hypermethylated oncological region (THOR) と呼ばれている<sup>2</sup>。TAF-I はクロマチン制御因子の1つであることから、TAF-I の *TERT* 遺伝子座の DNA メチル化状態への影響を調べた。*TERT* 遺伝子の転写開始点を中心に、上流 150 bp から下流 150 bp までの DNA のメチル化状態をバイサルファイト法で調べたところ、TAF-I KD 細胞では転写開始点から上流約 50 bp-100 bp の領域を中心に、野生型に比較して DNA メチル化のレベルが顕著に高くなっていることが明らかとなった(図2)。一方、THOR 領域の DNA メチル化レベルに大きな差は見られなかった。次に、実際に TAF-I KD 細胞での DNA メチル化の亢進が *TERT* 遺伝子の転写抑制に関わるかについて、TAF-I KD 細胞を DNA メチル化の阻害剤デシタピンで処理したところ、*TERT* 遺伝子転写開始点近傍の DNA メチル化レベルが低下するとともに、*TERT* 遺伝子の転写量が回復する様子が観察された。以上の結果より、HeLa 細胞において、TAF-I は *TERT* 遺伝子転写開始点近傍の DNA メチル化レベルを低く維持することにより、THOR の DNA メチル化に非依存的に *TERT* 遺伝子の転写活性化に関わる可能性が示唆された。

#### (4) TAF-I は *TERT* 遺伝子プロモーターのヒストン修飾を介して *TERT* 遺伝子の転写に関わる

*TERT* 遺伝子の転写はエピジェネティックな制御を受けるが、DNA メチル化とともに、転写制御に関わるヒストン H3 のアセチル化やメチル化も重要であることが知られている<sup>3</sup>。そこで、野生型 HeLa 細胞と TAF-I KD HeLa 細胞で、クロマチン免疫沈降法 (ChIP 法) により *TERT* 遺伝子転写開始点近傍のヒストン修飾状態を調べた。その結果、TAF-I KD 細胞では、野生型の細胞に比較して、転写活性化に関わるヒストン H3 の K14 アセチル化と K4 トリメチル化のレベルが低下していることが明らかとなった。

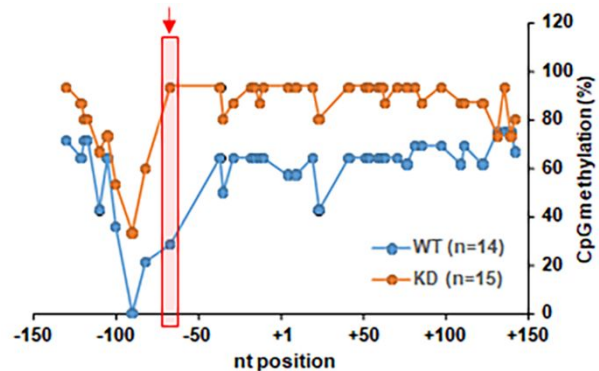


図2: *TERT* 転写開始点近傍の DNA メチル化レベル

また、同時に、TAF-I の KD により、*TERT* 遺伝子プロモーター上の RNA ポリメラーゼ II の結合量と、*TERT* 遺伝子の転写活性化に関わる Sp1 の結合量も低下していた。以上の結果より、TAF-I は *TERT* 遺伝子プロモーターの DNA メチル化とヒストン H3 のアセチル化/メチル化の制御を介して、Sp1 の結合と RNA ポリメラーゼ II のリクルートを促進することが示唆された。

研究当初の背景で先述したとおり、研究代表者らはヒト体細胞において、TAF-I がヒストン H1 シャペロンとしてクロマチン構造制御に関わることを見いだしていた。そこで、*TERT* 遺伝子座のヒストン H1 の結合量に TAF-I が与える影響を ChIP 法により調べた。その結果、予想に反して野生型 HeLa 細胞と TAF-I KD HeLa 細胞の間で、*TERT* 遺伝子座に結合するヒストン H1 量に大きな差は見られなかった。以上の結果より、TAF-I はヒストン H1 に依存せず、*TERT* 遺伝子座のエピジェネティック修飾に関わるということが明らかとなった。

#### (5) TAF-I は異なる組織由来のヒトがん細胞で *TERT* 遺伝子の転写制御に関わる

研究代表者らはここまでの解析で、ヒト子宮頸がん由来の HeLa 細胞をモデルとして用いてきた。しかし、HeLa 細胞はヒトパピローマウイルスの感染によりがん化しており、他の組織由来のがんとはメカニズムで一線を画する。そこで、TAF-I による *TERT* 遺伝子のエピジェネティックな転写制御が異なる組織由来のがん細胞でも共通に起こるかを調べた。肺がん由来の A549 細胞、大腸がん由来の HCT116 細胞を用いて、HeLa 細胞と同様に恒常的に TAF-I の発現が抑制された KD 細胞を樹立した。それぞれの野生型細胞とともに、*TERT* mRNA の発現量と、*TERT* 転写開始点近傍の DNA メチル化レベルを調べたところ、どちらの細胞でも TAF-I KD により、*TERT* mRNA 量の減少と、*TERT* 遺伝子座の DNA メチル化の亢進が観察された。以上の結果より、TAF-I は組織の違いによらず、多くのヒトのがん細胞でエピジェネティックなメカニズムにより *TERT* 遺伝子の転写活性化に関わる可能性が示唆された。

#### 引用文献

- Kato, K. *et al.*, Role of Template Activating Factor-I as a chaperone in linker histone dynamics. *J. Cell Sci.* 124, 2011, 3254-3265.
- Lee, D. D. *et al.* DNA hypermethylation within *TERT* promoter upregulates *TERT* expression in cancer. *J. Clin. Investig.* 129, 2019, 223-229
- Stern, J. L. *et al.*, Mutation of the *TERT* promoter, switch to active chromatin, and monoallelic *TERT* expression in multiple cancers. *Genes Dev.* 29, 2015, 2219-2224.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kohsuke Kato, Atsushi Kawaguchi, Kyosuke Nagata	4. 巻 11
2. 論文標題 Template activating factor-1 epigenetically regulates the TERT transcription in human cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-97009-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------