

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25440080

研究課題名(和文) テロメア機能破綻時の染色体不安定化の分子機構

研究課題名(英文) Defining the molecular mechanism of the cell cycle-specific regulation of chromosome end fusion at dysfunctional telomeres

研究代表者

小西 昭充 (Konishi, Akimitsu)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：50381877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞癌化に結びつく染色体末端融合の制御分子機構の解明を目指した。本研究によって、テロメア機能が破綻した際、染色体末端領域クロマチンのユビキチン化状態が、S/G2細胞周期で有意に抑制されていた。その結果、クロマチンのユビキチン化を標的に集積する染色体末端融合の必須因子である53BP1のテロメアへの集積が抑制され、S/G2細胞周期で染色体末端融合が抑制されていることを明らかにすることができた。また、テロメア保護の中心因子であるTRF2分子が直接テロメア領域のクロマチン(コアヒストン)と結合して染色体末端を安定化する新しい分子機構についても明らかにした。

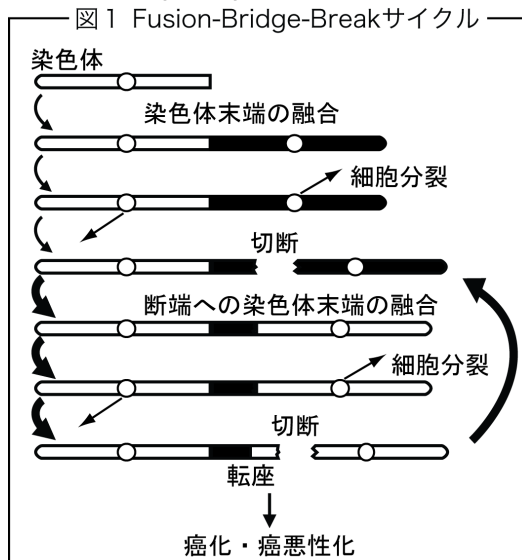
研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the molecular mechanism of the cell cycle-specific regulation of chromosome end fusion leading to the cell carcinogenesis. We revealed that chromatin ubiquitination at the end of chromosomes induced by telomere dysfunction was largely diminished in S/G2 cell cycle phase. As a result, the recruitment of 53BP1, which is an essential factor for chromosome end fusion, is suppressed in S/G2 phase. We also elucidated that TRF2, the central factor for telomere protection, directly binds to the chromatin (core histone) to stabilize the chromosome ends.

研究分野：細胞生物学

キーワード：テロメア 染色体不安定化 DNA損傷反応 DNA修復 細胞周期

### 1. 研究開始当初の背景

染色体末端に存在するテロメアはゲノム恒常性の維持に重要な役割を果たしており、老化、発癌、幹細胞機能異常など様々な疾病に関与している。テロメア機能の本質はDNA損傷反応からの染色体末端の保護であり、テロメア短縮などでテロメア機能が破綻すると、一般的なDNA損傷とほぼ同じ細胞応答が起こる。保護機能を失った染色体末端はDNA修復機構によって互いに融合されるため、細胞分裂時に染色体の断裂が生じる。この融合-断裂のサイクル (Fusion - Bridge - Break サイクル) はゲノムの不安定性を著しく増加させ、癌化および癌悪性化に寄与しているとされる (図1)。



申請者らは、染色体の末端融合反応の細胞周期依存的な制御機構を明らかにしてきた。テロメア機能が破綻した染色体での末端融合反応はG1細胞周期のみで特異的に起こり、他の細胞周期ではCDK1/2活性依存的に抑制されていた (2008年 Genes & Dev 誌、小西ら)。しかし、この制御メカニズムは現在のところ不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞周期依存的に制御されている染色体末端融合の分子機序の解明と、その異常がもたらす細胞癌化のメカニズムの理解を目的とした。

### 3. 研究の方法

1) テロメア機能破綻時に染色体末端に起こるDNA損傷反応と細胞周期との関連性を明らかにする：テロメア機能不全によって誘導されるDNA損傷反応が細胞周期によってどのように異なっているかをDNA損傷反応因子の局在変化を指標にして細胞生物学的手法により解析する。

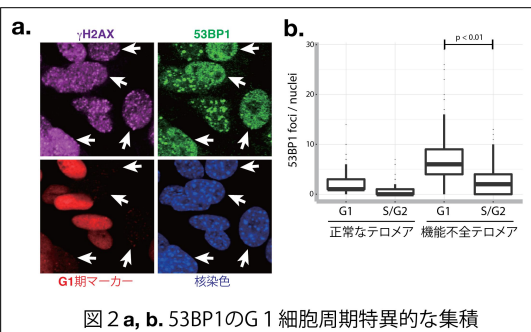
2) テロメアでの細胞周期依存的なDNA損傷反応の制御の仕組みを理解する：テロメア特異的な細胞周期依存的なDNA損傷反応の制御がどのような仕組みで行われているかをクロマチンの翻訳後修飾、特にDNA損傷反応の

シグナル伝達に重要なユビキチン化に着目して解析する。

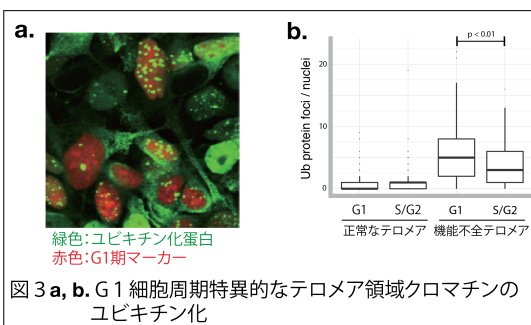
3) テロメア保護因子とクロマチンの相互作用についての理解：テロメア保護因子がテロメア領域クロマチンに及ぼす影響について検討を行う。

### 4. 研究成果

1) テロメア機能不全を来した染色体末端において誘導されるDNA損傷反応が細胞周期によってどのように異なるかについて詳細な解析を行った。53BP1分子は本来、細胞周期非依存的にDNA損傷箇所を集積するDNA損傷の初期応答因子である。しかし、機能不全状態のテロメアではこの53BP1分子がG1細胞周期でのみ集積し、S/G2細胞周期ではテロメアへの集積が抑制されていることを見出した (図2)。53BP1は染色体末端融合の必須因子であることが知られていることから、この53BP1の集積度の差異が細胞周期による染色体末端融合の制御の原因となっていることが示唆された。



2) 53BP1分子はDNA損傷部位のクロマチンのユビキチン化修飾を標的として集積することが知られている。そこで、テロメア機能不全時にテロメア領域のクロマチンのユビキチン化状態がどのようになっているかを検討した。その結果、テロメア領域ではクロマチンのユビキチン化状態が細胞周期により異なり、S/G2細胞周期でそのユビキチン化が抑制されていることを見出した。つまり、DNA損傷部位のクロマチンのユビキチン化修飾がテロメア領域では通常の染色体領域とは異なり、S/G2細胞周期では抑制されているため、53BP1分子が機能不全テロメアに集積することができず、その結果、染色体融合が抑制されていることが明らかとなった (図3)。



3) テロメア保護機能の中心的制御因子である TRF2 分子の生化学的解析の結果、TRF2 因子が直接テロメア領域クロマチン(コアヒストン)と結合することによって、染色体末端を安定化しているという新しい分子機構を明らかにすることができた(図4)

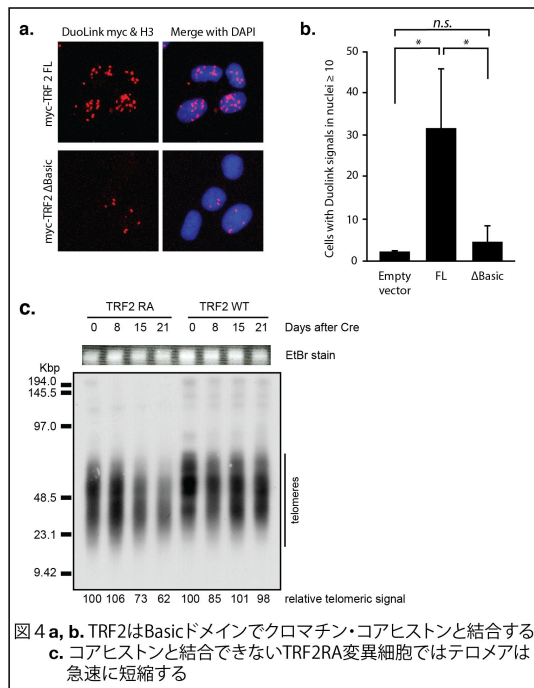


図4 a, b. TRF2はBasicドメインでクロマチン・コアヒストンと結合する  
c. コアヒストンと結合できないTRF2RA変異細胞ではテロメアは急速に短縮する

## 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 4 件)

1. Watanabe Y, Honda S, Konishi A, Arakawa S, Murohashi M, Yamaguchi Y, Torii S, Tanabe M, Tanaka S, Warabi E, and Shimizu S “Autophagy controls centrosome number by degrading Cep63.” *Nature Communications*, 7, 1-12, 2016(査読あり)、DOI: 10.1038/ ncomms13508
2. Konishi A<sup>#</sup> (Corresponding author), Izumi T, and Shimizu S “TRF2 Protein Interacts with Core Histones to Stabilize Chromosome Ends.” *J Biol Chem*, 291(39), 20798-20810, 2016(査読あり)、DOI: 10.1074/jbc.M116. 719021
3. Araki M, Ohshima N, Aso C, Konishi A, Obinata H, Tatei K, and Izumi T “Enzymatic characterization of recombinant rat DDHD2: a soluble diacylglycerol lipase.” *J Biochem-Tokyo*, 160(5), 269-279, 2016(査読あり)、DOI: 10.1093/jb/mvw034

4. Aso C, Araki M, Ohshima N, Tatei K, Hirano T, Obinata H, Kishi M, Kishimoto K, Konishi A, Goto F, Sugimoto H, Izumi T “Protein purification and cloning of diacylglycerol lipase from rat brain.” *J Biochem-Tokyo*, 159(6), 585-597, 2016(査読あり)、DOI: 10.1093/jb/mvw002

[学会発表](計 16 件)

[招待講演]

1. Akimitsu Konishi, 『TRF2 interacts with core histones to stabilize chromosome ends』、EMBO Workshop. Telomeric Chromatin and Telomere Fragility, 2015年12月7日~10日、Singapore, Nanyang Technological University(シンガポール、ナンヤン理工大学)
2. 小西昭充, 『細胞はどのようにしてDNA損傷から回復するのか』、群馬大学 ASRLD シンポジウム、2013年4月26日、前橋、群馬大学

[国際学会]

1. Akimitsu Konishi, 『Cell Cycle-Dependent Regulation of DNA Damage Response and DNA Repair at Dysfunctional Telomeres』、10<sup>th</sup> 3R Symposium, 2016年11月13日~17日、Matsue, Hotel Ichibata(日本、ホテル一畑)
2. Kaori Yauchi, Akimitsu Konishi, Takashi Izumi, 『Complete sequence of human telomere DNA by single-molecule real-time sequencing technique』、EMBO Workshop. Telomeric Chromatin and Telomere Fragility, 2015年12月7日~10日、Singapore, Nanyang Technological University(シンガポール、ナンヤン理工大学)
3. Akimitsu Konishi, 『Cell Cycle-Dependent Regulation of DNA Damage Response and DNA Repair at Dysfunctional Telomeres』、Cold Spring Harbor Meeting. Telomere and Telomerase, 2015年4月28日~5月2日、Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory(米国、コールドスプリングハーバー研究所)
4. Akimitsu Konishi, Takashi Izumi, Titia de Lange, 『Cell Cycle-Dependent Regulation of DNA Damage Response and DNA Repair at Dysfunctional Telomeres』、4D Nucleome, 2014年12月17日~20日、

