

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：14301
研究種目：基盤研究(A) (一般)
研究期間：2015～2017
課題番号：15H02383
研究課題名(和文) テロメア反応トランスアクションの研究

研究課題名(英文) Transactions of telomere components

研究代表者

石川 冬木 (Ishikawa, Fuyuki)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：30184493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,100,000円

研究成果の概要(和文)：CST複合体はCtc1, Stn1, Ten1の三因子からなる一本鎖DNA結合蛋白質複合体である。本複合体は出芽酵母、分裂酵母から哺乳類、植物まで保存されているが、その詳細な機能については不明な点が多かった。分裂酵母において同複合体は生存に必須であるが、本研究において我々は、先ず分裂酵母Stn1をコードするstn1遺伝子の温度感受性変異株stn1-1を取得した。次にstn1-1を許容温度、半許容温度、非許容温度において本複合体機能を低下させたときに、サブテロメアおよびリボソームRNA遺伝子における複製フォークの進行に必要なことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The CST complex consists of three subunits of CTC1, STN1 and TEN1. It is phylogenetically conserved among budding yeast, fission yeast, mammals and plants, but its exact function remains to be explored. Because in fission yeast, stn1 is essential, we isolated a temperature-sensitive mutant stn1-1. Culturing stn1-1 in permissive, semi-permissive or non-permissive temperatures, we found that Stn1 is required for efficient progressing of DNA replication fork at subtelomeres. When stn1 is dysfunctional, replication forks fails to complete replication to the very end of telomere, leading to massive loss of subtelomeres and telomeres in a couple of cell cycles.

研究分野：分子生物学

キーワード：テロメア DNA複製 相同性DNA組換え リボソームDNA

1. 研究開始当初の背景

染色体テロメアは、真核生物がもつ線状染色体の末端部分をさし、DNA 末端を含む特殊なクロマチン構造である。DNA 末端には反応性に富む 3'水酸基があり、容易に他の DNA 末端と結合反応をおこす。異なる染色体のテロメア同士が末端結合した二動原体染色体は細胞分裂期において動原体間の断裂を来しやすい。また、DNA 末端は細胞中がもつ DNA 末端消化酵素の標的となりうる。このような反応は、ゲノム DNA の不安定化を引き起こし、細胞死や発がんを招く。テロメアの第一の機能は、テロメア DNA 末端が、単純な DNA 2 本鎖切断部位と同じように DNA 修復経路や損傷チェックポイントの活性化を来すことがないようにそれを保護することである。一方、複製 DNA 合成酵素は、DNA 最末端を完全には複製できないために、細胞分裂のたびにテロメア長が短縮する(末端複製問題)。生殖細胞やがん細胞など、無限増殖可能な細胞はテロメラーゼを特異的に活性化させてテロメア短小化を代償するが、ほとんどの正常体細胞はテロメラーゼ活性をもたず、テロメアがある長さまで短くなると、細胞老化をおこし、不可逆的な増殖停止状態になる。テロメアの第二の機能は、細胞増殖によってテロメアを失わないように DNA 複製とテロメラーゼ反応を制御することである。このように、テロメアのいくつかの生物学的意義は理解され、それをもたらす分子機構の解明も進みつつあるが、以下のように多くの重要な問題点が未解明なままである。

2. 研究の目的

以下の3点について、分子レベルで検討を行う。

- (1) テロメア末端保護の分子実態
- (2) テロメア保護構造と細胞周期
- (3) 末端保護と DNA 複製以外のテロメア機能

3. 研究の方法

- (1) テロメア末端保護の分子実態

テロメアは染色体ゲノム DNA 末端部分(テロメア DNA)とヒストンなどの配列非特異的結合蛋白質、およびシエルタリン複合体や CST 複合体などのようなテロメア配列特異的結合蛋白質からなる。テロメア DNA 最末端部分には、グアニンに富む鎖(G鎖)が3'末端一本鎖突出をしていることが知られている(G tail)。G tail 最末端塩基のリボース 3'水酸基は、その他のヌクレオチドの三リン酸を求核攻撃することで末端結合反応を起こす。また最末端塩基とその一つ前の塩基の間のリン酸エステル結合は 3'エクソヌクレアーゼによる DNA 末端消化反応の標的である。このことから、最末端塩基は一本鎖 DNA の自由末端として存在するのではなく、同じテ

ロメアのより近位(セントロメアに近い)二本鎖 DNA に鎖侵入して D loop を形成していると提唱されている。この t-loop 構造は、これまでに細胞から調出されたテロメア DNA 断片を電子顕微鏡や STORM (stochastic optical reconstruction microscopy)などの超分解能顕微鏡でそれを指示する構造体が観察されてきた。しかし、これらの形態観察は細胞内にあるテロメアの状態を反映するとは限らない。そこで、本研究では、東京工業大学・理学研究科の藤芳暁博士が開発している極低温下で分子解像度において蛍光を三次元で観察できる顕微鏡を利用して、細胞内にある(固定され極低温(数 K)で保存されている)テロメアを分子レベルで解析することを目標とする。

- (2) テロメア保護構造と細胞周期

- (3) 末端保護と DNA 複製以外のテロメア機能

我々が同定した哺乳類テロメア一本鎖 DNA 結合蛋白質複合体である CST 複合体は DNA 合成酵素 α と物理的・遺伝学的に相互作用することから DNA 複製反応に関わることが明らかであるが、間接的証拠から本複合体はそれ以外の機能をもつことが予想されたため、分裂酵母 CST 複合体(Cに相当する因子が未同定であるため ST 複合体とよぶ)と哺乳類 CST 複合体について、その可能性を検討する。

4. 研究成果

- (1) テロメア末端保護の分子実態

本研究については、分子を特異的に蛍光標識するための色素化合物の選定、極低温に耐えられる顕微鏡躯体および光学系の設計を終了させたの(JACS, 139: 8990, 2017)。今後、実際に細胞内テロメア構造を観察できるか否かを検討する。

- (2) テロメア保護構造と細胞周期

- (3) 末端保護と DNA 複製以外のテロメア機能

まず分裂酵母 ST 複合体について詳細な遺伝学的解析を実施した。S 因子 STN1 および T 因子 TEN1 をコードする遺伝子 *stn1* および *ten1* は成育に必須な遺伝子であるため、その機能解析のための方法のひとつは温度感受性株を得ることである。*stn1* 遺伝子に PCR によるランダム突然変異を導入して温度感受性株 *stn1-1* を得た。*stn1-1* がコードする Stn1-1 蛋白質は野生型に比べて H17M および M180I のミスセンス突然変異をもつ。*stn1-1* は 26°C では増殖可能であるが(許容温度) 36°C では生存できない(非許容温度)。そこで、26°C で培養した *stn1-1* を 36°C に培地温度を変化すると、4 時間後には 50%以上のテロメア DNA が失われることが分かった。その原因を詳細に検討した結果、ST 複合体はサブテロメア領域の DNA 複製に必須であって、その機

能が低下すると、内部（セントロメア方向）からテロメアに向かって複製を進めてきた複製フォークがサブテロメア領域で停止し、未複製の残りのサブテロメアとテロメアが失われることを示した。この成果は、CST複合体がテロメア DNA のみならずサブテロメア DNA の複製にも必要であることを明らかにしたのは本報告が最初である(Nucl Acids Res, 45: 1255, 2017)。

次に、ST複合体はテロメア・サブテロメア以外の特定の領域の DNA 複製にも必要であることを示した。*stn1-1* 株を半許容温度で培養すると、リボソーム RNA をコードする rDNA 領域の DNA 複製能が低下することを DNA 複製反応中間体を検出する 2 次元電気泳動法により明らかとなった。rDNA は 1 コピーが約 10 kb の配列が染色体上の 2 箇所において、それぞれ数十～150 コピータンデムに繰り返していることを特徴としている。分裂酵母ゲノム DNA を 8 塩基認識制限酵素である SfiI で切断し、繰り返し全体の長さを PFGE (pulse field gel electrophoresis) で測定すると、野生株では約 900 kb および約 200 kb の明瞭なふたつの rDNA を含むバンドを検出することができるが、単一細胞から増殖させた半許容温度下の *stn1-1* クローンは、増殖回数が増加とともに、明瞭なバンドとはならずスミア状のシグナルを示した。この場合、rDNA 領域に DNA 二重鎖切断 (DSB) マーカーである phospho-H2A ヒストンと相同組換え反応マーカーである Rad52 が蓄積していた。このことから、ST複合体機能が低下していると、rDNA 領域において DNA 複製フォークの進行が停止し、その結果、DSB が高頻度で生じ、その修復過程に DNA 相同組換えは用いられることでリピート数が変化したものと考えられた (論文投稿準備中)。

次にヒトおよびマウス細胞株を用いて CST 複合体の C 因子である *CTCF* 遺伝子をノックダウンすると、ある種の DNA 修復ができないことを示した。この結果は現在投稿準備中であるが、CST 複合体が DNA 修復反応に必要であることはこれまでに報告されていない。

以上のように、本研究によって 1 本鎖 DNA 結合能をもつテロメア蛋白質 CST 複合体は、テロメア領域のみならずゲノム内の特定の領域において多彩な機能を持つことが示された。

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 4 件)

1. Hirai, Y., Tamura, M., Otani, J., and Ishikawa, F. (2016). NEK6-mediated phosphorylation of human TPP1 regulates

telomere length through telomerase recruitment. *Genes Cells*, 21(8): 874-889

2. Takikawa, M., Tarumoto, Y., and Ishikawa, F. (2017). Fission yeast Stn1 is crucial for semi-conservative replication at telomeres and subtelomeres. *Nucleic Acids Res*, 45 (3): 1255-1269.
3. Furubayashi, T., Motohashi, K., Wakao, K., Matsuda, T., Kii, I., Hosoya, T., Hayashi, N., Sadaie, M., Ishikawa, F., Matsushita, M., and Fujiyoshi, S. (2017) Three-dimensional localization of an individual fluorescent molecule with angstrom precision. *J. Am. Chem. Soc.* 139(26): 8990-8994.
4. Okumura, K., Saito, M., Yoshizawa, Y., Munakata, H., Isogai, E., Miura, I., Wakana, S., Yamaguchi, M., Shitara, H., Taya, C., Karaplis, A.C., Kominami, R., and Wakabayashi, Y. The parathyroid hormone regulates skin tumour susceptibility in mice. *Scientific Reports.* 7 (1) : 11208. (2017).

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 石川冬木 “Refreshing telomeres” 第 2 回 IFOM-京都大学 合同シンポジウム The 2nd IFOM - KU Joint Symposium 「Perspectives in cancer biology: Genomic variations and host-tumor interactions」, 2015 年 10 月 6 日～7 日 (発表日: 10/6) (京都市、芝蘭会館)
2. 石川冬木 「ミトコンドリア・核ゲノム間関による老化制御」国際高等研究所研究プロジェクト「クロマチン・デコーディング」, 2015 年 12 月 19 日～20 日 (発表日 12/20) (京都府木津川市、国際高等研究所)
3. Yusuke Shima, Yuzo Watanabe, and Fuyuki Ishikawa “CST complex in the base excision repair (BER) pathway” EMBO conference on Telomeres, Telomerase and Disease, 2016 年 4 月 26 日～5 月 1 日 (発表日: 4/27) (Crowne Plaza Liège, Liege, Belgium)
4. Masahiro Takikawa, Io Yamamoto, Fuyuki Ishikawa “Stn1 functions at non-telomeric regions in fission yeast” Cold Spring Harbor Asia Conference 「telomere and telomerase」,

2016年9月5日～9日(発表日:9/9)
(Suzhou, China, Worldhotel Grand
Dushulake Suzhou)

5. Shoma Ishikawa and Fuyuki Ishikawa
“Cellular senescence in post-mitotic cells”
第一回日仏交流ワークショップ
「CELLULAR SENESENCE and AGING
IN CANCER AND DISEASES」, 2016年10
月31日～11月2日(発表日:11/2)(京
都市、コープイン京都)
6. Fuyuki Ishikawa “Fission yeast
telomere-binding proteins Taz1 and Rap1 are
required for preventing GCR (gross
chromosomal rearrangements) formation”
CSH telomere meeting, 2017年5月2日～5
月6日(発表日:5/5)(Cold Spring Harbor
Laboratory, Cold Spring Harbor, New York,
USA)
7. Fuyuki Ishikawa “Cellular Senescence in
Post-mitotic Cells” 東北大学知のフォー
ラムテーマプログラム"ASC"、2017年5月
10日～5月12日(発表日:5/11)(東北
大学加齢医学研究所)
8. 石川 冬木「テロメア維持の分子機構:テ
ロメラーゼとALT (alternative lengthening
of telomeres)」第35回日本脳腫瘍病理学
会、2017年5月18日～20日(発表日:
5/19)(栃木県総合文化センター)
9. 石川冬木 「マイトホルミシス」第14
回レドックス・ライフイノベーションシ
ンポジウム 2017年10月26日(木)～27
日、東北大学医学部星稜オーデトリ
アム
10. 石川冬木「テロメア・細胞ストレスと寿
命・がん化」第22回静岡健康・長寿学
術フォーラム11月24日(金)～25日 静
岡県コンベンションツアーセンター「グ
ランシップ」(発表日11/25)

〔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〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川冬木 (ISHIKAWA, Fuyuki)
京都大学・大学院生命科学研究所・教授
研究者番号: 30184493

(2) 研究分担者

若林 雄一 (WAKABAYASHI, Yuichi)
千葉県がんセンター研究所・発がん研究
グループ・室長
研究者番号: 40303119

藤芳 暁 (FUJIYOSHI, Satoru)
東京工業大学・大学院理学院・助教
研究者番号: 70371705

(3) 連携研究者・研究協力者
該当なし