

平成 28 年 9 月 8 日現在

機関番号：10101
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2014～2015
課題番号：26890001
研究課題名(和文)テロメラーゼによるDNA二重鎖切断修復機構の解明

研究課題名(英文)Telomerase mediated DNA repair

研究代表者

小野澤 真弘 (Onozawa, Masahiro)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70455632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：テロメラーゼは染色体末端でのテロメア配列伸長以外に様々な生理的機能を持つ。テロメラーゼがDNA修復に関わる事が推察されてきたが、これまで直接的な証明はなかった。本研究では細胞株を用い、実験的に導入したDNA二重鎖切断が、テロメア配列(TTAGGG)_nの挿入で修復される事を見いだした。また、テロメア配列挿入がヒト遺伝多型の一つであることを見いだした。染色体非末端部にあるテロメア配列はDNA損傷修復の痕跡と考えられ、進化的に保存された遺伝子修復機序と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Telomerase has various biological functions other than elongation of telomere repeat at chromosomal end. Although previous study suspected that telomerase play role for DNA repair mechanisms, there was no direct evidence. In this study, we showed induced DNA double strand breaks could be repaired by insertion of telomere repeat (TTAGGG)_n in cell line. We also revealed that telomere repeat insertion is one of the human genome polymorphisms. Interstitial telomeric sequences are considered to be trace of DNA break repair events, and this mechanisms were evolutionally conserved mechanisms to repair DNA breakage.

研究分野：ゲノム医化学

キーワード：テロメラーゼ DNA損傷 DNA修復 遺伝多型 CRISPR

1. 研究開始当初の背景

テロメラーゼは腫瘍細胞で高発現しているが、正常分化細胞では発現が低く、腫瘍治療の分子標的としても注目されている。テロメラーゼによる DNA 修復機構の理解は、テロメラーゼ阻害剤による腫瘍増殖抑制機序の解明にも重要である。

ヒト腫瘍細胞の約 90% でテロメラーゼが活性化されており、テロメア長の維持により不死化がもたらされると考えられている。一方、近年テロメラーゼにテロメア DNA 合成以外の様々な生理的機能があり、テロメアとは関係ない機能を介しても、がん細胞の生育を促進する事が明らかになって来ている。その具体的なメカニズムはまだ十分に解明されていないが、テロメラーゼは正常幹細胞の維持にも寄与しており、その仕組みの中にヒントが隠されている可能性がある。申請者が注目したのは DNA 二重鎖切断 (DSB: double strand break) 修復への関与である。

ヒトでのテロメラーゼは鋳型となる RNA 構成要素 TARC と逆転写酵素である TERT およびその他の制御サブユニットからなる複合体である。脊椎動物においては (TTAGGG)_n よりなる反復配列が、染色体末端のテロメア領域に存在し、テロメラーゼにより伸長される。一方、染色体の非末端部にある同様の反復配列があることが知られており、染色体非末端テロメア配列 (interstitial telomeric sequences: ITSs) と呼ばれている。ヒトとその他の霊長類の配列解析からこれらの ITSs は DNA 修復の痕跡である事が推測されていた (Nergadze SG, et al. Genome Res. 2004; Genome Biology 2007)。

2. 研究の目的

近年テロメラーゼにテロメア DNA 合成以外の様々な生理的機能があり、テロメア非依存性の新たながん増殖作用が探求されている。本研究ではテロメラーゼが DNA-DSB 修復に直接関与している事を証明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 遺伝多型として存在するテロメア配列挿入

染色体非末端テロメア配列 (interstitial telomeric sequences: ITSs) が過去遺伝子損傷修復の痕跡であると仮定した。オンライン上に公開されている“国際 1000 人ゲノムプロジェクト”の次世代シーケンスによる全ゲノムシーケンスデータを解析し、リファレンスゲノムには認めないテロメア配列 (TTAGGG)_n の挿入部位を検索した。

(2) 実験系での DNA 損傷部位へのテロメア配列挿入

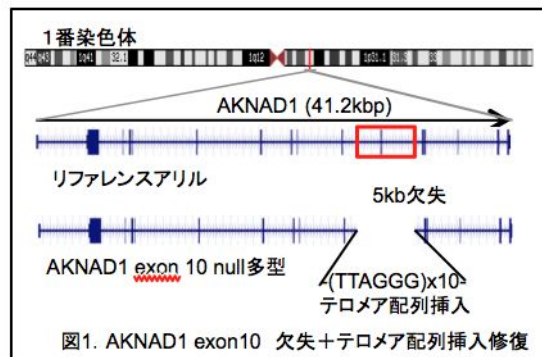
I-SceI 認識配列を導入した細胞株を用い、I-SceI 発現により細胞内で 1 カ所導入した

DNA-DSB がどのように修復されるかを解析した。また、CRISPR を用い、部位特異的に導入した DNA-DSB がどのように修復されるかを解析した。

4. 研究成果

(1) 遺伝多型として存在するテロメア配列挿入

オンライン上でアクセス可能な次世代シーケンスによる全ゲノムシーケンスデータから、異なる民族背景の健常 52 人のデータを解析し、ヒトゲノムの中に遺伝子多型として (TTAGGG)_n の反復配列挿入があることを見いだした。その中の一つは領域が 5kbp 欠失し、そこに 60bp の (TTAGGG)_n 配列が挿入されているものである (図 1)。欠失により当該領域の遺伝子 AKNAD1 の 1 エクソンがまるごと失われており、この個人ではこの遺伝子は 1 アリルしか存在しない事になる。この遺伝子多型は、JPT (日本人東京)、HCB (中国人北京) のそれぞれ 1 個人に共通した配列であり、東アジア地域に共通祖先がいたものと思われる。この現象は過去の 1 個体の生殖細胞において生理的な DNA-DSB 部位がテロメア配列挿入によって修復された事を示唆している。



本研究の過程で、ヒトゲノムの遺伝多型として、様々な“配列挿入”多型が存在する事が明らかとなった。配列はランダムな塩基の挿入ではなく“鋳型”のあるもので、多くは数 100bp の長さで、ゲノム上の他部位の配列だった。“鋳型配列”には、これまで知られていた LINE, SINE などのレトロトランスポゾン、cDNA 状の偽遺伝子その他、ミトコンドリア由来配列、テロメアリピート、ポリ A 付加された非コード領域の配列などがあった。これらの挿入多型を“鋳型配列挿入多型” (TSIPs: templated sequence insertion polymorphisms) と名付けた。TSIPs には 2 つのパターンがあり、ポリ A 付加された配列が、レトロトランスポゾンの挿入認識配列 (TTTT/A) 部位に挿入され、挿入部位の両端に target site duplication (TSD) がある Class1 と、領域が欠失した上で、挿入配列の両端が微小ホモロジーを有して結合し、TSD を欠く Class2 に分類した。Class2 の TSIPs は DNA 二重鎖切断部位が、欠失+挿入で修復された痕跡と考えられた。ヒト集団において

Class2 TSIPs は Class1 TSIPs よりも数が多く、進化的により新しい時期に起きている事が推察された。対象とした 52 人の異なる民族背景の集団を、アフリカ、アジア、ヨーロッパ、アメリカの 4 地域に再分類し検討したところ、TSIPs のバリエーションはアフリカ地域の個人でもっとも多い事が明らかとなった。これは人類遺伝学研究におけるミトコンドリア DNA や Y 染色体での検討と同様の結果であり、現生人類の起源がアフリカであることを裏付けるものである。

鋳型配列挿入による遺伝子修復は遺伝病やヒトゲノムの多様性を産む可能性がある。ある遺伝子のイントロンに、他の遺伝子のエクソンが挿入された場合、新たな遺伝子産物が生成される可能性があり、ヒトのゲノム進化を考える上で重要な発見となった。

(2) 実験系での DNA 損傷部位へのテロメア配列挿入

I-SceI や CRISPR によって細胞内に導入した DNA-DSB は (TTAGGG)_n の配列挿入によって修復され得ることを確認した。(TTAGGG)_n 配列の挿入が、テロメア領域から切り出されて来たものではなく、DNA 損傷部位でテロメラーゼによって合成されたものであることを示すため、テロメラーゼ (TERT) およびそのドミナントネガティブ型 (TERT DN) の発現ベクターを作成し実験を継続している。

当初、DNA 切断部位を PCR 増幅し、TA クローニングして切断部位の挿入配列を確認していたが、この方法では時間労力がかかるため、PCR 産物を次世代シーケンズ技術でディープシーケンズすることで、DNA 切断部位の修復機序 (欠失、挿入) を網羅的に解析する方法を確立した。

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 3 件)

MLL rearrangements impact outcome in HOXA-deregulated T-lineage acute lymphoblastic leukemia: A children's oncology group study.

Matlawska-Wasowska K, Kang H, Devidas M, Wen J, Harvey RC, Nickl CK, Ness SA, Rusch M, Li Y, Onozawa M, Martinez C, Wood BL, Asselin BL, Chen IM, Roberts KG, Baruchel A, Soulier J, Dombret H, Zhang J, Larson RS, Raetz EA, Carroll WL, Winick NJ, Aplan PD, Loh ML, Mullighan CG, Hunger SP, Heerema NA, Carroll AJ, Dunsmore KP, Winter SS.

Leukemia. 2016 Mar 8. doi: 10.1038/leu.2016.60.

査読有り

Thymic expression of a T-cell receptor targeting a tumor-associated antigen coexpressed in the thymus induces T-ALL. Cui Y, Onozawa M, Garber HR, Samsel L, Wang Z, McCoy JP, Burkett S, Wu X, Aplan PD, Mackall CL.

Blood. 2015 May 7;125(19):2958-67

査読有り

Landscape of insertion polymorphisms in the human genome.

Onozawa M, Goldberg L, Aplan PD.

Genome Biol Evol. 2015 Mar 4;7(4):960-8.

査読有り

[学会発表](計 1 件)

ヒトゲノムにおける欠失多型の解析

小野澤真弘, Peter Aplan, 豊嶋崇徳

第 60 回日本人類遺伝学会総会、2015 年 10 月 15 日、京王プラザホテル (東京都・新宿区)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野澤 真弘 (ONOZAWA, Masahiro)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 70455632

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

(4)研究協力者

アプラン ピーター (APLAN, Peter)
NIH/NCI Genetics branch, Senior
investigator

宮下 直洋 (MIYASHITA, Naohiro)