Hiroshima, Aki Grand Hotel(日本、安芸  
グランドホテル)

[ 一般講演 ]

1. 小西昭充、和泉孝志、清水重臣、『TRF2は  
コアヒストントの直接結合によりテロメ  
アのループ構造を維持する』第34回染色  
体ワークショップ、2017年1月12日～14  
日、木更津、かずさアカデミアホール
2. Hiraku Suzuki, Kadiombo Tshilela  
Anastasie, Akimitsu Konishi, Takashi  
Izumi, 『Cell cycle-dependent regulation  
of DNA damage response at dysfunctional  
telomeres』第39回日本分子生物学会年  
会、2016年11月30日～12月2日、横浜、  
パシフィコ横浜
3. 本田真也、渡辺雄一郎、小西昭充、室橋道  
子、荒川聡子、山口啓史、清水重臣、『オ  
ートファジーによるCep63の分解を介し  
た中心体数の制御』第39回日本分子生物  
学会年会、2016年11月30日～12月2日、  
横浜、パシフィコ横浜
4. 小西昭充、『テロメアにおける細胞周期依  
存的なDNA損傷反応・DNA修復の制御機構』  
第6回DNA損傷ワークショップ、2016年4  
月4日～5日、浜松、浜名湖弁天リゾート  
ジ・オーシャン
5. Kadiombo Tshilela Anastasie, Akimitsu  
Konishi, Takashi Izumi, 『Cell  
cycle-dependent regulation of  
non-homologous end joining at  
unprotected telomeres』第33回染色体  
ワークショップ、2016年1月12日～14  
日、松島、松島一の坊
6. Kadiombo Tshilela Anastasie, Akimitsu  
Konishi, Takashi Izumi, 『Cell  
Cycle-dependent regulation of  
non-homologous end joining at  
unprotected telomeres』第38回日本分  
子生物学会年会、2015年12月1日～4日、  
神戸、ポートアイランド
7. 小西昭充、和泉孝志、Titia de Lange, 『テ  
ロメアにおける細胞周期依存的なDNA損  
傷反応・DNA修復の制御機構』第32回染  
色体ワークショップ、2014年12月15日  
～17日、広島、安芸グランドホテル
8. 小西昭充、和泉孝志、Titia de Lange, 『テ  
ロメアでの細胞周期依存的なDNA損傷反  
応・DNA修復の制御機構』第37回日本分  
子生物学会年会、2014年11月25日～27  
日、横浜、パシフィコ横浜

9. Akimitsu Konishi, Takashi Izumi,  
Shigeomi Shimizu, 『Regulation of DNA  
damage checkpoint termination』第36  
回日本分子生物学会年会、2013年12月3  
日～6日、神戸、ポートアイランド

10. 小西昭充、和泉孝志、清水重臣、『Wee1  
によるDNA損傷チェックポイントの回復  
制御』第31回染色体ワークショップ、  
2013年11月25日～27日、箱根、ホテ  
ルおかだ

[ 図書 ] (計 0 件)

[ 産業財産権 ]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[ その他 ]  
ホームページ等

群馬大学大学院医学系研究科・代謝機能制御  
系期間機能制御学・生化学  
<http://www.med.gunma-u.ac.jp/med-organiza-tion/bioreg/bioreg-function/123.html>

群馬大学大学院医学系研究科・テニュアトラ  
ック普及推進室  
<http://tenure.showa.gunma-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小西 昭充 (Konishi Akimitsu)  
群馬大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号 : 50381877

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし