

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2010～2014

課題番号：22220012

研究課題名(和文) 発がんにおけるテロメア機能

研究課題名(英文) Telomere Functions in Cancer Development

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) 167,400,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞は勝手に「賢く」なって、患者との「戦い」に勝つように見える。がん細胞は正常細胞と異なり、自分もつ遺伝子・染色体を、自分の都合が良いようにさまざまに変化させることができる。このことが、がん細胞の「自律的な悪性化」の理由である。本研究では、CST複合体と呼ばれるタンパク質に注目して、その正確な機能を明らかにするとともに、その異常がどのようにがん細胞に利用されているのか解明を試みた。

研究成果の概要(英文)：When you get cancers, it appears that they automatically become clever: They frequently relapse after surgical resection, chemo and radiation therapy, and resist to the second line of therapies. Since we have recently witnessed outstanding advances in genetic dissection of cancer DNAs, we now need to understand molecularly how cancer cells acquire malignant phenotypes (progression). One key step of the progression is that cancer cells modify genetic materials so that it contributes to their continuous growth. In this study, we focus on telomeres, a specific domain comprising chromosomal termini. We previously isolated a protein complex called CST (Ctc1-Stn1-Ten1), which facilitates DNA replication in both normal and cancer cells. Here, we investigated details of the function of the CST complex. Results allowed us to propose how normal CST function is important for preventing cancer development and progression.

研究分野：腫瘍学

キーワード：ゲノム不安定性 テロメア 皮膚発がん 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

染色体末端テロメアは、線状ゲノム DNA の物理的末端部分を含む染色体ドメインである。一般的に、DNA 末端は、DNA 損傷チェックポイントを活性化させるとともに、DNA 末端結合反応、DNA 消化酵素による短小化、DNA 相同組換え反応などの DNA 修復反応の基質となり、遺伝的不安定性をもたらすが、テロメア DNA はテロメア蛋白質との結合によって特徴的なクロマチン構造を形成し、これらの反応を阻止している。従って、テロメアの第一の機能は、テロメア DNA 末端を保護することにある。

一方、テロメア DNA はヒトを含む脊椎動物において、TTAGGG・CCCTAA の 6 塩基対で構成されるテロメア繰り返し配列からなり、そこにテロメア結合蛋白質が結合するため、ヘテロクロマチンを形成してトランス因子の作用を妨げている。そのため、テロメアおよびその近傍領域は、DNA 複製フォークは進行が遅く、フォークの停止・崩壊が起こりやすい複製困難領域の一つであることが知られていた。テロメアの第二の機能は、このように不安定な DNA 複製反応を促進してテロメア DNA の複製を保証することにある。

ゲノムには多くの複製困難領域が存在することが知られているが、それらの多くは染色体脆弱部位 (fragile site) と呼ばれ、細胞に複製ストレスが作用したときに切断を受けやすく、がん細胞では染色体転座や欠失のホットスポットとなることが知られている。しかし、脆弱部位ではどのような分子機構に基づいて異常染色体が生じるのかは十分に明らかにされていない。

2. 研究の目的

古く、B. McClintock はテロメア機能の喪失は異常染色体形成をもたらすことを細胞遺伝学的に示した。その後、上述したようにテロメアが複製困難領域であって、染色体脆弱部位でもあることが示されたため、がん細胞においてはテロメアにおける複製フォークの機能低下が異常染色体の出現の一因である可能性が示唆される。

我々は、哺乳類細胞テロメア結合因子である CST 複合体 (CTC1-STN-TEN1 複合体) を初めて同定・報告してきた (Mol Cell, 36: 193, 2009)。本研究の目的は、CST 複合体がテロメア DNA 複製をはじめとするいかなる DNA 代謝に関わるのかを明らかにし、その機能異常がどのような分子機構によって染色体不安定化をもたらすのかを明らかにすることにある。

3. 研究の方法

分裂酵母の遺伝学的実験は常法に従った。アフリカツメガエル卵抽出液より濃縮した核質抽出液 (NPE, nucleoplasmic extract) を用いた試験管内プラスミド DNA 複製系は

既報に従った (Mol Cell, 1: 519, 1998)。マウス Ctc1 遺伝子の第 1 エキソンおよびその上流領域を 2 個の flox 配列で囲った cre 誘導可能な Ctc1 ノックアウトマウスは、理研清成 寛博士等との共同研究で作出された (藤田祥子他、未発表)。

4. 研究成果

(1) アフリカツメガエル卵抽出液を用いた脊椎動物 CST 複合体の複製反応における機能の解明 (JBC, 287: 619, 2011)

出芽酵母 Stn1 ホモログは DNA 合成酵素 α の B サブユニットと結合することが報告されている (Genes & Dev. 18:992, 2004)。また、CST 複合体の報告後、その 3 因子のうちの 2 因子は、DNA 合成酵素 α 付属因子としてその酵素活性を刺激する因子として報告されていた活性 (JBC 265: 13231, 1990) の分子実体であることが分かった。これらのことから、CST 複合体は DNA 合成酵素 α ・プライメース活性を制御する因子であることが示唆された。この仮説を検証するために、アフリカツメガエル卵 NPE による試験管内複製系を利用して、NPE から免疫除去によって Stn1 を除去したものと対照 NPE の複製反応の差を検証した。その結果、二本鎖環状 DNA の複製反応効率には両者のあいだで差が認められない一方、一本鎖環状 DNA を鋳型に用いた DNA 新規合成反応は免疫除去 NPE で著明に反応効率が低下していた。このことから、CST 複合体は半保存的 DNA 複製反応には必要ではないが、一本鎖 DNA を鋳型に用いる新規 DNA 合成には必要であることが明らかになった。テロメア DNA が複製される時、一方の鎖 (グアニンに富む G 鎖) はリーディング反応によって DNA 末端まで複製されるが、反対鎖である C 鎖はラギング反応によって複製されるため末端まで複製されず DNA 端は 3' 突出となることが知られている (Mol Cell Biol, 21: 5753, 2001)。そのため、DNA 複製後、C 鎖の 5' 陥入部位を新規 DNA 合成によってフィルインする必要性が想定されているが、CST 複合体はこの反応に必要な可能性がある。

(2) 分裂酵母 Stn1 蛋白質の機能解析

分裂酵母では、CST 複合体の 3 因子のうち Stn1 と Ten1 ホモログが知られているが、Ctc1 ホモログはいまだ報告されていない (Proc Natl Acad Sci, 104: 14038, 2007)。stn1 あるいは ten1 遺伝子は必須であるため、我々は、stn1 遺伝子の高温感受性株 stn1-1 を単離同定した。この株は許容温度 25°C では野生株と同じように増殖するが、制限温度 36°C では増殖速度が低下する。我々は、stn1-1 を許容温度から制限温度に移して 4 時間後には、テロメア DNA およびその内部隣接領域であるサブテロメア領域が失われることを見出した。これは、テロメレース欠損株のようにテロメアが徐々に短小化する

のではなく、S 期を 1 回通過することで突然欠失することを特徴とした。2 次元電気泳動による DNA 複製中間体の解析結果から、制限温度下の *stn1-1* 株では、ゲノム全体として複製反応に異常が見られない一方、サブテロメアの複製フォークが高頻度で崩壊することが明らかになった。以上のことから、CST 複合体はサブテロメア領域のような限られた部位の半保存的複製を効率よく進めるのに必要であることが分かった（滝川雅大他、論文投稿中）。

(3) 哺乳類 CST 複合体の塩基除去修復における役割

ヒトおよびマウス CST 複合体の結合因子を同定する目的で、CST 複合体を特異抗体で免疫沈降した後に共沈蛋白質を質量分析器を用いて同定することを試みた。その結果、塩基除去修復に関わる蛋白質が複数同定された。一方、特異抗体を用いた哺乳類細胞の免疫染色、クロマチン免疫沈降法による解析から、CST 複合体はテロメア領域のみならず、ゲノム内に散在するグアニンに富む配列が 4 個以上タンデムに並ぶ場合に形成される DNA 高次構造 *guanine quadruplex*（以下、G4）領域にも局在することが分かった。正常 DNA がもつ 4 種類の塩基の中で、グアニンは最も酸化を受けやすい塩基であり、塩基除去修復は酸化グアニンを取り除いて正常なグアニンを入れ戻す DNA 修復経路である。これらのことから、CST 複合体はゲノム全体の酸化グアニン修復に必要であることが推定された。実際、*Ctc1* ノックアウト細胞は、対照細胞に比べて酸化グアニンが蓄積しやすいことがわかり、CST 複合体が塩基除去修復に必要であることを示した（嶋 祐輔他、論文準備中）。

G4 領域にある DNA 高次構造は複製反応を阻害しやすいことから、G4 領域は複製困難領域であって染色体異常形成のホットスポットとなる可能性がある。一方、G4 を作るグアニンが酸化を受けると G4 が不安定となる通常のワトソン・クリック結合による二本鎖 DNA に変換されやすいことも報告されている。G4 は *myc*, *ras* 遺伝子などの発がんを促進するがん遺伝子のプロモーター領域にしばしば観察され、それらの遺伝子の発現制御を行うことも知られている。従って、CST 複合体による酸化グアニンの塩基除去修復は、領域の DNA 複製反応効率の制御、および、近傍がん関連遺伝子の発現制御を介してがん細胞の悪性化に影響を与えることが考えられた。

(4) 成果のまとめ

本研究により、CST 複合体について、1) 半保存的 DNA 複製ではない新規 DNA 合成に必要である、2) サブテロメアのような複製困難領域の複製効率の維持に必要である、3) ゲノムワイドな塩基除去修復反応に必要

であって、G4 構造の制御を介したゲノム不安定性に関わる可能性がある、の三点を明らかにすることができた。今後、がん細胞にこれらの分子機構の破綻が悪性化に貢献する可能性を検討する予定である。

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 10 件）

1. Wakai, M., Abe, S., Kazuki, Y., Oshimura, M., Ishikawa, F. 「A human artificial chromosome recapitulates the metabolism of native telomeres in Mammalian cells」 *PLoS One*, 9(2): e88530, 2014, 査読あり, doi: 10.1371/journal.pone.0088530.
2. Tarumoto, Y., Kanoh, J., and Ishikawa, F. 「Receptor for activated C-kinase (RACK1) homolog Cpc2 facilitates the general amino acid control response through Gcn2 kinase in fission yeast」 *J Biol Chem*, 288(26): 19260-19268, 2013, 査読あり, doi: 10.1074/jbc.M112.445270.
3. Ishikawa, F. 「Portrait of Replication Stress Viewed from Telomeres」 *Cancer Sci*, 104(7) : 790-794, 2013, 査読あり, doi: 10.1111/cas.12165.
4. Tashiro, S., Asano, T., Kanoh, J., and Ishikawa, F. 「Transcription-induced chromatin association of RNA surveillance factors mediates facultative heterochromatin formation in fission yeast」 *Genes Cells* 18(4): 327-339, 2013, 査読あり, doi: 10.1111/gtc.12038.
5. Tanimura, N., Saito, M. Ebisuya, M., Nishida, E., and Ishikawa, F. 「Stemness-related Factor Sall4 Interacts with Transcription Factors Oct-3/4 and Sox2 and Occupies Oct-Sox Elements in Mouse Embryonic Stem Cells」 *J Biol Chem* 288(7), 5027-38, 2013, 査読あり, doi: 10.1074/jbc.M112.411173.
6. Chujo, M., Tarumoto, Y., Miyatake, K., Nishida, E., and Ishikawa, F. 「HIRA, a conserved histone chaperone plays an essential role in low-dose stress response via transcriptional stimulation in fission yeast」 *J Biol Chem* 287(28), 23440-23450, 2012, 査読あり, doi: 10.1074/jbc.M112.349944.
7. Hirai, Y., Masutomi, K., and Ishikawa, F. 「Kinetics of DNA replication and telomerase reaction at a single-seeded telomere in human cells」 *Genes*

- Cells*17, 186-204, 2012, 査読あり, doi: 10.1111/j.1365-2443.
8. Yamazaki, H., Tarumoto, Y., and Ishikawa, F. 「Tel1ATM and Rad3ATR phosphorylate the telomere protein Ccq1 to recruit telomerase and elongate telomeres in fission yeast」 *Genes Dev*26, 241-246, 2012, 査読あり, doi: 10.1101/gad.177873.111.
 9. Nakaoka, H., Nishiyama, A., Saito, M., and Ishikawa, F. 「Xenopus laevis Ctc1-Stn1-Ten1 (x CST) complex is involved in priming DNA synthesis on single-stranded DNA template in Xenopus egg extract」 *J Biol Chem*287(1), 619-627, 2012, 査読あり, doi: 10.1074/jbc.M111.263723.
 10. Muraki, K., Nabetani, A., Nishiyama, A., and Ishikawa, F. 「Essential roles of Xenopus TRF2 in telomere end protection and replication」 *Genes Cells*16, 728-739, 2011, 査読あり, doi: 0.1111/j.1365-2443.2011.01520.x.
- [学会発表] (計 44 件)
1. 石川冬木 「Refreshing telomeres」 染色体研究の最前線 - Forefront of Chromosome Study、2015年8月10日(京都市、先端科学研究棟大セミナー室)
 2. 石川冬木 「ホルメーシスとはなにか」 鹿児島大学大学院セミナー、2014年12月17日(鹿児島市、鹿児島大学)
 3. Fuyuki Ishikawa 「How telomerase is recruited to telomeres in human cells」 4th 日仏がんワークショップ、2014年11月20日(京都市、関西セミナーハウス)
 4. Fuyuki Ishikawa 「Telomere, Aging and Cancer」 14th 日独がんワークショップ、2014年11月14日(Adina Apartment Hotel am Hauptbahnhof (conference room), Berlin, Germany)
 5. Fuyuki Ishikawa 「テロメレーズのテロメアリクルートメント制御/Molecular mechanisms of telomerase recruitment」 第73回日本癌学会学術総会、2014年9月26日(横浜市、パシフィコ横浜)
 6. Fuyuki Ishikawa 「How telomerase is recruited to telomeres in human cells」 京都大学・国立台湾大学共催シンポジウム (KU-NTU シンポジウム)、2014年9月1日(京都市、京都大学芝蘭会館別館、京都大学百周年時計台記念館 百周年記念ホール)
 7. 石川冬木 「テロメア DNA 結合蛋白質 CST」 第16回生命科学科シンポジウム、2014年7月1日(京都市、京都大学芝蘭会館)
 8. 石川冬木 「Telomere DNA Replication」 高等研カンファレンス 2014 「chromatin decoding」、2014年5月12日(京都府、国際高等研究所)
 9. 石川冬木 「低容量ストレス反応」 第2回発がん進化の会、2014年3月8日(新潟県東蒲原郡阿賀町、新潟古澤屋旅館)
 10. 石川冬木 「染色体テロメアと細胞の老化、がん化 (Telomeres, Aging and Cancer)」 The Kyoto University and National Taiwan University Joint Symposium 2013 (招待講演)、2013. Dec. 19 (Taiwan University, Taiwan, China)
 11. Fuyuki Ishikawa 「Low - dose stress responses」 3rd 日仏がんワークショップ (招待講演)、2013. Nov 20 (Hotel Mercure Toulouse Compans Caffarelli, Toulouse, France)
 12. 石川冬木 「テロメア機能不全による染色体不安定性」 第72回日本癌学会学術総会 (招待講演)、2013年10月3日(横浜市、パシフィコ横浜)
 13. 石川冬木 「テロメアストレスと細胞老化」 第77回日本皮膚科学会東部支部学術大会 (招待講演)、2013年9月21日(さいたま市、大宮ソニックシティ)
 14. 石川冬木 「テロメアとテロメレーズの制御機構」 最先端酵素学シンポジウム (招待講演)、2013年5月31日(徳島市、徳島大学大塚講堂)
 15. 石川冬木 「老化分子機構の多義性」 国際高等研究所第2回「老いを考える」研究会 (招待講演)、2013年02月02日(京都府、国際高等研究所)
 16. 石川冬木 「テロメアと染色体組換え」 平成24年度「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム (招待講演)、2013年01月30日(東京都、学術総合センター 一橋記念講堂)
 17. 石川冬木 「細胞老化における NF-kappaB 経路の役割」 第35回日本分子生物学会年会 (招待講演) 2012年12月13日(福岡県、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡)
 18. Fuyuki Ishikawa 「 Chromosomal rearrangements in fission yeast with dysfunctional telomeres」 日仏がんワークショップ (招待講演)、2012年11月30日(徳島県、グランドエクスィブ鳴門)
 19. 石川冬木 「高校生のためのがん研究入門」 がん研究の現在・未来 (招待講演)、2012年11月17日(石川県、金沢歌劇座)
 20. 石川冬木 「CST Complex in Telomere DNA Replication」 Keystone Symposia Aging and Diseases of Aging (S2) (招待講演)、2012年10月25日(東京都、シエラト

- ン都ホテル東京)
21. 石川冬木「テロメアと発癌」第74回日本血液学会学術集会(招待講演)、2012年10月19日(京都市、国立京都国際会館)
 22. 石川冬木「がん細胞を標的にする」第20回日本癌学会市民公開講座「がん先端研究とがん治療の現在・将来」(招待講演)、2012年09月22日(北海道、札幌市民ホール)
 23. Fuyuki Ishikawa 「Telomere dysfunctions and chromosome instability」第71回日本癌学会学術総会(招待講演)、2012年9月20日(札幌市、ロイトン札幌)
 24. 石川冬木「テロメアの複製とDNA組換え」第14回生命科学研究所シンポジウム、2012年07月11日(京都市、京都大学芝蘭会館)
 25. 石川冬木「テロメアの生化学:テロメアはDNA損傷チェックポイント分子が好きか嫌いか?」生化学会北陸支部集会(招待講演)、2012年5月26日(金沢市、金沢歌劇座)
 26. 石川冬木「テロメラーゼによるテロメアDNA伸長機構」第49回日本臨床分子医学会学術集会(招待講演)、2012年4月14日(京都市、みやこめっせ)
 27. Fuyuki Ishikawa 「Conserved molecular architectures of telomere chromatin in eukaryotes」第34回日本分子生物学会年会(招待講演)、2011年12月14日(横浜市、パシフィコ横浜)
 28. Fuyuki Ishikawa 「Molecular mechanisms of controlling telomerase reaction in fission yeast」日仏がんワークショップ(招待講演)、2011年11月22日(Mercure Hotel, Montpellier, France)
 29. Fuyuki Ishikawa 「Highly conserved molecular architectures of telomeres in eukaryotes」日米がん研究協力事業ワークショップ(招待講演)、2011年10月25日(京都市、京都ホテルオークラ)
 30. Fuyuki Ishikawa 「Telomere Dysfunction and Genetic Instability」第70回日本癌学会学術総会(招待講演)、2011年10月4日、(名古屋市、名古屋国際会議場)
 31. 石川冬木「テロメアの維持機構とテロメア短小化症候群」第14回間質性肺炎細胞分子病態研究会(招待講演)、2011年8月20日、(東京都、シェーンパツハ・サボー(砂防会館))
 32. 石川冬木「ヒストン修飾 mRNA 分解」第13回生命科学研究所シンポジウム、2011年7月7日(京都市、京都大学芝蘭会館)
 33. Fuyuki Ishikawa 「How do telomeres sense their length?」第9回京都大学・国立台湾大学合同「分子細胞生物学シンポジウム」(招待講演)、2011年6月4日(京都市、京都大学吉田構内 総合人間学部棟)
 34. 石川冬木「細胞老化:持続的炎症がもたらす生体防御反応」第11回日本抗加齢医学会総会(招待講演)、2011年5月27日(京都市、国立京都国際会館)
 35. Fuyuki Ishikawa 「The sequence of events at a single human telomere in S phase」Telomeres and Telomerase (招待講演)、2011年5月3日(Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA)
 36. 石川冬木「テロメア機能構造の維持機構とその破綻によるゲノム不安定性」新潟大学特別講義(招待講演)、2011年2月19日(新潟市、新潟大学医学部)
 37. Fuyuki Ishikawa 「Regulation of telomerase by PIKK family kinases Tel1 (ATM) and Rad3 (ATR) through shelterin complex in fission yeast」BMB2010(第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会)(招待講演)、Dec 9, 2010(Kobe Port Island, Kobe)
 38. 石川冬木「がん細胞と肉腫細胞におけるテロメラーゼ依存的と非依存的テロメア維持機構」第21回小児固形腫瘍研究会(招待講演)2010年11月19日(京都市、京都大学医学部芝蘭会館)
 39. 石川冬木「Bridge over troubled water」大阪市立大学理学研究科主催セミナー(招待講演)、2010年10月20日(大阪市、大阪市立大学)
 40. 石川冬木「「がん」はどのようにして起こるのか?」2010年度文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」青少年・市民公開講座『「がん」を知って大切な人を守ろう』(招待講演)、2010年10月9日(秋田市、秋田大学60周年記念ホール)
 41. 石川冬木「Bridge over troubled water」東京医科歯科大学特別講義(招待講演)、2010年10月5日(東京都、東京医科歯科大学)
 42. Fuyuki Ishikawa 「Regulation of telomerase through Tel1/ATM and/or Rad3/ATR-mediated phosphorylation of the shelterin component Ccq1 in fission yeast」EMBO Conference Series 'Telomeres and the DNA Damage Response'(招待講演)、Sep 17, 2010(The Hotel Pullman, Marseille, France)
 43. 石川冬木「テロメアと細胞老化」第19回日本Cell Death学会学術総会(招待講演)、2010年8月1日(名古屋市、愛知県産業労働センター)
 44. 石川冬木「単一テロメア解析」第12回

生命科学研究科シンポジウム、2010年7月2日（京都市、京都大学医学部芝蘭会館）

〔図書〕（計7件）

1. 石川冬木「プログレッシブ 生命科学：老化」南山堂（2014）
2. 石川冬木「図説 分子病態学 改訂5版」中外医学社（2014）
3. 定家真人、石川冬木「最新がん薬物療法学 -がん薬物療法の最新知見-：合成致死を利用したがん治療」日本臨牀社（2014）
4. 石川冬木（編集）「次世代がん戦略研究 update がん基礎生物学-革新的シーズ育成に向けて-：総論、がん染色体・分裂期チェックポイントを標的とした治療法の確立」南山堂（2013）
5. 石川冬木（分担執筆）「英語論文セミナー21 世紀の分子生物学：老化」東京化学同人（2013）
6. 石川冬木（分担執筆）「英語論文セミナー21 世紀の分子生物学：老化」東京化学同人（2013）
7. 宮園浩平、石川冬木、間野博行（監訳）「デヴィータがんの分子生物学」メディカル・サイエンス・インターナショナル（2012）

〔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

○京都大学大学院生命科学研究科ホームページ

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/j/>

○京都大学大学院生命科学研究科細胞周期学分野石川研究室

<http://www.fish.lif.kyoto-u.ac.jp/>

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科・教授
研究者番号：30184493

(2) 研究分担者

鍋谷 彰 (NABETANI, Akira)
京都大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号：40334495

(3) 研究分担者

樽本 雄介 (TARUMOTO, Yusuke)
京都大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号：70551381

(4) 研究分担者

榊原 康文 (SAKAKIBARA, Yasubumi)
慶應義塾大学・理工学部・教授
研究者番号：10287427

(5) 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

(6) 研究分担者

藤芳 暁 (FUJIYOSHI, Satoru)
東京工業大学・理工学研究科・助教
研究者番号：70371705