

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	Diana Romero Zamora
論文題目	The molecular mechanism of mitotic telomere deprotection		
(論文内容の要旨)			
<p>テロメアは染色体の末端を保護する DNA-タンパク質の複合体であり、ヒトでは TTAGGG の単純反復 DNA 配列と、テロメア配列結合タンパク質からなる。末端の保護に重要な因子として TRF2 が同定されており、テロメア DNA 末端が自身の 2 本鎖 DNA 部分にループして潜り込むような構造体 (T ループ) の形成に必要であることが知られる。T ループの潜り込み部位は相同組換えの中間体のような構造をとり、TRF2 がこの中間体を安定化すると考えられている。テロメアの保護は正常な細胞の分裂に必須であり、テロメアの保護が解かれた細胞では、DNA 損傷応答 (DNA Damage Response: DDR) が活性化され、細胞周期が停止するとともに、脱保護されたテロメア同士の融合などの異常な染色体構造が生じる。例えばヒト体細胞は DNA 複製とともにテロメア DNA が短小化し、結果として生じるテロメア脱保護が細胞老化の一因となる。このように非常に重要なテロメア保護構造であるが、細胞周期の有糸分裂期に細胞が停止した際に脱保護する現象、M 期テロメア脱保護が報告されていた。有糸分裂停止は複製ストレスを受けた細胞や染色体融合を持つ細胞でも引き起こされることが報告されており、これらの M 期停止細胞において細胞死を誘導することで、細胞のがん化を防ぐ機能を持つと提唱されている。さらに、M 期をターゲットとする抗がん剤によっても引き起こされるため、これらの抗がん剤の薬理効果としても重要である。分子機構として、M 期に活性化されるオーロラ B キナーゼ (AURKB) が必須であることや、TRF2 の保護機能と拮抗する反応であることが知られていたが、その詳細は不明であった。</p> <p>申請者は、M 期テロメア脱保護の分子機構を明らかにする目的で、T ループ構造を解消しうる RECQ ヘリケースファミリーに着目し、過剰発現によるスクリーニングを行なった。その結果、WRN と BLM がそれぞれ M 期テロメア脱保護の抑制と促進に必要であることを明らかにした。</p> <p>この結果を受け、WRN の機能解析に取り組んだ。各種の点変異体や部分欠失変異体による解析により、WRN の M 期テロメア脱保護抑制能は酵素活性に依存しておらず、コイルドコイル構造をとる 168-333 アミノ酸が必要であることを明らかにした。さらにこの領域に AURKB のターゲットモチーフ S282 を同定し、このサイトのアラニン変異は抑制能を持つものに対して、リン酸化ミミック変異である S282D、S282E は抑制能を失うことを明らかにしている。また、WRN のこの機能は TRF2 を必要とし、その T ループ保護能を補助するような機能であることを報告している。</p> <p>さらに BLM の機能解析に着手し、各種の変異体による実験から BLM の酵素活性が M 期テロメア脱保護に必要であることを明らかにした。さらに BLM と複合体を形成する TOP3A、RMI1、RMI2 の機能が全て必要であることを突き止めている。テロメア結合タンパク質である TRF1 は BLM 結合モチーフをもち、テロメアの DNA 複製を促進することが知られていた。そこで申請者は、TRF1 が M 期テロメア脱保護に関与すると考え解析を進め、TRF1 の 2 つの AURKB リン酸化ターゲットサイト S354 と T358 が M 期テロメア脱保護に必要であり、AURKB を含む CPC 複合体との結合に機能することを、共同研究者と共に明らかにした。さらにテロメア結合に必須の MYB ドメイン内にも AURKB ターゲットサイト S417 を同定し、このサイトのアラニン変異は M 期テロメア脱保護を促進できないことを発見した。さらに MYB ドメイン欠失変異でも促進機能が保持されていることを確認した。このことから申請者は TRF1 が AURKB 活性をテロメアに運搬するリクルーターであると仮説を立て、テロメアにおける AURKB 活性のターゲット候補として TRF2 に着目した。TRF2 の N 末塩基性ドメインは T ループの安定化に必要であることが知られていたが、この塩基性ドメイン内に AURKB ターゲットサイト S65 を同定し、このサイトのリン酸化ミミック変異 S65D が M 期特異的にテロメア保護能を失うことを突き止めた。</p> <p>以上のように、M 期テロメア脱保護に関与する因子として WRN と BLM を同定し、さらに AURKB のターゲットとして TRF1、TRF2 を特定しており、分子遺伝学的アプローチからその分子機構を詳細に明らかにすることに成功した。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

M期テロメア脱保護は、細胞周期の有糸分裂期に停止した細胞においてテロメアの保護構造が解かれる現象として最初に報告され、M期に停止した細胞において細胞死を誘導する経路の一つであると考えられている。しかしながら、その分子機構はほとんど未知であった。

本論文著者は、テロメアの保護構造である T ループに着目し、そのような DNA 構造を解消する活性を持つ RECQ ヘリケース酵素群の過剰発現スクリーニングから WRN と BLM の関与を見出した。さらにそれぞれの因子について、特に AURKB による制御機構に主眼を置き、詳細な分子遺伝学的な解析を展開した。

M期テロメア脱保護を抑制する WRN の機能には、酵素活性は必須ではなく、N末の Coiled-coil domain (168-333 a.a.)が必要であることを発見した。またこの領域内の AURKB ターゲットサイトの変異体解析から、S282 のリン酸化によって WRN の抑制機能が負に制御されている可能性を見出した。

一方、M期テロメア脱保護を促進する BLM の機能は酵素活性依存的であり、TOP3A、RMI1、RMI2 との BTR 複合体として働くことを発見した。さらにテロメア結合因子 TRF1 も脱保護の促進に必要であるという興味深い結果を報告し、TRF1 の S354、T358、S417 の3つの AURKB リン酸化ターゲットサイトが脱保護の促進に関与することを突き止めた。最後に、AURKB のターゲットとして TRF2-S65 を同定しており、リン酸化によって TRF2 の T ループ保護能が低下することによって、BTR による T ループ解消が促進される、というモデルを提唱した。

以上のように、本論文著者は、これまで未知であった AURKB による M期テロメア脱保護の分子機構の理解を大きく前進させた。テロメア因子 TRF1 がテロメアの脱保護に必要である、という一見逆説的な発見を伴っており、テロメア因子についての認識を変革する可能性を秘めた重要な仕事であると評価できる。さらに長期的には M期抗がん剤の薬理効果の上昇などの臨床応用も期待できる。

本論文は優れた論理構成によって記載されており、申請者の生命科学に対する広範かつ高度な学識、及び専攻分野における研究能力の高さを示す内容となっている。以上のことから、本論文を博士(生命科学)の学位論文として高い価値があるものと認めた。

なお、令和5年8月3日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行なった結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 2023年 12月 15日