

平成 21 年 6 月 26 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19370078
 研究課題名（和文） 細胞がん化形質の発現・維持に対するタンキラーゼ1の多面的生理機能の関与

研究課題名（英文） Multi-functions of tankyrase-1 in carcinogenesis

研究代表者

清宮 啓之（SEIMIYA HIROYUKI）

財団法人癌研究会・癌化学療法センター分子生物治療研究部・部長

研究者番号：50280623

研究成果の概要：タンキラーゼ1は、がん細胞の無限増殖を支持するテロメラーゼの働きを助ける、ポリ(ADP-リボシル)化酵素である。本酵素の本来の働きは良く分かっておらず、特異的阻害剤も得られていない。我々は、タンキラーゼ1の下流で働く TRF1 と呼ばれる蛋白質が、がん化の一因となる異常な細胞分裂に寄与することを見出した。また、タンキラーゼ1の働きを遮断する物質を複数同定するとともに、ある種の培養がん細胞に対し、同酵素の阻害が制がん効果を生み出すことを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2008年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：ポリ(ADP-リボシル)化・がん・テロメア・細胞分裂・分子標的・創薬

1. 研究開始当初の背景

テロメア (telomeres) は真核生物の染色体末端を安定に保つ高次構造体であり、細胞の分裂寿命を規定する一要素である。ヒト体細胞におけるテロメアの短縮は細胞老化を誘導し、発がん抑制機構の一翼を担う。テロメア合成酵素であるテロメラーゼは、がん細胞のテロメアを伸長維持し、その無限増殖を支えるものとして、生物学的観点から、またがん治療の観点からも注目されてきた。我々はこれまでに、種々のテロメラーゼ阻害剤を同定・開発し、その制がん効果を実証してき

た (Naasani et al, *Cancer Res*, 1999; Seimiya et al, *Mol Cancer Ther*; 2002 等)。一方、ポリ(ADP-リボシル)化 (PAR 化) は蛋白質に最も大きな物性変化を与える翻訳後修飾の一つであり、ゲノム安定性や転写制御をはじめ、様々な生命現象の調節に寄与する。タンキラーゼ1 (tankyrase-1) は PAR 化酵素 (PARP) ファミリーの一員であり、テロメア結合蛋白質 TRF1 (telomeric repeat-binding factor 1) を PAR 化し、これをテロメア DNA から遊離させることによってテロメラーゼのテロメア会合を促進する。

すなわち、タンキラーゼ1はテロメラーゼの働きを促進することによってがん細胞の不死化に寄与すると考えられる。我々は近年、タンキラーゼ1がテロメラーゼ阻害剤の耐性因子となることを示した (Seimiya et al, *Cancer Cell*, 2005)。但し、テロメアに局在するタンキラーゼ1は細胞内プール全体のごく僅かであり、これをがん治療の標的と想定するにあたっては、その生理機能をより詳細に理解する必要がある (Seimiya, *Br J Cancer*, 2006)。

そもそも、タンキラーゼ1はテロメア上でいつ、どのような仕組みで TRF1 を PAR 化するのか、その詳細は明らかにされていない。また、タンキラーゼ1は細胞分裂期の中心体などにも豊富に分布するため、テロメア長制御とは異なる機能も担っている可能性が高い。事実、タンキラーゼ1は細胞分裂において重要な役割を果たす可能性も報告されている (Dynek et al, *Science*, 2004; Chang et al, *Nat Cell Biol*, 2005)。

2. 研究の目的

本研究は、タンキラーゼ1の多機能性(テロメア長の制御および細胞分裂の制御)とその調節機構を各論的かつ俯瞰的に捉え、その破綻が細胞のがん化形質にどのように関与するかを明らかにすることを目的とする。さらに、同蛋白質の機能を人為的に修飾する手法を開発し、これを新たながん治療法に応用する可能性について検討する。具体的な達成目標は以下の4点である。

- (1) タンキラーゼ1による染色体末端安定化機構(テロメア維持機構)の詳細を明らかにする。
- (2) がん遺伝子 Aurora-A の発現亢進による細胞分裂異常に対する、タンキラーゼ1の機能的関与を明らかにする。
- (3) タンキラーゼ1のテロメア機能の迅速可視化システムを構築し、同酵素の阻害物質を単離する。
- (4) がん細胞においてタンキラーゼ1を阻害したときの即時的な影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) タンキラーゼ1のテロメア機能の解析：タンキラーゼ1をヒト子宮頸がん HeLa I.2.11 細胞の核内に一過性に過剰発現させ、TRF1 とともに間接免疫蛍光染色法にて検出した。タンキラーゼ1を過剰発現した細胞では TRF1 が PAR 化されてテロメアから遊離するため、TRF1 の核内ドットシグナルが消失する(TRF1 遊離アッセイ:後述の図3参照)。生物種間差の検討では、マウス NIH3T3 細胞を用いた。タンキラーゼ1と TRF1 の結合は

試験管内プルダウン法および免疫沈降・ウェスタンブロット法にて解析した。タンキラーゼ1の PAR 活性は以下の方法で測定した：FLAG タグを付加したタンキラーゼ1を恒常的に過剰発現させた HTC75 細胞の抽出液を調製し、FLAG 抗体ビーズで粗精製した免疫複合体を酵素源とした。基質として ³²P 標識 NAD、PAR 受容体として GST-TRF1 組換え融合蛋白質を用いた。PAR 反応産物を SDS-PAGE にかき、GST-TRF1 の PAR 化をオートラジオグラフィーで検出した。各種タンキラーゼ1変異体発現レトロウイルスを作製し、これを HTC75 細胞に感染させ、同細胞のテロメア長変化をサザンブロット法で解析した。TRF1 およびテロメア1本鎖 DNA 結合蛋白質 POT1 のテロメア結合はクロマチン免疫沈降法にて解析した。

(2) Aurora-A による細胞分裂異常の解析：HeLa I.2.11 および線維肉腫 HTC75 細胞に Aurora-A を一過性に過剰発現させ、中心体数の異常、核・紡錘体の異常、微小管・動原体捕捉の異常を間接免疫蛍光染色にて観察した。細胞分裂の様子をライブ観察する場合は、ヒストン H2B-GFP を共発現させ、タイムラプス蛍光共焦点顕微鏡(オリンパス FV-1000)で動画撮像した。TRF1 のノックダウンは siRNA のトランスフェクションにて実施した。

(3) タンキラーゼ1阻害物質の探索：文部科学省がん特定領域研究・化学療法基盤情報支援班 (<http://gantoku-shien.jfcr.or.jp/>) の標準阻害剤キット(SCADS inhibitor kit)に収載の95種類の化合物の存在下で、前述の TRF1 遊離アッセイを実施した。細胞を 0.1 ~ 10 μM の濃度で24時間処理後、タンキラーゼ1の核内ドット化を誘導し、かつ TRF1 のテロメアからの遊離を阻害したものを陽性化合物と判定した。

(4) タンキラーゼ1阻害の制がん効果の解析：既存の PAR 阻害剤はタンキラーゼ1以外の様々な PAR メンバー(DNA 修復や転写制御に関わる PARP-1 など)も阻害すると予想されるため、タンキラーゼ1の特異的阻害は、shRNA 導入によるノックダウンもしくは優性不活(ドミナントネガティブ)変異体の過剰発現によって実施した。標的がん細胞としては、大腸がん HCT116 および線維肉腫 HTC75 を用いた。タンキラーゼ1との2重阻害による合成致死性(synthetic lethality)を誘導しうるカウンターパート因子としては、BRCA1 および BRCA2 を選択し、これらの発現を shRNA によってノックダウンした。さらに BRCA1 変異がんとして、卵巣がん UWB1.289 および乳がん HCC1937

細胞についても検討した。細胞増殖への影響はコロニー形成数により評価した。

4. 研究成果

(1) タンキラーゼ1のテロメア機能における生物種間差：タンキラーゼ1はテロメア伸長抑制因子 TRF1 を PAR 化し、これをテロメアから遊離する。我々は、タンキラーゼ1はマウス TRF1 を PAR 化せず(図1) テロメアから遊離しないことを見出した。これは、マウス TRF1 ではタンキラーゼ1結合部位 [RXX(P/A)DG] がゲノムレベルで欠落しているためであると考えられた。マウスでは、テロメアが長く、体細胞でも高いテロメラーゼ活性が認められることから、タンキラーゼ1がテロメア伸長因子として働く必然性が進化の過程で失われた可能性が示唆された。

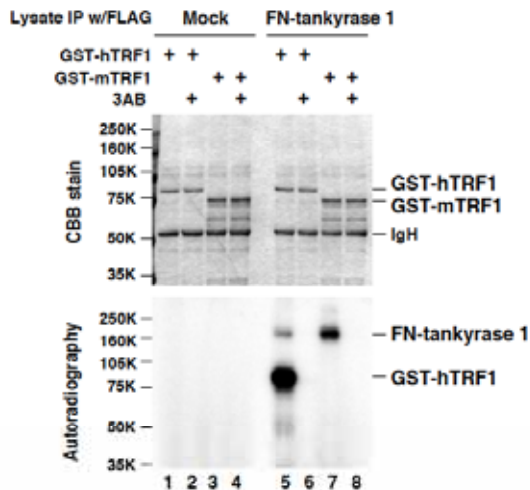


図1 タンキラーゼ1による TRF1 の PAR 化

(2) タンキラーゼ1変異体のテロメア伸長活性：我々は以前、タンキラーゼ1分子内に存在するアンキリン領域は5つの副領域(ANK repeat clusters; ARC I-V)に分割され、それぞれの ARC が独立して TRF1 結合部位として機能することを見出した (Seimiya et al, *JBC*, 2002)。なかでも C 末端側の ARC V による TRF1 認識がタンキラーゼ1のテロメア機能に必須であったが (Seimiya et al, *MCB*, 2004)、それ以外の ARC の機能は不明であっ

た。今回我々は、TRF1 を PAR 化せずにテロメア結合因子 POT1 をテロメアから遊離させ、テロメアを伸長させるタンキラーゼ1変異体 (ARC IVmut- ARC V) を作製した(図2)。これにより、タンキラーゼ1は TRF1 の PAR 化のみならず、ARC による PAR 化非依存的メカニズムを介してもテロメア高次構造を制御する可能性が示唆された。

(3) 細胞分裂異常に対するタンキラーゼ1・TRF1 の機能的関与：がん遺伝子としても機能する分裂期キナーゼ Aurora-A の過剰発現は、細胞分裂の異常を引き起こす。我々は、タンキラーゼ1を細胞核内に過剰発現させると Aurora-A による分裂異常が抑制されることを見出した。同効果は PARP 不活性変異型タンキラーゼ1では認められなかったため、タンキラーゼ1は何らかの核内因子を PAR 化することによって細胞分裂を制御している可能性が示唆された。タンキラーゼ1を核内で過剰発現した細胞では、タンキラーゼ1標的の蛋白質である TRF1 がテロメアから遊離し、プロテアソーム分解によるダウンレギュレーションを受けた。これらの結果をもとにさらに検討を加えた結果、Aurora-A の過剰発現による細胞分裂異常に対し、TRF1 のノックダウンが抑制的に作用することを見出した。すなわち、Aurora A を過剰発現した細胞では微小管と動原体のアタッチメントに異常が見られ、細胞質分裂の失敗やこれに伴う中心体数の増加・多核化が観察されたが、TRF1 をノックダウンした細胞では Aurora A を過剰発現してもこれらの分裂期異常が観察されなかった (論文投稿中)。

(4) 細胞内 PARP 活性可視化システムの構築と阻害剤スクリーニング：前述の通り、タンキラーゼ1はテロメラーゼ阻害剤の耐性因子として機能するため、タンキラーゼ1阻害剤は新たなテロメア分子標的薬として利用できる可能性がある。さらに一般的に言う、PARP 阻害剤はがん・虚血性脳・心疾患などの治療薬としての応用性が期待され、分子標的創薬における新たなシードとして脚光を浴びている。我々はイメージングによる細胞内 PARP 活性阻害評価系を構築した(図3)。従来のサザン法を用いたテロメア長の解析では、タンキラーゼ1のテロメア機能を評価

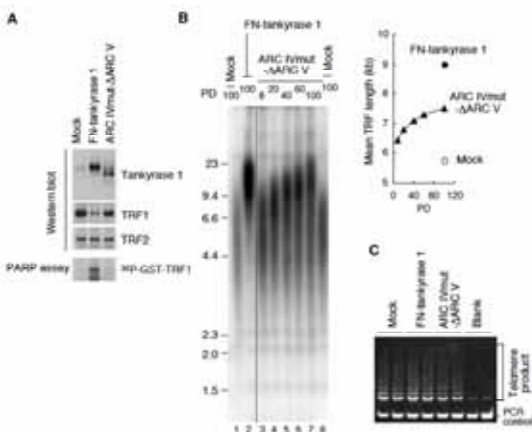


図2 タンキラーゼ1変異体 (ARC IVmut-ΔARC V) による TRF1 の PAR 化に依存しないテロメア伸長

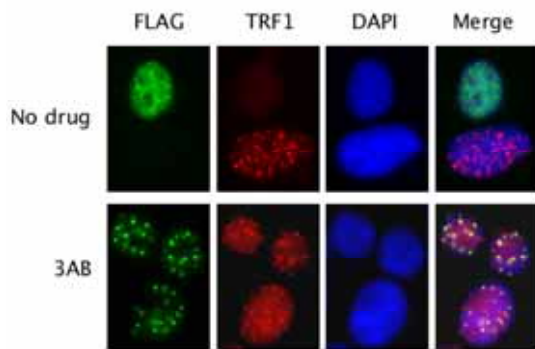


図3 タンキラーゼ1阻害剤のビジュアル探索系

するには2～3ヶ月の長期細胞培養を要したが、本法には2～3日で結果が取得できるという利点がある。この系を用い、タンキラーゼ1によるTRF1のテロメアからの遊離を阻害するものを探索した。標準阻害剤キット(SCADS inhibitor kit)に収載の95種類の化合物を調べ、4種類の陽性化合物を同定した。これらの化合物はタンキラーゼ1の核内自己多量体化を誘導した。

(5) BRCA欠損がんにおけるタンキラーゼ1阻害の制がん効果：タンキラーゼ1のドミナントネガティブ変異体もしくはshRNA(図4)を発現したがん細胞株を樹立し、これらの細胞株ではBRCA1/2のノックダウンが合成致死性を誘導することを見出した。同様に、BRCA欠損がん細胞であるUWB1.289およびHCC1937では、タンキラーゼ1のノックダウン単独で制がん効果が誘導されることを見出した。これらの結果は、タンキラーゼ1特異的阻害剤および現在臨床試験に移行しているPARP阻害剤が、有望な新規制がん剤となる可能性を示唆するものである。

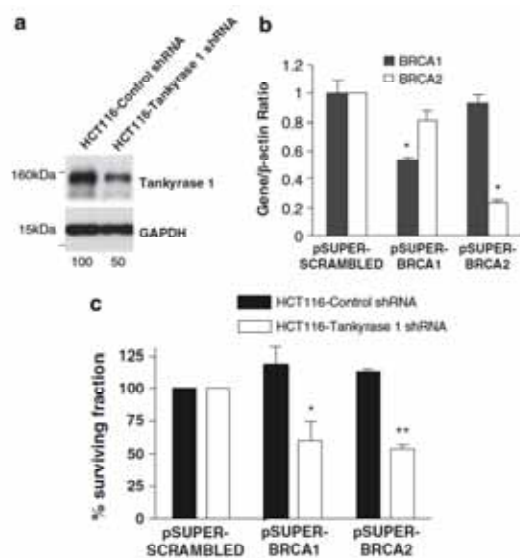


図4 タンキラーゼ1・BRCA1/2阻害による制がん

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

1. Mashima T, Sato S, Okabe S, Miyata S, Matsuura M, Sugimoto Y, Tsuruo T, Seimiya H. Acyl-CoA synthetase as a cancer survival factor: its inhibition enhances the efficacy of etoposide. *Cancer Sci.* in press.
2. McCabe N, Cerone MA, Ohishi T, Seimiya H, Lord CJ, Ashworth A. Targeting Tankyrase 1 as a therapeutic strategy for BRCA-associated cancer. *Oncogene.* 28: 1465-1470 (2009)
3. Mashima T, Seimiya H, Tsuruo T. *De novo* fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. *Br J Cancer.* 100: 1369-1372 (2009)
4. Mashima T, Sato S, Sugimoto Y, Tsuruo T, Seimiya H. Promotion of glioma cell survival by acyl-CoA synthetase 5 under extracellular acidosis conditions. *Oncogene.* 28: 9-19 (2009)
5. Muramatsu Y, Tahara H, Ono T, Tsuruo T, Seimiya H. Telomere elongation by a mutant tankyrase 1 without TRF1 poly(ADP-ribosylation). *Exp Cell Res.* 314: 1115-1124 (2008)
6. Migita T, Narita T, Nomura K, Miyagi E, Inazuka F, Matsuura M, Ushijima M, Mashima T, Seimiya H, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Ishikawa Y. ATP citrate lyase: activation and therapeutic implications in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 68: 8547-8554 (2008)
7. Muramatsu Y, Ohishi T, Sakamoto M, Tsuruo T, Seimiya H. Cross-species difference in telomeric function of tankyrase 1. *Cancer Sci.* 98: 850-857 (2007)
8. Ohishi T, Tsuruo T, Seimiya H. Evaluation of tankyrase inhibition in whole cells. *Meth Mol Biol.* 405: 133-146 (2007)
9. Tanaka E, Fukuda H, Nakashima K, Tsuchiya N, Seimiya H, Nakagama H. hnRNP A3 binds to and protects mammalian telomeric repeats *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun.* 358: 608-614 (2007)

[学会発表](計17件)

1. 初谷香織、大石智一、杉本芳一、鶴尾隆、清宮啓之・ポリ(ADP-リボシル)化酵素タンキラーゼ1の自己多量体化によるテロメア機能の調節・日本薬学会第129年会・2009年3月26日・京都
 2. Seimiya H. Telomere fingerprinting and its application to drug sensitivity studies, The 9th Korea-Japan Symposium on Cancer and Ageing Research. 2009年3月12日・韓国 Damyang
 3. 清宮啓之・テロメア・老化関連分子を標的とした新規がん化学療法の開発・"第1回佐賀大学先端研究センター研究推進部門セミナー「がん分子標的療法の新展開」"・2009年2月27日・佐賀
 4. 清宮啓之・テロメア動態制御ネットワークの解明と薬剤反応性研究への応用・"岩手医科大学・化学療法基盤情報支援班共催シンポジウム「抗がん剤創薬の新たな展開」"・2009年1月16日・岩手
 5. 平島匡太郎、鶴尾隆、清宮啓之・テロメア伸長がもたらすがん細胞の遺伝子発現変化・第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学会大会合同大会・2008年12月11日・神戸
 6. 大石智一、鶴尾隆、清宮啓之・TRF1 mediates mitotic abnormalities induced by Aurora A overexpression. 第67回日本癌学会学術総会・2008年10月29日・横浜
 7. 清宮啓之、村松由起子、田原栄俊、上野勝、矢守隆夫、鶴尾隆・Construction of the Telomere Fingerprint Database, a novel platform for telomere dynamics and drug sensitivity studies. 第67回日本癌学会学術総会・2008年10月28日・横浜
 8. Seimiya H, Ohishi T, Tsuruo T. Tankyrase 1 suppresses oncogene-induced mitotic abnormalities. 欧州EMBOカンファレンス「Telomeres and the DNA Damage Response」・2008年9月18日・スイス Villars-sur-Ollon
 9. 清宮啓之・細胞分裂におけるテロメア結合蛋白質の新たな機能・第26回日本ヒト細胞学会学術集会・2008年8月30日・東京
 10. Seimiya H, Muramatsu Y, Sato S, Tahara H, Yamori T, Tsuruo T. Anticancer effect of a telomerase inhibitor, MST-312, associated with telomere length and a premature aging-related protein, AACR Special Conference "The Role of Telomeres and Telomerase in Cancer Research" 2007年12月7日・San Francisco, CA, USA
 11. 大石智一、鶴尾隆、清宮啓之・Tankyrase 1 suppresses mitotic abnormalities induced by Aurora A overexpression, 第66回日本癌学会学術総会・2007年10月5日・横浜
 12. 村松由起子、大石智一、鶴尾隆、清宮啓之・Cross-species difference in telomeric function of tankyrase 1, 第66回日本癌学会学術総会・2007年10月5日・横浜
 13. Seimiya H, Tsuruo T. Cancer therapy by a telomerase inhibitor, MST-312, 第66回日本癌学会学術総会・2007年10月4日・横浜
 14. Seimiya H, Tsuruo T. Intracellular reactions induced by a telomerase inhibitor and their impact on human cancer cell growth, The 8th Japan-Korea Joint Symposium on Cancer and Ageing Research・2007年8月11日・岐阜
 15. Ohishi T, Tsuruo T, Seimiya H. Tankyrase 1 suppresses mitotic abnormalities induced by Aurora A overexpression, The 8th Japan-Korea Joint Symposium on Cancer and Ageing Research・2007年8月11日・岐阜
 16. 大石智一、鶴尾隆、清宮啓之・タンキラーゼ1の細胞分裂における機能的関与・第11回がん分子標的治療研究会総会・2007年7月5日・大阪
 17. Seimiya H, Muramatsu Y, Sato S, Sakamoto M, Ohishi T, Tahara H, Yamori T, Tsuruo T. Acute anti-proliferative effect of a synthetic telomerase inhibitor, MST-312, on human cancer cells, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Telomeres & telomerase, 2007年5月4日・Cold Spring Harbor, NY, USA
- 〔図書〕(計1件)
Seimiya H, Tsuruo T. Tankyrase 1, telomere-binding proteins, and inhibitors. In "Telomeres and Telomerase in Cancer" edited by Hiyama K. Humana Press, 281-292 (2009)
- 〔その他〕
 ホームページ：
 和文：
<http://www.jfcr.or.jp/laboratory/cc/molecularbiotherapy/index.html>
 英文：

<http://www.jfcr.or.jp/laboratory/english/ccc/molecularbiotherapy/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

清宮 啓之 (SEIMIYA HIROYUKI)
財団法人癌研究会・癌化学療法センター
分子生物治療研究部・部長
研究者番号：50280623

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし