

氏名	なかむらみらい 中村未来
学位(専攻分野)	博士(生命科学)
学位記番号	生博第57号
学位授与の日付	平成18年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	生命科学研究所統合生命科学専攻
学位論文題目	哺乳類細胞におけるテロメアの機能維持とその末端構造制御の解析

論文調査委員 (主査) 教授 石川冬木 教授 米原伸 教授 眞貝洋一

論文内容の要旨

真核生物の線状染色体末端には、テロメアと呼ばれる構造体が存在し、染色体の末端を保護している。テロメア DNA はグアニンに富んだ G 鎖と、シトシンに富んだ C 鎖から構成される。G 鎖の 3' 末端は G-tail と呼ばれる一本鎖で突出している。テロメア DNA の新規合成の際には、逆転写酵素のテロメレーズが G-tail に新規配列を付加して G 鎖を伸長させ、DNA 複製酵素が反対側の C 鎖をラギング鎖合成によって合成することから、両者が協調的に働くことが重要だと考えられる。しかし、哺乳類細胞では複製因子がテロメアにおいてどのような働きをおこなうのか、その詳細なメカニズムは明らかではなかった。

そこで申請者は、哺乳類細胞においてラギング鎖合成をおこなう DNA ポリメラーゼ α の、テロメア維持における役割を明らかにすることを目的として実験を行った。マウスの温度感受性変異株 tsFT20 は、DNA ポリメラーゼ α の p180 触媒サブユニットに点突然変異を持つ。申請者は tsFT20 を半許容温度で培養し、DNA ポリメラーゼ α の活性を部分的に低下させると、テロメア DNA はクロマチン構造と共に二段階で異常をきたすことを明らかにした。一段階目では G-tail 量がテロメレーズ非依存的に増加し、二段階目ではテロメア二本鎖 DNA の伸長がテロメレーズ依存的に観察された。このことは C 鎖のラギング鎖合成異常によって長い G-tail が露出し、テロメレーズが G-tail の末端へ作用しやすくなったことを示す。従って、DNA ポリメラーゼ α は G-tail の長さを規定することでテロメア長の維持に寄与することが示唆された。さらに半許容温度で継代培養した tsFT20 では、テロメア領域特異的に染色体の不安定化がひきおこされていた。このことから、テロメアは複製装置が進行するために厳密な制御を必要とする「複製ストレスに弱い」領域であることが示唆された。

さらに申請者はテロメアの末端構造によるテロメア維持機構を明らかにするため、OB-fold を持つ、テロメアの本鎖 DNA 結合タンパク質複合体に注目した。出芽酵母では、一本鎖結合タンパク質である Cdc13 に Stn1 と Ten1 が結合してテロメアの末端を保護し、テロメレーズのテロメアへのリクルートを制御する。一方、哺乳類では一本鎖結合タンパク質として Pot1 が単離されたものの、Stn1 のような結合因子の存在は明らかではなかった。そこで申請者は、本研究室の石川がホモロジーサーチによって同定した、ヒトとマウスの STN1 タンパク質ホモログ、OBFC1 (OB-fold containing 1) の機能解析を行った。OBFC1 は Stn1 同様 N 末端に OB-fold ドメインを有する。OBFC1 は核内に局在し、その一部は TRF1 やテロメア DNA の一部と共局在したことから、テロメアの構成因子であることが示唆された。また OBFC1 は配列非特異的な弱い一本鎖 DNA 結合能を示し、*in vitro* および *in vivo* で Pot1 と物理的相互作用を示したことから、POT1 とのタンパク質間相互作用を介してテロメアへ局在する可能性が示唆された。また、本研究室の齋藤、田村の協力によって OBFC1 の相互作用因子を質量分析で同定したところ、Pot1 と DNA ポリメラーゼ α 複合体が陽性タンパク質として検出された。このことは OBFC1 が Pot1 と複合体を形成し、テロメア DNA の新規合成の際に必要なテロメレーズと DNA ポリメラーゼ α の協調的な働きに、OBFC1 が寄与する可能性を示唆する。

論文審査の結果の要旨

染色体末端テロメアは、染色体の安定な維持に必須な構造体であるが、それが細胞複製、特にS期におけるDNA複製とどのような関連をもって維持されるのかは、特に哺乳類細胞においては明らかではなかった。DNA合成酵素は必須遺伝子であるため、その欠失体やドミナントネガティブ体を用いた機能解析は困難であった。本研究では、DNA合成酵素 α の温度感受性株 tsFT20 を巧みに用いることで、この問題にアプローチしたものである。まず、第1章において、テロメアに関する基本的知識と、テロメア維持におけるDNA複製を論じる意義、本研究の目的が述べられている。第2章においては、tsFT20細胞の半許容温度を設定することで、DNA合成酵素 α を部分的に機能低下させた場合のテロメア表現型に関して、新規に発見した現象を述べ、その分子機構について考察がなされている。それによれば、tsFT20を半許容温度に設定した後、まず、最末端のテロメア一本鎖DNA部分の伸長が起き、続けて、テロメラーゼ依存的なテロメア二本鎖DNAの伸長が起こる。さらに、テロメア結合蛋白質の量がこの過程で変化することが示されている。特に、半許容温度におけるtsFT20細胞がテロメア機能異常を介したと思われる染色体異常を高頻度で示すことは、あらゆる生物種を通してこれまでに知られていない新規な事実であり、がん細胞が生体内で複製ストレスを受けていることを考え合わせると、がん細胞の染色体不安定化を説明する一機構として大変興味深い。第3章では、新規な哺乳類テロメア因子としてObfclを同定し、本蛋白質がテロメアに局在する真のテロメア構成因子であることを示した後に、その他のテロメア因子との物理的相互作用について検討を加えている。本章で述べられている研究成果はいまだ研究途上であり、完成はしていないが、新規テロメア因子として今後の研究が楽しみである。以上まとめると、本論文は、テロメア維持にDNA複製装置構成成分であるDNA合成酵素 α が重要な役割を果たしていることを哺乳類細胞を用いて初めて明らかにしたものであり、また、新規テロメア因子の同定によって、今後の研究の展開に大きな期待を抱かせる研究内容となっている。以上のことから、本論文は、博士(生命科学)の学位論文としてふさわしいものであると判断された。また、平成18年1月24日に、論文内容およびそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認められた。