

過酸化水素処理後のゲノム安定性維持に関わる

CST 複合体の機能解析

原 智彦

## 目次

目次 .....	1
要旨 .....	4
略語集.....	6
<b>第一章 序論 .....</b>	<b>8</b>
1-1 テロメア .....	9
1-2 CST 複合体 .....	12
1-3 非テロメア領域における CST 複体の機能 .....	16
1-4 複製ストレスによってもたらされる DNA 鎖切断と CST 複合体との関連性 ...	17
1-5 DNA 修復関連因子と CST 複合体との関連性 .....	18
1-6 活性酸素種によって引き起こされる DNA 損傷 .....	21
1-7 本研究の目的.....	22
<b>第二章 材料と方法 .....</b>	<b>24</b>
2-1 試薬 .....	25
2-2 培養細胞、化合物 .....	25
2-3 レンチウイルス感染による遺伝子ノックダウン .....	25
2-4 RNA 抽出、定量 RT-PCR .....	26
2-5 生存率測定実験.....	27
2-5-1 トリパンブルー染色 .....	27
2-5-2 コロニー形成アッセイ .....	27
2-5-3 PI 染色 .....	28
2-6 ブロッキング反応.....	28
2-7 蛍光免疫染色.....	29
2-8 コメットアッセイ .....	30
2-9 フローサイトメトリー解析.....	31

2-10 抗体リスト .....	32
2-11 ソフトウェアと統計解析 .....	32
<b>第三章 結果 .....</b>	<b>35</b>
3-1 過酸化水素に対する感受性に CST 複合体が及ぼす影響.....	36
3-1-1 <i>CTCI</i> または <i>STN1</i> がロックダウンされた HeLa 細胞の樹立.....	36
3-1-2 CST 複合体を欠く HeLa 細胞が DNA 損傷を受けた場合の生存率 .....	38
3-1-3 CST 複合体が過酸化水素処理された HeLa 細胞の生存に及ぼす影響 .....	41
3-1-4 過酸化水素処理された HeLa 細胞における <i>STN1</i> の発現量解析 .....	45
3-2 過酸化水素処理による DNA 損傷応答経路の活性化.....	47
3-2-1 DNA 損傷チェックポイントリン酸化酵素のリン酸化 .....	47
3-2-2 $\gamma$ -H2AX の形成.....	48
3-2-3 過酸化水素処理によってもたらされる DNA 損傷の細胞周期依存性.....	52
3-3 過酸化水素処理によって引き起こされる DNA 鎖切断と CST 複合体 .....	56
3-3-1 コメットアッセイによる DNA 鎖切断の検出 .....	56
3-3-2 DNA 鎖切断が細胞死によってもたらされた可能性 .....	62
3-4 S 期の細胞が過酸化水素に対して示す感受性に CST 複合体が及ぼす影響 .....	63
3-4-1 ミモシンを用いた細胞周期の同調.....	63
3-4-2 細胞周期の同調を経て過酸化水素処理された場合の生存率.....	66
3-5 CST 複合体によって促進された、過酸化水素処理後の新生鎖 DNA 合成 .....	68
3-5-1 チミジンアナログの取り込みに基づく、新生鎖 DNA を合成している細胞の検出.....	68
3-5-2 過酸化水素処理後に取り込まれた EdU 量の定量的解析 .....	72
3-6 CST 複合体と DNA 複製に依存した RAD51 フォーカス数の増減.....	74
3-6-1 HeLa 細胞を用いた蛍光免疫染色 .....	74
3-6-2 U2OS 細胞の過酸化水素に対する感受性と U2OS sh <i>STN1</i> 細胞の表現型 .....	77
3-6-3 過酸化水素処理された U2OS sh <i>STN1</i> 細胞における RAD51 フォーカスの消失 .....	79
3-6-4 過酸化水素処理によってもたらされた RAD51 フォーカスの蛍光強度の減弱化 .....	81
3-7 CST 複合体と RAD51 によって制御される過酸化水素に対する感受性.....	83
3-7-1 RAD51 阻害剤.....	83
3-7-2 CST 複合体と RAD51 が過酸化水素処理された HeLa 細胞の生存に及ぼす影響.....	86
<b>第四章 考察 .....</b>	<b>89</b>
4-1 概要 .....	90

4-2 過酸化水素によってもたらされた表現型に CST 複合体が及ぼす影響 .....	90
4-3 本研究から新たに示唆された CST 複合体の機能 .....	92
4-4 結論 .....	95
4-5 今後の展望 .....	95
参考文献 .....	98
謝辞 .....	110

## 要旨

真核生物の線状ゲノム DNA は染色体を形成し、その末端部分はテロメアと呼ばれる。テロメアは反復配列（ヒトの場合 5'-TTAGGG-3' / 5'-CCCTAA-3'）からなる DNA と、反復配列に特異的に結合する蛋白質群によって構成される。これらのテロメア結合蛋白質はヌクレアーゼによるテロメア DNA の分解や不必要な二本鎖 DNA 切断修復を防ぐ。テロメアの最末端一本鎖 DNA に結合する因子として、CST 複合体 (CTC1-STN1-TEN1) が哺乳類細胞で同定された (Miyake Y *et al.*, 2009)。近年、CST 複合体はテロメアを保護するだけでなく、DNA 複製フォークの進行再開を促すことが報告されている。また、同複合体が全ゲノム上のグアニン・シトシンに富む反復 DNA 領域に局在することも見出された。すなわち CST 複合体はテロメア関連因子として従来認識されていたが、機能解析の対象範囲は全ゲノムに拡張された。全ゲノム上で進行停止した複製フォークは DNA 損傷として認識されるものの、修復反応に同複合体が寄与するか未解明である。DNA 損傷の原因と修復経路は様々だが、本研究では、ミトコンドリアなど内在的な原因から生じ、かつ複製フォークの進行にも影響しうる酸化的な DNA 損傷に着目した。そこで、酸化ストレスに曝されたヒト由来培養細胞における CST 複合体の働きを調べた。

CST 複合体と活性酸素種（過酸化水素）に対する感受性との関連性を調べるために、恒常的に *STN1* をノックダウンした HeLa 細胞を実験に供した。*STN1* ノックダウンによって培地に過酸化水素を添加した際の細胞生存率は減少し、また、一本鎖および二本鎖 DNA 切断が顕著に検出された。過酸化水素による DNA 損傷は細胞周期によらず引き起こされたが、同処理に対して特に DNA 複製中の細胞が生存率の低下を示したため、CST 複合体と DNA 複製との関連性を調べた。同複合体は通常の DNA 複製には関与しなかったが、*STN1* ノックダウンによって過酸化水素処理後の新生鎖 DNA 合成反応が妨げられた。さらに、過酸化水素に曝された細胞における CST 複合体の機能を探るため、複製フォークの進行再開や DNA 修復に寄与する RAD51 リコンビナーゼに着目した。過酸化水素処理された *STN1* ノックダウン細胞の核では RAD51 フォーカスが形成されず、また、RAD51 阻害剤は過酸化水素処理後の生存率に対して *STN1* ノックダウンと同等の効果をもたらした。すなわち、CST 複合体は酸化ストレスに曝された DNA 上に RAD51 を結合させ、ゲノムの恒常性に寄与することが示唆された。

以上の結果から、CST 複合体は複製中のゲノム上で RAD51 を介して酸化的な DNA 損傷の解消を促していると考えられる。従来の報告では同複合体と RAD51 によって一時停止した複製フォークの進行再開が促されるモデルが提唱されていたが、それらは DNA 鎖切断がほとんど起きない条件下で得られた知見だった。過酸化水素処理によって形成された損傷塩基との衝突も複製フォークの進行停止をもたらす。しかし、*STN1* ノックダウンによって一本鎖および二本鎖 DNA 切断がより顕著に検出されたことから、

CST 複合体は DNA 鎖切断の修復も促すという可能性も得られた。本研究成果は CST 複合体についての理解を加速させ、これまで未解明だった同複合体と DNA 複製・修復・組換えとの関連を明らかにするための基盤となることが期待される。

## 略語集

ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
a.u.	Arbitrary unit
bp	Base pairs
BRCA1 (BRCA2)	Breast cancer type
Cdc13	Cell division control protein 13
ChIP-seq	chromatin Immunoprecipitation-Sequencing
Chk1 (Chk2)	Checkpoint kinase
CTC1	Conserved telomere component 1
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FISH	Fluorescence in situ hybridization
FSC	Forward scatter
HEPES	2-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazine) ethanesulfonic acid
HRP	Horseradish peroxidase
IgG	Immunoglobulin G
HU	Hydroxyurea
kDa	kilo Dalton
MMS	Methyl methanesulfonate
mRNA	Messenger RNA
OB	Oligonucleotide/oligosaccharide-binding
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PARP	poly ADP-ribose polymerase
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
POT1	Protection of telomeres 1
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RAP1	Transcriptional activator repressor protein 1
RNA	Ribonucleic acid
SDS	Sodium dodecyl sulfate

SOD	Superoxide dismutases
SSC	Side scatter
STN1	Suppresser of cdc thirteen
TAE	Tris-acetate-EDTA
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TE	Tris-EDTA
TEN1	Telomeric pathways in association with Stn1
TIN2	TRF1-interacting nuclear protein 2
TNT	Tris-NaCl-Tween 20
TPP1	TINT2/PTOP/PIP1
TRF1 (TRF2)	Telomeric-repeat-binding factor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane



# 第一章

## 序論

## 1-1 テロメア

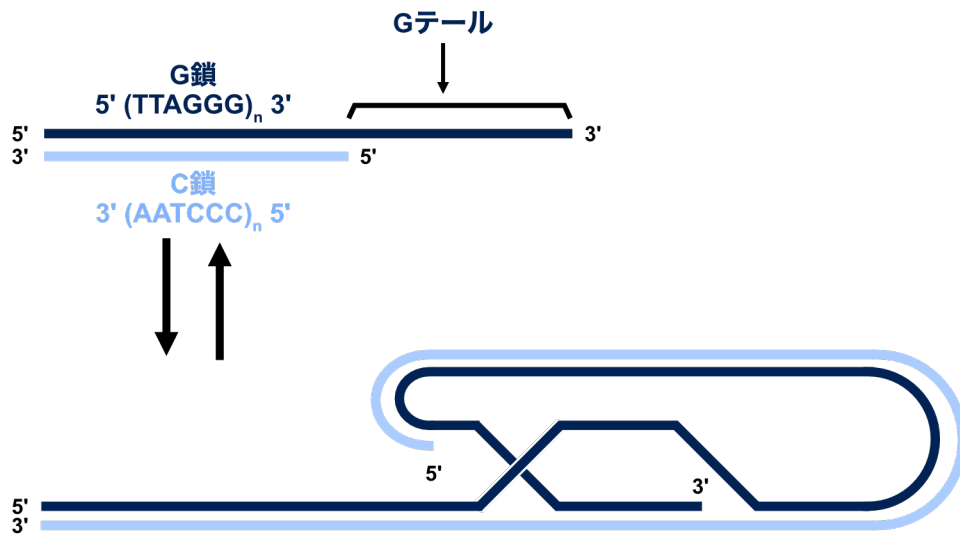
真核生物の染色体末端部分はテロメアと呼ばれ、染色体中の他の領域では見られない特殊なクロマチン構造を形成することで遺伝子コード領域を保護する役割を担う。テロメアは DNA および DNA 結合性の蛋白質によって構成されている (図 1-1 A)。テロメアの DNA は反復配列で構成され、3'末端あるいは 5'末端がテロメア末端にある DNA 鎖は、それぞれグアニンに富むため G 鎖 (脊椎動物では (TTAGGG)<sub>n</sub>)、およびシトシンに富むため C 鎖と呼ばれる。G 鎖の 3' 末端は一本鎖 DNA として突出していて、これは G テールと呼ばれる。テロメア DNA は G テールを内側に巻き込んだループ構造を取ることで、ヌクレアーゼによる DNA の分解を防ぎつつ単純な DNA 二本鎖切断部位と区別される (Griffith JD *et al.*, 1999; Doksan Y *et al.*, 2013)。しかし、特に細胞周期の S 期でループ構造は解消されて直鎖状構造に変化する (Sarek G *et al.*, 2015)。そのような場合も、テロメア DNA に結合している蛋白質によって DNA は保護される。テロメア結合蛋白質は、CST 複合体およびシェルタリン複合体と呼ばれる 2 種類の複合体を形成する (図 1-1 B)。哺乳類細胞における CST 複合体とは CTC1、STN1、および TEN1 で構成されるヘテロ三量体で一本鎖 DNA に結合する (次節で詳述)。また、シェルタリン複合体は、TRF1、TRF2、POT1、TPP1、TIN2、および RAP1 の 6 種類の蛋白質から構成されていて、細胞周期を通じてテロメアの二本鎖または一本鎖 DNA に結合している (de Lange. T, 2005)。これらの DNA 結合蛋白質による複合体は、テロメアがその機能を果たす上で極めて重要な因子である。

テロメアは線上ゲノム DNA の末端に位置しているため、DNA の半保存的複製の代償としてゲノムが倍化する度に短小化する (図 1-1 C)。DNA ポリメラーゼによる新生鎖 DNA 合成反応は RNA プライマーの 3'-OH 末端を起点として、5'から 3'方向のみに進む。DNA ポリメラーゼがもつこれら 2 つの特徴のため、複製フォークの進行方向と同じ向きに進むリーディング鎖合成と逆方向に進むラギング鎖合成が同時に起こる。ラギング鎖合成において G 鎖を鋳型として用いた場合、新生 C 鎖最末端の RNA プライマーは DNA に置き換わることなく除去されるため、C 鎖は複製を繰り返す度に短小化する (Watson JD, 1972; Olovnikov AM, 1973)。このように短小化された新生 C 鎖を鋳型として G 鎖のリーディング鎖合成が次の S 期で行われるため、当初の塩基長と比べて G 鎖も短小化する。C 鎖を鋳型として用いるリーディング鎖合成では、G テールを形成するために鋳型 C 鎖に対して ExoI と Apollo のエキソヌクレアーゼ活性が働き、C 鎖の最末端が 5'から 3'方向に分解される (Wu P *et al.*, 2012)。

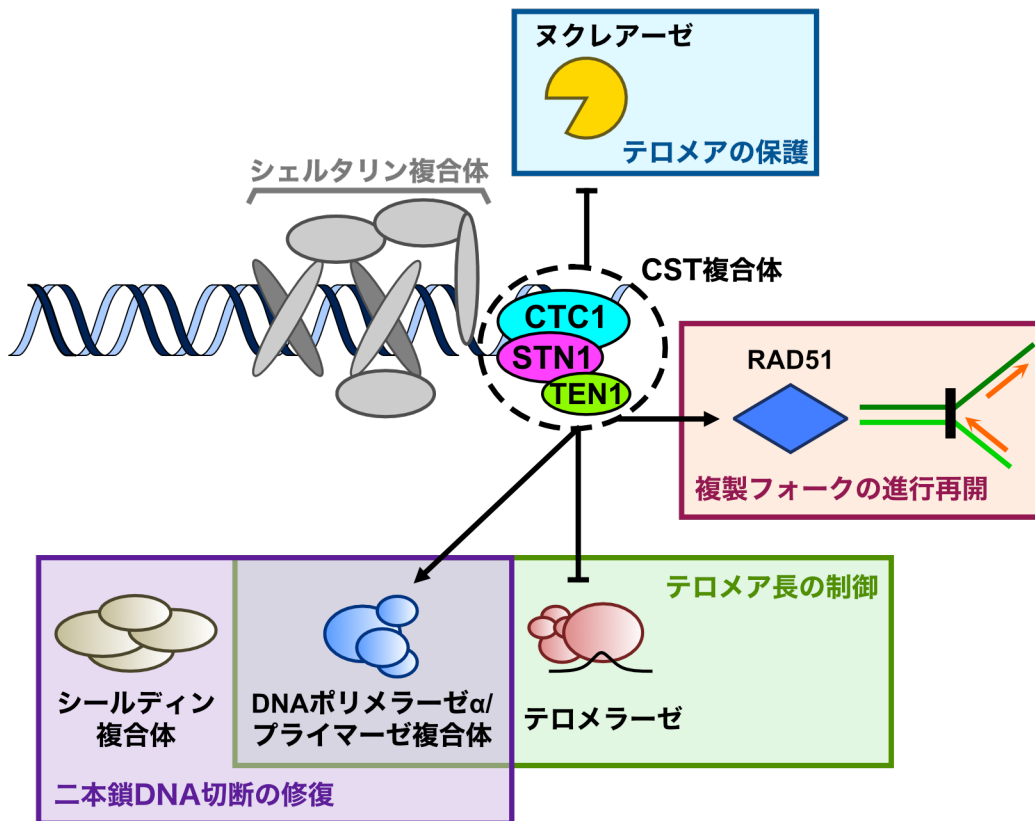
このようにテロメア DNA は細胞分裂に伴って次第に短小化する。この特徴は末端複製問題と呼ばれる。テロメアの短小化に伴い、テロメアとしての機能に必要な塩基長を下回ると細胞は増殖を不可逆的に停止する。しかし、ヒトでは生殖系列など一部の細胞でテロメラーゼが機能することで末端複製問題を回避している。テロメラーゼは鋳型

RNA と触媒サブユニットからなるリボヌクレオチド蛋白質複合体である。テロメラーゼは内在する鋳型 RNA の配列の一部を用いた逆転写活性によって、G 鎖最末端でテロメア DNA 反復配列を 5'から 3'方向に伸長させる。一方の C 鎖では、DNA ポリメラーゼ $\alpha$ /プライマーゼ複合体が G 鎖を鋳型として突出部分を埋め戻すような新生鎖 DNA 合成反応が 5'から 3'方向に起きる。テロメア研究とは独立して、DNA ポリメラーゼ  $\alpha$ /プライマーゼ複合体による新生鎖 DNA 合成反応を促進させる因子として AAF (Alpha Accessory Factor) が同定された (Goulian M, Heard CJ, 1990; Goulian M *et al.*, 1990)。Goulian らは、マウス細胞抽出液に含まれる AAF が DNA ポリメラーゼ  $\alpha$ /プライマーゼ複合体の DNA 結合と合成反応を促進することを見出した。その後、AAF のサブユニットをコードする遺伝子が *CTCI* と *STN1* だと分かった (Casteel DE *et al.*, 2009)。これらの先行研究から、CST 複合体が DNA ポリメラーゼ  $\alpha$ /プライマーゼ複合体による C 鎖の埋戻し反応に必要である可能性が得られた。この可能性はアフリカツメガエル卵抽出液を用いた研究によって確かめられた (Nakaoka H *et al.*, 2012)。中岡助教らは卵抽出液から STN1 (CST 複合体) を免疫除去した場合、一本鎖環状 DNA から二本鎖環状 DNA が生じる効率が著しく低下することを明らかにした。この研究から、CST 複合体は一本鎖 DNA を鋳型とした RNA プライマーを起点とした新生鎖 DNA 合成反応を促進することが示唆された。

A



B



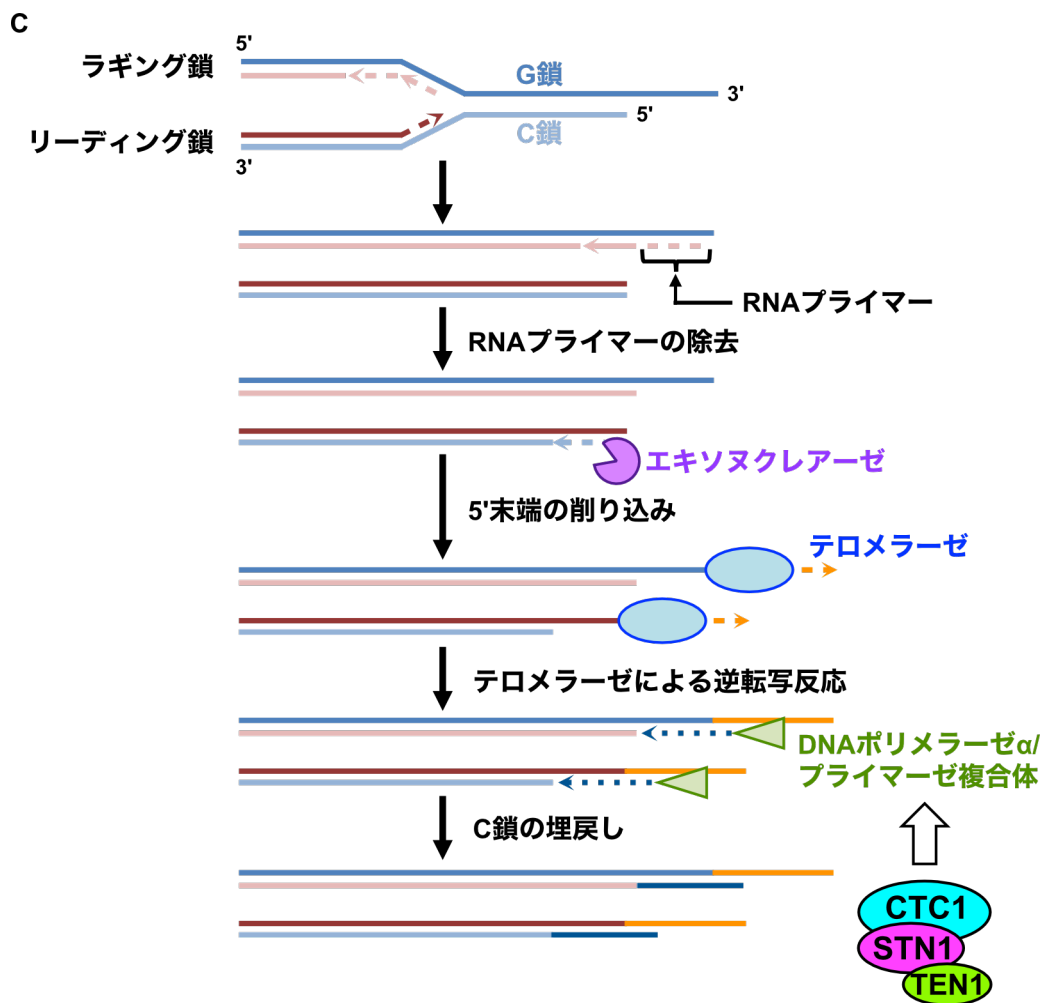


図 1-1 テロメアとは直鎖状ゲノム DNA の末端で形成された特殊なクロマチン構造である  
**A** テロメア DNA は反復配列で構成されていて、G テール部分(50 から 300 塩基長)が C 鎖と相補することでループ状構造が形成される。**B** テロメア結合性の蛋白質群はシェルタリン複合体と CST 複合体に大別される。CST 複合体が影響を及ぼす主な因子と機能を、後述する機能も含めて図示する。**C** テロメア DNA の塩基長が徐々に短小化する現象は末端複製問題と呼ばれる(図の3段目まで)。この問題はテロメラーゼの逆転写活性と DNA ポリメラーゼ $\alpha$ /プライマーゼ複合体の新生鎖 DNA 合成反応によって解決される。

## 1-2 CST 複合体

脊椎動物では CST 複合体は CTC1-STN1-TEN1 で構成される三量体で、一本鎖 DNA に結合する。同複合体の機能解析は、ホモログが出芽酵母で同定されたことを出発点とする。前節で述べた AAF の報告とは独立して、出芽酵母の温度感受性変異株 *cdc* 変異体から *CDC13* 遺伝子が同定された (Garvik B *et al.*, 1995)。また、Cdc13 蛋白質の相互

作用因子として Stn1 および Ten1 蛋白質が同定された (Grandin N *et al.*, 1997; Grandin N *et al.*, 2001)。Cdc13、Stn1 および Ten1 蛋白質の頭文字から CST 複合体と名付けられた。高等真核生物における CST 複合体は、哺乳類細胞およびシロイヌナズナにおいて初めて同定された (Miyake Y *et al.*, 2009; Surovtseva YV *et al.*, 2009)。私が所属する研究室の博士研究員であった三宅博士らは、哺乳類細胞においては出芽酵母における Stn1-Ten1 複合体のホモログに CTC1 が伴って CST 複合体が形成されていることを明らかにした。さらに、Cdc13 と CTC1 の間の配列相同性は低いことと、Cdc13 蛋白質は単独で G 鎖の一本鎖 DNA に結合できるが CTC1 蛋白質の結合能は低いことから、CTC1 は Cdc13 のオーソログではないことが分かった。ヒト CST 複合体の蛋白質立体構造は 2020 年に明らかにされた (図 1-2 A) (Lim CJ *et al.*, 2020)。Lim らはクライオ電子顕微鏡を用いて CST 複合体がテロメア G 鎖の一本鎖 DNA を核として十量体を形成している状態を捉えた。なお、後年に別の研究グループが構造解析を行った際には同様の構造が得られていない (Cai SW *et al.*, 2022; He Q *et al.*, 2022) ため、同複合体の一本鎖 DNA への結合様式については議論の余地が残されている。

生物種を問わず、同複合体のテロメアにおける機能は 2 つの特徴からもたらされている (図 1-2 B)。1 つ目は、OB フォールドドメインを介して一本鎖 DNA と結合する点である。OB フォールドドメインとは  $\beta$ ヘリックス構造から成るモチーフドメインで、一本鎖 DNA との結合や蛋白質間相互作用に寄与する (Murzin AG, 1993)。文献によって諸説あるが、ヒト CST 複合体では、同ドメインは CTC1 には 3 つから 7 つ、STN1 には 2 つ、TEN1 には 1 つ存在すると考えられている。CST 複合体がテロメア一本鎖 DNA (G テール) に結合する際には、特に CTC1 の C 末端側の OB フォールドドメインが大きく寄与する (Miyake Y *et al.*, 2009; Casteel DE *et al.*, 2009)。この DNA 結合によって、先述のようにヌクレアーゼによるテロメアの末端からの分解は防がれている。また、同複合体の G テールへの結合は同部位へのテロメラーゼの結合を競合的に阻害し、G テールの過剰な伸長を抑制する (Chen LY *et al.*, 2012)。また、CTC1 の C 末端は STN1 との蛋白質間相互作用にも重要で、STN1 によって CTC1 と TEN1 が橋渡しされることでヘテロ三量体が形成される。

2 つ目は、DNA ポリメラーゼ  $\alpha$ /プライマーゼ複合体との蛋白質間相互作用に基づき C 鎖最末端での埋め戻し反応を促進する点である (Nakaoka H *et al.*, 2012; Zaug AJ *et al.*, 2022)。ヒト DNA ポリメラーゼ  $\alpha$ /プライマーゼ複合体とヒト CST 複合体は 1 対 1 の割合で結合し、その際に DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  と CTC1 の複数のアミノ酸残基との間で相互作用が形成される (Cai SW *et al.*, 2022; He Q *et al.*, 2022)。また、出芽酵母およびヒト STN1 は、DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  による新生鎖 DNA 合成反応とプライマーゼによる RNA プライマー合成反応の切り替えを促す (Lue NF *et al.*, 2014; Ganduri S *et al.*, 2017)。これら 2 つの特徴を併せ持つ CST 複合体はテロメア DNA を保護するだけでなく、テロメア長を維持するために不可欠な因子であると考えられている。

ヒト *CTCI* または *STN1* にホモの変異が入ると、Coats-plus 症候群と呼ばれる常染色体劣性の遺伝疾患が生じる (Anderson BH *et al.*, 2012; Gu P, Chang S, 2013; Simon AJ. *et al.*, 2015)。変異導入箇所によっては胎生致死で、出生後も Coats-plus 症候群の患者のテロメア長は同年代の健常者と比べて短く一部の染色体末端は融合する。染色体異常との因果関係は不明だが、Coats-plus 症候群の患者では網膜の毛細血管拡張や頭蓋内石灰化などの症状が見られる。この疾患から、CST 複合体はテロメアの形成・維持を通して個体の生命維持に重要な因子であることが示唆される。

CST 複合体の構造と機能は、同じく一本鎖 DNA 結合蛋白質によって構成されたヘテロ三量体の RPA 複合体 (Sakaguchi K *et al.*, 2009) と一部類似しているが相違点も多い。STN1 と RPA32 (両複合体の中サブユニット)、TEN1 と RPA14 (両複合体の小サブユニット) との間で OB フォールドドメインを中心に相同性が認められる (Lim CJ *et al.*, 2020)。しかし、STN1 と RPA32 は進化系統の早い時点で分化したと考えられている (Price C *et al.*, 2010)。特に、RPA32 の 4 番目と 8 番目のセリン残基は DNA 損傷応答において重要な ATR キナーゼの基質だが STN1 には存在しない。このことは CST 複合体が果たす機能を問う際に重要な点だと考えられる。すなわち、セリン/スレオニンキナーゼの ATR (または ATM) によって STN1 が基質として認識されないため、CST 複合体はテロメアでは不要な (むしろ有害な) DNA 損傷応答経路の活性化を回避しつつ G テールなどの一本鎖 DNA を保護できると推察される。

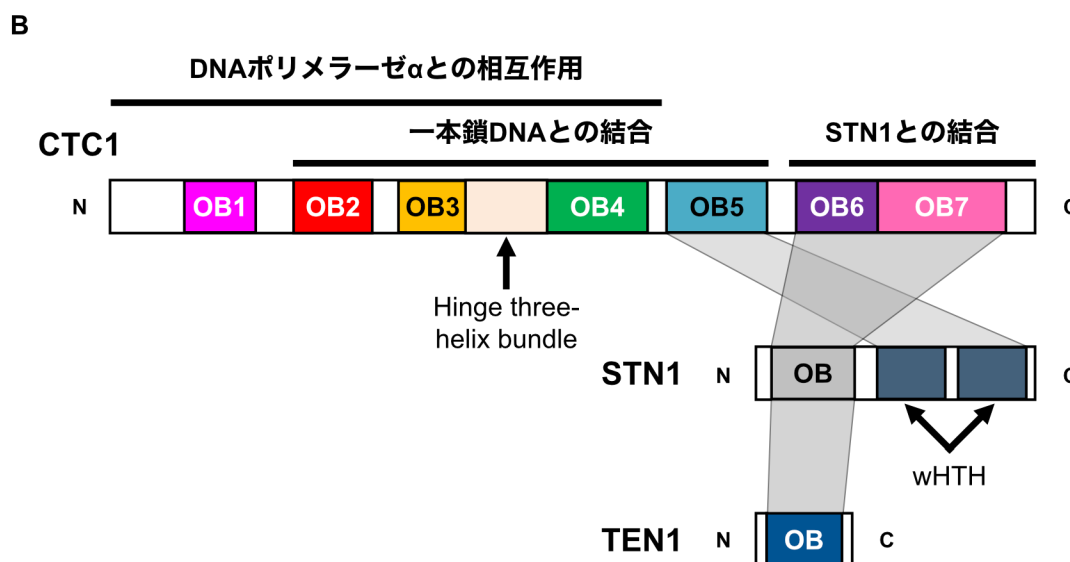
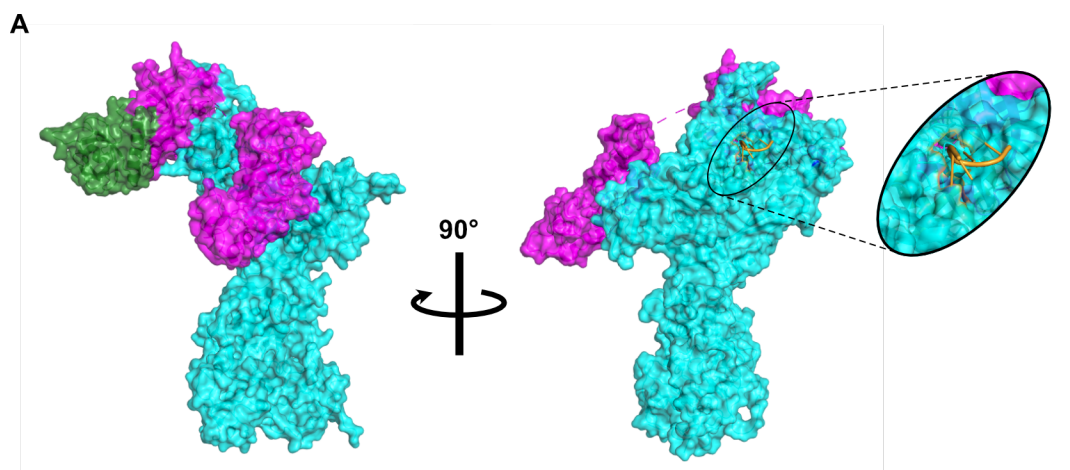


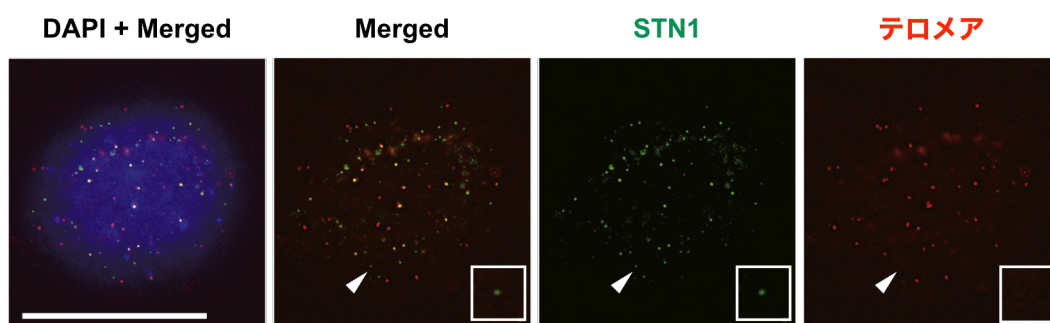
図 1-2 CST 複合体とは、一本鎖 DNA 結合蛋白質によって構成されたヘテロ三量体である  
**A** ヒト CST 複合体の三次元立体構造 (PDB ID: 6W6W)。PDB データを Pymol 上で展開し、CTC1 (水色)・STN1 (桃色)・TEN1 (緑色) の分子表面を着色した。一本鎖 DNA (橙色) を示すために、楕円形に囲った部分を拡大した。**B** Lim CJ *et al.*, 2020 などに基づいて、CST 複合体のサブユニットに含まれる OB フォールドドメインと各種結合に用いられる領域を示した。サブユニット間での蛋白質間相互作用に寄与する領域同士を灰色の台形で繋げた。各長方形の横幅はアミノ酸配列の長さを反映している。wHTH: winged Helix-Turn-Helix (蛋白質の構造モチーフの1つで、DNA 結合に寄与する)。



### 1-3 非テロメア領域における CST 複合体の機能

前節から引き続き、CST 複合体が結合する一本鎖 DNA の配列には特異性が見られる点も同複合体の特徴の 1 つである。この特徴は以下の先行研究から示唆された。最初に哺乳類細胞の CST 複合体が同定された際、三宅博士らは内在性 STN1 の細胞内局在を調べるためにマウス STN1 に対する蛍光免疫染色とテロメア DNA を特異的に認識するプローブを用いた FISH を同時に行った。その結果、一部の STN1 がテロメアと共局在しないことを見出した (図 1-3)。すなわち、CST 複合体が非テロメア DNA とも結合する可能性が得られた。この可能性はゲルシフトアッセイの結果からも支持された。一本鎖 DNA が「グアニンに富み」かつ「塩基長が比較的長い」場合、ヒト CST 複合体の精製リコンビナント蛋白質はランダムな配列の一本鎖 DNA にも結合することが分かった (Miyake Y *et al.*, 2009; Bhattacharjee A *et al.*, 2016; Hom RA, Wuttke DS *et al.*, 2017)。その後、HU 処理された細胞内で CST 複合体は全ゲノム上のグアニンとシトシンに富む反復配列上に集積することがクロマチン免疫沈降・DNA 配列決定法 (ChIP-seq) 解析によって明らかとなった (Chastain M *et al.*, 2016)。

これらが報告された以前に既に、HU 処理された HeLa shSTN1 細胞では複製起点の発火頻度が低下することと、HU 処理を終えた後も DNA 複製の再開が阻害されることが報告されていた (Stewart JA *et al.*, 2012)。原核生物と異なり真核生物のゲノム上には複数の複製起点が存在し、それらが発火する時期は異なる。そのため、HU によって新規 dNTP 産生が阻害され複製フォークの進行が滞った場合、それとは逆方向から別の複製フォークが到達することで停滞した状態は解消される。CST 複合体は DNA ポリメラーゼ $\alpha$ /プライマーゼ複合体を未発火な複製起点にリクルートし、DNA 複製の再開を促す因子だと考えられた (Karnani N *et al.*, 2011; Wang F *et al.*, 2014)。これらの知見に基づき、Chastain らは ChIP-seq 解析を行った際に STN1 のみを過剰発現する HeLa 細胞を 20 時間 HU 処理した。STN1 と結合した一本鎖 DNA に含まれるグアニンとシトシンの割合は染色体全体の平均値よりも高かった。また、STN1 が結合した部位のうち 73% が既知または予測される CpG アイランド内だった。これらの結果を踏まえて、STN1 (CST 複合体) が全ゲノム中のグアニンとシトシンに富む反復配列上に存在しうることが示唆された。



**図 1-3 CST 複合体は非テロメア領域にも局在しうる**

Miyake *et al.*, 2009 より引用し、一部改変した蛍光免疫染色の顕微鏡写真。何も DNA 損傷を加えていないマウス NIH3T3 細胞で、一部の STN1 フォーカス(抗マウス STN1 抗体)とテロメアシグナル(テロメア DNA を特異的に認識するプローブ)は共局在しなかった (白矢印)。矢印の先端のフォーカスを右下隅に拡大した。スケールバーは 15  $\mu\text{m}$  を示す。

#### 1-4 複製ストレスによってもたらされる DNA 鎖切断と CST 複合体との関連性

円滑な新生鎖 DNA 合成を妨げ DNA 鎖切断も誘導するような、細胞内外から加わる影響を複製ストレスと定義する。HU を含む培地で 24 時間以上培養し続けることでストレス処理したヒト培養細胞内では MUS81 エンドヌクレアーゼによってフォーク構造が解消され、二本鎖 DNA 切断が生じる (Hanada K *et al.*, 2007; Petermann E *et al.*, 2010)。Chastain らはグアニンとシトシンに富む反復配列に対合するプローブを用いて FISH を行い、HU 処理された HeLa shSTN1 細胞では染色体異常 (破断、損失、姉妹染色分体の分離) が起こりやすいことを見出した。加えて、分裂酵母の Stn1 変異株を HU 処理した場合、多コピーがタンデムに連結して存在する rDNA 反復配列のリピート数が不均一になった (Yamamoto I *et al.*, 2021; Vaurs M *et al.*, 2023)。この不均一化は、rDNA 領域内で生じた二本鎖 DNA 切断によって相同組換えが引き起こされるためもたらされると考えられた。すなわち、複製ストレスによって DNA 鎖切断が生じるものの、CST 複合体はこれを防ぐことが示唆された。

複製フォークの進行停止に伴い露出した鋳型一本鎖 DNA はヌクレアーゼによる分解から保護される必要がある (Bhat KP *et al.*, 2018)。前節で述べたように、CST 複合体は HU 処理されたゲノム上のグアニンとシトシンに富む反復配列に結合する。複製ストレスと同複合体との関連性を調べた一連の先行研究によって、CST 複合体は単体としてだけではなく RAD51 と共に DNA を保護するというモデルが提唱されている (Chastain M *et al.*, 2016; Lyu X *et al.*, 2021; Lei KH *et al.*, 2021)。HeLa 細胞内の CST 複合体と RAD51 は、HU 処理を行った場合のみ免疫沈降-免疫ブロッティング法に基づく蛋白質間相互作用を示した。また、蛍光免疫染色における RAD51 フォーカス数は HU 処理後に増加し

たが、CST 複合体のサブユニットを欠失することで数の増加は抑制された (Chastain M *et al.*, 2016)。さらに、一本鎖 DNA 上で CST 複合体は RAD51 に置換される (Lyu X *et al.*, 2021; Lei KH *et al.*, 2021)。Lyu らは、HU 処理された細胞の核内で CST 複合体と RAD51 が複製フォーク上で近接することをマクロな実験 (蛍光免疫染色) によって見出した。そして、複製フォークと MRE11 ヌクレアーゼとの共局在と MRE11 による新生鎖 DNA の分解が HU 処理された *STN1* ノックダウン細胞で起こりやすいことが分かった。CST 複合体と RAD51 以外の因子も対象として、進行停止した複製フォークについての研究は長年続けられている。その中で、一本鎖 DNA の保護に重要な RPA 複合体が寄与することが明らかにされた (Bhat KP *et al.*, 2018)。そこで Lei らは 3 種類の一本鎖 DNA 結合蛋白質 (RPA 複合体・CST 複合体・RAD51) の結合順序を、主に *in vitro* の実験に基づいて調べた。その結果、一本鎖 DNA に CST 複合体が予め結合していることで RAD51 の安定的な DNA 結合がもたらされることが分かった。これらの先行研究に基づき、複製フォークの進行が停止した場合、一本鎖 DNA の保護を通じて CST 複合体と RAD51 は DNA 複製の再開に寄与すると考えられている。

#### 1-5 DNA 修復関連因子と CST 複合体との関連性

HU 処理された HeLa 細胞内における CST 複合体と RAD51 との蛋白質間相互作用は、ATR 阻害剤を加えた場合のみ解消された (Chastain M *et al.*, 2016)。そのため、複製ストレスに曝された細胞における CST 複合体の機能は一本鎖 DNA の露出を原因とする DNA 損傷応答経路に基づいていることが示唆された。DNA 損傷応答経路とは複数の蛋白質によって構成される多段階の反応経路で、DNA 修復や細胞周期の停止、細胞死を誘導する (Gaillard H *et al.*, 2015; Blackford AN, Jackson SP, 2017)。同経路は ATR や ATM、DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) が DNA 損傷を検出することで活性化され、蛋白質のリン酸化によって経路の上流から下流に向けてシグナルが伝達される。ATR は一本鎖 DNA の露出 (ギャップ・ニックの形成) によって、ATM と DNA-PK は二本鎖 DNA 切断によってそれぞれ活性化されるという違いがある。先述の CST 複合体と RAD51 との蛋白質間相互作用は ATM 阻害剤による影響を受けなかったことから、複製ストレスに曝された細胞における CST 複合体の機能は一本鎖 DNA の露出によって惹起されたと考えられる。

複製ストレスによって鋳型一本鎖 DNA が露出することで DNA 損傷応答経路は活性化される。また、前節で触れたように長期に渡って進行を妨げられた複製フォークは MUS81 によって切断される。さらに、複製フォークが一本鎖 DNA 切断を通過した場合、その構造は自発的に解消される。このようにフォーク構造が解消されることで二本鎖 DNA 切断がもたらされる。先行研究の著者らも先述の ATR 依存的な CST 複合体と RAD51 との蛋白質間相互作用は複製フォークにおける一本鎖 DNA の露出によっても

たらされたと考察している。しかし、長時間の HU 処理によって二本鎖 DNA 切断がもたらされることが既に報告されている (Petermann E *et al.*, 2010)。それにも関わらず、彼らの DNA 修復経路と CST 複合体との関連性に関する検討は不十分であり、同複合体が複製ストレスによってもたらされた二本鎖 DNA 切断の修復に関わるかどうかという問題は未解決である。

DNA 鎖切断と CST 複合体との関連性を調べた研究は過去に行われているものの、詳細は未解明である (Wang F *et al.*, 2014; Zhou Q, Chai W, 2016)。DNA 損傷試薬によって様々な種類の DNA 損傷が誘導される。例えば、メタンスルホン酸メチル (MMS) によるアデニン・グアニンのメチル化や、カンプトテシンによってトポイソメラーゼ I 活性が途中で阻害されるために生じる一本鎖 DNA 切断などである。このような DNA 損傷も複製フォークの進行停止と同構造の解消を引き起こすことから、一本鎖 DNA 切断と二本鎖 DNA 切断の両者をもたらさう (Wyatt MD *et al.*, 2006; Groth P *et al.*, 2010; Hsiang YH *et al.*, 1989; Regairaz M *et al.*, 2011)。これらの薬剤に加えて、ブレオマイシンやエトポシドは二本鎖 DNA 切断を誘導する。Wang と Zhou らは、これら 4 種類の薬剤全ては HU と同様に、STN1 を欠失した HeLa 細胞の生存率を対照細胞よりも低下させることを明らかにした。さらに、Zhou と Chai は薬剤処理された同ノックダウン細胞のゲノム DNA は断片化されやすいことを見出した。STN1 ノックダウン細胞のゲノム DNA は、カンプトテシンまたはエトポシドに曝した場合、同程度にノックダウン対照細胞よりも短く断片化されることが示された。そのため、これらの報告は複製フォークの再開だけでなく崩壊した複製フォークの修復にも CST 複合体が必要とされる可能性を提起している。しかし、先述のように CST 複合体の欠失によって DNA 修復が阻害された可能性も残されているが詳細は未解明である。

CTC1 の特定領域 (Wang Y, Chai W, 2018) を介して CST 複合体と結合する RAD51 は進化的に保存された ATPase ドメインを含む DNA 修復関連因子で、一本鎖 DNA 上でフィラメント状に重合しながら DNA と結合する (Bonilla B *et al.*, 2020)。この特徴によって一本鎖 DNA はヌクレアーゼによる分解から保護される。さらに、フィラメント状の RAD51 は ATP を消費しながら娘鎖の塩基対を解離させ、相補配列同士を対合させる。この機能に基づいて行われる DNA 修復反応が相同組換え修復で、RAD51 は二本鎖 DNA 切断部位で失われた塩基を過不足なく補うために重要な役割を担う。すなわち、RAD51 が単に一本鎖 DNA に結合しただけでは相同組換え修復は開始されない。しかし CST 複合体について調べられた先行研究で、RAD51 の特に相同組換え修復における機能と直接関連するのかどうかは調べられていない (図 1-5)。

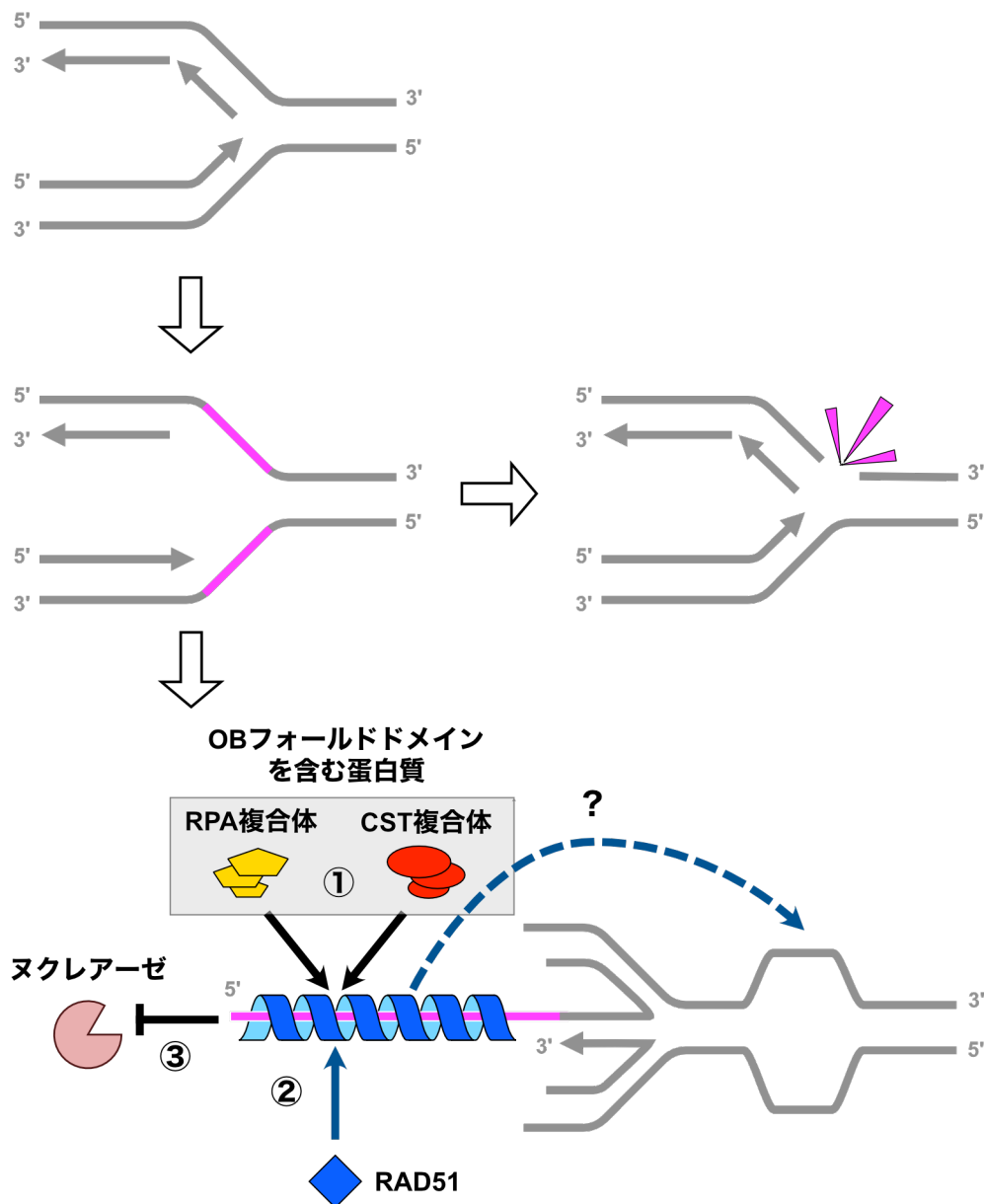


図 1-5 複製ストレス後に起きる DNA 複製の再開が、CST 複合体が DNA 修復を促すことでもたらされたかは不明である

複製フォークの進行を妨げたことで露出した一本鎖 DNA (マゼンタの部分) は脆弱で、この部分の DNA が分解されると二本鎖 DNA 切断が生じフォーク構造が解消される。進行を妨げられた複製フォーク中の DNA が分解されなかった場合、新生鎖 DNA 同士の対合によってフォーク構造は巻き戻されたような特殊な構造に変化する。先行研究 (Lei KH *et al.*, 2021) では、① 最初に CST 複合体および RPA 複合体が一本鎖 DNA に結合し、② 続いて RAD51 が結合するというモデルが示唆された。③ 一本鎖 DNA に結合した RAD51 は MRE11 エキソヌクレアーゼ活性を妨げた (Lyu X *et al.*, 2021)。彼らは、これらの蛋白質はフォークの進行を

妨げる因子が除去され DNA 複製が再開するまでの間 DNA を保護する上で重要であると考察している。しかし、CST 複合体によってリクルートされた RAD51 が自身の ATPase 活性を用いた相同組換え修復(注:複製フォークがグアニンとシトシンに富む反復配列上で停止しているという前提)を促したことで DNA 複製が再開した可能性もあり得る。しかし、RAD51 などの機能制御を介して同複合体と DNA 修復が関連しているか調べた研究例は乏しい。

## 1-6 活性酸素種によって引き起こされる DNA 損傷

前節で触れた MMS やカンプトテシン、ブレオマイシンやエトポシドは細胞内に本来存在しない DNA 損傷試薬であるが、活性酸素種は生理的環境にある細胞内で常に生成され DNA などに障害を与える。活性酸素種とはスーパーオキシドアニオン、ヒドロキシルラジカル、過酸化水素、および一重項酸素の 4 種類の総称である。過酸化水素 1 分子に 1 つの電子を与えることでヒドロキシイオンとヒドロキシルラジカルが 1 つずつ生じる。活性酸素種の生体内での主な発生源はミトコンドリアの電子伝達系や様々な酵素反応である (Novo E, Parola M, 2008)。活性酸素種の蓄積を防ぐため、細胞には抗酸化経路が備わっている。スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) と称される酵素は金属イオン ( $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ) を含み、スーパーオキシドアニオンから酸素分子または過酸化水素が生じる反応を触媒する。また、過酸化水素 1 分子を水分子 2 つと酸素分子 1 つに分解する反応がカタラーゼによって促進される。

活性酸素種の標的分子は蛋白質・脂質・核酸である。酸化ストレスに曝された DNA では、8-オキソグアニン (7,8-dihydro-8-oxoguanine) やチミングリコール (5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymine) などの損傷塩基が生じる。これらの損傷塩基の多くは DNA 複製フォークの進行を阻害する他、塩基の誤対合も招く。加えて、塩基が欠落した脱プリン・ピリミジン部位や DNA 鎖切断も活性酸素種によって引き起こされる (Poetsch AR, 2020)。活性酸素種による突然変異が体細胞内で誘発・蓄積することで、神経変性疾患や発がん、細胞死や老化が促される。酸化ストレスによってもたらされた DNA 損傷が染色体の異常な再配列を促しゲノム不安定性が増すことは、出芽酵母を使った実験からも示唆された (Zhang K *et al.*, 2019)。

このような DNA 損傷をもたらす、活性酸素種に対する感受性は *STN1* ノックダウンによって亢進された (Nguyen DD *et al.*, 2023)。Nguyen らは TCGA から大腸がん細胞では *CTCI* または *STN1* の遺伝子変異 (塩基置換や欠失など) が起きやすいことを見出した。そして *STN1* をノックダウン・ノックアウトした細胞ではグリコシラーゼの発現量が減少したため感受性が亢進することを明らかにした。グリコシラーゼは損傷塩基を切り出すために用いられる酵素なので、*STN1* の欠失によって DNA 損傷の蓄積と生存率の減少が促された。CST 複合体が失われることでグリコシラーゼの発現が抑制された分子機構は明らかにされなかったものの、同複合体が酸化ストレスによって誘導される発

がんと腫瘍形成に影響することが示唆された。加えて、所属研究室で過去に行われた実験でも、HeLa 細胞の培地に過酸化水素を添加した際に生存率は *STN1* の発現を持続的に抑制することで減少した（嶋裕輔氏、未発表）。これらの結果から、CST 複合体は酸化ストレスに曝された細胞内で DNA 修復に関与している可能性が得られた。

## 1-7 本研究の目的

テロメア関連因子として最初に同定された CST 複合体の役割の1つは、テロメアの構成・維持を通じて遺伝子コード領域を保護することである。これに加えて、DNA 複製フォークの進行を促す役割も見出されたことで、CST 複合体がゲノムの領域を問わず恒常性の維持に寄与している可能性が得られた。同複合体のサブユニットを欠いた細胞は DNA 損傷試薬に対して感受性を示すが、CST 複合体が DNA 修復に直接関与することを示した知見は現在までに得られていない。DNA 損傷試薬のように細胞外から加わる要因の他にも、DNA 損傷はミトコンドリアなどから生じた活性酸素種のように内的な要因によっても引き起こされる。以上を踏まえて、分子細胞生物学的実験を通じて CST 複合体が酸化ストレスに曝された細胞内で DNA 修復に関与するか明らかにすることを目的に本研究を行った。

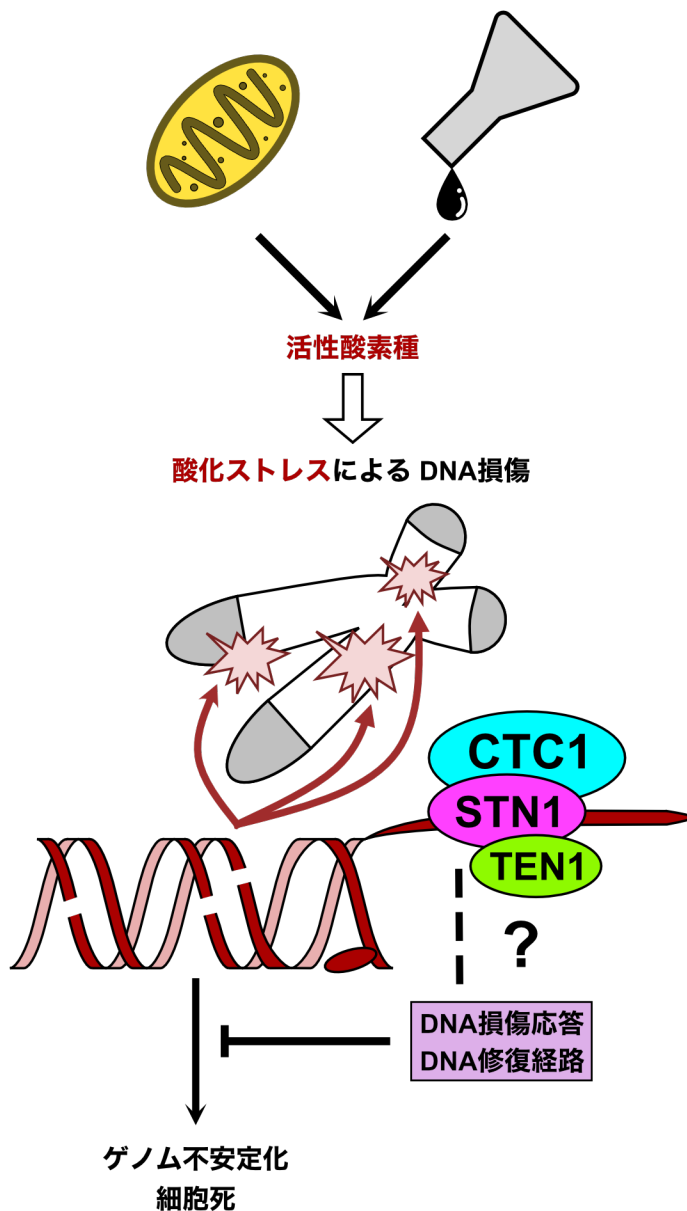


図 1-7 CST 複合体が複製ストレスに曝された細胞内で DNA 修復に寄与しているかは未解明である

内的(ミトコンドリアの好気呼吸など)または外的な(DNA 損傷試薬など)要因から生じた活性酸素種によって、一本鎖または二本鎖 DNA 切断や損傷塩基がゲノム領域を問わず形成される。これらの DNA 損傷はゲノムの不安定性を引き起こし、細胞周期の停止や細胞死をもたらす。DNA 鎖切断部位で失われた塩基は正確に補われ、複製フォークの進行を妨げる損傷塩基は除去・修復される必要がある。このような損傷の形態に応じて DNA を修復するための経路が生物には備わっている。酸化ストレスに曝された細胞で必須の DNA 修復に CST 複合体は関与していると仮定して、本研究を開始した。



## 第二章 材料と方法

## 2-1 試薬

本研究では、特に記さない限り、試薬はナカライテスク社、酵素はタカラバイオ社の製品を用いた。

## 2-2 培養細胞、化合物

HeLa 1.2.11 子宮頸がん由来細胞、HEK293T ヒト胎児腎由来細胞、および U2OS 骨肉腫由来細胞は 5% 二酸化炭素濃度に保たれた 37°C 気相インキュベータ内で培養された。培地として、10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Capricorn Scientific)、1.92 mM L-グルタミン (Sigma-Aldrich)、0.144% 炭酸水素ナトリウム、100 U/mL ペニシリン・ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) (ニッスイ) を用いた。なお、VenorGeM Classic Mycoplasma Detection Kit (Sigma-Aldrich) を用いて、細胞がマイコプラズマに感染していないことを定期的に確認した。

過酸化水素 (富士フイルム和光純薬) およびヒドロキシウレア (Sigma-Aldrich) は滅菌水に、エトポシド (Sigma Aldrich) および B02 (Cayman Chemical Company) は DMSO に、ミモシン (Cayman Chemical Company) はリン酸緩衝塩 (PBS) (ニッスイ) にそれぞれ溶解させた上、各図で示した終濃度になるように培地へ添加された。

## 2-3 レンチウイルス感染による遺伝子ノックダウン

shRNA 標的配列 (表 1) を含むオリゴ DNA を対合させ、二本鎖 DNA とした。バッファー (500 mM 酢酸カリウム、150 mM HEPES-KOH (pH7.4)、10 mM 酢酸マグネシウム) 2  $\mu$ L をセンス鎖およびアンチセンス鎖のオリゴ DNA (100  $\mu$ M となるように TE に溶解された状態) (Fasmac) 各 4  $\mu$ L ずつ計 8  $\mu$ L と混合し、Veriti™ サーマルサイクラー (Thermo Fisher Scientific) にて 98°C から 0.5°C/30 秒ずつ低下させる間にオリゴ DNA を対合させた。この二本鎖 DNA と *NotI* および *AgeI* で切断された pLKO.1 ベクター (Sigma-Aldrich) を混合し、DNA Ligation Kit Mighty Mix を加えた後 15°C で 3 時間から 4 時間かけて反応させる間に DNA 断片同士を連結させた。得られた反応産物によって大腸菌 XL1-Blue 株を形質転換し、50  $\mu$ g/mL アンピシリンを含む Luria Broth (LB) 寒天プレート上に播種した。レンチウイルス感染に用いた全てのプラスミド DNA は GenElute HP Plasmid Midiprep Kit (Sigma-Aldrich) を通して精製された。DNA クローニングによって得られたプラスミド DNA に任意の shRNA 配列が含まれていることを、U6 プロモーター領域から配列解析することで確認した。

組換えレンチウイルスを作製するために、HEK293T 細胞を 2 mL の DMEM で満たし

た6ウェルプレート (Greiner) に  $2 \times 10^5$  細胞/ウェルの密度で播種した。2日後、transfection grade linear polyethylenimine hydrochloride (MW 40,000) (PEI-MAX-40K) (Polysciences) 8  $\mu\text{g}$  とプラスミド DNA (pLKO.1-shRNA ベクター 2  $\mu\text{g}$ 、pCAG-HIV gp 2  $\mu\text{g}$  および pCMV-CSV-Rev 1  $\mu\text{g}$ ) を Opti-MEM 1 mL 中で懸濁した後、HEK293T 細胞の培地に添加することでトランスダクションを行った。一晚培養した後、培地を 3 mL の新鮮な DMEM に交換した。トランスダクションした約 48 時間後にウイルス粒子を含む培養上清を回収し、0.45  $\mu\text{m}$  の PES (polyethersulfone) フィルター (Merck Millipore) で濾過した。得られたウイルス上清は使用するまで  $-80^\circ\text{C}$  で保存した。なお、NotI および AgeI サイトの間に shRNA 標的配列を挿入していない pLKO.1 ベクターに由来するウイルス上清をノックダウン対照とした。

各実験に用いるノックダウン細胞を作製するために、HeLa 細胞または U2OS 細胞を 2 mL の DMEM で満たした 6 ウェルプレートに  $2 \times 10^5$  細胞/ウェルの密度で播種した。2日後、培地を DMEM で 6 倍希釈したウイルス上清 (polybrene (Sigma-Aldrich) を終濃度 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるように添加した) と交換し、24 時間培養する間に感染させた。感染終了後、細胞を継代する際に DMEM に puromycin (Sigma-Aldrich) を終濃度 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるように添加して感染細胞を選抜した。2日間の薬剤選択後再び細胞を継代し、各実験を開始する前にさらに 2 日間培養した。

**表1 shRNA 配列**

shRNA配列名	塩基配列
shCTC1#2	5'-CAGAAAGTCTTGCCGGTATT-3'
shCTC1#3	5'-CAGGGAAATGACGACAATGAT-3'
shSTN1#2	5'-CACTGGAGTTATAAACTGCAT-3'
shSTN1#3	5'-CAGCTTAACCTCACAACCTAA-3'
shSTN1#4	5'-CAAGGCAATTCATAGTATATT-3'

## 2-4 RNA 抽出、定量 RT-PCR

HeLa 細胞を 2 mL の DMEM で満たした 6 ウェルプレートに  $2 \times 10^5$  細胞/ウェルの密度で播種した。2日後、細胞を PBS で洗浄し、0.9 mL の TRIzol 試薬 (Thermo Fisher Scientific) を各ウェルに直接添加し、製造元の説明書に従いながら全 RNA を抽出した。1  $\mu\text{g}$  の抽出 RNA を鋳型として、オリゴ dT プライマー (Invitrogen)、AMV 逆転写酵素 (Life Sciences)、および Ribonuclease Inhibitor (ブタ肝臓由来) を用いた逆転写反応 (Reverse transcription, RT) の産物として cDNA を得た。cDNA 1  $\mu\text{g}$  と Luna Universal qPCR Master

Mix (NEW ENGLAND BioLabs) および任意のプライマーセット (表 2) を混合し、StepOne-Plus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量 RT-PCR を行った。

表2 定量 RT-PCR 用のプライマー配列

標的遺伝子産物	塩基配列	
	Forward側	Reverse側
<i>CTC1</i>	5'-TGGCTCTTCAGTCCGCTGGTTT-3'	5'-AACTCCAGAGGACGCCG-3'
<i>STN1</i>	5'-GAGATTCATGCCACCGCTTAC-3'	5'-GCGCCTGGATTGCTTAGTG-3'
<i>SOD2</i>	5'-CTGGACAAACCTCAGCCCTA-3'	5'-TGATGGCTTCCAGCAACTC-3'
<i>GAPDH</i>	5'-CCTGCACCACCAACTGCTTAG-3'	5'-GGTCATGAGTCCTTCCACGATAC-3'
<i>ACTB</i>	5'-CCAACCGCGAGAAGATGA-3'	5'-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3'

## 2-5 生存率測定実験

### 2-5-1 トリパンブルー染色

HeLa 細胞または U2OS 細胞を 6 mL の DMEM で満たされた直径 6 cm の培養皿 (Thermo Fisher Scientific) に  $2.5 \times 10^5$  細胞/培養皿の密度で播種し、2日間培養した。過酸化水素を培地から除去した後、細胞を 37°C で予熱した PBS で洗浄した。洗浄後速やかに培養皿に DMEM を満たし、2日間培養した。2日後、付着細胞および浮遊細胞の両方をトリプシン処理および遠心分離によって回収した。回収した細胞を適度な濃度になるように DMEM で再懸濁し、うち 10  $\mu$ L を 0.4%トリパンブルー/PBS 溶液 10  $\mu$ L と混合した。細胞数の計測には Countess automated cell counter (Thermo Fisher Scientific) を使用した。

ミモシン処理を伴う生存率測定実験では、10 mL の DMEM で満たされた直径 10 cm の培養皿 (FPI) に  $5 \times 10^5$  細胞/培養皿 (ミモシン処理用) または  $2.5 \times 10^5$  細胞/培養皿 (ミモシン非処理用) の各密度で播種し、ミモシンを添加するまで2日間培養した。2日後、ミモシン処理細胞の培地を終濃度が 500  $\mu$ M になるようにミモシンを添加した DMEM に交換し 23 時間培養した。詳細は 3-4-2 で述べる。

### 2-5-2 コロニー形成アッセイ

HeLa 細胞を 12 ウェルプレート (Greiner) に播種して1日間培養した。DNA 損傷を加えた後、コロニー同士が重なり合わない程度に大きくなるまで6日から9日間程度培養した。計測可能な大きさとなったコロニーを固定する際には、ウェルの底面を PBS で

洗浄した後、細胞固定液 (2%ホルムアルデヒド、0.2%グルタルアルデヒドを含む PBS) を添加して室温で 10 分間固定した。細胞固定液を除去し滅菌水で洗浄した後、各ウェルに 1 mL ずつ 0.1%クリスタルバイオレット溶液を添加し室温で 1 時間振とうすることでコロニーを染色した。クリスタルバイオレット溶液を除去し滅菌水で洗浄した後、室温で乾燥させたコロニーの数を測定した。相対的な生存率は  $(X_c / S_c) / (X_0 / S_0)$  の計算式で算出した。X<sub>c</sub> : X はコロニー数 (同時に播種した 3 ウェル分の平均値)、c (または 0) は濃度 (μM)。S<sub>c</sub> : S は播種した細胞数、c (または 0) は濃度 (μM)。

### 2-5-3 PI 染色

上述 (2-5-1 トリパンプルー染色) の方法に従って細胞播種から細胞数計測を行った後、 $5 \times 10^5$  cells/mL の濃度となるように回収された細胞の一部を PBS 0.5 mL に再懸濁した。細胞懸濁液に対して PI を 2 μg/mL の濃度で添加した後、室温で 15 分間インキュベート (遮光) した。PI 染色されたサンプルは BD Accuri C6 Plus Flowcytometer (BD Biosciences) に供された。得られたデータを FCS ファイルとして出力し、FlowJoV10 (BD Biosciences) ソフトウェア上で展開した後種々の解析を行った。

## 2-6 プロテソング反応

HeLa 細胞を 6 mL の DMEM で満たした直径 6 cm の培養皿に  $2.5 \times 10^5$  細胞/培養皿の密度で播種し 2 日間培養した。各図で示した濃度の過酸化水素またはエトポシドを添加した後、任意の時点でトリプシン処理と遠心分離 (100×g, 4°C, 5 分) によって回収した。

細胞質に局在する蛋白質 (Chk1, Phospho-Chk1 (Ser345), Chk2, Phospho-Chk2 (Thr68), Tubulin, および PARP1) を検出するため、細胞を CSK バッファー (10 mM PIPES (pH6.8), 300 mM sucrose, 150 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 0.2 mg/mL phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM dithiothreitol (DTT)) に対して 1× Complete EDTA free (Roche), PhosSTOP (Roche) and 0.1% (v/v) Triton X-100 を添加した溶液を用いて溶解させた。バッファーと細胞を懸濁した状態で氷上にて 30 分間静置後、遠心分離 (20,400×g, 4°C, 5 分) することで上清を得た。上清の蛋白質濃度を Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad) で測定し、蛋白質濃度をサンプル間で揃えるために上清溶液を溶出バッファーで適宜希釈した。調製済み溶液を 3×SDS サンプルバッファー (150 mM Tris-HCl (pH 6.8), 30% (v/v) glycerol, 6% (w/v) SDS, 18% (v/v) 2-mercaptoethanol, 0.01% (v/v) bromophenol blue) と混合し、100°C で 5 分間加熱することで蛋白質を変性させた。DNA 結合する蛋白質 (STN1, γ-H2AX および Histone H3) については、サンプル間で細胞数を揃えつつ回収し、SDS lysis buffer (0.5% SDS, 10 mM HEPES (pH 8.5), 50 U Benzonase (Merck Millipore), and 2 mM MgCl<sub>2</sub>) (Chen Q *et al.*, 2021) と混合した後、氷上で 5 分間静置する間に DNA の分解と蛋白質の溶出を同時に行った。その後、遠心分離 (10,000×g, 4°C,

5分) することで得られた上清を 3×SDS サンプルバッファーと混合し、100°Cで5分間加熱することで蛋白質を変性させた。

変性させた蛋白質を含む溶液を SDS-PAGE ゲルで展開した。展開済みの SDS-PAGE ゲルとメンブレン (Immobilon-L または Immobilon-FL (Merck Millipore))、およびろ紙を転写用バッファー (47.9 mM Tris、38.6 mM グリシン、10%エタノール、および 0.037% SDS) 中で振とうさせた後、トランスブロット SDS セル (Bio-Rad) に設置してゲル中の蛋白質をメンブレンに転写 (12 V、1時間) した。転写済みメンブレンを 3% スキムミルク (雪印メグミルク) /TNT バッファー (0.1 M Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) または BlockingOne-P 中で1時間振とうさせることでブロッキングした。メンブレンを TNT バッファーで洗浄した後、Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 (東洋紡) で希釈した一次抗体と 4°Cで一晩インキュベートした。翌日、メンブレンを TNT バッファーで洗浄した後、0.01% SDS/TNT バッファー溶液で 5,000 倍希釈された二次抗体と室温で1時間インキュベートした。再びメンブレンを TNT バッファーで洗浄した後、Chemi-Lumi One を用いてメンブレン上に結合した二次抗体を化学発光させた。シグナルの検出には FUSION Solo S (Vilber-Lourmat) を用いた。あるいは、IRDye600 二次抗体から発せられるシグナルを検出する際には ODYSSEY Infrared Imaging System (LI-COR) を用いた。

## 2-7 蛍光免疫染色

15 mm カバースリップ (松浪硝子) を敷いた 6 ウェルプレートに、細胞密度 (濃度) が  $2 \times 10^5$  細胞/2 mL/ウェルとなるように HeLa 細胞を播種し、2日間培養した。U2OS 細胞を観察に用いる際には、カバースリップへの接着を促進するためにガラス表面を 1%ゼラチン溶液 (富士フイルム和光純薬) で前処理 (37°C インキュベータ内で約1時間静置した後液体を除去し、同所で一晩自然乾燥) した。各図に示された条件で DNA 損傷を与えた後、カバースリップを氷冷した PBS が張られた 12 ウェルプレートに移した。氷冷した PBS で3回洗浄し、固定用バッファー (3%パラホルムアルデヒド (ナカライまたは富士フイルム和光純薬)、2%スクロースおよび 0.5% Triton X-100 を含む PBS) に浸して氷上で30分間静置することで細胞を固定した (Inano S *et al.*, 2017)。氷冷した PBS を用いて5分間隔で3回振とうした後、0.5% Triton X-100/PBS に置換し5分間氷上で静置することで透過処理を行った。常温の PBS を用いて5分間隔で4回振とうした後、2% BSA を含む PBS でブロッキングした。1時間後、常温の PBS で一度洗浄した後一次抗体反応を室温で1時間行った。その後常温の PBS で洗浄し、二次抗体反応を遮光した状態で1時間行った。一次抗体および二次抗体は 2% BSA を含む PBS で希釈され、カバースリップ表面を完全に覆うために十分な量を滴下した。最後に、PBS で希釈した 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) によって核を対比染色した。PBS と滅

菌水で洗浄した後、VECTORSHIELD Mounting Medium (VECTOR LABORATORIES) を用いてカバースリップをスライドガラス (松浪硝子) 上にマウントした。

カバースリップ上のサンプルを観察するために、高解像度蛍光顕微鏡 DeltaVision Elite システム (Cytiva) を用いた。蛍光顕微鏡の対物レンズは観察対象に応じて 20×UPlanFI (NA 0.50)、40×UPlanFI (NA 0.75) または油浸 60×PlanApo N (NA 1.42) (全て Olympus) を使い分けて使用し、カメラは CoolNAP HQ2 Monochrome Interline CCD (Photometrics) を用いた。画像は各視野につき z 軸方向に 0.2-0.5  $\mu\text{m}$  間隔で最大 50 枚程度撮影し、図 3-10 および 12 (RAD51 foci) 以外は焦点が最も合った 1 枚を選んで用いた。得られた画像データを SoftWoRx (Cytiva) ソフトウェアから TIFF ファイルまたは deltavision ファイルとして出力し、バックグラウンド補正 (明暗の補正) は FIJI ソフトウェア上で行った。これらの画像処理操作は同一条件で全画像に反映させた。

5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) または 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) で新生鎖 DNA を標識するために EdU または BrdU を終濃度 10  $\mu\text{M}$  で培養上清に加え、各図に示された時間だけ培地に含ませることで新生鎖 DNA に取り込ませた。Click-iT EdU 染色を単独で行った際には製造元 (Thermo Fisher Scientific) の説明書に従った。Click-iT EdU 染色と蛍光免疫反応を同時に行った際には、上述の蛍光免疫染色法の手順における二次抗体反応と DAPI 対比染色との間で必要な試薬を調製し EdU を蛍光標識した。BrdU の蛍光標識は蛍光免疫染色法に則って行われた。上述のように固定処理と透過処理を施した細胞を滅菌水で洗浄し、2 M 塩酸と 30 分間室温でインキュベートすることで DNA を変性させた。変性反応は 1M Tris 溶液を加えることで終了させた。PBS で洗浄した後、BlockAce (住友ファーマプロモ) 溶液でブロッキングした。0.2% Tween20 を含む PBS で希釈した抗 BrdU 抗体をガラス表面に滴下し、4°Cで一晩インキュベートした。その後、抗 BrdU 抗体に対する二次抗体反応を行った。

1 核あたりの平均蛍光強度の測定 ( $\gamma$ -H2AX および EdU) および RAD51 フォーカス数の解析は、中岡秀憲助教と共同開発した ImageJ カスタムマクロプログラムまたはマクロスクリプトを使用して行った。DAPI 画像は "Mexican Hat Filter" プラグイン

(<https://imagej.nih.gov/ij/plugins/mexican-hat/index.html>) を使って処理され、処理された画像に基づいて核領域を内蔵の "Analyze Particles" 機能で識別した。バックグラウンド減算後 (内蔵の "Subtract Background" 機能を使用)、個別の核領域内における  $\gamma$ -H2AX または EdU シグナルの平均蛍光強度を定量した。RAD51 フォーカスを判別するために、FIJI に内蔵された "Find Maxima" 機能を使用した。

## 2-8 コメットアッセイ

コメットアッセイは comet assay kit (Bio-Techne) を用いて行われた。HeLa 細胞を 6 mL の DMEM で満たした直径 6 cm の培養皿に  $2.5 \times 10^5$  細胞/培養皿の密度で播種し、2

日間培養した。各図に示された条件に基づき、過酸化水素または HU を含む培地中で培養した後細胞を回収した。回収された細胞を低融点アガロースと混合し、専用のスライドガラス上に滴下した。スライドガラスを湿箱内に平置した後 4°C 冷蔵庫内に移し、アガロースゲルを固化させた。検出する DNA 鎖切断の種類に応じて、以下の操作①または②を行った；① DNA を変性させずに電気泳動を行う場合、スライドガラスをキットに付属の溶出バッファー液に浸し、4°C 冷蔵庫内で 2 時間インキュベートした。泳動バッファー（100 mM Tris および 300 mM 酢酸ナトリウムを溶かし、酢酸で pH9.0 に調製した溶液）に平衡化した後、スライドガラスを同バッファーで満たされた電気泳動槽（BIO CRAFT）内に移し、45 分間 25 V で電気泳動した。この時に用いる泳動バッファーは予冷しておき、また、4°C の冷蔵庫内で遮光しながら電気泳動することで発熱と DNA の分解を抑えた。泳動終了後、スライドガラスを 7.5 M 酢酸アンモニウム溶液および 95% エタノールに順に浸すことで DNA を固定させた後、室温で一晩かけて自然乾燥させた。DNA を変性させて電気泳動を行う場合、スライドガラスを溶出バッファーに浸したまま 4°C 冷蔵庫内で一晩インキュベートした。② DNA を変性させて電気泳動を行う場合、スライドガラスをキットに付属の溶出バッファー液に浸し、4°C 冷蔵庫内で一晩（約 16 時間から 18 時間）インキュベートした。アルカリ性の泳動バッファー（400 mM NaOH, 2 mM EDTA）に平衡化した後、スライドガラスを同バッファーで満たされた電気泳動槽内に移し、30 分間 25 V で電気泳動した。泳動終了後、スライドガラスを 70% エタノールに浸すことで DNA を固定させた後、37°C に設定したホットプレート上で乾燥させた。操作①および②に共通して、スライドガラス上で固定された DNA を SYBR Gold（Thermo Fisher Scientific）で染色した。染色した DNA は DeltaVision Elite システムを用いて観察された。その際に用いた対物レンズは 10×UPlanFL N (NA 0.30) で、視野ごとに焦点を合わせながら単層の画像を得た。得られた画像データを SoftWoRx（Cytiva）ソフトウェアから TIFF ファイルまたは deltavision ファイルとして出力し、バックグラウンド補正（明暗の補正）は FIJI ソフトウェア上で行った。これらの画像処理操作は同一条件で全画像に反映させた。

コメットテールの長さを解析するために、操作①に則って電気泳動を行った場合は FIJI ソフトウェアを使用した。ソフトウェア上でヘッド領域の中心からテール領域の端まで（シグナル強度がバックグラウンドと等しくなる点まで）を直線に沿って手動で測定した。操作②に則って電気泳動を行った場合は、ImageJ の OpenComet プラグイン（Gyori BM *et al.*, 2014）を使用した。

## 2-9 フローサイトメトリー解析

蛍光免疫染色されたサンプルをフローサイトメトリー解析するための方法は文献に従った（Tanaka T *et al.*, 2009）。HeLa 細胞を 10 mL の DMEM で満たした直径 10 cm の



培養皿 2 枚に  $5 \times 10^5$  細胞/培養皿の密度で播種し、3 日間培養した。各図に示された条件に基づき過酸化水素または HU を含む培地中で培養された細胞ペレットを回収し PBS 0.5 mL で懸濁した。細胞懸濁液を 1% PFA を含む PBS 5 mL と懸濁した後、15 分間氷上で静置することで固定処理を行った。遠心分離 ( $200 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 5 分) することで集めた細胞ペレットを 80% エタノール 5 mL で再懸濁した後、 $-20^\circ\text{C}$  冷凍庫内で一晩インキュベートすることで透過処理を施した。翌日、遠心分離 ( $200 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 5 分) した後細胞ペレットを PBS と懸濁することで細胞を洗浄した。再び遠心分離した上で 1% BSA を含む PBS と懸濁しブロッキング反応を行った。その後、一次抗体として抗 $\gamma$ -H2AX 抗体を、二次抗体として抗マウス IgG Alexa 488 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。一次抗体反応は 2 時間、二次抗体反応は 30 分間かけて室温で行った。これらの抗体は 1% BSA を含む PBS で希釈された。最後に、サンプルを遮光しながら DNA を  $5 \mu\text{g/mL}$  PI で染色しながら RNA を  $100 \mu\text{M}$  RNase によって分解した。PI 染色されたサンプルは FACS Aria III (BD Biosciences) に供された。得られたデータを FCS ファイルとして出力し、FlowJo V10 ソフトウェア上で展開した後種々の解析を行った。

HeLa 細胞の細胞周期を解析した際は、任意の時点で得られた細胞ペレットを 1 mL の PBS に懸濁した。細胞懸濁液と 100% エタノール 5 mL を懸濁することで固定処理を行った。遠心分離 ( $200 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 5 分) した後細胞ペレットを PBS と懸濁することで細胞を洗浄した。洗浄済の細胞に含まれる RNA を  $100 \mu\text{M}$  RNase によって分解した後、 $50 \mu\text{g/mL}$  PI で DNA を遮光しながら染色した。PI 染色されたサンプルは BD Accuri C6 Plus Flowcytometer に供された。得られたデータを FCS ファイルとして出力し、FlowJo V10 ソフトウェア上で展開した後種々の解析を行った。

## 2-10 抗体リスト

本研究に用いた抗体（一次抗体および二次抗体）に関する情報は章末の**表3および4**にまとめた。

## 2-11 ソフトウェアと統計解析

FIJI (ImageJ v2.3.0/1.53f) (Schindelin *et al.*, 2012) を用いて画像処理を行った。数値データの整理と計算を行うために Microsoft Excel for Mac を用いた。統計的有意差を求めるために、Unpaired *t*-tests と Mann-Whitney *U* tests は GraphPad Prism software (version 6) for Mac OS 上で行った。Anderson-Darling test は ‘nortest’ R package (<https://CRAN.R-project.org/package=nortest>) に含まれる ‘ad.test’ function を用いた。各図のグラフは GraphPad Prism または FlowJo V10 上で作成され、出力されたものを Affinity Designer (v1.10.5) 上で図としてまとめた。

表3 実験に用いた一次抗体

抗体の商品名	販売会社名	カタログ番号	ホスト生物	抗体の種類	抗原	希釈倍率
STN1	Sigma	HPA037924-100UL	Rabbit	ポリクローナル	Recombinant protein - Protein epitope signature tag (PREST) antigen	1:100
Histone H3	Abcam	ab1791	Rabbit	ポリクローナル	Synthetic peptide (Available as ab12149)	1:5,000
Chk1 (G-4)	SantaCruz	sc-8408	Mouse	モノクローナル	Full length human Chk1	1:1,000
Phospho-Chk1 (Ser345)	Cell Signaling Technology	2341	Rabbit	ポリクローナル	A synthetic phosphopeptide corresponding to residues surrounding Ser345 of human Chk1	1:1,000
Chk2	BD	611571	Mouse	モノクローナル	Peptide corresponding to amino acids 311-234 of mouse Chk2	1:1,000
Phospho-Chk2 (Thr68)	Cell Signaling Technology	2661	Rabbit	ポリクローナル	A synthetic phosphopeptide corresponding to residues surrounding Thr68 of human Chk2	1:1,000
STN1	Sigma	HPA037924-100UL	Rabbit	ポリクローナル	Recombinant protein - Protein epitope signature tag (PREST) antigen	1:100
Histone gamma H2AX (JBW301)	Millipore	05-636	Mouse	モノクローナル	Phosphopeptide (C-KATQAP(S)QEY) corresponding to amino acids 134-142 of human histone H2AX	1:2,000 (ウエスタタンブロットティング、蛍光免疫染色); 1:200 (フローサイトメトリー)
PARP1	Cell Signaling Technology	9532	Rabbit	ポリクローナル	A synthetic peptide corresponding to residues surrounding Gly623 of human PARP-1	1:1,000
BrdU	Roche	BMC9318	Mouse	モノクローナル	5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)	1:400
RAD51	Abcam	ab63801	Rabbit	ポリクローナル	Recombinant full length protein of human RAD51	1:1,000

表4 実験に用いた二次抗体

抗体の商品名	販売会社名	カタログ番号	宿主生物	抗体の種類	付加された化合物	抗原	希釈倍率
Amersham ECL Mouse IgG, HRP-linked whole Ab	Cytiva	NA931-1ML	Sheep	Polyclonal	Horse radish Peroxidase	Mouse IgG	1:5,000
Amersham ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole Ab	Cytiva	NA934-1ML	Donkey	Polyclonal	Horse radish Peroxidase	Rabbit IgG	1:5,000
IRDye® 800CW Donkey anti-Mouse IgG Secondary Antibody	LI-COR	926-32212	Donkey	Polyclonal	IRDye 800CW	Mouse IgG	1:10,000
IRDye® 800CW Donkey anti-Rabbit IgG Secondary Antibody	LI-COR	926-32213	Donkey	Polyclonal	IRDye 800CW	Rabbit IgG	1:10,000
Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 488	Thermo Fisher	A21202	Donkey	Polyclonal	Alexa Fluor 488	Mouse IgG	1:500 (蛍光免疫染色) 1:100 (フローサイトメトリ-解析)
Cy5 AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson	115-175-146	Goat	Polyclonal	Cy5	Mouse IgG	1:500
Cy5 labeled goat anti-rabbit IgG (H+L)	Cytiva	PA45004	Goat	Polyclonal	Cy5	Rabbit IgG	1:500

## 第三章

### 結果

### 3-1 過酸化水素に対する感受性に CST 複合体が及ぼす影響

#### 3-1-1 CTC1 または STN1 がノックダウンされた HeLa 細胞の樹立

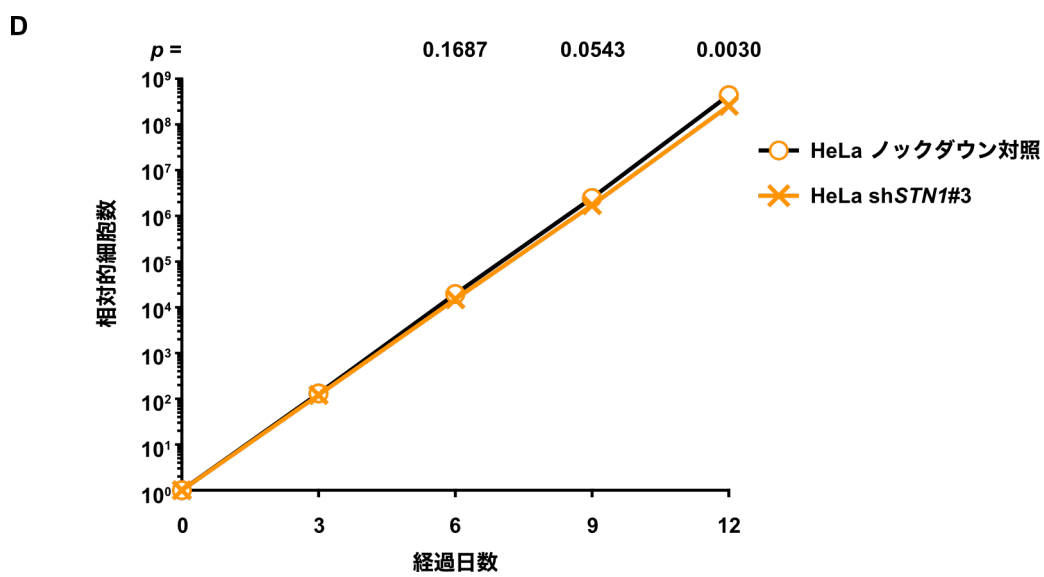
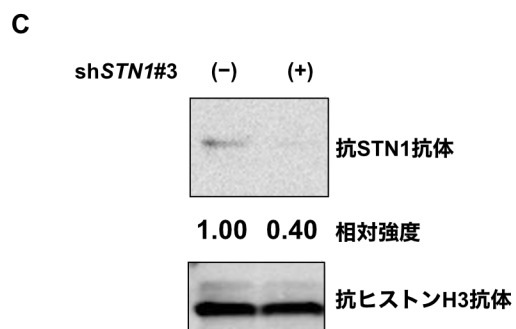
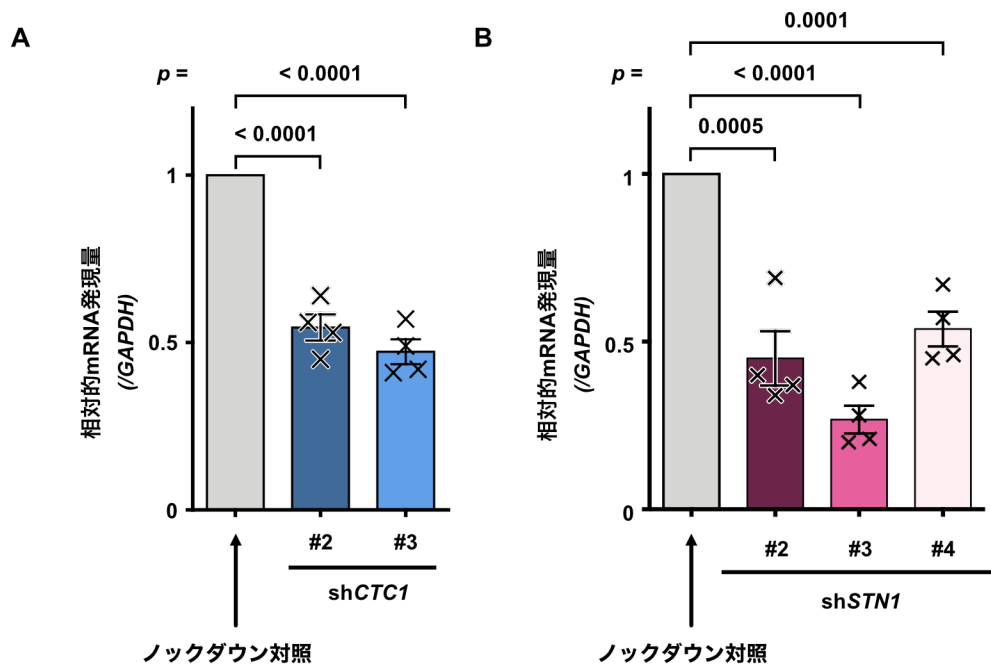
*CTC1* または *STN1* ノックダウン細胞を作製するために、sh*CTC1* または sh*STN1* 配列をレンチウイルス感染によって HeLa 細胞に導入し、恒常的に発現させた。また、陰性対照として sh 配列を挿入していない空のベクターを用いてウイルス感染させた細胞（ノックダウン対照細胞）も作製した。

sh 配列を発現させた HeLa 細胞における *CTC1* または *STN1* の発現量を、定量 RT-PCR 法を用いて調べた。ウイルス感染後、薬剤選択と回復期間を経て 7 日目の各細胞から全 RNA を抽出し、mRNA を逆転写した後 *CTC1* または *STN1* に対合するプライマーセットを用いて定量的に増幅することで、得られた産物の量を比較定量した。ハウスキーピング遺伝子の *GAPDH* の発現量に基づき標準化させた上でノックダウン対照細胞での *CTC1* または *STN1* の発現量に対する相対値を求めた。実験の結果、sh*CTC1*#3 配列および sh*STN1*#3 配列が最も高い発現抑制効率を示した（**図 3-1-1 A から D**）。

発現量解析に加えて、*STN1* ノックダウンによって内在性の STN1 蛋白質が減少したことをウェスタンブロットティングによって確かめた。RNA の回収と同じ時点で、HeLa sh*STN1* 細胞とノックダウン対照細胞を同数ずつ回収した。各細胞ペレットを SDS サンプルバッファと混合・加熱することで蛋白質を変性させ、得られた全細胞抽出液を SDS-PAGE に供した。ノックダウン対照細胞と sh*STN1*#3 細胞との間でバンドの濃さを比較した際に、ローディングコントロールとして検出したヒストン H3 蛋白質に対するバンドの濃さは均一だった一方、抗 STN1 抗体によるバンドは sh*STN1*#3 細胞のみ薄くなった（**図 3-1-1 C**）。抗ヒストン H3 抗体によるバンドのシグナル値で標準化させた上で抗 STN1 抗体によるバンドのシグナルを定量したところ、sh*STN1*#3 細胞に含まれる STN1 蛋白質はノックダウン対照細胞の約 40% であると推察された。

*STN1* 遺伝子を持続的にノックダウンすることで HeLa 細胞の増殖にどのような影響がもたらされるか調べるために増殖曲線を作成した。レンチウイルス感染後薬剤（ピューロマイシン）による選択と薬剤選択を行わなかった回復期間を経て 5 日目の時点から実験を開始し、細胞数を測定したあと継代する操作を 3 日おきに計 4 回繰り返した。そして、初発の細胞数を 1 とした相対的な細胞数を片対数グラフに表した（**図 3-1-1 D**）。その結果、HeLa sh*STN1*#3 細胞の数は 9 日目を過ぎた頃からノックダウン対照細胞と比べて有意な差を示したが、両者の増殖速度はほぼ等しかった。すなわち、STN1 を欠失させても細胞増殖は抑制されないことが示唆された。

以上の結果から、sh 配列の導入後 7 日目の sh*CTC1* または sh*STN1* 細胞において各遺伝子の発現は抑制されていることが分かった。そのため、以降の実験ではレンチウイルス感染後 7 日目の細胞を用いて行った。また、以降の実験では sh*CTC1*#3 細胞を sh*CTC1* 細胞、sh*STN1*#3 細胞を sh*STN1* 細胞とそれぞれ呼ぶ。



### 図 3-1-1 shRNA 配列の導入によって CTC1 および STN1 の発現は持続的に抑制される

**A** レンチウイルス感染後 7 日目の HeLa shCTC1#2, #3 およびノックダウン対照細胞から全 RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法により CTC1 の cDNA を定量した。ノックダウン対照細胞での CTC1 の発現量を 1 とした相対的発現量を求めた。その際に GAPDH の mRNA 量を内部標準として用い標準化を行った。各棒グラフ上の記号は各実験での発現量を表し、棒グラフの高さは平均値を表している。誤差線は 4 回の独立した実験の標準誤差を示す。**B** **A** と同様の手法で、感染 7 日目の HeLa shSTN1#2, #3 および#4 細胞での STN1 の発現抑制効率を調べた。各棒グラフ上の記号は各実験での数値を表し、棒グラフの高さは平均値を表している。誤差線は 4 回の独立した実験の標準誤差を示す。**C** HeLa shSTN1#3 細胞およびノックダウン対照細胞から得られた全細胞抽出液に含まれる STN1 およびヒストン H3 蛋白質をウェスタンブロッティングにより検出した。図の右側に、どの抗体をブロッティング反応に用いたかを記した。抗 STN1 抗体のバンドの下部に記した相対強度とは、(抗 STN1 抗体のバンドのシグナルの総量 / 抗ヒストン H3 抗体のバンドのシグナルの総量) の計算式によって得られた各サンプルの値を「ノックダウン対照細胞」の値を基準に変換した値である。**D** HeLa shSTN1 #3 細胞およびノックダウン対照細胞の増殖曲線。レンチウイルス感染後 5 日目がグラフの 0 日目に相当し、細胞種ごとにこの時点での細胞数を  $10^0$  (= 1.0) と定める。グラフ中の各点は 4 回の独立した実験の平均値を示す。細胞種間での相対的細胞数の差について、グラフの上部に  $p$  値を記載した。統計的有意差は Unpaired  $t$  tests に基づいて求めた。

### 3-1-2 CST 複合体を欠く HeLa 細胞が DNA 損傷を受けた場合の生存率

CST 複合体と DNA 損傷試薬に対する感受性との関連性は幾つかの先行研究で示されている (Wang F *et al.*, 2014; Zhou Q, Chai W, 2016; Nguyen DD *et al.*, 2023)。彼らは過酸化水素の他に MMS やカンプトテシンなどを細胞に作用させ、生存率が STN1 ノックダウンによって低くなることを見出した。この再現性を確かめるため、DNA 損傷試薬に曝された細胞の生存率と増殖能に CST 複合体が及ぼす影響をコロニー形成率に基づいて調べた (図 3-1-2 A)。互いに重なり合わない程度の数 (1 ウェルあたり 100 から 400 細胞) の HeLa shSTN1 細胞およびノックダウン対照細胞を最初に播種し、損傷導入後は 1 細胞由来のコロニー同士が重なり合うまでに固定してクリスタルバイオレット染色した。その結果、統計的有意差は得られなかったものの HeLa shSTN1 細胞の相対的生存率がノックダウン対照細胞を下回る傾向が観察された (図 3-1-2 B および C)。相対的生存率は最初に播種した細胞がウェルの底面に付着した割合に基づいていて、培地に DNA 損傷試薬を加えなかった場合でも 6 割程度の細胞しかコロニーとして計測できなかった。各ウェルに播種した細胞数が 100 から 400 と限られていたため、同時に播種した 3 ウェル分の平均値を各濃度におけるコロニー数として扱ったものの、実験誤差は強く現れたと考えられる。このような結果からも先行研究の再現性はある程度確かめられたため、以降の実験に進んだ。その際に、1 細胞レベルでの実験 (例: 蛍光免疫染色)

と細胞集団としての実験(ウェスタンブロッティング)との間で一貫性をもたせるため、少なくとも  $2 \times 10^5$  個以上の細胞に対して過酸化水素による DNA 損傷を与えた。生存率を測定するための実験でも同様に、 $2.5 \times 10^5$  個の細胞を播種した培地に過酸化水素を添加した。



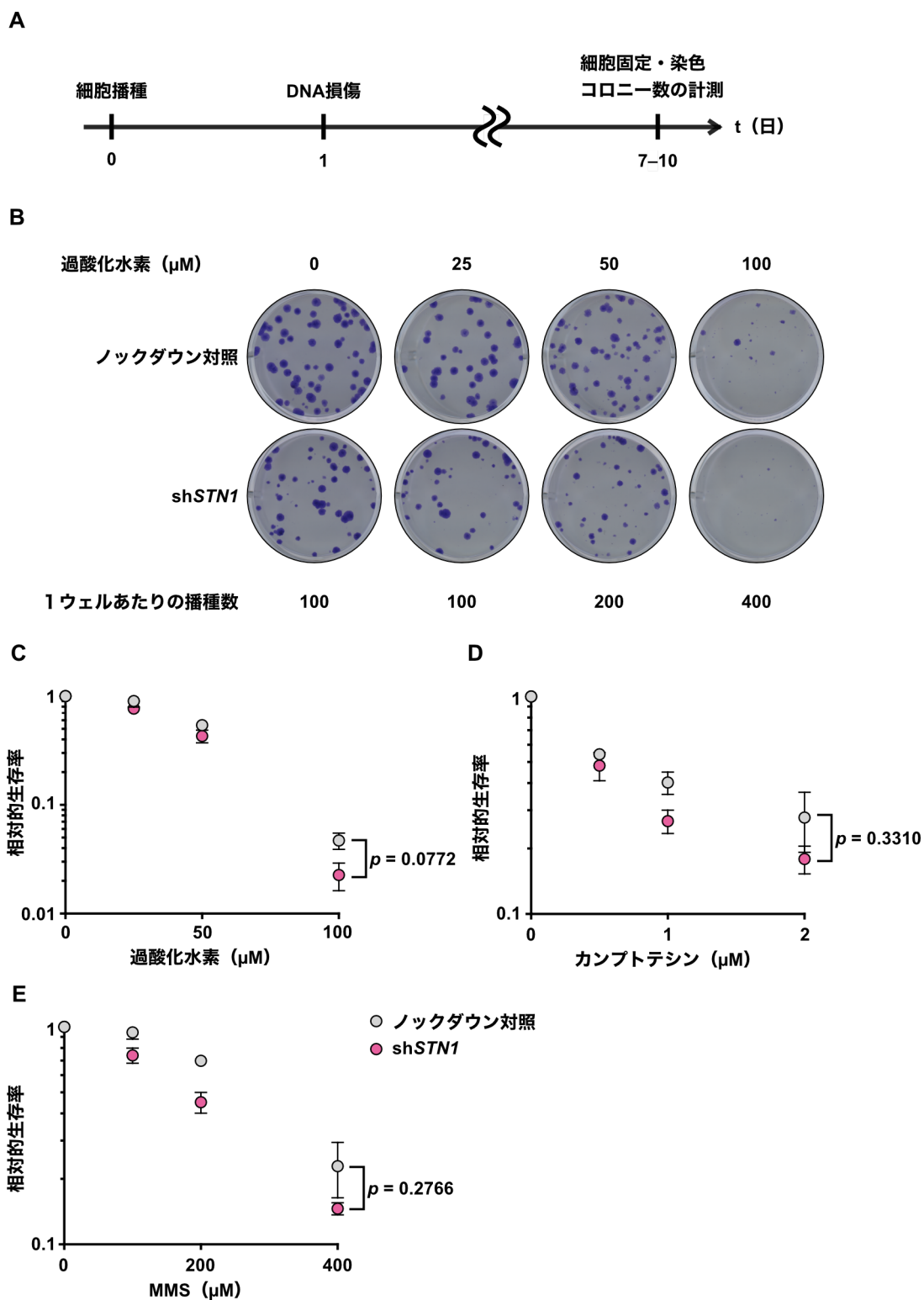


図 3-1-2 STN1 ノックダウンによって DNA 損傷に対する感受性が亢進される

A 実験の流れ図。播種して1日後に DNA 損傷を加えた。各 DNA 損傷試薬を培地に添加していた時間は以下の通りである：過酸化水素、2 時間；カンプトテシンおよび MMS、1 時間。

PBS で洗浄し、培地を交換した後コロニーが計測可能な大きさになるまで(6日から9日間程度)培養した。**B** 過酸化水素を含む培地で培養された HeLa shSTN1 細胞またはノックダウン対照細胞由来のコロニーをクリスタルバイオレット染色したことを示す代表的な画像。図の下部に過酸化水素の濃度と、播種した細胞数を記載している。**C-E** 過酸化水素(**C**)、カンプトテシン(**D**)、または MMS(**E**)を用いた際にコロニー数を計測し、相対的な生存率を求めた。誤差線は3回の独立した実験の標準誤差を示す。統計的有意差は Unpaired *t* tests に基づいて求めた。比較したサンプル間に *p* 値を記載した。

### 3-1-3 CST 複合体が過酸化水素処理された HeLa 細胞の生存に及ぼす影響

*CTCI* または *STN1* の発現低下と HeLa 細胞の過酸化水素に対する感受性との関連性を調べるために、過酸化水素に曝された細胞の生存率を調べた。

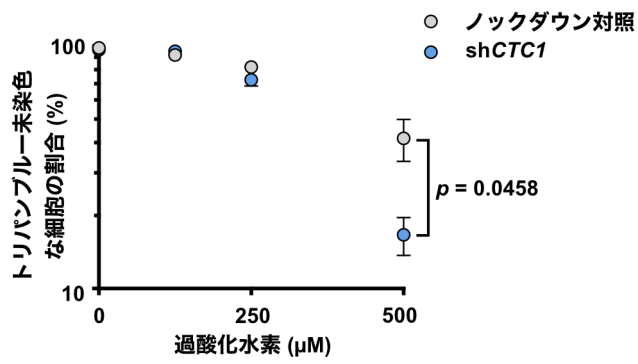
ノックダウン対照細胞、sh*CTCI* 細胞または sh*STN1* 細胞の培地に、終濃度 125, 250, 500  $\mu\text{M}$  となるように過酸化水素を添加したあと 2 時間培養した。過酸化水素を除去した後は通常の培地に交換し、2 日後にトリパンブルー染色法に基づいて生存率を調べた。培地に過酸化水素を添加しなかった(濃度 0  $\mu\text{M}$ ) 場合、HeLa sh*CTCI* または sh*STN1* 細胞とノックダウン対照細胞との生存率(計測した細胞の内、トリパンブルー未染色な細胞の割合)はほぼ 100%で等しかった。そのため、*CTCI* または *STN1* ノックダウン自体によって細胞生存率が損なわれないことが示唆された。125, 250  $\mu\text{M}$  の各濃度の過酸化水素に曝された細胞の生存率は濃度 0  $\mu\text{M}$  の場合と比べて殆ど減少しなかった。しかし、500  $\mu\text{M}$  の過酸化水素で処理された HeLa sh*CTCI* 細胞および同 sh*STN1* 細胞は、生存率が対照細胞と比較して低い傾向を示した(図 3-1-3A および B)。これらから、*CTCI* および *STN1* が過酸化水素処理された細胞の生存に寄与していることが示唆された。なお、sh 配列の非特異的結合によって表現型が得られた可能性を排除するため、HeLa sh*STN1*#2 細胞も用いて生存率測定実験を行った。その結果、過酸化水素に曝された HeLa sh*STN1*#2 細胞の生存率も B と同様にノックダウン対照細胞の生存率を下回った(図 3-1-3 C)。なお、前項のコロニー形成アッセイから培養スケールを変更(約 50 細胞/cm<sup>2</sup> から  $1.2 \times 10^4$  細胞/cm<sup>2</sup>) したため、細胞死をもたらす過酸化水素濃度が前項の実験と比べて 5 倍大きくなった。先行研究(Katsube *T et al.*, 2014)によると、過酸化水素は播種した細胞密度の差によって 1 細胞あたりの実効濃度が変化しやすいと考えられている。

トリパンブルー染色法以外の方法で HeLa sh*STN1* 細胞が過酸化水素に対して感受性を示しやすいことを確かめるために、未固定な細胞を PI 染色した後、陰性な(すなわち生細胞の)割合を求めた。図 3-1-3C までの実験と同様に HeLa sh*STN1* 細胞およびノックダウン対照細胞を回収し、フローサイトメトリーを用いた解析に供した(図 3-1-3 D)。フローサイトメトリー解析によって得られたデータを前方散乱光(FSC)と側方散乱光(SSC)の強度に基づき二次元展開した。この座標上で FSC および SSC の閾値を定めた。座標左下隅の正方形型の領域に含まれる粒子は、過酸化水素処理によって増加

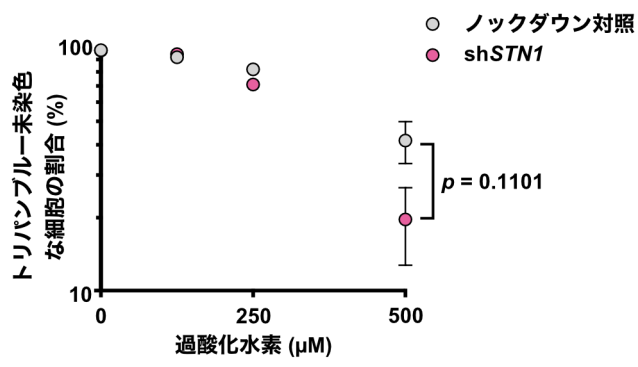
したので壊死細胞片だと考えられる。そのため、この領域外に存在する粒子を細胞として扱った。この領域に含まれる細胞の PI 強度をヒストグラム上に展開し、サンプル間で統一された FSC および SSC の閾値を定めた。閾値に基づき、PI 陰性（二次元展開座標上の黒点、ヒストグラムにおいて水色で表示された領域）または陽性（二次元展開座標上の赤点）を判定した（**図 3-1-3 E**）。培地に過酸化水素を加えなかった場合、FSC の強度が異なる 2 つの集団が検出され、PI 陽性細胞の FSC 強度は PI 陰性細胞よりも小さいという特徴が現れた。これらの 2 つの集団の SSC は等しいため、死（すなわち PI 陽性）細胞は内部の複雑さが保たれつつ小さくなったことが示唆された。過酸化水素処理によって二次元展開座標上での細胞の分布は変化したものの、同処理後の PI 陰性率に対して *STN1* ノックダウンは有意な差をもたらさなかった。しかし、PI 染色法でもトリパンブルー染色法と同様に *STN1* ノックダウンによって細胞生存率が低下する傾向が捉えられた（**図 3-1-3 F**）。

CST 複合体のいずれの構成因子を欠失させた場合でも安定的な蛋白質-DNA 間相互作用結合が失われることが先行研究で示唆されているため、以降の実験には *STN1* をノックダウンした細胞を供し、*CTCI* をノックダウンした細胞は用いなかった。発現抑制の標的としなかった *TEN1* も含めた、CST 複合体の全ての構成因子は複合体としての機能（**1-2** で説明）を発揮する上で必要である（Wang F *et al.*, 2012; Kasbek C *et al.*, 2013; Chastain M *et al.*, 2016; Lei KH *et al.*, 2021）。また、CST 複合体のいずれかのサブユニットを欠失させた場合、蛋白質間および DNA との相互作用は不安定化する（Miyake Y *et al.*, 2009; Feng X *et al.*, 2018）。そのため、HeLa sh*CTCI* および sh*STN1* 細胞の過酸化水素に対する感受性は機能的な CST 複合体が失われたことによって亢進されたと推察した。そこで以降の実験では、特筆ない限り HeLa sh*STN1* 細胞と同ノックダウン対照細胞を用いた。また、これらの細胞を終濃度 500  $\mu$ M の過酸化水素を含む培地で 2 時間培養する操作を過酸化水素処理と定めた。

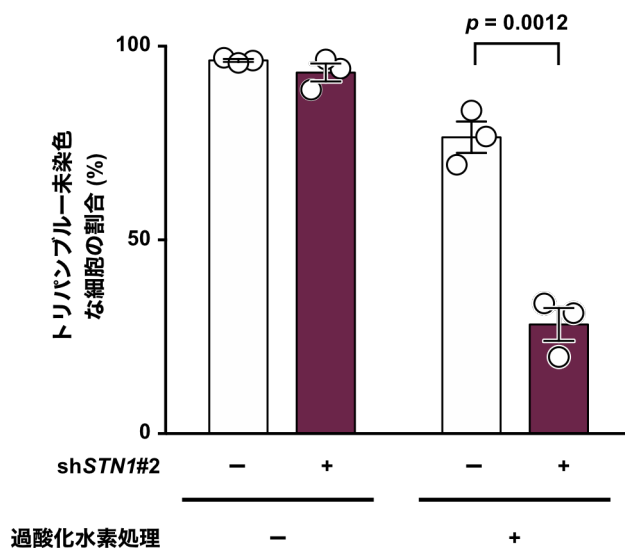
A



B



C



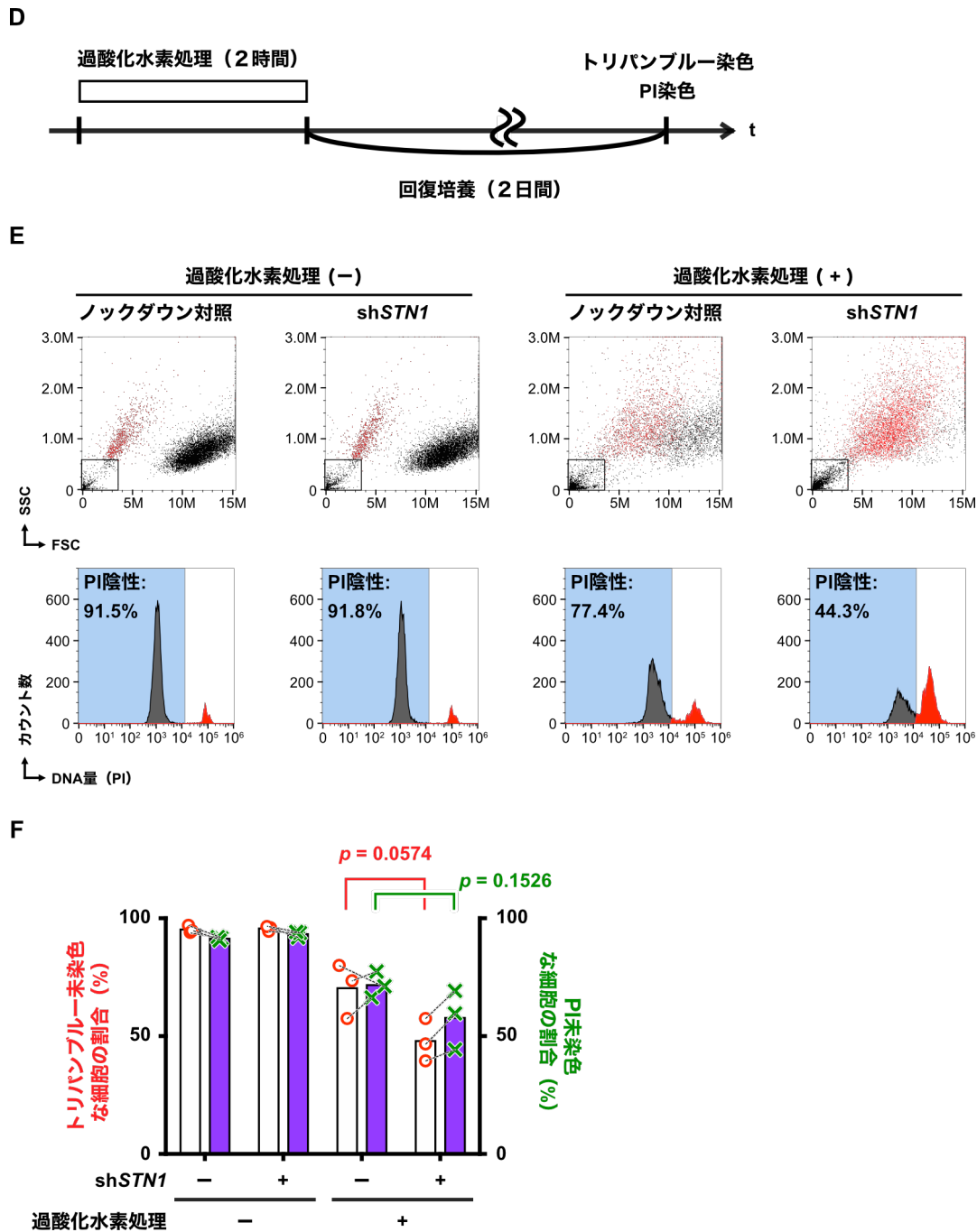


図 3-1-3 CTC1 または STN1 をノックダウンすることで過酸化水素処理された HeLa 細胞の生存率は減少する

A, B HeLa shCTC1 細胞 (A) または shSTN1 細胞 (B) を終濃度 125, 250, 500  $\mu\text{M}$  の過酸化水素を含む培地で 2 時間培養した後、総細胞数に占めるトリパンブルー未染色な細胞の (生細胞の) 割合を求めた。グラフの凡例に細胞種、横軸に過酸化水素濃度 (0  $\mu\text{M}$  は陰性対照として、何も加えずに培養した場合)、対数目盛の縦軸に割合を百分率で表す。誤差線は 3

回の独立した実験の標準誤差を示す。C HeLa shSTN1#2 細胞を終濃度 500  $\mu$ M の過酸化水素で 2 時間処理した後、A および B と同様の手法で生存率測定実験を行った。各棒グラフ上の記号は各実験結果を表し、棒グラフの高さは平均値を表している。誤差線は3回の独立した実験の標準誤差を示す。比較した各生存率の間に  $p$  値を記載した。統計的有意差は Unpaired  $t$  tests に基づいて求めた。D 実験の流れ図。回収した細胞の一部に対して、まずトリパンブルー染色を行った。次に、残りの細胞懸濁液の濃度(0.5 mL あたりの細胞数)を整えた後 PI を添加し、フローサイトメトリー解析に供した。E 独立に3回行った実験のうち1回分のフローサイトメトリー解析の結果。上段側の二次元展開座標上に設けた正方形型の領域(左下隅)外に含まれる細胞を  $10^4$  個計測した。上下段とも、黒色または赤色はそれぞれ PI 陰性または陽性な細胞を示している。F トリパンブルー陰性率と PI 陰性率との相関を示す。各棒グラフ上の記号は各実験での数値を表し、棒グラフの高さは平均値を表している。また、破線は実験ごとの各値の組み合わせを示している。比較した各陰性率の間に  $p$  値を記載した。統計的有意差は Unpaired  $t$  tests に基づいて求めた。

### 3-1-4 過酸化水素処理された HeLa 細胞における STN1 の発現量解析

過酸化水素に曝された HeLa 細胞の生存率が減少したことから、同細胞中では活性酸素種に対する応答経路が影響を受けたと予想された。そこで、過酸化水素処理に応じて STN1 の発現量が増加、あるいは減少するか調べた。

過酸化水素処理直後、または6時間の回復期間を置いた後に細胞を溶解し全 RNA を抽出した。オリゴ dT プライマーとトリ骨髄芽球症ウイルス (Avian Myeloblastosis Virus, AMV) 由来の逆転写酵素を用いて mRNA を逆転写した後、抗酸化経路に含まれる SOD2 (陽性対照) および STN1 に対合するプライマーセットを用いて各遺伝子産物を定量的に増幅した (図 3-1-4 A)。ハウスキーピング遺伝子の ACTB ( $\beta$ -Actin をコードする遺伝子) の発現量に基づいて標準化を行った上で、標的遺伝子の発現量を比較定量した。

過酸化水素処理を終えた直後の時点では、ノックダウン対照細胞における SOD2 の発現量は、培地に過酸化水素を添加しなかった場合 (陰性対照) と等しかった。しかし、過酸化水素処理後に回復期間を置いたことで同発現量は陰性対照と比べて有意に増加した。また、陰性対照において、SOD2 の発現量は STN1 ノックダウンの影響を受けなかった (図 3-1-4 B)。よって、STN1 ノックダウン自体がストレス応答経路を惹起させる可能性は少ないことが示唆された。ノックダウン対照細胞と同様に、shSTN1 細胞においても過酸化水素処理直後は SOD2 の発現量は陰性対照と比べて大きくならなかった。そして、shSTN1 細胞の SOD2 の発現量も回復培養を行うことで陰性対照と比べて平均値は増加した。しかし、両者の間で有意な差は生じなかった。SOD2 の発現量解析結果から、少なくともノックダウン対照細胞において過酸化水素処理は抗酸化経路を惹起させることが示唆された。STN1 ノックダウンの有無によって SOD2 の発現量に差が生じた原因として、 $t=8$  の時点で一部の HeLa shSTN1 細胞では細胞死が進み応答経路が

働かなかった可能性がある。

陽性対照の結果を踏まえて *STN1* の発現量も調べたところ、過酸化水素処理の有無に関わらず細胞種ごとに発現量は一定だった (図 3-1-4 C)。この結果から、過酸化水素処理によって *STN1* の発現は変化しないことと、同処理は恒常的なノックダウンを妨げないことが示唆された。

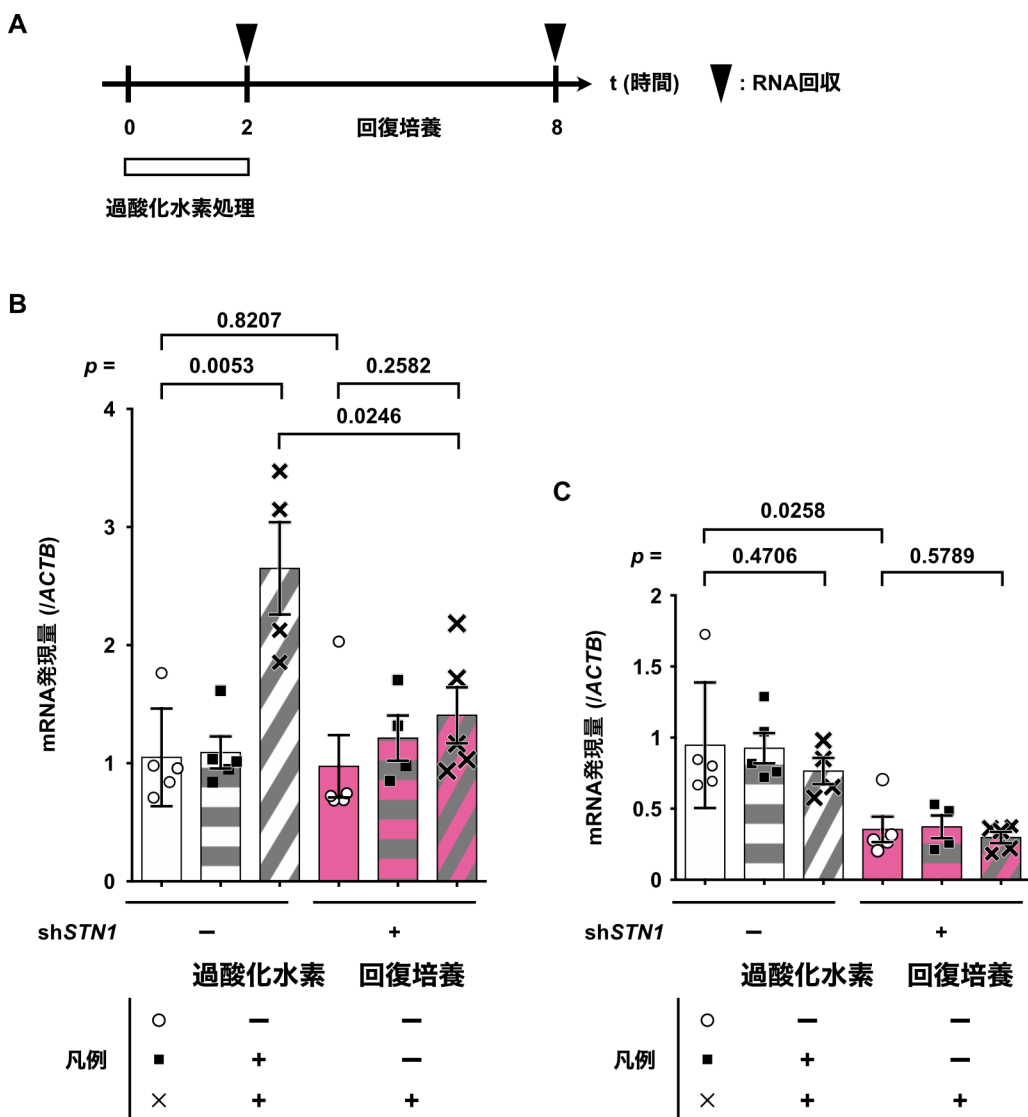


図 3-1-4 *STN1* の発現量は過酸化水素処理する前後で変化しない

**A** 実験の流れ図。**B**, **C** HeLa 細胞に過酸化水素処理を加えた直後、または回復培養を行った後全 RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法により *SOD2* (**B**) または *STN1* (**C**) の cDNA を比較定量した。その際に *ACTB* の mRNA 量を内部標準として用い標準化を行った後、発現量を求めた。各棒グラフ上の記号(凡例に各図形に対応する条件を記載)は各実験での発現量

を表し、棒グラフの高さは平均値を表している。誤差線は3回以上の独立した実験の標準誤差を示す。統計的有意差は Unpaired *t* tests に基づいて求めた。比較したサンプル間の上部に *p* 値を記載した。

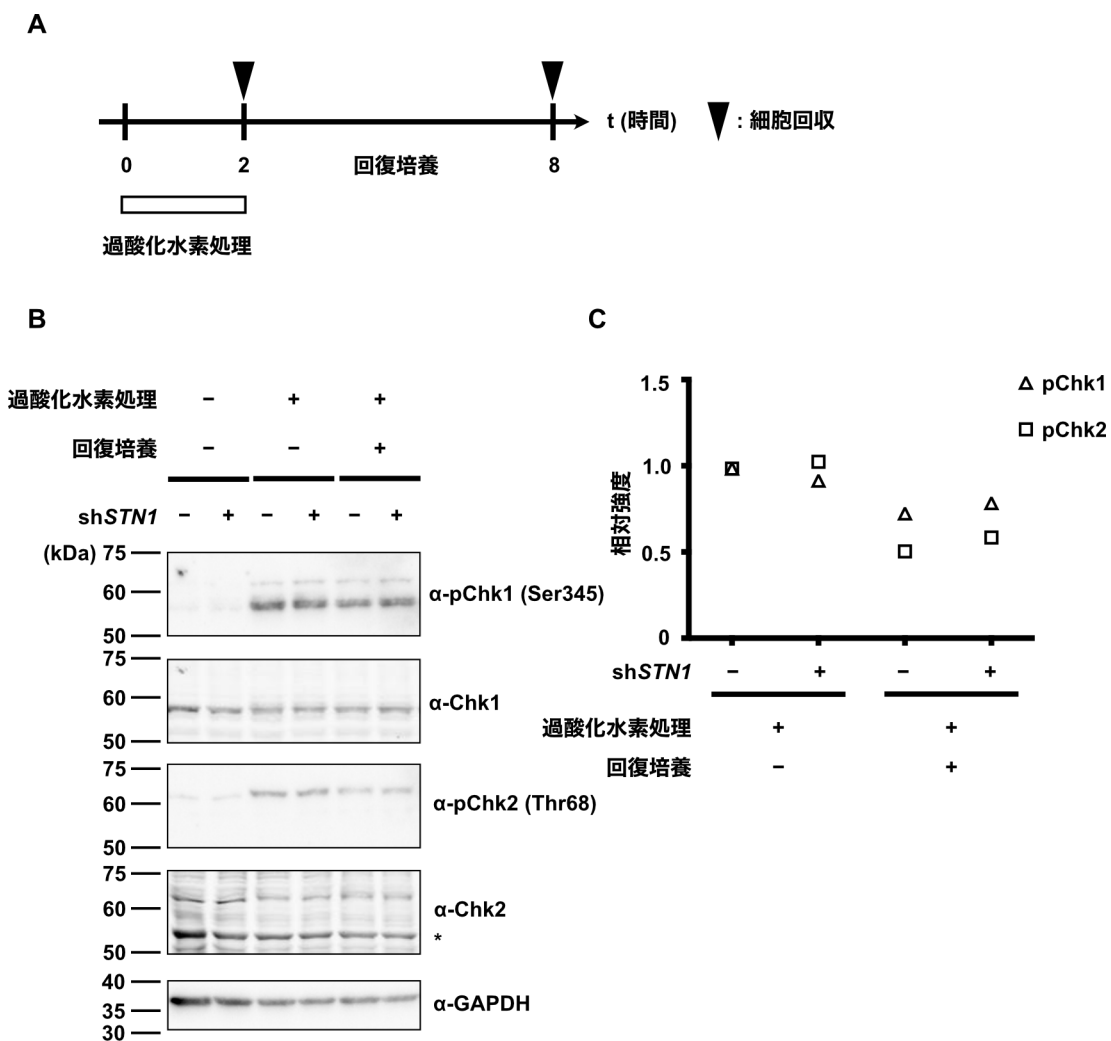
### 3-2 過酸化水素処理による DNA 損傷応答経路の活性化

#### 3-2-1 DNA 損傷チェックポイントリン酸化酵素のリン酸化

外的あるいは内的要因によって DNA 鎖が切断されると、リン酸化酵素の ATR および ATM の誘導と活性化が起きる。ATR および ATM が損傷を感知する因子として働き、蛋白質のリン酸化を介して DNA 修復や細胞周期の停止、または細胞死を制御する一連の分子機構は DNA 損傷応答と呼ばれる (Kopp B *et al.*, 2019)。この応答経路中で Chk1 および Chk2 と呼ばれるリン酸化酵素は ATR または ATM によってそれぞれリン酸化され、シグナル伝達因子として機能する。そこで、Chk1 および Chk2 蛋白質のリン酸化を指標として、過酸化水素処理によって DNA 損傷応答経路が活性化したことをウエスタンブロッティングによって確かめた。

過酸化水素処理直後、または回復培養を行った後、HeLa sh*STN1* 細胞およびノックダウン対照細胞をトリプシン処理することで回収した (図 3-2-1 A)。各細胞を溶出用バッファーで処理した際に上清画分に含まれる蛋白質の濃度を均一化させた後、サンプル溶液を SDS-PAGE に供した (図 3-2-1 B)。ローディングコントロールとして扱った抗 GAPDH 抗体と同様に、抗 Chk1 抗体および Chk2 抗体によるバンドが細胞種および回収時点に関わらず均一な濃さで検出されたことから、Chk1 蛋白質および Chk2 蛋白質の総量はサンプル間で一定だったことが示唆された。一方、リン酸化された Chk1/Chk2 蛋白質は過酸化水素処理されたサンプルのみに含まれることが、抗 phospho- (p) Chk1 (Ser345) 抗体および抗 pChk2 (Thr68) 抗体によるバンドから分かった。また、各時点における pChk1/pChk2 蛋白質のバンドの濃さを比較定量したことで、回復培養後も DNA 損傷応答経路が活性化される程の DNA 損傷が残っていたことが示唆された (図 3-2-1 C)。これらの結果から、過酸化水素処理によって DNA 損傷応答経路は活性化されることが明らかになった。





### 図 3-2-1 過酸化水素処理によって HeLa 細胞の DNA 損傷応答経路が活性化される

**A** 実験の流れ図。**B** HeLa shSTN1 細胞およびノックダウン対照細胞を終濃度 500 μM の過酸化水素で 2 時間処理した後回収した。回収する前に回復期間(通常培地で 6 時間培養)を設けたサンプルも準備した。図の右側に、どの抗体をブロットング反応に用いたかを記した。\*は非特異的なバンドであることを指す。**C** 抗 pChk1 抗体および抗 pChk2 抗体によるバンドのシグナル強度を定量した結果。グラフの縦軸の相対強度とは、(抗 pChk1 または pChk2 抗体のバンドのシグナルの総量 / 抗 Chk1 または Chk2 抗体のバンドのシグナルの総量) の計算式によって得られた各サンプルの値を「過酸化水素処理のみ施されたノックダウン対照細胞」の値を基準に変換した値である。

#### 3-2-2 γ-H2AX の形成

過酸化水素から生じる活性酸素種は DNA 鎖のホスホジエステル結合や塩基を攻撃し、一本鎖または二本鎖 DNA 切断を引き起こす (Driessens N *et al.*, 2009; Krokan HE,

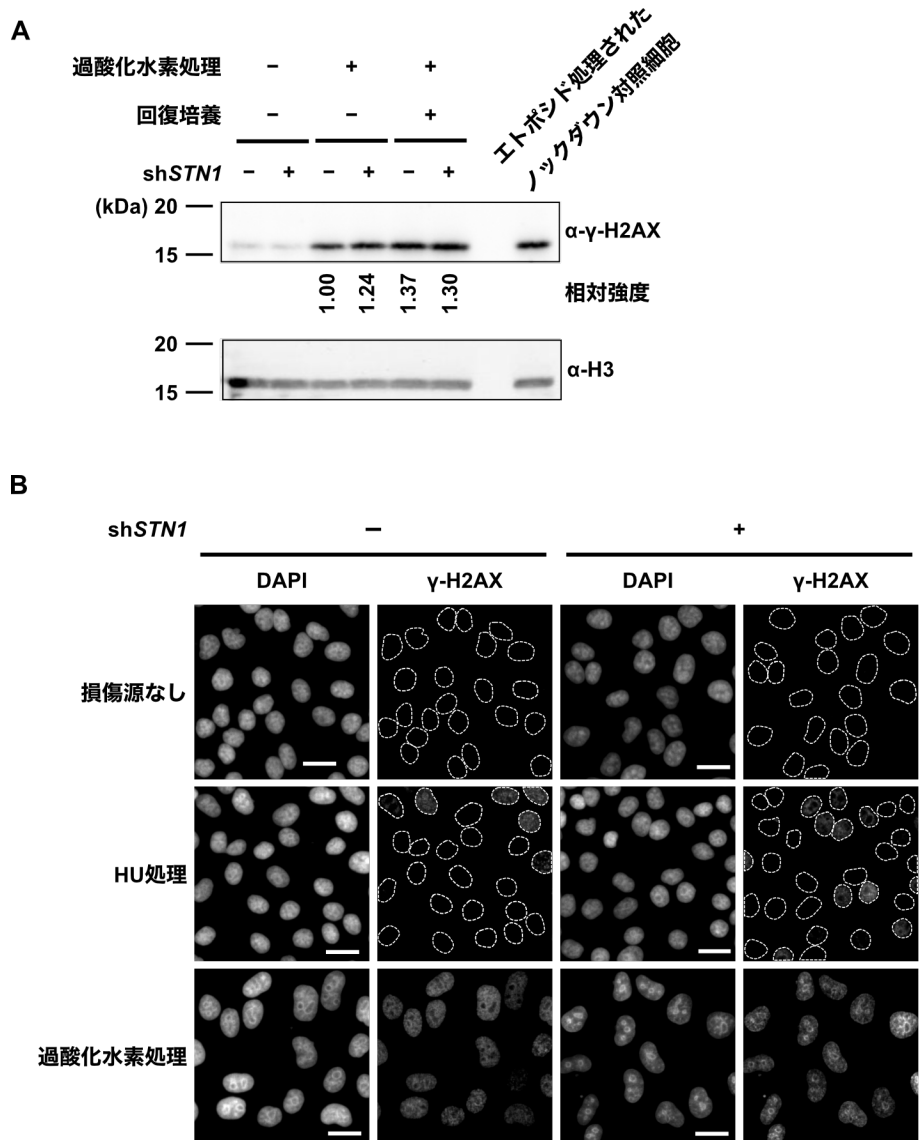
Bjørås M., 2013; Katsube T *et al.*, 2014)。そこで、ヒストン $\gamma$ -H2AX (139 番目のセリン残基がリン酸化されたヒストン H2AX) を指標として DNA 鎖切断が過酸化水素処理によって生じたか調べた。なお詳細は後述 (3-3-1) するが、HU または過酸化水素処理によって生じた $\gamma$ -H2AX は ATR に依存している可能性が先行研究で得られた (Ward IM *et al.*, 2001; Katsube T *et al.*, 2014)。そのため、本研究では $\gamma$ -H2AX を DNA 損傷のマーカー蛋白質として捉えるに留めた。

3-2-1 と同じ時間軸に沿って各時点で HeLa shSTN1 細胞およびノックダウン対照細胞をトリプシン処理することで回収した後、細胞数を揃えて得た細胞ペレットを SDS サンプルバッファーと混合した。この懸濁液を加熱することで蛋白質を変性させ、全細胞抽出液を得た。また、過酸化水素と異なる作用機序 (トポイソメラーゼ II の阻害) で二本鎖 DNA 鎖を切断する、エトポシドで処理されたノックダウン対照細胞を陽性対照として準備した。これらのサンプルを用いてウエスタンブロッティングを行った (図 3-2-2 A)。全てのサンプルの蛋白質濃度がほぼ均一であることは、ローディングコントロールとして扱ったヒストン H3 のバンドの濃さから示唆された。そして、過酸化水素処理された細胞のみで抗 $\gamma$ -H2AX 抗体によるバンドが検出され、過酸化水素処理による DNA 鎖切断が示唆された。なおバンドのシグナル強度の比較も行い、STN1 ノックダウンと回復培養の有無に関わらず過酸化水素処理によって $\gamma$ -H2AX が形成されることを確かめた。

次に、蛍光免疫染色法に基づいてヒストン $\gamma$ -H2AX のシグナル強度を比較定量することで、過酸化水素処理によって誘導された DNA 損傷の程度と STN1 ノックダウンとの関連性を調べた (図 3-2-2 B)。培養皿底面のカバーガラス上で培養した HeLa shSTN1 細胞およびノックダウン対照細胞に過酸化水素処理を行った直後に固定した。固定した細胞に対して透過処理を施した後、抗体反応によって細胞内の $\gamma$ -H2AX を蛍光標識した。DAPI で対比染色された領域中における $\gamma$ -H2AX シグナルの平均蛍光強度を、FIJI 上で 1 核ごとに解析した (図 3-2-2 C)。先行研究において、HU 処理された HeLa 細胞に含まれる $\gamma$ -H2AX シグナルは STN1 ノックダウンによって増強されるという結果が得られた (Chastain M *et al.*, 2016; Lyu X *et al.*, 2021)。そのため本実験では HU 処理を陽性対照として用いたところ、ノックダウン対照細胞と shSTN1 細胞との間に有意な差が見られた (図 3-2-2 C HU 処理)。HU は新生鎖 DNA 合成を阻害するため、S 期ではない一部の細胞では $\gamma$ -H2AX シグナルは検出されなかった。一方、過酸化水素処理された場合、 $\gamma$ -H2AX シグナルはほぼ全ての HeLa 細胞の核全面で検出された。このような傾向は先行研究でも報告されていて、他の DNA 損傷源 (例: 放射線照射) によって形成が促された場合と異なった (Katsube T *et al.*, 2014)。そして、STN1 ノックダウンによって 1 核あたりの $\gamma$ -H2AX シグナルの平均蛍光強度は増強されることが分かった (図 3-2-2 C 過酸化水素処理)。

ウエスタンブロッティングと蛍光免疫染色の実験結果から、過酸化水素処理によっ

で $\gamma$ -H2AX が生じることが見出された。特に、蛍光免疫染色によって $\gamma$ -H2AX は *STN1* ノックダウンによって増すことが示唆された。また、HU 処理または過酸化水素処理された細胞における $\gamma$ -H2AX シグナルを比較定量したことで、過酸化水素処理された細胞では細胞周期を問わず DNA 鎖が切断されている可能性も得られた。



C

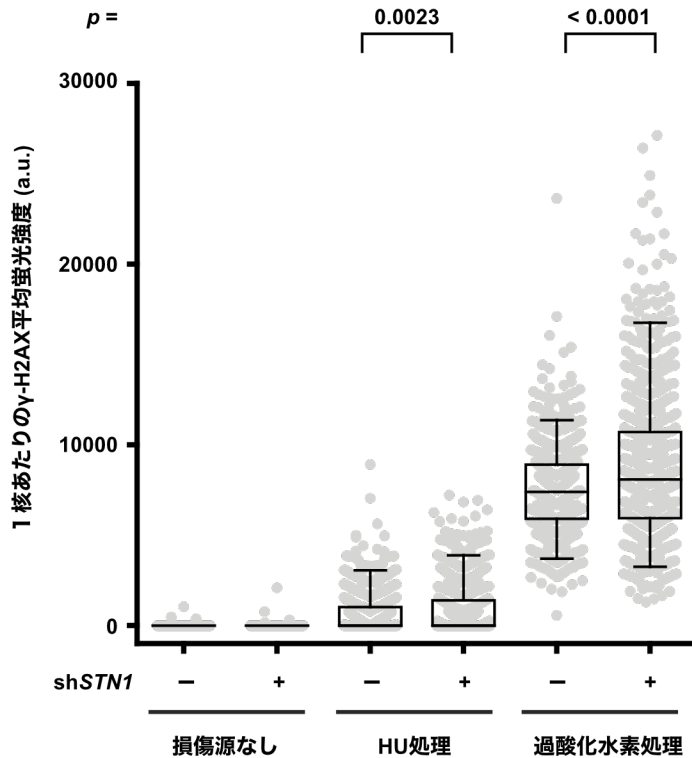


図 3-2-2 過酸化水素処理によって $\gamma$ -H2AX が生じる

**A** HeLa shSTN1 細胞ノックダウン対照細胞に対して過酸化水素処理またはエトポシド処理 (終濃度 25  $\mu$ M となるようにエトポシドを培地に添加し1時間培養)を加えた後細胞を回収した。図の右側に、どの抗体をプロット反応に用いたかを記した。抗 $\gamma$ -H2AX 抗体のバンドの下部に記した相対強度とは、(抗 $\gamma$ -H2AX 抗体のバンドのシグナルの総量 / 抗ヒストン H3 抗体のバンドのシグナルの総量)の計算式によって得られた各サンプルの値を「過酸化水素処理のみ施されたノックダウン対照細胞」の値を基準に変換した値である。**B** 抗 $\gamma$ -H2AX 抗体を用いた蛍光免疫染色の結果の中から、代表的な画像を抽出して示す。HeLa shSTN1 細胞およびノックダウン対照細胞に対して過酸化水素処理または HU 処理(終濃度 5  $\mu$ M となるように HU を培地に添加し3時間培養)を加えた直後に細胞を固定した。抗 $\gamma$ -H2AX 抗体と対応する二次抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。白色の破線で囲われた領域は核領域を表す。スケールバーは 30  $\mu$ m を表す。**C** **B** の結果に基づき、1核あたりの $\gamma$ -H2AX の平均蛍光強度を求めた。800 個以上の細胞核における $\gamma$ -H2AX の平均蛍光強度を解析した上で、ランダムに選んだ 800 個のデータを示している。箱ひげ図の箱部分は第一から第三四分位、ひげ部分の両端は 5 または 95 パーセントイルを示す(以下同様)。統計的有意差は Mann-Whitney *U* test に基づいて求めた。比較したサンプル間の上部に *p* 値を記載した。

### 3-2-3 過酸化水素処理によってもたらされる DNA 損傷の細胞周期依存性

前項の蛍光免疫染色の実験結果から、過酸化水素は細胞周期に依らず DNA 鎖切断をもたらす可能性を見出した。この可能性を大規模かつ効率的に検証するために、フローサイトメトリーを用いた解析を行った (Kurose A *et al.*, 2006; Tanaka T *et al.*, 2009; Berniak K *et al.*, 2013)。過酸化水素または HU (陽性対照) で処理された細胞を固定・透過した後、抗 $\gamma$ -H2AX 抗体およびヨウ化プロピジウム (Propidium iodide, PI) で染色し、フローサイトメトリーを通じて 1 サンプルあたり  $10^5$  個の細胞の蛍光強度を測定した。

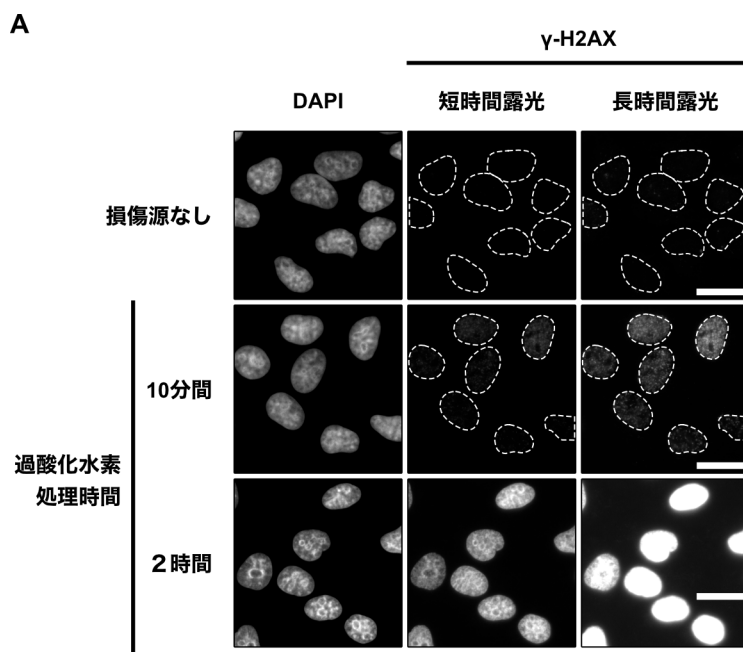
この解析における過酸化水素の処理時間は、以下の理由のため **3-2** で定義した時間よりも短縮した。**図 3-2-2 B** の結果を得る前の予備実験から、過酸化水素処理時間の長短に応じて $\gamma$ -H2AX シグナルの蛍光強度が変化するという知見を得た (**図 3-2-3 A**)。生存率測定実験などと同様に HeLa 細胞を 500  $\mu$ M の過酸化水素を含む培地で 2 時間培養した場合、ほぼ全ての細胞核で輝点を区別できないほど飽和した $\gamma$ -H2AX シグナルが検出された。一方、同じ濃度ながら培養時間を 10 分間に短くした場合でも $\gamma$ -H2AX は検出されたが、シグナル強度は全体的に減弱した。よって、蛍光シグナルの飽和を避けつつ、過酸化水素によって誘導された DNA 損傷と細胞周期あるいは CST 複合体との関連性を検証するために、フローサイトメトリーを用いた解析では過酸化水素の処理時間を 10 分間に短縮した。

PI 強度に基づいた細胞ごとの DNA 量の分布をヒストグラムとして表した。また、DNA 量と $\gamma$ -H2AX の蛍光強度との相関を示すために両者を二次元展開した。これらの結果を 2 回の実験ごとに表した (**図 3-2-3 B および C**)。培地に DNA 損傷源を何も加えなかった陰性対照群において、x 軸方向 (PI の蛍光強度) に約 2 倍の値の差を示す 2 つの集団が見られた (**図 3-2-3 B および C** 左端列)。これらは値が小さい順に G1 期または G2 期の細胞に相当し、2 集団の間は S 期に相当する。HU 処理によって主に S 期の細胞内で $\gamma$ -H2AX が生じるため、HU 処理された細胞集団は先行研究 (Kurose A *et al.*, 2006; Tanaka T *et al.*, 2009; Berniak K *et al.*, 2013) と同様に二次元展開座標上で特徴的な形状を示した (**図 3-2-3 B および C** 中列)。一方、過酸化水素処理された細胞集団は同様の傾向を示さず、陰性対照における細胞群が全体的に y 軸方向へ移動した (**図 3-2-3 B および C** 右端列)。すなわち、過酸化水素処理後は *STN1* ノックダウンに関わらず $\gamma$ -H2AX が全ての細胞周期において生じたと考えられた。

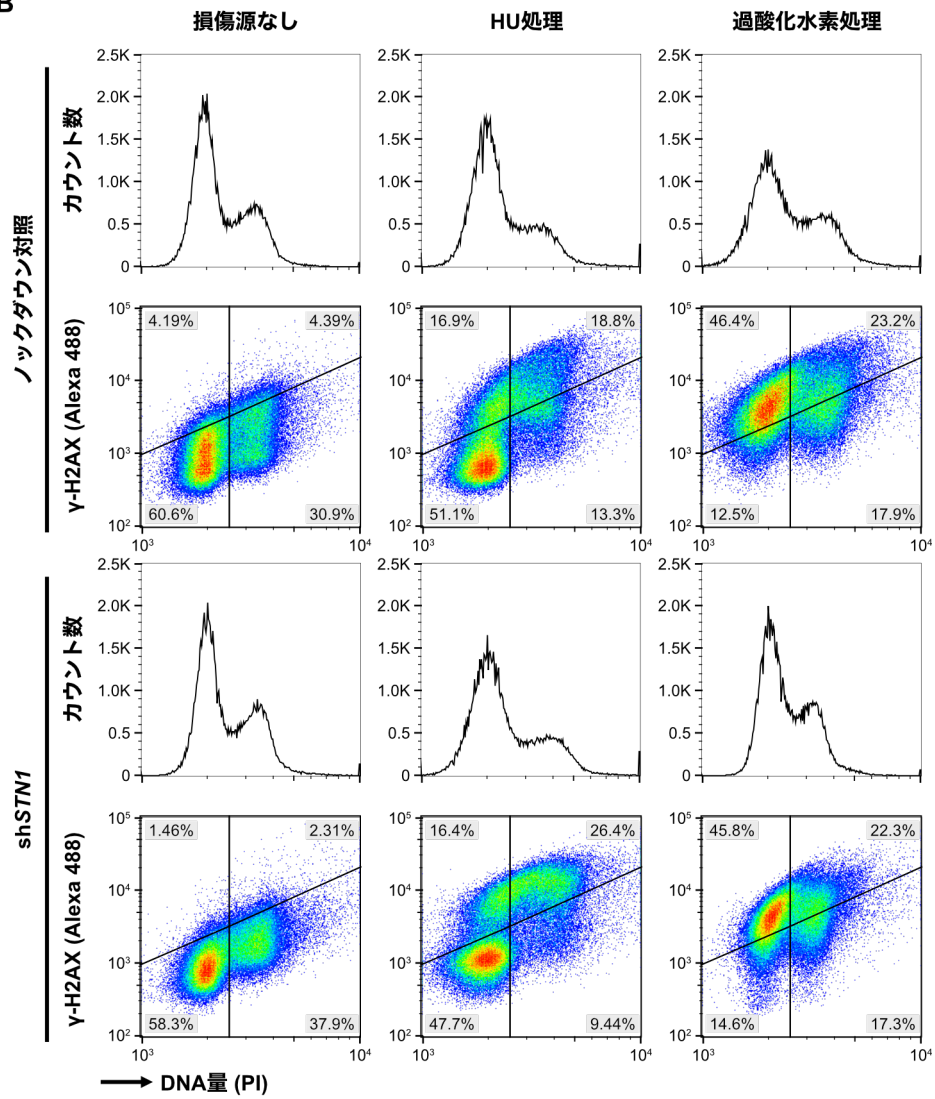
*STN1* ノックダウンが過酸化水素処理によって形成された $\gamma$ -H2AX に及ぼす影響を調べるために、 $\gamma$ -H2AX の蛍光強度を細胞種ごとに色分けしたヒストグラムに表した (**図 3-2-3 D**)。DNA 損傷源を加えなかった場合 (陰性対照群) における HeLa sh*STN1* 細胞およびノックダウン対照細胞は  $x = 10^3$  前後をピークとする分布を示した (**図 3-2-3 D** 左端)。対照的に、HU 処理によって二峰性の分布に変化した (**図 3-2-3 D** 中央)。二峰のうち左側のピークは陰性対照とほぼ同値であったことから、 $\gamma$ -H2AX を含まない細胞によって構成された集団に相当すると考えられる。二峰の谷間に閾値を設けることで、

$\gamma$ -H2AX 陽性率を求めた (図 3-2-3 D ヒストグラム上の青色で示された領域)。STNI ノックダウンの有無に関わらず HU 処理後の $\gamma$ -H2AX 陽性率は等しかった。しかし、二峰のうち右側のピークは STNI ノックダウンによって右側に移動した。この結果から、STNI ノックダウンは HU 処理に感受性を示す細胞の割合には影響しないが、より多くの $\gamma$ -H2AX を生じさせることが示唆された。しかし過酸化水素処理された場合は HU 処理と同様の傾向はもたらされず、 $x=10^4$  前後をピークとする一峰性のヒストグラムが形成された (図 3-2-3 D 右端)。 $\gamma$ -H2AX 陽性率は等しく、また、灰色 (対照細胞) と桃色 (shSTNI 細胞) のヒストグラムが重なり合った。したがって、10 分間だけ過酸化水素処理した場合、STNI ノックダウンは $\gamma$ -H2AX に影響しないことが示唆された。

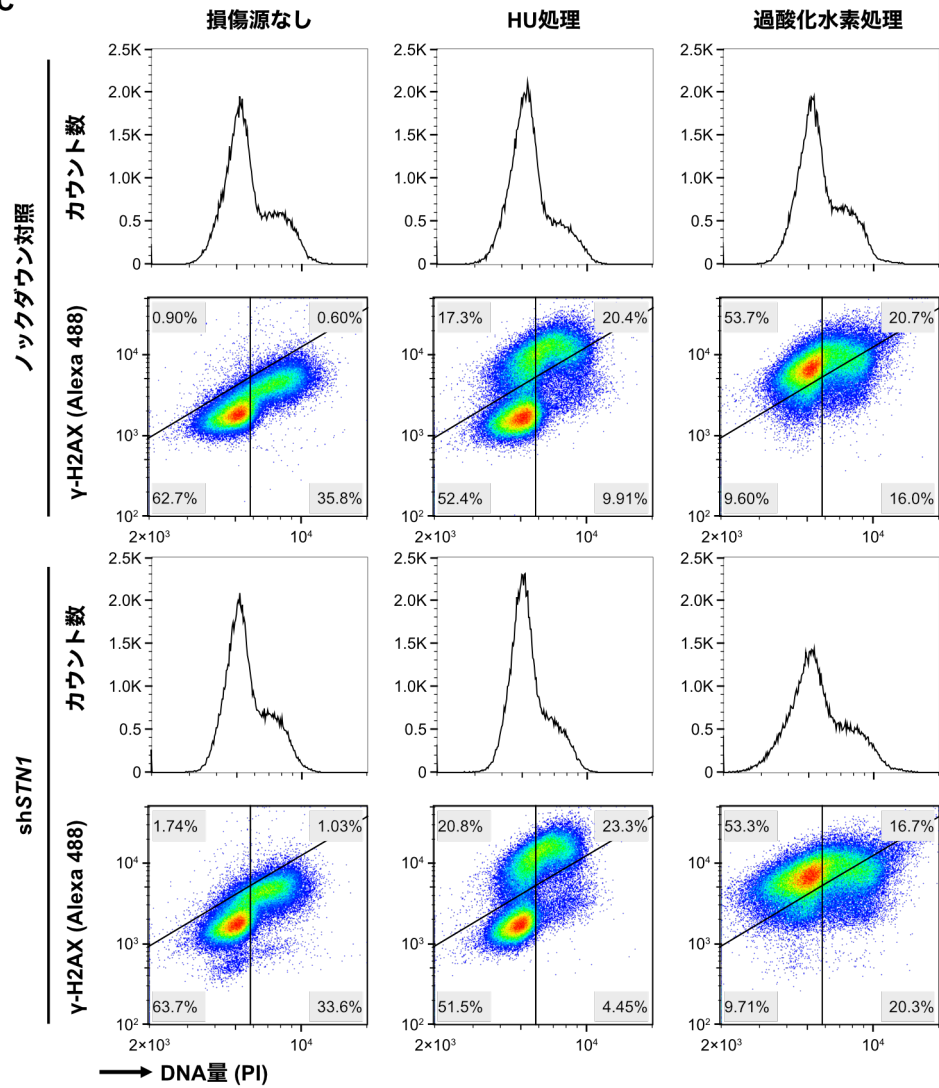
続いて $\gamma$ -H2AX 陽性率が細胞周期 (DNA 量の差) に応じて変化するか調べた。そのためにまず、PI と $\gamma$ -H2AX の蛍光強度に基づく二次元展開座標上に四分極を設けて、各象限に含まれる細胞の割合を求めた (図 3-2-3 B および C 四隅に記した%)。次に S 期から G2 期に相当する第一象限および第四象限 (縦軸と並行な閾値を基準に右側。4N 領域と呼称。) と、G1 期から S 期に相当する第二象限および第三象限 (同左側。2N 領域と呼称。) において、第一象限または第二象限に含まれる細胞が $\gamma$ -H2AX 陽性であるとみなした。そして 4N 領域 (または 2N 領域) に占める第一象限 (または第二象限) に含まれる細胞の割合を $\gamma$ -H2AX 陽性率として棒グラフに表した (図 3-2-3 E)。その結果、HU 処理を行った際に第一象限に含まれる細胞の割合は STNI ノックダウンによって増したことから、DNA 複製が進行中の shSTNI 細胞では HU に対する感受性が高まることが示唆された。しかし、過酸化水素処理された際には DNA 量と STNI ノックダウンの有無による差は見られなかったため、過酸化水素による DNA 損傷は細胞周期に関わらずもたらされることが示唆された。



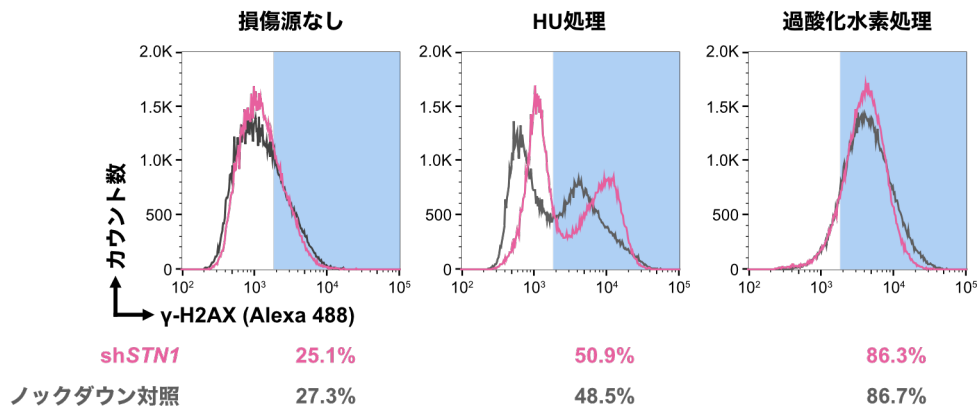
**B**



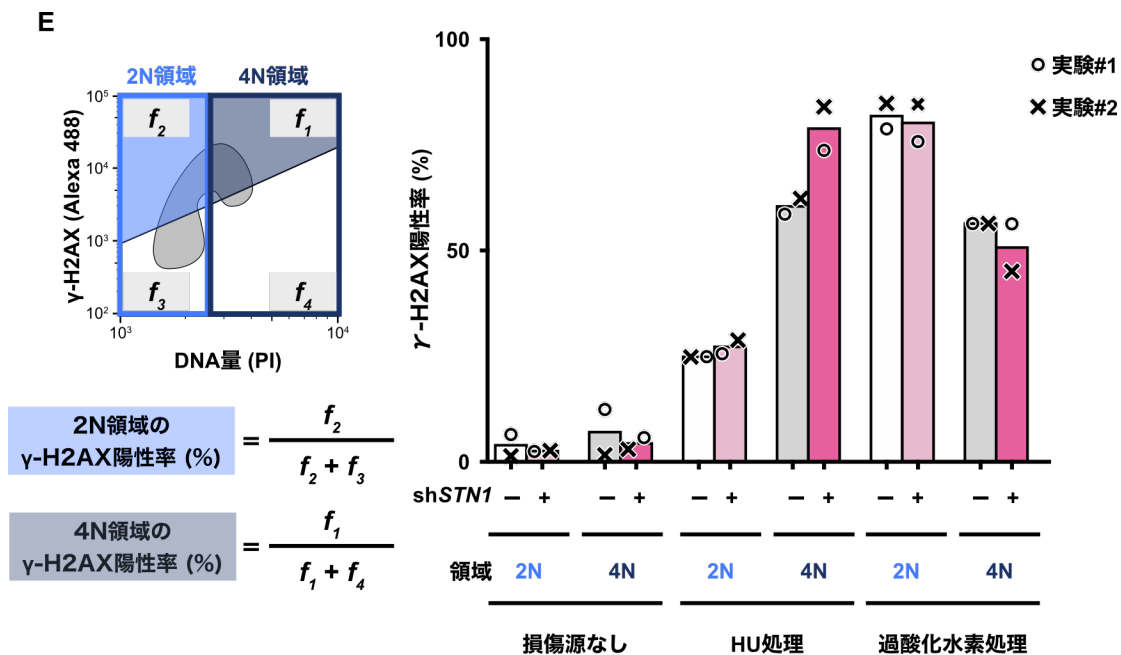
C



D







### 図 3-2-3 過酸化水素処理による DNA 損傷は細胞周期に関わらずもたらされる

**A** 抗 $\gamma$ -H2AX 抗体を用いた蛍光免疫染色の結果の中から、代表的な画像を抽出して示す。HeLa parental 細胞を終濃度 500  $\mu$ M の過酸化水素を含む培地で 10 分間または 2 時間培養した直後に固定し、抗 $\gamma$ -H2AX 抗体と対応する二次抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。顕微鏡観察した際に、異なる露光時間(短時間(0.25 秒)または長時間(0.6 秒))で撮影を行った。白色の破線で囲われた領域は核領域を表す。スケールバーは 20  $\mu$ m を表す。**B**, **C** HeLa shSTN1 細胞およびノックダウン対照細胞を HU または過酸化水素で処理した後回収・固定し、抗 $\gamma$ -H2AX 抗体を用いた蛍光免疫染色と PI 染色を行った。計  $10^5$  個の細胞の蛍光輝度に関するデータを示す。上段側のヒストグラムは PI 強度に基づき、下段側の二次元展開座標における色分けはデータの密度に基づいている(赤色が最も密、青色が最も疎)。**B** および **C** で 2 回の実験結果を個別に示している。**D** **B** の y 軸成分をヒストグラムとして展開した。横軸は Alexa488 の蛍光強度 (a.u.) を示し、縦軸はカウント数に相当する。**E** DNA 量の多寡に基づいた $\gamma$ -H2AX 陽性率。 $f_i$ ( $i$  は第一から第四の象限の番号に対応)は、二次元展開座標(**B** および **C**)の各象限に含まれる細胞の割合である。各レーン上の点は実験回ごとの値を示し、棒グラフの高さは平均値を表している。

## 3-3 過酸化水素処理によって引き起こされる DNA 鎖切断と CST 複合体

### 3-3-1 コメットアッセイによる DNA 鎖切断の検出

ウェスタンブロッティングとフローサイトメトリー解析で DNA 損傷応答に関連する因子が検出されたことで、細胞周期の特定の段階や STN1 の有無に関わらず過酸化水

素処理は DNA 鎖切断を引き起こすことが示唆された。また、ウェスタンブロッティングでは検出できない程度の差であるが、過酸化水素を含む培地で2時間培養することで HeLa sh*STN1* 細胞の核内における $\gamma$ -H2AX のシグナル強度は増強されたため、*STN1* ノックダウンによって過酸化水素処理された HeLa 細胞中で $\gamma$ -H2AX は形成されやすくなることが示唆された。すなわち、同時点の HeLa sh*STN1* 細胞にはより多くの DNA 損傷が加わっていると推察された。生存率と同様に DNA 鎖切断の程度も *STN1* ノックダウンによる影響を受けているか調べるため、1 細胞レベルのアガロースゲル電気泳動であるコメットアッセイを行った。ゲノムに DNA 鎖切断が高頻度に加わることでより短い断片が生じるため、アガロースゲル電気泳動すると断片長が短いほど長い距離を移動する。以下ではゲノム DNA の塊部分を「ヘッド」、断片による泳動像を「テール」と呼称するが、本研究ではテール部分の長さを比較定量することで DNA 鎖切断の程度の差を調べた (図 3-3-1 A)。このアッセイの特徴として、電気泳動とそれに先立つ細胞の溶出 (細胞質成分などの分離) 時に用いるバッファの pH を変更することで検出可能な DNA 鎖切断の種類を制限することができる。アルカリ性のバッファを用いることで、二本鎖 DNA は変性 (解離) され一本鎖および二本鎖 DNA 切断が検出可能となる (図 3-3-1 B)。

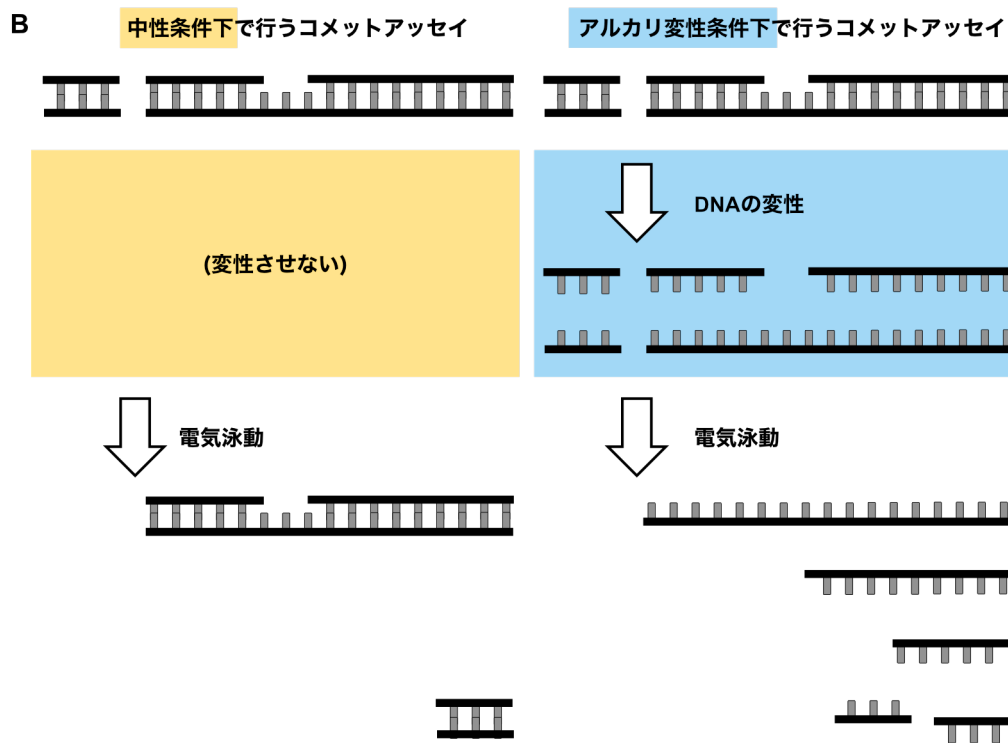
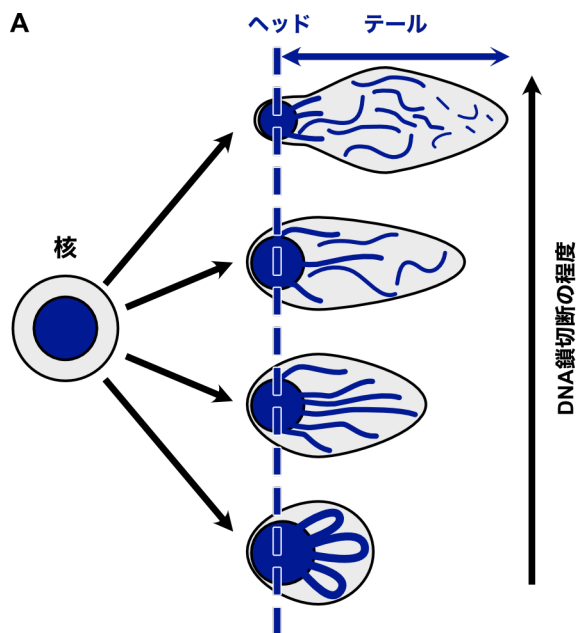
まず初めに二本鎖 DNA を変性させない pH が中性なバッファを用いて、過酸化水素処理と回復培養後に回収された HeLa 細胞に含まれる二本鎖 DNA 鎖切断を検出した。細胞種と過酸化水素処理の有無ごとにテール長を示した (図 3-3-1 C)。過酸化水素処理によってテール長は伸長され、特に sh*STN1* 細胞では顕著に長いテールが多く観察された。分布の裾での一致性を調べる Anderson–Darling test によって、過酸化水素処理された sh*STN1* 細胞由来のテール長はノックダウン対照細胞と比べて有意に長いことが示された。観察されたテールの集団を閾値 (80  $\mu$ m) で二分し、各群に含まれるテールの割合を百分率で表した (図 3-3-1 D および E)。閾値より長いテール長である「クラス 1」の割合は、ノックダウン対照細胞の 11% に対して sh*STN1* 細胞では 24% だった。カイ二乗検定による  $p$  値は 2.4E-9 だったことからクラス 1 または 2 への帰属はランダムに起きるものではなく、テール長の伸長は *STN1* ノックダウンによってもたらされたことが示唆された。

二本鎖 DNA 鎖切断に加えて一本鎖 DNA 鎖切断も検出するために、アルカリ性のバッファを用いたアッセイを行った。この実験における過酸化水素の処理時間は 10 分間だったがテールが検出され、さらに *STN1* ノックダウンによってテール長はさらに伸長した (図 3-3-1 F)。なお、HU 処理は S 期の細胞 (全体の 3,40%) のみにしか作用しないため、同処理が DNA 鎖切断を引き起こしたとしてもアッセイの検出限界量以下だった可能性もある。この点に留意する必要があるが、HeLa 細胞では *STN1* ノックダウンの有無に関わらずテール長の伸長は認められなかった。すなわち、HU を培地に添加して 3 時間以内には DNA 鎖切断やフォーク構造の解消は生じなかったと推察される。

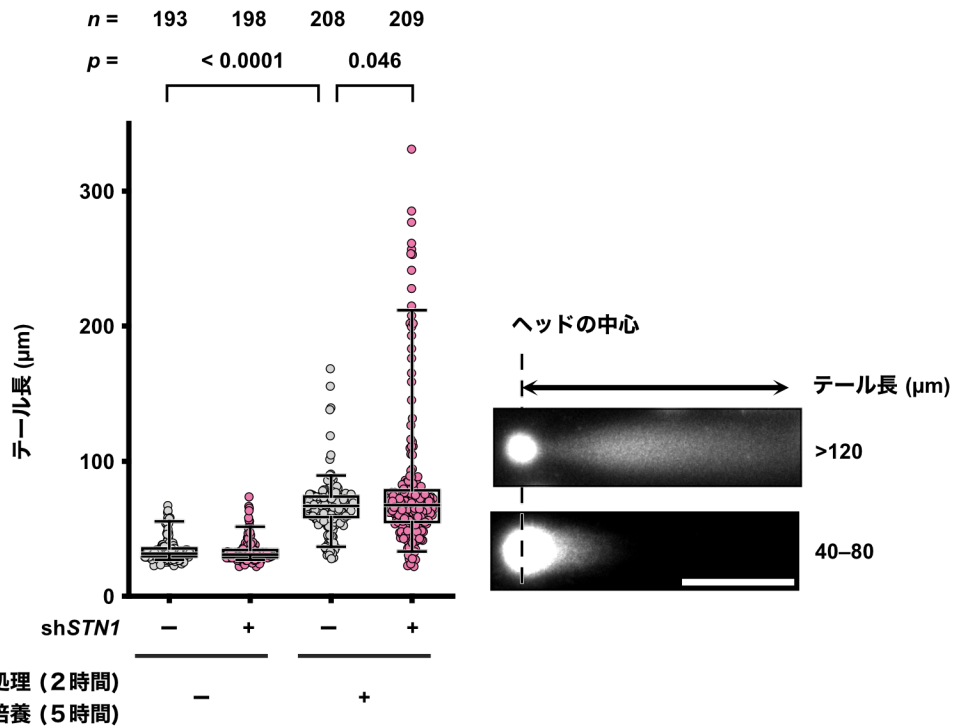
pH が中性のバッファーを用いて行ったアッセイと同様に、観察されたテールの集団を閾値 (155  $\mu\text{m}$ ) で二分し、各群に含まれるテールの割合を百分率で表した (図 3-3-1 G および H)。閾値より長いテール長である「クラス 1」の割合は、ノックダウン対照細胞の 31% に対して *shSTN1* 細胞では 75% だった。図 3-3-1 D と同様にカイ二乗検定による *p* 値を調べたところ  $2.2\text{E-}16$  以下だったので、過酸化水素処理によって生じた DNA 鎖切断は *STN1* ノックダウンによってさらに増すことがアルカリコメットアッセイの結果からも示唆された。

コメットアッセイの結果から *STN1* ノックダウンによってテール長は伸長することが分かり、ゲノム断片化の程度が増したことが示唆された。しかし、*STN1* ノックダウンの効果は、同じ処理時間 (10 分間) にも関わらずアルカリコメットアッセイ (図 3-3-1 F) ではテール長の有意な差として見出された一方、フローサイトメトリー解析 (図 3-2-2 D) からは示唆されなかった。この原因の 1 つとして、1 箇所での DNA 鎖切断に対して切断点近傍のヒストン H2AX 蛋白質は迅速にかつ過剰にリン酸化される (Lowndes NF, Toh GW, 2005) という特徴が挙げられる。そのため、DNA 切断の程度の差は  $\gamma$ -H2AX の蛍光強度の差として検出できなかつたと考えられる。また、ヒストン H2AX 蛋白質の 139 番目のセリン残基をリン酸化する酵素は ATM のみとは限らない。一部の先行研究 (Ward IM *et al.*, 2001; Katsube T *et al.*, 2014) では、ATR によって HU 処理や過酸化水素処理された細胞核内で  $\gamma$ -H2AX が生じたと考えられている。つまり、DNA 鎖の切断に至らずとも一本鎖 DNA が露出しただけで  $\gamma$ -H2AX が生じた可能性がある。これらの考察を踏まえて、過酸化水素処理後にヒストン H2AX をリン酸化する酵素を特定しなかつたものの、本研究では  $\gamma$ -H2AX を DNA 損傷のマーカー蛋白質として捉えた。

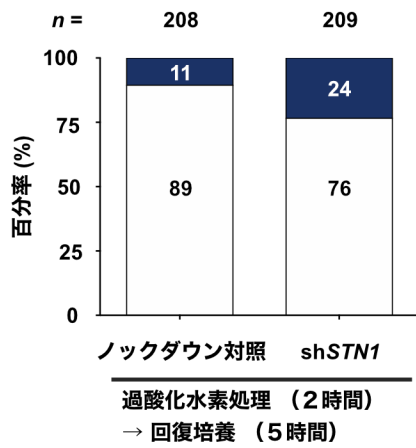
よって、CST 複合体は過酸化水素によってゲノム DNA が切断された後、過剰な断片化を防いでいる可能性が得られた。この可能性は、過酸化水素以外の DNA 損傷源を用いた先行研究の結果からも支持される (Zhou Q, Chai W, 2016; Nguyen DD *et al.*, 2023)。これらの先行研究の結果と一致したことからも、CST 複合体は過酸化水素処理された細胞の生存に影響するという仮説が裏付けられた。



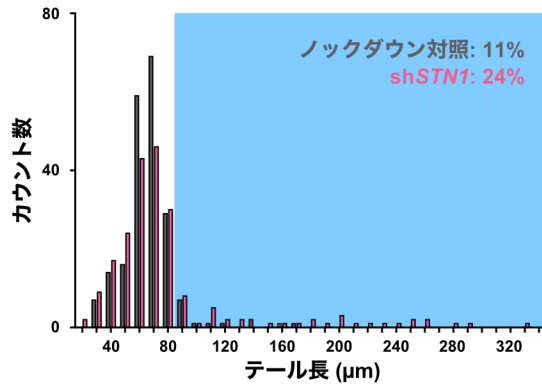
C



D



E



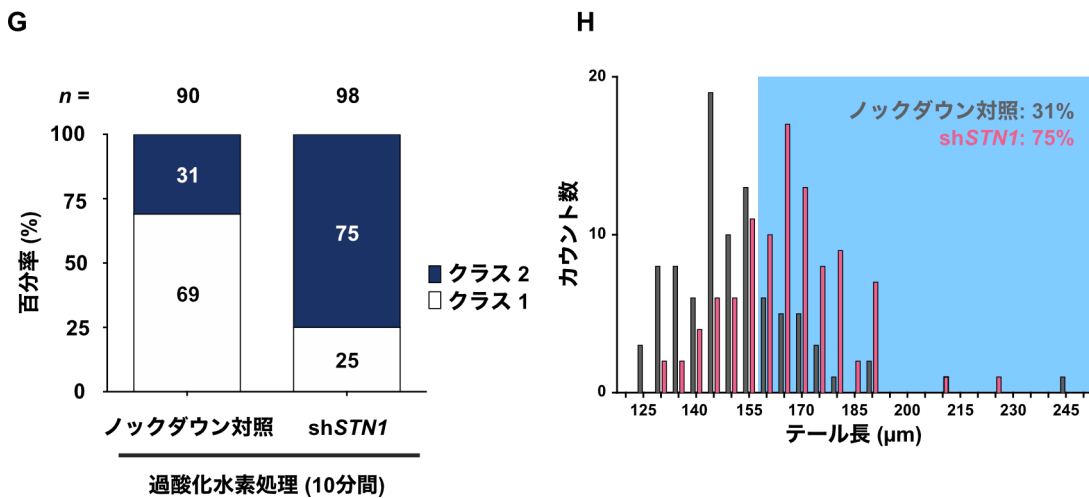
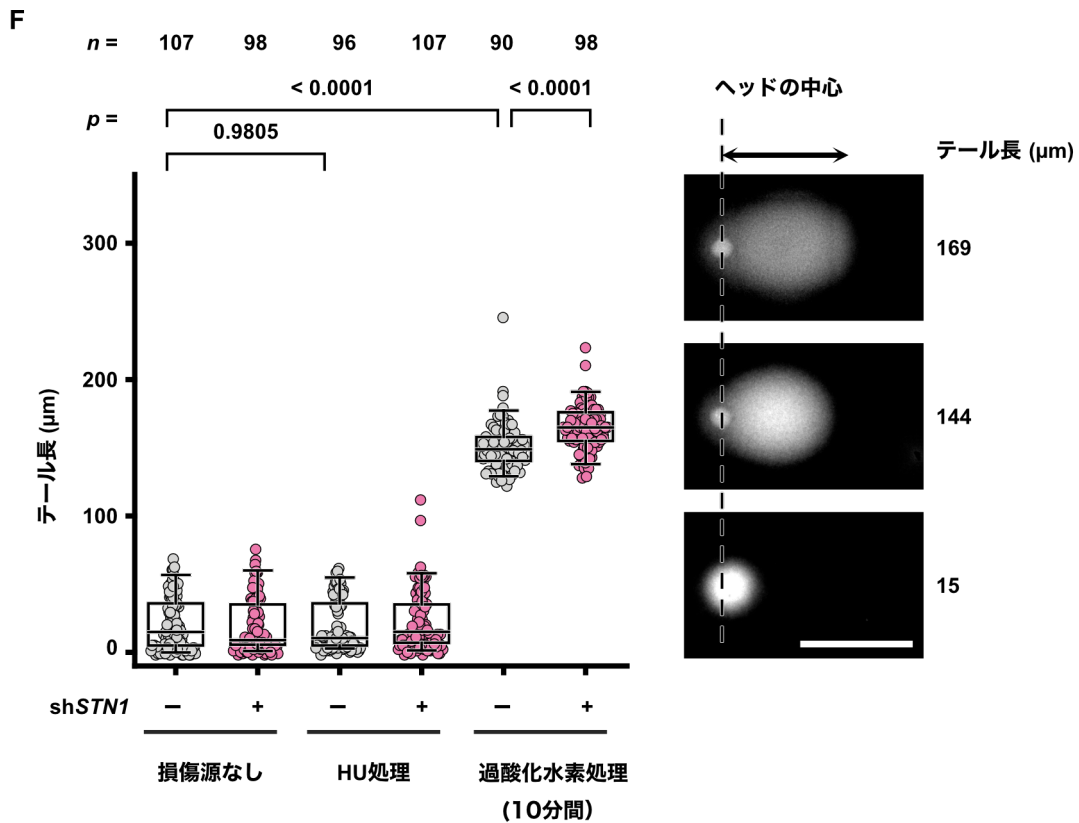


図 3-3-1 過酸化水素処理によって DNA 鎖切断が引き起こされるが、CST 複合体によって抑制される

A, B コメットアッセイの概略図。C pH が中性のバッファーを用いて行ったコメットアッセイの結果。過酸化水素処理(2時間)と回復培養(5時間)を行った HeLa shSTN1 細胞とノックダウン対照細胞をアッセイに供した。 $n$  はサンプルごとに観察したテールの数を表している。また、それらの中から代表的な泳動像をテール長別に抽出し、プロットの右側に示した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を表す。比較したサンプル間に  $p$  値を記載した。統計的有意差は

Anderson–Darling test に基づいて求めた。D C の結果に基づいて閾値(80  $\mu\text{m}$ )より長いテール長を「クラス1」、それ以下を「クラス2」として定義し、各々に含まれる割合を示した。E C の結果における、テール長の分布を示すヒストグラム。各ヒストグラム上の青色で示された領域が D の「クラス1」に対応する。F アルカリ性のバッファーを用いて行ったコメットアッセイの結果。HU 処理(3時間)または過酸化水素処理(10 分間)を施した HeLa shSTN1 細胞とノックダウン対照細胞をアッセイに供した。 $n$ はサンプルごとに観察したテールの数を表している。また、それらの中から代表的な泳動像をテール長別に抽出し、プロットの右側に示した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ を表す。比較したサンプル間に  $p$  値を記載した。統計的有意差は Mann–Whitney  $U$  test に基づいて求めた。G F の結果に基づいて閾値(155  $\mu\text{m}$ )より長いテール長を「クラス1」、それ以外を「クラス2」として定義し、各々に含まれる割合を示した。H F の結果における、テール長の分布を示すヒストグラム。ヒストグラム上の青色で示された領域が G の「クラス1」に対応する。

### 3-3-2 DNA 鎖切断が細胞死によってもたらされた可能性

過酸化水素処理直後の HeLa 細胞は培養皿底面に接着したままだったが、過酸化水素処理を終えてから 7 時間以上経過すると特に shSTN1 細胞の一部が剥離し始めた。そこで過酸化水素処理直後と 6 時間の回復培養を終えた後に回収した HeLa shSTN1 細胞およびノックダウン対照細胞をウェスタンブロッティングに供した。その結果、過酸化水素処理後に回復培養されたサンプルで分解された PARP1 蛋白質が検出された (図 3-3-2)。すなわち、同時点で既に細胞死(アポトーシス)が進行していることが示唆された。

したがって、特に過酸化水素処理後の HeLa shSTN1 細胞で二本鎖 DNA 切断が検出されやすい (図 3-3-1 C–E) もの、細胞死に伴い DNA が切断された(アポトーシスの進行に従ってゲノムが断片化された)可能性を排除できない。しかし、過酸化水素処理を開始して 10 分後に回収した HeLa shSTN1 細胞でも一本鎖および二本鎖 DNA 鎖切断がより検出された (図 3-3-1 F–H) ことから、過酸化水素による DNA 鎖切断が CST 複合体によって抑制されるという主張には大きく影響しないと考えられた。

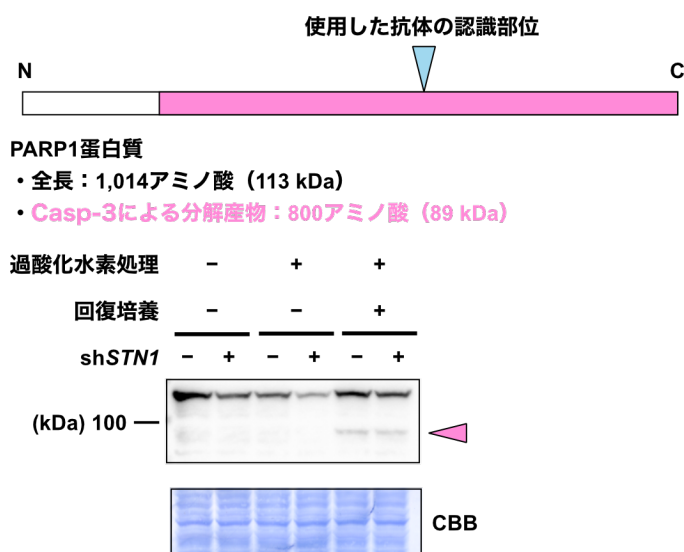


図 3-3-2 過酸化水素処理直後から細胞死が開始する

(上部) Caspase-3 (Casp-3) によってもたらされる PARP1 の分解産物 (桃色) の大きさと使用した抗体の認識部位を示す模式図。図形の横幅はアミノ酸配列の長さを反映している。(下部) HeLa shSTN1 細胞およびノックダウン対照細胞を終濃度 500  $\mu\text{M}$  の過酸化水素で 2 時間処理した後回収した。回収する前に回復期間 (通常培地で 6 時間培養) を設けたサンプルも合わせて、抗 PARP1 抗体を用いたウエスタンブロッティングに供した。図の右側の三角形は分解産物のバンドを指示している。CBB: レーンごとにアプライされた蛋白質量が等しいことを示すローディングコントロール。

### 3-4 S 期の細胞が過酸化水素に対して示す感受性に CST 複合体が及ぼす影響

#### 3-4-1 ミモシンを用いた細胞周期の同調

上述の実験結果から、過酸化水素は細胞周期を問わず DNA 損傷をもたらすものの、CST 複合体は過酸化水素に対する感受性を弱めることが示唆された。HU 処理された細胞において CST 複合体が DNA 複製の再開に寄与するという知見 (Stewart JA *et al.*, 2012; Kasbek C *et al.*, 2013; Wang F *et al.*, 2014) に基づき、過酸化水素に対する感受性の亢進も特に細胞周期の S 期で起きると仮定した。この仮説を検証するために複製フォークの形成および進行を可逆的に阻害した上で、過酸化水素処理を行う必要が生じた。そのため本研究ではミモシンと呼ばれるギンネム (*Leucaena leucocephala*) 由来の生理活性物質を用いた。ミモシンが細胞周期に影響する際の分子機序は完全には同定されていない (Nguyen BC *et al.*, 2016)。しかし、可能性の 1 つとして、ヌクレオシド合成酵素を可逆的に阻害する鉄イオンキレーターとしての機能が報告されている (Tsai WC *et al.*, 1971; Watson PA *et al.*, 1991; Krude T., 1999)。ミモシンを含む培地で培養することで細胞内の

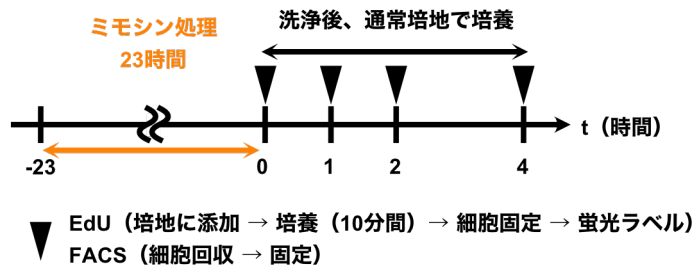


dNTP 量が減少し、G1/S 境界への同調が促されると考えられている。

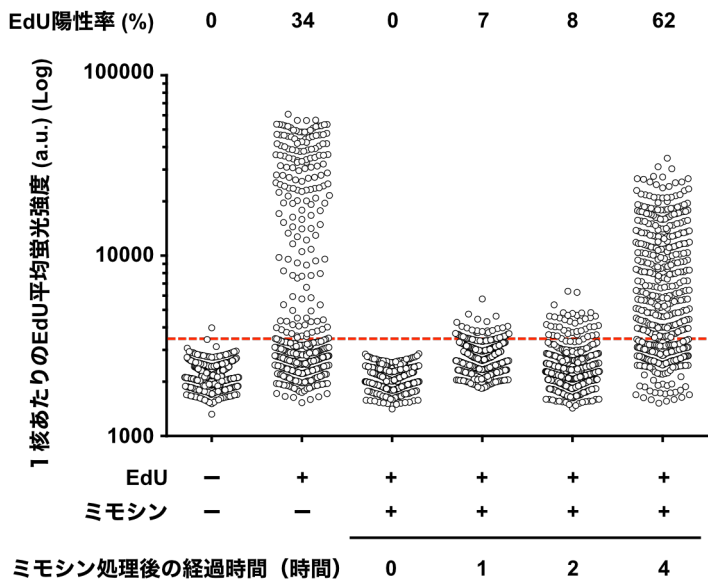
まず、ミモシンを用いて細胞周期を同調させる方法を確立させた (図 3-4-1 A)。ミモシンを HeLa 細胞の培地中で終濃度 500  $\mu\text{M}$  になるように添加し、23 時間培養した後新しい培地に交換した。以降は、この実験操作をミモシン処理と定義する。ミモシン処理後の任意の時点における細胞周期を異なる 2 つの方法で調べた。1 つ目は、DNA 複製中の細胞の検出するために 5-ethynil-2'-deoxyuridine (EdU) を用いた手法である。EdU はチミンとしてゲノムに取り込まれた後、専用の蛍光色素と銅触媒を利用したクリックケミストリー (Click-iT staining) によって検出可能になる。本研究では、核領域 (DAPI で対比染色された領域) 中の EdU の平均蛍光強度を解析した (図 3-4-1 B)。陽性対照 (ミモシン処理せずに EdU を取り込ませた細胞) の分布は二極化した。3,500 (a.u.) 以上の蛍光強度を示す細胞集団が全体に占める割合は 34% で、多くの文献において HeLa 細胞が示す S 期の割合と一致した。対照的にミモシン処理直後の EdU 陽性率は 0% だったことから、同処理によって DNA 複製が抑制されている状態が示唆された。その後、ミモシン処理後の時間が経過するに従って EdU 陽性率は増加し、1 核あたりの EdU 平均蛍光強度も大きくなった。ミモシン処理を終えて 1 時間後には EdU が検出されたため、培地からミモシンを除去することで DNA 複製は低調ながら再開したとみなした。

同処理が細胞周期に及ぼす影響を次に調べた (図 3-4-1 C)。ミモシン処理後の HeLa 細胞を回収した後エタノール固定と PI 染色を施した。サンプルをフローサイトメトリーに供することで 1 細胞ごとの DNA 量を PI 強度に基づいて解析した。ミモシン処理されなかった細胞は二峰性の分布を示し、DNA 量が少ない集団は G1 期、DNA 量が多い集団は G2 期に相当すると考えられる。ミモシン処理直後の HeLa 細胞では G1 期に相当する集団の数が増加した一方、G2 期に相当する集団の数は減少した。すなわち、ミモシン処理によって細胞周期が S 期の手前で停止したことが示唆された。そして、ミモシン処理後の時間が経過するに従い DNA 量が徐々に増したので、培地からミモシンを除去したことで S 期以降に進んだことが示唆された。

A



B



C

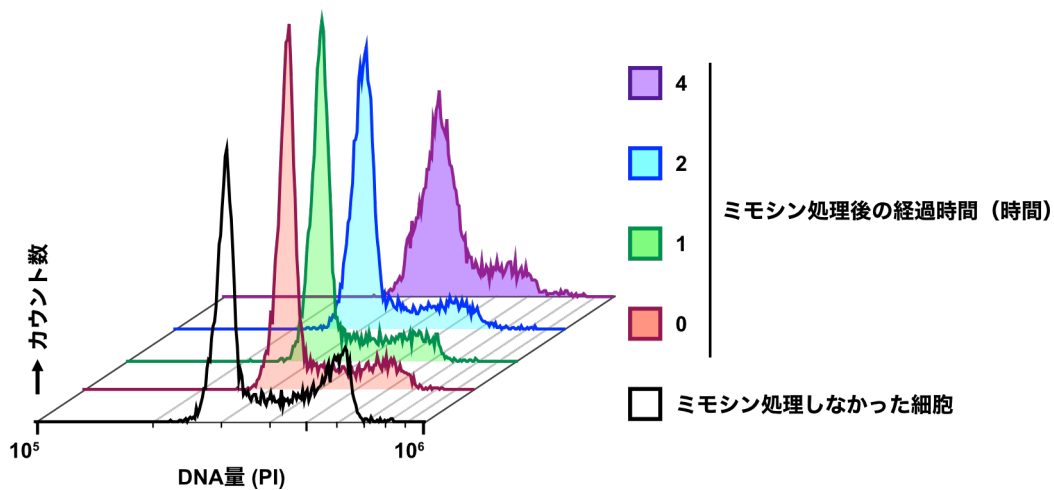


図 3-4-1 ミモシン処理によって細胞周期は同調される

A 実験の流れ図。HeLa-parental 細胞に対してミモシン処理を施した後、図中の三角形で示した時点における細胞周期を異なる方法 (B および C) で解析した。B 1核あたりの EdU の平均蛍光強度を求めた。500 個以上の細胞核における EdU の平均蛍光強度を解析した上

で、ランダムに選んだ 500 個のデータを示している。赤破線は閾値(3,500 (a.u.))を示し、これより大きな平均蛍光強度を示す細胞を EdU 陽性とみなし、全体に占める割合 (EdU 陽性率) を上部に記載した。C フローサイトメトリーを用いて1細胞ごとの DNA 量を調べた。各ヒストグラムは計  $10^4$  個の細胞の PI 強度に関するデータを示している。最も手前側が培地にミモシンを添加しなかった細胞で、有色のヒストグラムはミモシン処理されたサンプルである。奥に移るにつれてミモシン除去後の経過時間が延びていく(0, 1, 2, 4 時間)。

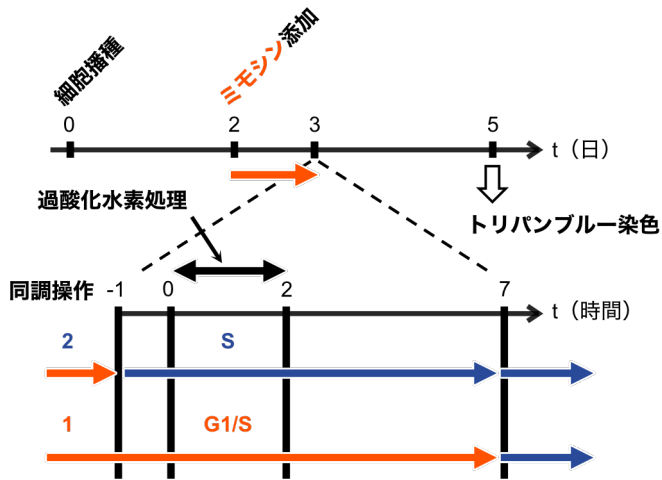
### 3-4-2 細胞周期の同調を経て過酸化水素処理された場合の生存率

前項で確立したミモシン処理の実験操作法を用いて、細胞周期の S 期前後における HeLa 細胞の過酸化水素に対する感受性に CST 複合体が及ぼす影響を調べた。ミモシン処理と過酸化水素処理を連続的に行い、2 日後にトリパンブルー染色法に基づいて生存率を調べた (図 3-4-2 A)。ミモシン処理中または同処理後に過酸化水素処理を行うことで、G1 期または S 期に同調された HeLa 細胞の過酸化水素に対する感受性を調べた。

白色の棒グラフ群は非同調細胞を表す。非同調な HeLa 細胞が過酸化水素処理された場合、生存率は 3-1-2 の結果と同様に *STN1* ノックダウンによって有意に減少した (図 3-4-2 B 白色の棒グラフ)。一方、有色の棒グラフ群はミモシン処理されたサンプルである。過酸化水素を培地に添加しなかった場合、ミモシンを培地に添加していた時間の長短 (23 時間または 31 時間) に関わらず HeLa 細胞の生存率はほぼ 100% だったため、ミモシン処理そのものは生存率を低下させないことが示唆された。オレンジ色の棒グラフ群は、過酸化水素処理時に G1/S 境界に同調された HeLa 細胞の生存率を表す。過酸化水素処理後の HeLa sh*STN1* 細胞とノックダウン対照細胞の生存率は約 90% だった。これらの生存率に差は見られなかった (図 3-4-2 B オレンジ色の棒グラフ)。対照的に、ミモシン処理後に過酸化水素処理された HeLa 細胞の生存率は、*STN1* ノックダウンによって有意に減少した (図 3-4-2 B 青色の棒グラフ)。有意差の有無に加えて、過酸化水素処理時の細胞周期同調も生存率に影響することが分かった。過酸化水素処理されたノックダウン対照細胞の生存率は G1/S 境界に同調することで非同調な場合よりも上昇したが、S 期に同調することで逆に低下した。

ミモシン処理と過酸化水素処理を組み合わせることで生存率を調べたことで、DNA 複製中の HeLa 細胞は過酸化水素に対して特に脆弱で、*STN1* が欠失することで過酸化水素に対する感受性がさらに亢進することが分かった。すなわち、CST 複合体は特に S 期の細胞が過酸化水素処理された際に生存を維持するために必要な因子であることが示唆された。

A



B

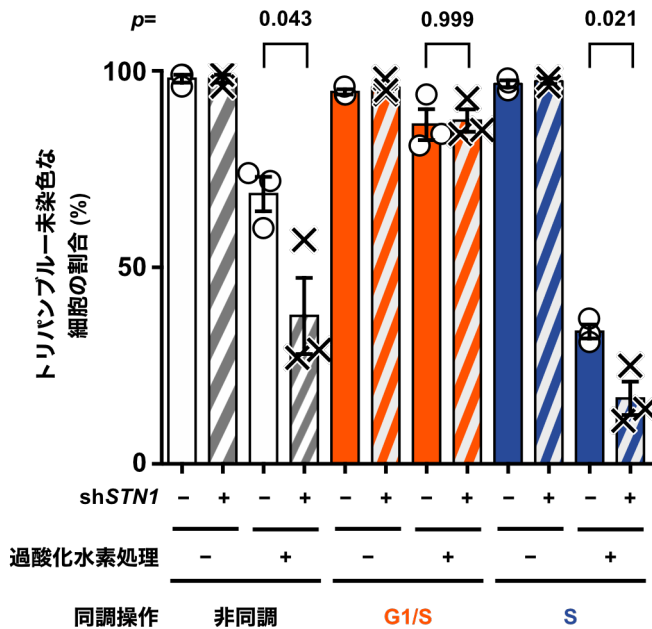


図 3-4-2 DNA 複製中の HeLa 細胞は過酸化水素処理に対して脆弱で、STN1 をノックダウンすることで感受性はさらに亢進される

A 実験の流れ図。ミモシンを含む培地で HeLa 細胞を 23 時間培養し、細胞周期を G1/S 境界で停止させた。(1)培地からミモシンを除去しないまま過酸化水素処理を行った。過酸化水素処理後はミモシンを再び培地に添加し、5 時間培養した後通常の培地に交換した。(2)培地からミモシンを除去して 1 時間後に過酸化水素処理を開始した。同調操作(1)および(2)と過酸化水素処理を施した 2 日後に、トリパンプルー染色を行った。B HeLa shSTN1 細胞およびノックダウン対照細胞の生存率をトリパンプルー染色法に基づき調べた。各棒グラフ上の記号は各細胞の生存率を表し、棒グラフの高さは平均値を表している。誤差線は3回の独立した実験の標準誤差を示す。比較した生存率の間に p 値を記載した。統計的有意差は

Unpaired *t* tests に基づいて求めた。

### 3-5 CST 複合体によって促進された、過酸化水素処理後の新生鎖 DNA 合成

#### 3-5-1 チミジンアナログの取り込みに基づく、新生鎖 DNA を合成している細胞の検出

前節の実験結果と関連して、*STN1* ノックダウンによって HU 処理後の DNA 複製の再開が妨げられることが報告されている (Stewart JA *et al.*, 2012; Lyu X *et al.*, 2021)。この報告に着想を得て、*STN1* ノックダウンは過酸化水素処理後の新生鎖 DNA 合成に影響するか調べた。

実験の流れ図に沿うように、過酸化水素処理を行う直前または直後に異なるチミジンアナログ (BrdU または EdU) を培地に添加した (図 3-5-1 A)。ゲノム DNA に取り込まれた各チミジンアナログは蛍光ラベルされた (BrdU, 蛍光免疫染色; EdU, Click-iT staining)。目視で蛍光の有無を判別し、BrdU または EdU 陽性な細胞の数と割合を調べた。

BrdU または EdU 陽性な細胞の数について、独立に 3 回行った実験結果が合わさったベン図を作成した (図 3-5-1 B)。1 回の実験ごとに最低 200 個 / サンプルの細胞を観察したが、過酸化水素処理された細胞の中に EdU のみ陽性な細胞は含まれていなかった。すなわち、過酸化水素処理後は新生鎖 DNA 合成が新規に開始されないことが示唆された。また、BrdU および EdU が両陽性な細胞数も過酸化水素処理によって減少した。過酸化水素を培地に添加しなかった場合、両陽性な細胞数は *STN1* ノックダウンに関わらずほぼ等しかった (ノックダウン対照, 262 / 872 個 (30.0%); sh*STN1*, 234 / 688 個 (34.0%))。しかし過酸化水素処理後、*STN1* ノックダウンによって両陽性な細胞数は著しく減少した (ノックダウン対照, 56 / 756 個 (7.4%); sh*STN1*, 4 / 856 個 (0.47%))。したがって、CST 複合体 (*STN1*) は過酸化水素処理後の DNA 合成に寄与することが示唆された。

次に、BrdU または EdU 陽性な細胞の割合について、実験ごとの値と平均値を表す棒グラフを作成した (図 3-5-1 C)。BrdU 陽性細胞の割合は *STN1* ノックダウンに関わらず一定 (約 40%) だった (図 3-5-1 C 白色の棒グラフ)。すなわち、CST 複合体は通常の DNA 複製には関与しないことが示唆された。また、*STN1* ノックダウンが細胞周期を妨げないという結果は増殖曲線 (図 3-1-1 D) やフローサイトメトリー解析 (図 3-2-3 B および C) の結果とも一致した。培地に過酸化水素を加えなかった場合、EdU 陽性細胞の割合も *STN1* ノックダウンの有無に関わらず一定 (約 45%) だった (図 3-5-1 C 左から 2 本の紫色の棒グラフ)。この値は BrdU 陽性細胞の割合よりも若干大きいのが、EdU の取り込み時間が BrdU のそれよりも長かったためであると推察される。しかし、培地に過酸化水素を添加したことで EdU 陽性細胞の割合は添加前と比べ顕著に減少した (図 3-5-1 C 右から 2 本の紫色の棒グラフ)。過酸化水素処理されたノックダウン対照細胞

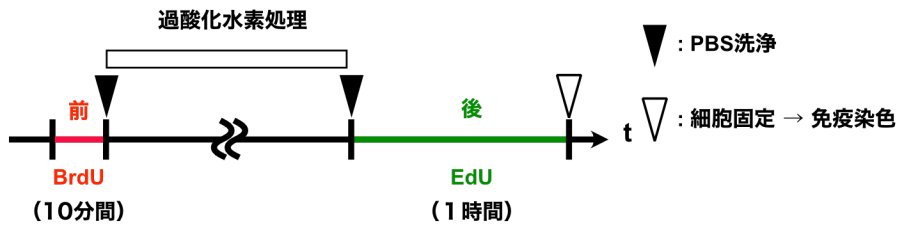
における EdU 陽性細胞の割合は約 7%だった。そして過酸化水素処理された EdU 陽性細胞の割合は *STN1* ノックダウンによって有意に減少し、約 0.5%だった。

*STN1* ノックダウンによって過酸化水素処理後の新生鎖 DNA 合成の再開が妨げられたことを示すため、同じデータセットを用いつつ BrdU 陽性細胞に占める EdU 陽性細胞の割合を求めた。この割合は過酸化水素処理を挟んで DNA 合成が継続しているかを示す指標として用いられた。上述のように、通常条件下における EdU の取り込みは *STN1* ノックダウンの影響を受けなかった (図 3-5-1 D 左から 2 本の棒グラフ)。すなわち、約 75%の HeLa 細胞が 2 時間以上かけてゲノムを倍化させていることが示唆された。しかし、過酸化水素処理によって EdU の取り込みが阻害されたことで BrdU 陽性細胞に占める EdU 陽性細胞の割合は減少し、さらに *STN1* ノックダウンによって有意に減少した (図 3-5-1 D 右から 2 本の棒グラフ)。この指標からも、過酸化水素処理された細胞内で CST 複合体 (*STN1*) が新生鎖 DNA 合成の再開を促していることが示唆された。

過酸化水素処理によって新生鎖 DNA 合成反応が抑制されたので、同処理が細胞周期に及ぼす影響も調べた (図 3-5-1 E)。過酸化水素を培地に添加した 2 時間後に HeLa 細胞を固定し、フローサイトメトリー解析に供した。その結果、同処理は HU 処理 (陽性対照) と異なり二峰性の分布をもたらした。過酸化水素処理によって、DNA 損傷応答経路が活性化させる。p53 が不活化されている HeLa 細胞でも、細胞周期は G2/M チェックポイントで停止しうる (Sancar A *et al.*, 2004)。加えて DNA 損傷を受けた複製途中の細胞では複製フォーク構造が解消されるため、細胞周期は S 期の途中でも停止する。したがって、過酸化水素処理された細胞における二峰性の分布は、同処理後に細胞周期のあらゆる時点でその進行が抑制されたためにもたらされたと推察された。

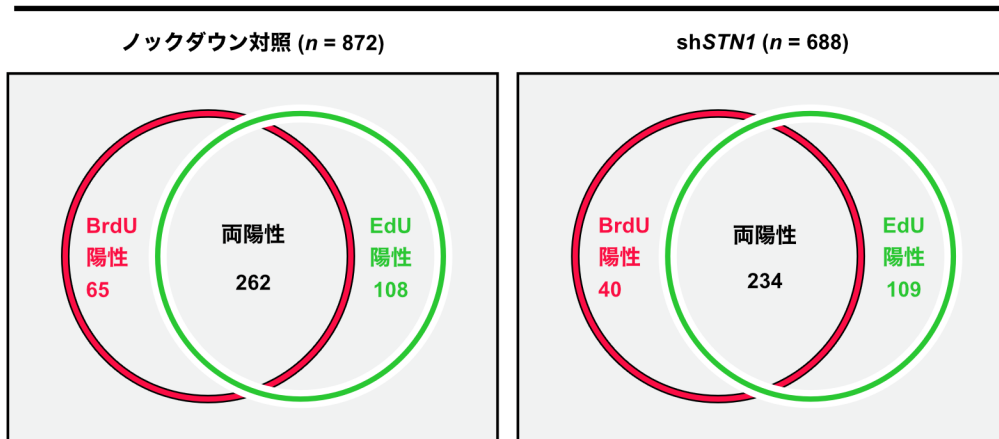
これらの結果から、過酸化水素に曝された HeLa *shSTN1* 細胞では DNA 合成の維持または再開が困難であることが示唆された。

A

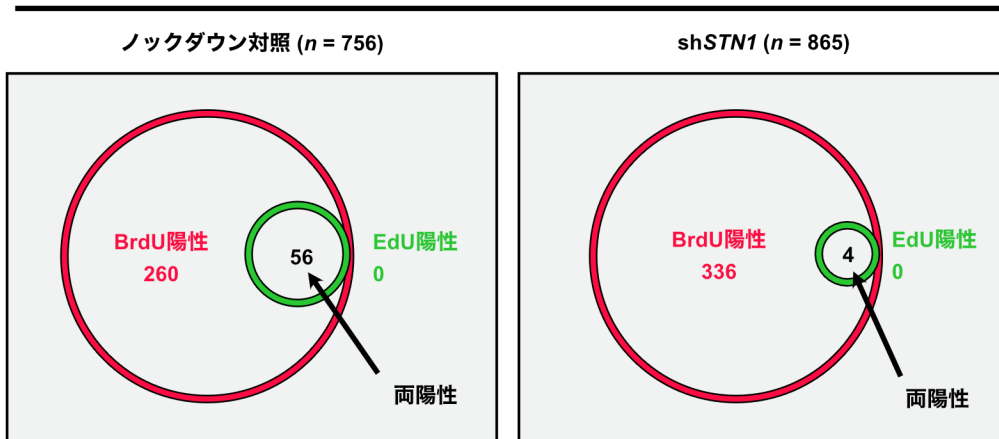


B

過酸化水素処理 (-)



過酸化水素処理 (+)



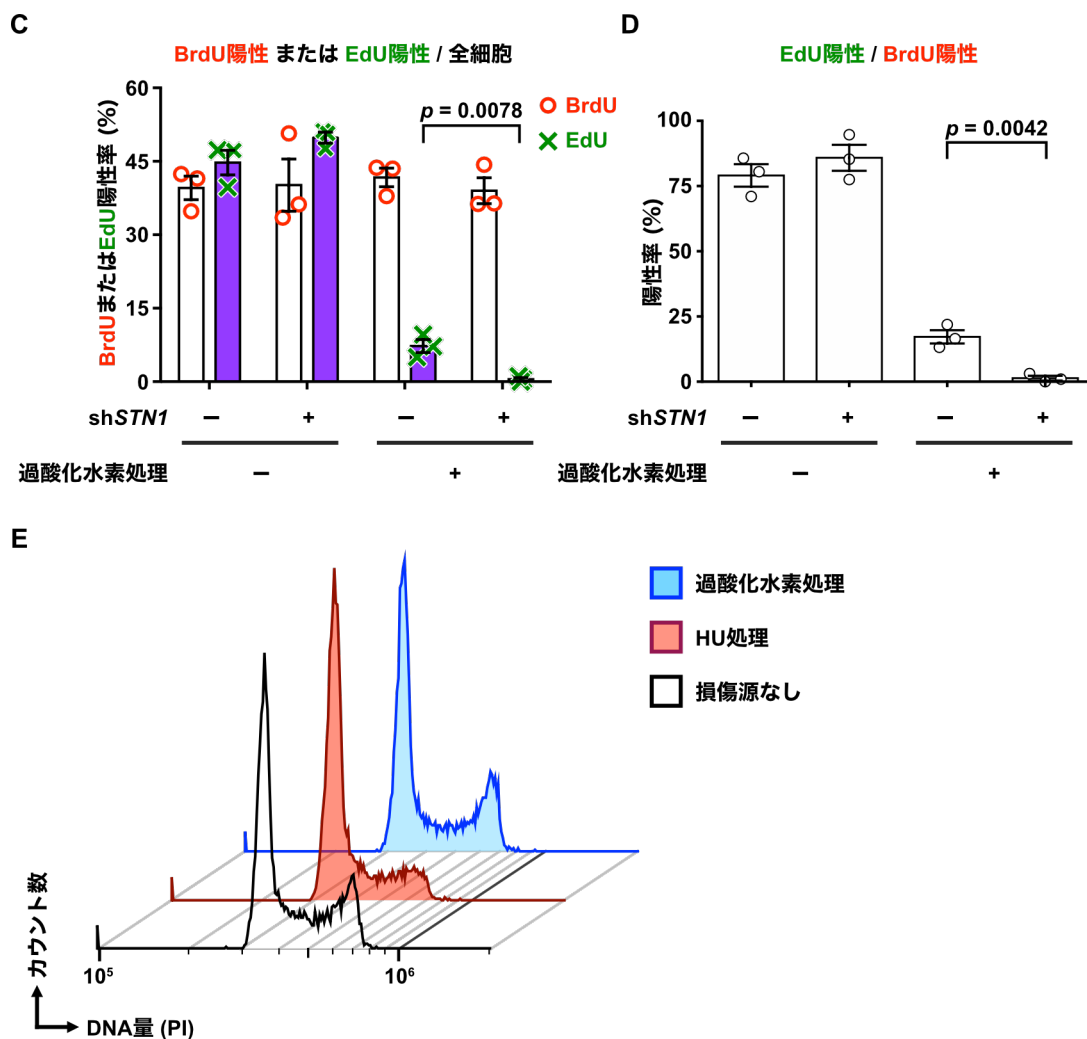


図 3-5-1 *STN1* をノックダウンすることで過酸化水素処理後に新生鎖 DNA が合成されなくなる

**A** 実験の流れ図。過酸化水素処理を行う直前にS期のHeLa細胞にBrdUを取り込ませた。10分後にBrdUは培地から除去され、何も含んでいない培地に対して過酸化水素を添加した。2時間後、細胞をPBSで洗浄した後EdUを含む培地に交換した。その後1時間培養し、その間にDNA合成を行ったHeLa細胞を標識した。**B** BrdUまたはEdU陽性細胞の数についてのベン図。過酸化水素処理の有無ごとにHeLa *shSTN1* 細胞およびノックダウン対照細胞を1回の実験あたり最低200個ずつ顕微鏡観察しBrdUまたはEdU陽性細胞を目視で数えた。これを3回繰り返して、得られた合計数を円の内外に記載した。BrdUおよびEdU陰性な細胞も含む観察した細胞の合計数( $n$ )は各図の上部に記載した。図形の面積は概略を示すためのものであり、細胞数の差を正確に反映したものではない。**C** 観察した全細胞におけるBrdUまたはEdU陽性細胞の割合についての棒グラフ。各棒グラフ上の記号は各実験でBrdUまたはEdU陽性率を表し、棒グラフの高さは平均値を表している。誤差線は3回の独

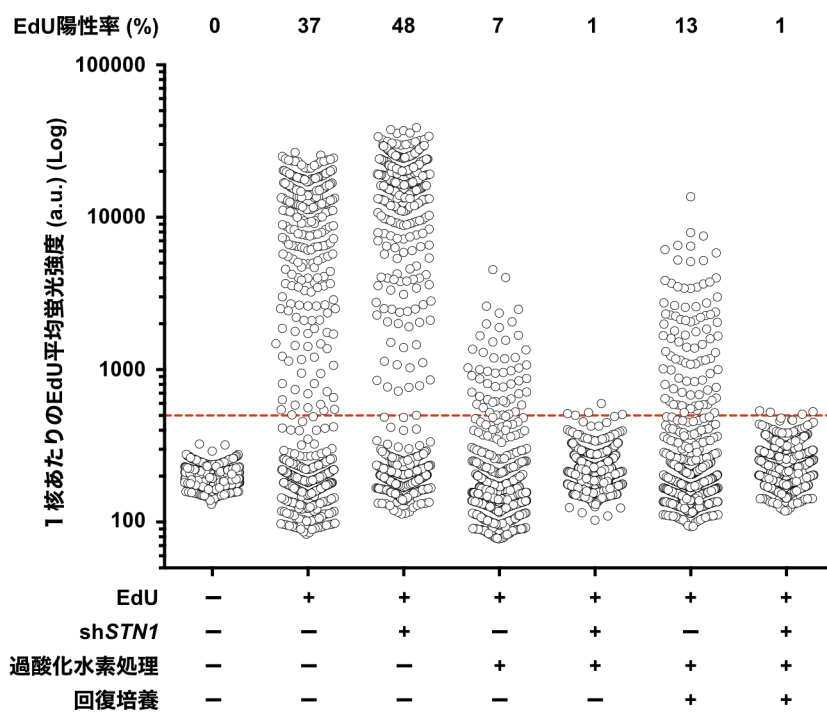
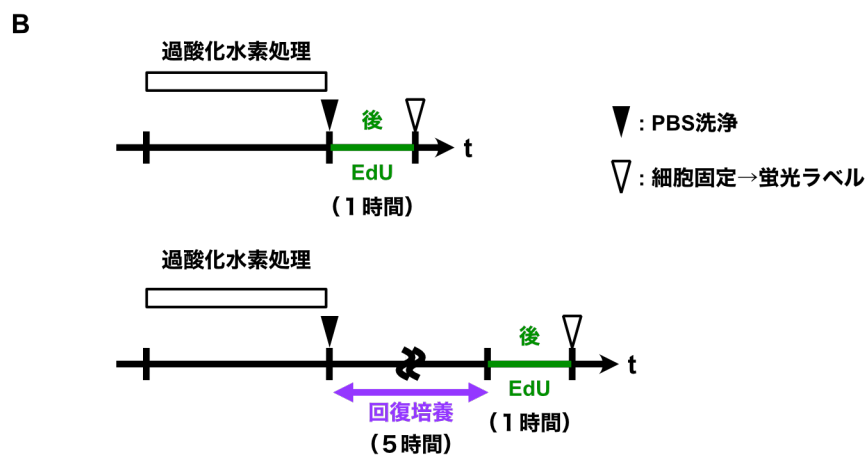
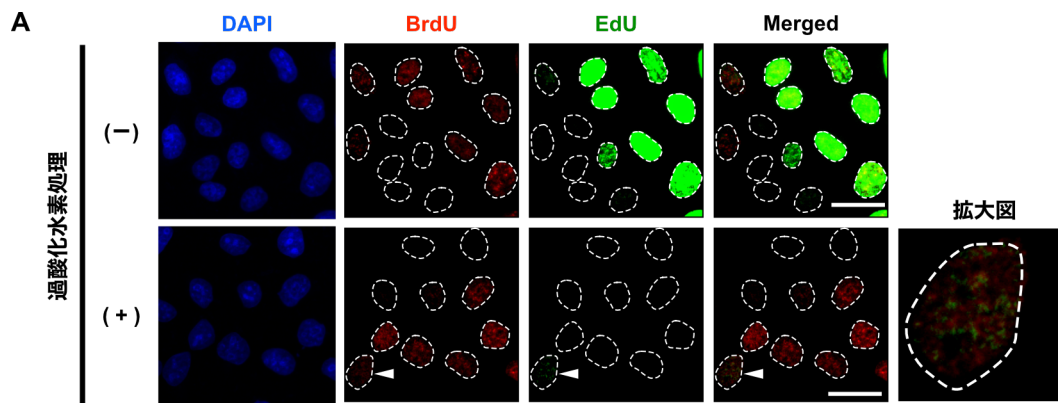


立した実験の標準誤差を示す。統計的有意差は Unpaired *t* tests に基づいて求めた。比較したサンプル間の上部に *p* 値を記載した。D BrdU 陽性細胞に占める EdU 陽性細胞の割合。E フローサイトメトリーを用いて、HU または過酸化水素処理された直後の HeLa 細胞を回収・固定し、DNA 量を調べた。各ヒストグラムは  $10^4$  個の細胞の PI 強度に関するデータを示している。統計的有意差は Unpaired *t* tests に基づいて求めた。比較したサンプル間の上部に *p* 値を記載した。

### 3-5-2 過酸化水素処理後に取り込まれた EdU 量の定量的解析

前項の実験を行った際に、過酸化水素処理された同細胞内の EdU の蛍光輝度は通常条件で培養した場合と比べて減弱した (図 3-5-2 A)。EdU によって標識された新生鎖 DNA を比較定量するために、1 核あたりの EdU 平均蛍光強度を解析した (図 3-5-2 B)。赤破線で示した閾値以上の蛍光強度の細胞を EdU 陽性細胞と定義して EdU 陽性率を求めた。培地に過酸化水素を加えなかった場合の EdU 陽性率は、先の 3 回の実験で得られた誤差範囲に含まれた。また、過酸化水素処理直後の培地に EdU を含ませた場合、平均蛍光強度に基づいた EdU 陽性率は目視判定した場合の値とほぼ一致した。この時、ノックダウン対照細胞では EdU シグナルが検出されたが shSTN1 細胞では見られなかった。さらに過酸化水素処理終了後に回復培養を行うことで DNA 修復を促し、EdU の平均蛍光強度への影響を調べた。その結果、ノックダウン対照細胞の平均蛍光強度は全体的に上昇し EdU 陽性率は倍増したが shSTN1 細胞は変化しなかった (図 3-5-2 B)。したがって、過酸化水素処理を終えて 6 時間後も新生鎖 DNA 合成反応は STN1 の欠失によって阻害されていることが分かった。

前節 (3-4) と合わせて、S 期の HeLa 細胞が過酸化水素に曝された場合に CST 複合体は DNA 合成の維持・再開に寄与していることが示唆された。過酸化水素処理によって生存率が減少する原因の 1 つとしてゲノムの不安定化が挙げられるが、shSTN1 細胞では DNA 複製・修復が持続的に阻害されたことで過酸化水素に対する感受性が亢進したという可能性が得られた。



### 図 3-5-2 過酸化水素処理後に取り込まれる EdU の量は *STN1* をノックダウンすることで減少する

**A** 過酸化水素処理の有無ごとに、BrdU かつ EdU 陽性なノックダウン対照細胞の核の代表例を示す。白色の正方形の部分拡大した画像が、最右端列の「拡大図」である。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$  を表す。**B**(上部)実験の流れ図。**3-5-1** の実験と同様に過酸化水素処理直後の培地に EdU を添加するか、通常の培地を用いて回復培養を開始し5時間後に EdU を添加した。(下部)1核あたりの EdU の平均蛍光強度。700 個以上の細胞核における EdU の平均蛍光強度を解析した上で、ランダムに選んだ 700 個のデータを示している。赤破線は閾値 (500 (a.u.))を示し、これより大きな平均蛍光強度の細胞を EdU 陽性とみなし、全体に占める割合 (EdU 陽性率)を上部に記載した。

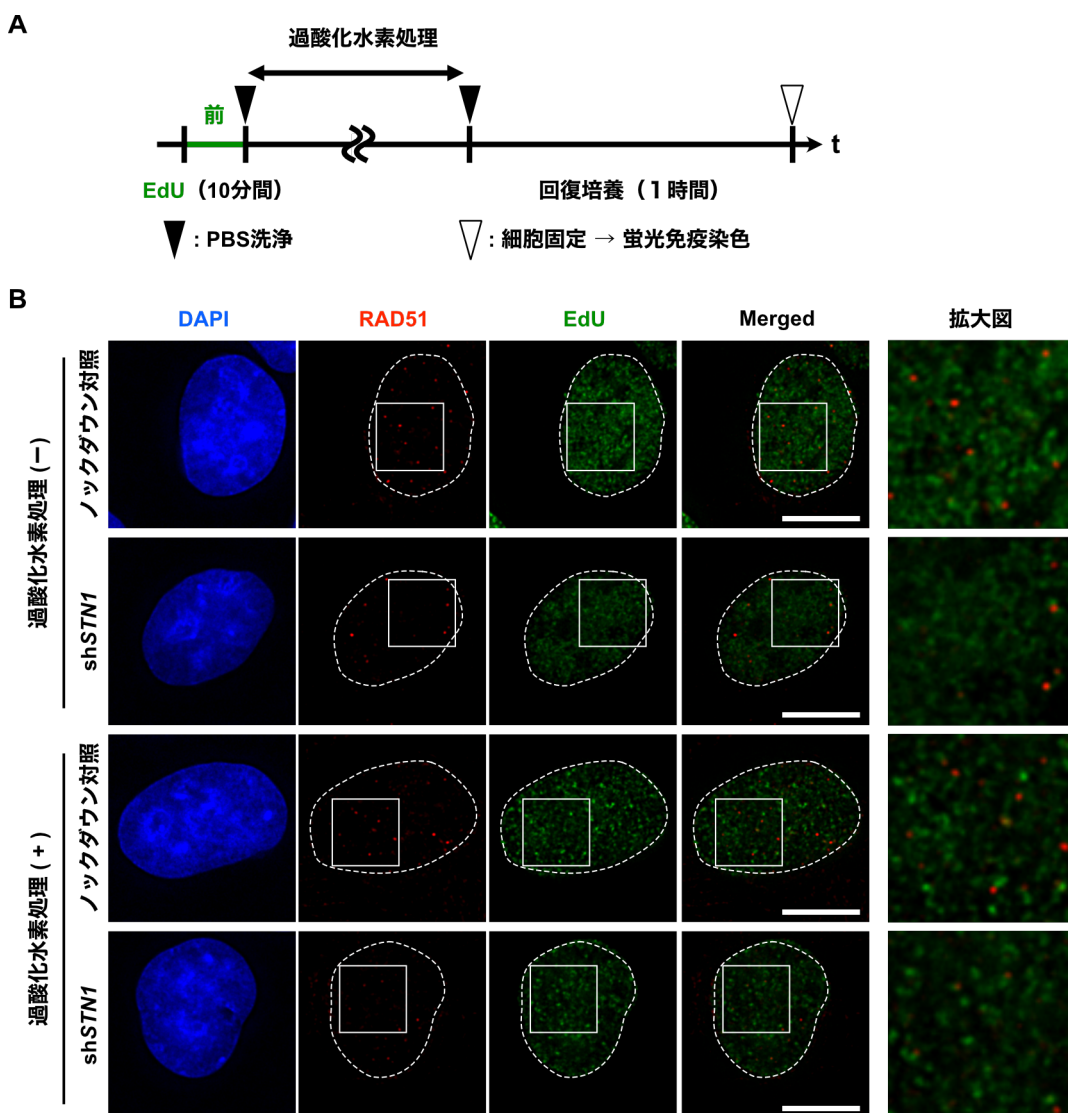
## 3-6 CST 複合体と DNA 複製に依存した RAD51 フォーカス数の増減

### 3-6-1 HeLa 細胞を用いた蛍光免疫染色

過酸化水素処理された *shSTN1* 細胞の表現型について、コメットアッセイから二本鎖 DNA 切断が、細胞周期同調を伴う生存率測定実験とチミジンアナログの取り込み率から DNA 複製との関連性が見出された。すなわち、過酸化水素処理された HeLa 細胞で DNA 合成が抑制された原因として、過酸化水素によって生じた DNA 損傷が修復されず DNA 損傷応答が活性化され続けていると考えられた。DNA 損傷を受けた細胞が生存するためには露出した一本鎖 DNA の保護または相同組換え修復が必要で、その際に RAD51 は中心的な役割を果たす。序章で説明したように CST 複合体と RAD51 との物理的相互作用は既に知られており、また、DNA 複製と相同組換え修復との関連性も調べられている (Fedor Y *et al.*, 2013; Chastain M *et al.*, 2016; Whelan DR *et al.*, 2018; Lyu X *et al.*, 2021)。そこで、過酸化水素処理された HeLa 細胞の核内で RAD51 フォーカスとして検出できるか調べた。

S 期の細胞を区別するために EdU を添加・除去した後、過酸化水素処理を行った。同処理後 1 時間の回復培養も行った後蛍光免疫染色に供した (図 3-6-1 A および B)。独立に 2 回行った実験を統合し、EdU 陽性または陰性細胞ごとに 1 核あたりの RAD51 フォーカス数を調べた (図 3-6-1 C および D)。まず、過酸化水素処理された際に S 期だった EdU 陽性細胞に限って比較定量した。過酸化水素処理されなかった細胞では、1 核あたり数個から数十個の RAD51 フォーカスが観察された。これらは通常の培養条件下に置かれた HeLa 細胞内で内在性の DNA 損傷に対して起きる DNA 損傷応答を示していると考えられる (図 3-6-1 C 左から 2 レーン)。培地に過酸化水素が加えられたノックダウン対照細胞においても RAD51 フォーカスは検出されたが、添加しなかった場合と比較してその数は有意に減少した。しかし、*shSTN1* 細胞では、過酸化水素処理によって RAD51 フォーカスはほぼ消失した (図 3-6-1 C 右から 2 レーン)。また、EdU 陰

性（すなわち S 期以外の細胞）の核では、RAD51 のフォーカスは過酸化水素処理の有無に関わらず殆ど検出されなかった（**図 3-6-1 D**）。なお、観察した全ての細胞核における EdU の平均蛍光強度と RAD51 のフォーカス数との相関も調べ、EdU シグナルの強弱が RAD51 フォーカス数に特に影響しないことを確かめた（**図 3-6-1 E および F**）。これらの結果から、S 期の細胞で CST 複合体（STN1）は RAD51 を DNA 損傷部位にリクルートする可能性が得られた。また、露出した一本鎖 DNA の保護または相同組換え修復の促進という同複合体の機能が予想された。



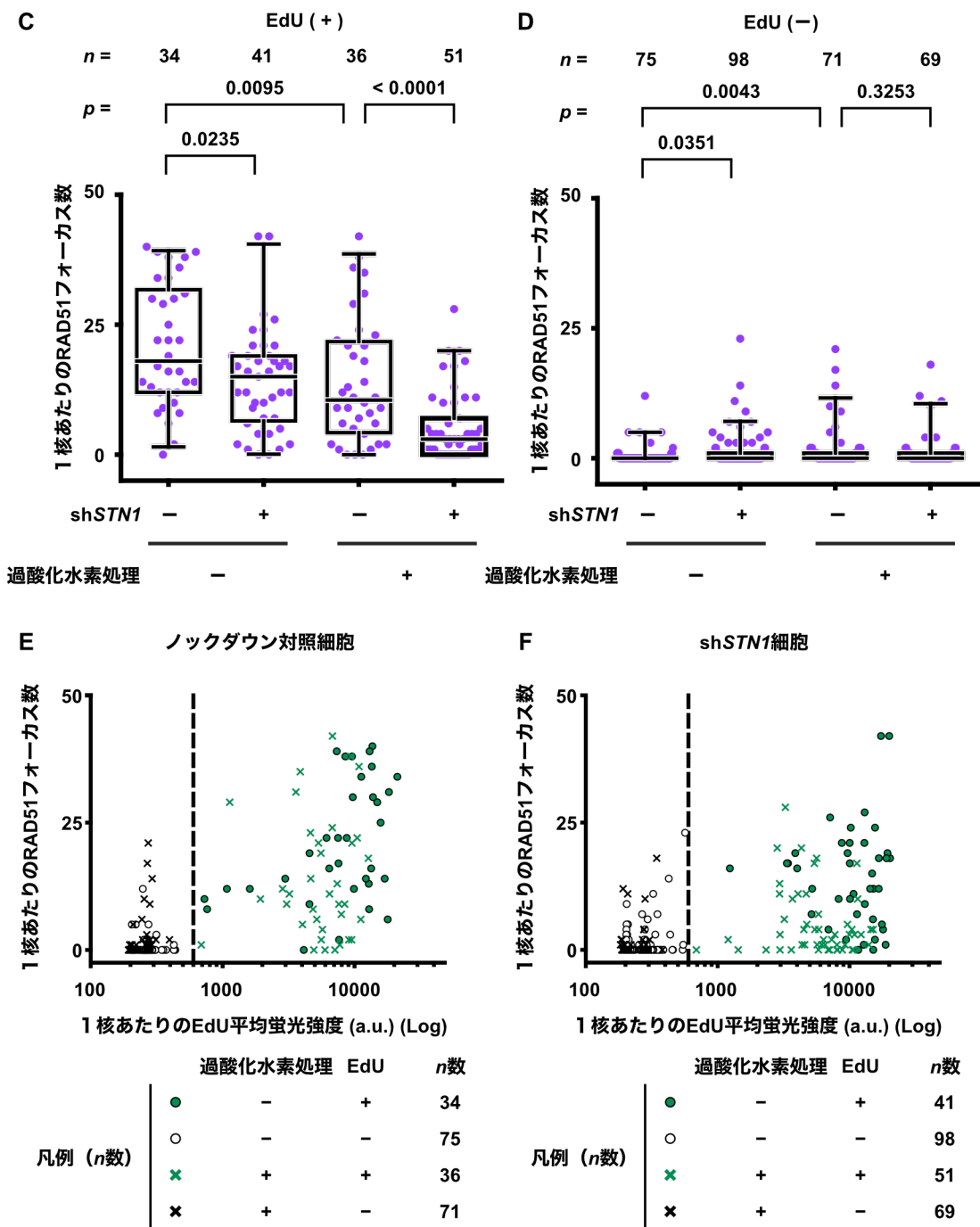


図 3-6-1 過酸化水素処理された HeLa 細胞の核において、RAD51 のフォーカス形成は STN1 をノックダウンすることで抑制される

**A** 実験の流れ図。過酸化水素処理を行う直前に S 期の HeLa 細胞に EdU を取り込ませた。10 分後に EdU を培地から除去し、何も含まない培地に対して過酸化水素を添加した。2 時間後、細胞を PBS で洗浄した後通常の培地に交換した。最後に 1 時間培養した後、細胞を固定した。**B** EdU 陽性な HeLa shSTN1 細胞またはノックダウン対照細胞の核の代表例を

示す。細胞種と過酸化水素処理の有無は左側に記載した。白色の正方形の部分を拡大した画像が、最右端列の「拡大図」である。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$  を表す。C, D EdU 陽性(C)または陰性(D)な HeLa 細胞の核内で検出された RAD51 のフォーカス数。n はサンプルごとに観察された核の数を表している。1 回の実験あたり最低 50 個の細胞 (EdU 陽性および陰性細胞) を観察することを 2 回繰り返し、2 回分の合計値を図にまとめた。統計的有意差は Mann-Whitney *U* test に基づいて求めた。比較したサンプル間の上部に *p* 値を記載した。E, F ノックダウン対照(E)または shSTN1(F)細胞の核内で検出された 1 核あたりの EdU の平均蛍光強度と RAD51 のフォーカス数との相関。下部に凡例ごとのサンプル条件と n 数を表している。破線は EdU の閾値 (600 (a.u.)) を示していて、平均蛍光強度が閾値以下の細胞を EdU 陰性、逆に閾値より大きな細胞を EdU 陽性と定めた。

### 3-6-2 U2OS 細胞の過酸化水素に対する感受性と U2OS shSTN1 細胞の表現型

HeLa 細胞以外のヒト由来培養細胞も過酸化水素に対して感受性を示す (図 3-6-2 A)。そのため、3-6-1 で明らかとなった RAD51 の核内局在に普遍性があるか調べるために先行研究でも HeLa 細胞と並び多く用いられている U2OS shSTN1 細胞を樹立し、これを実験に用いた。STN1 をノックダウンするために shSTN1#3 配列を用いた。レンチウイルス感染から 7 日後に全 RNA を回収して行った定量 RT-PCR によって、U2OS 細胞においても shSTN1#3 配列の発現抑制効果が認められた (図 3-6-2 B)。HeLa shSTN1 細胞 (図 3-1-1 E) と異なり、U2OS shSTN1#3 細胞の数は経時的計測を始めた直後からノックダウン対照細胞との間に有意な差を示した。しかし、同ノックダウン細胞の増殖は完全に抑制されることなく 12 日目まで続いた (図 3-6-2 C)。以下では U2OS shSTN1#3 細胞を U2OS shSTN1 細胞と呼称する。

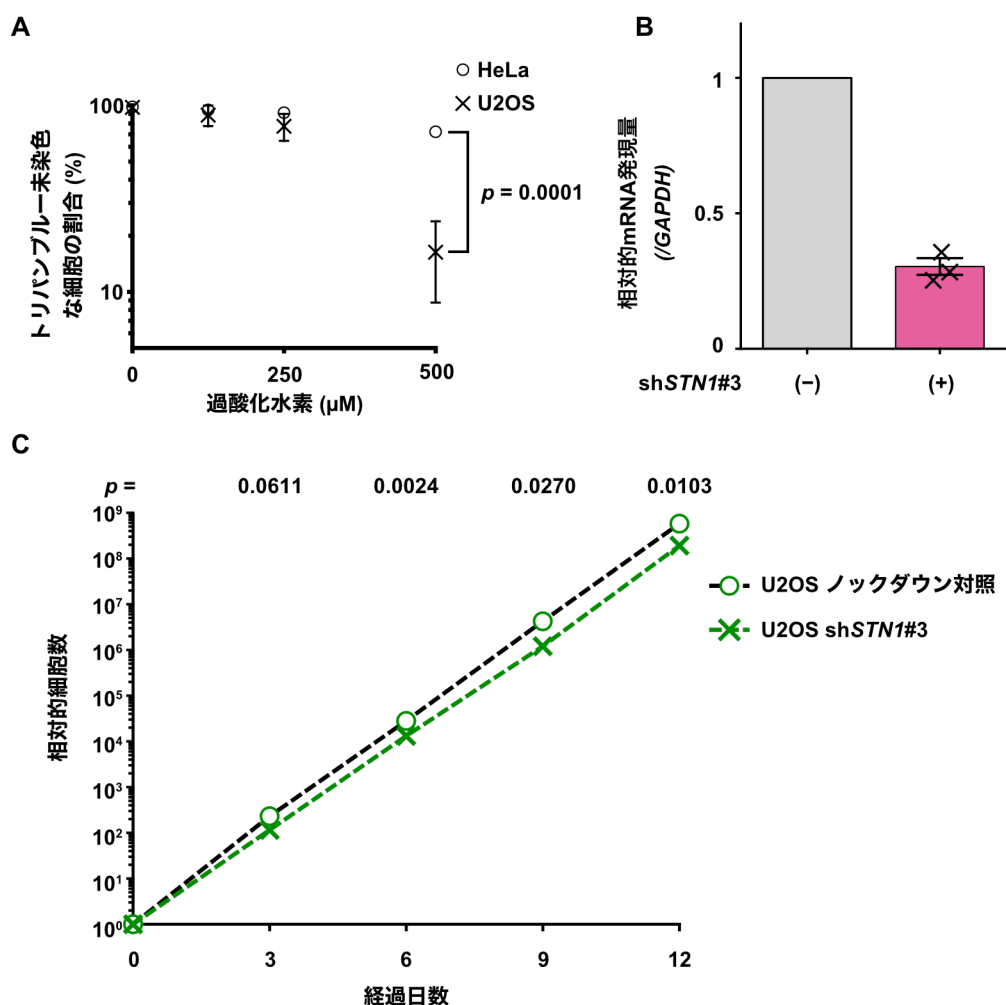


図 3-6-2 U2OS 細胞も過酸化水素に対して感受性を示し、*STN1* をノックダウンしても増殖は著しく阻害されない

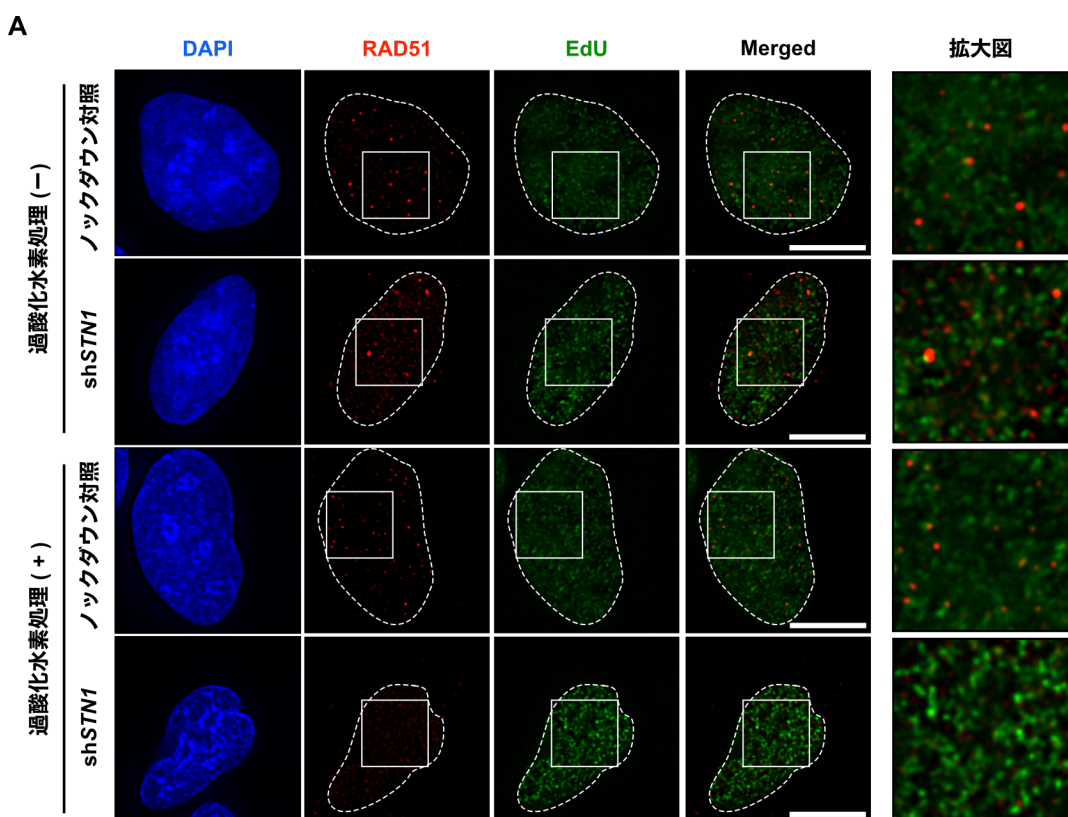
**A** HeLa 細胞および U2OS 細胞を終濃度 125, 250, 500 μM の過酸化水素を含む培地で 2 時間培養した後、総細胞数に占めるトリパンブルー未染色な細胞数の割合を求めた。グラフの凡例に細胞種、横軸に過酸化水素濃度(0 μM は陰性対照として、何も加えずに培養した場合)、対数目盛の縦軸に割合を百分率で表す。誤差線は 3 回の独立した実験の標準誤差を示す。統計的有意差は Unpaired *t* tests に基づいて求めた。**B** レンチウイルス感染後 7 日目の U2OS sh*STN1*(#3)およびノックダウン対照細胞から全 RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法により *STN1* の cDNA を定量した。ノックダウン対照細胞での *STN1* の発現量を 1 とした相対的発現量を求めた。その際に *GAPDH* の mRNA 量を内部標準として用い標準化を行った。各棒グラフ上の記号は各実験での発現量を表し、棒グラフの高さは平均値を表している。誤差線は 3 回の独立した実験の標準誤差を示す。**C** U2OS sh*STN1*#3 細胞およびノックダウン対照細胞の増殖曲線。レンチウイルス感染後 5 日目がグラフの 0 日目に相当し、細胞種ごとにこの時点での細胞数を 10<sup>0</sup> (= 1.0) と定める。グラフ中の各点は 4 回の独立した実験の平

均値を示す。細胞種間での相対的細胞数の差について、グラフの上部に  $p$  値を記載した。統計的有意差は Unpaired  $t$  tests に基づいて求めた。

### 3-6-3 過酸化水素処理された U2OS shSTN1 細胞における RAD51 フォーカスの消失

過酸化水素処理された HeLa 細胞の核内における RAD51 のフォーカス形成は、CST 複合体によって促されることが示唆された。同様の知見が U2OS 細胞からも得られるか調べた。

U2OS shSTN1 細胞とノックダウン対照細胞に対して、先の実験 (図 3-6-1 A) と同様に EdU による S 期細胞の標識と過酸化水素処理 (回復培養も含む) を行った後、顕微鏡観察結果から 1 核あたりの RAD51 フォーカス数を解析した。その結果、U2OS 細胞においても RAD51 フォーカスは EdU 陽性細胞 (過酸化水素処理される直前に S 期だった細胞) でより多く見られ、また、同フォーカスは STN1 ノックダウンによって過酸化水素処理された細胞核から消失した (図 3-6-3 B-D)。すなわち、CST 複合体は S 期の細胞が過酸化水素処理された際の DNA 修復・組換えに関わっていることが示唆された。





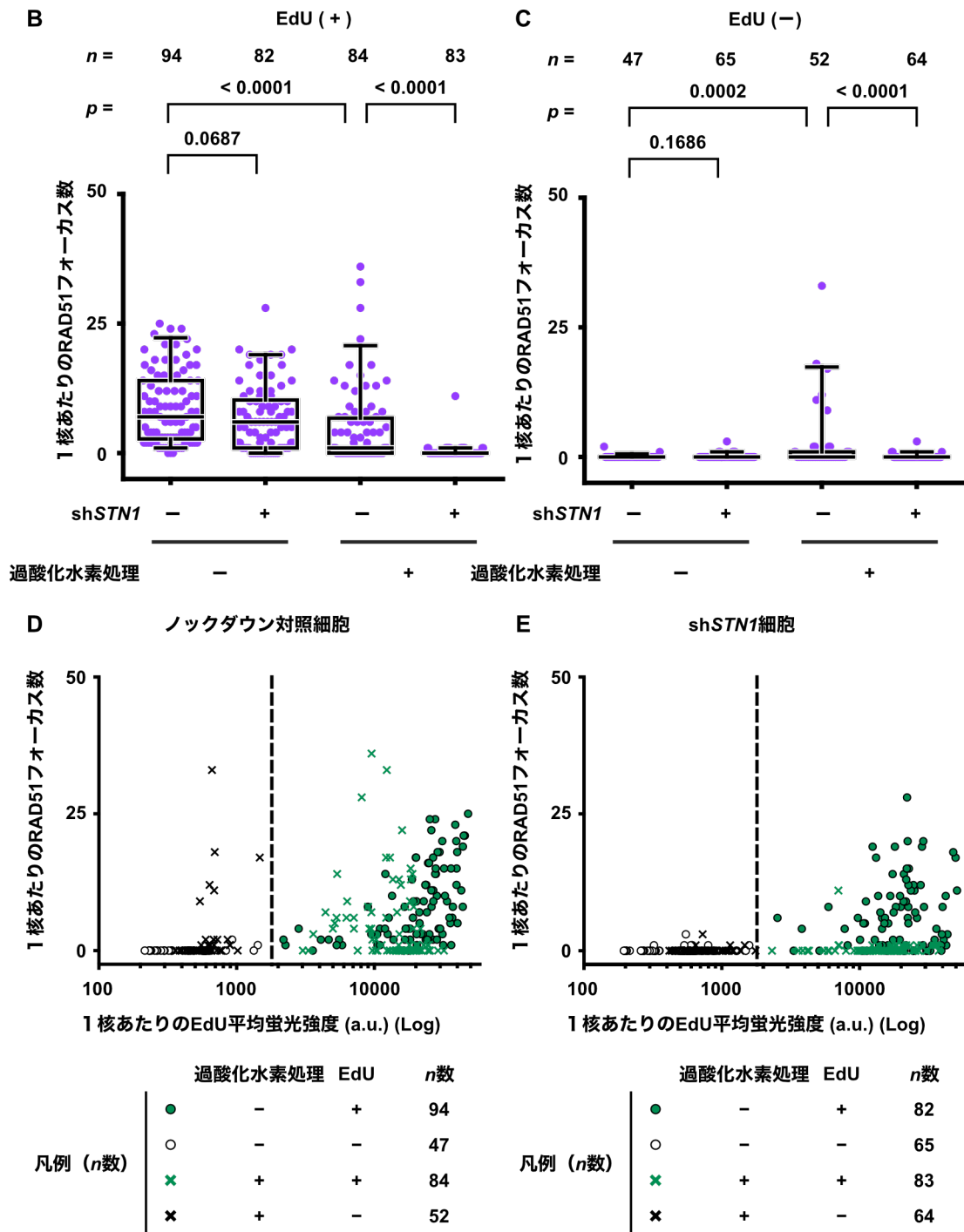


図 3-6-3 過酸化水素処理された U2OS 細胞においても、RAD51 のフォーカス形成は *STN1* をノックダウンすることで抑制される

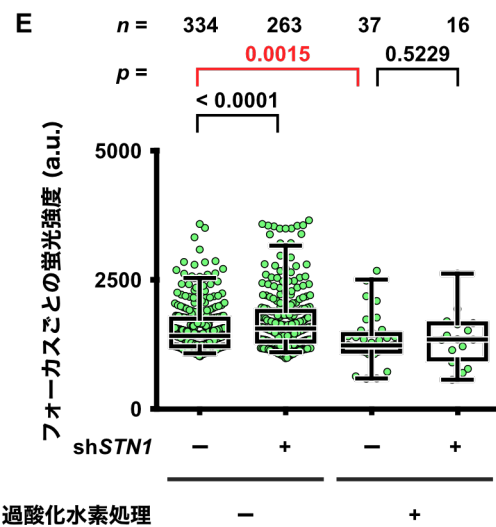
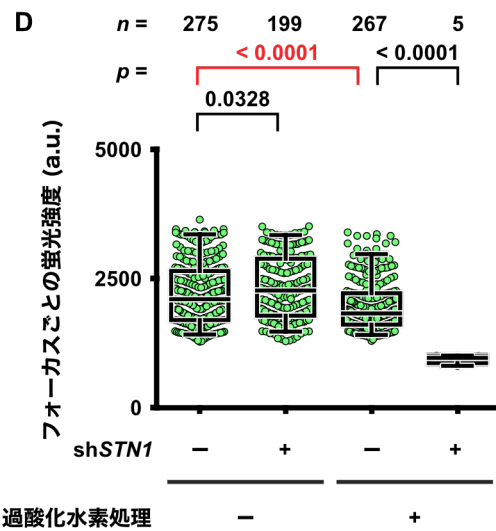
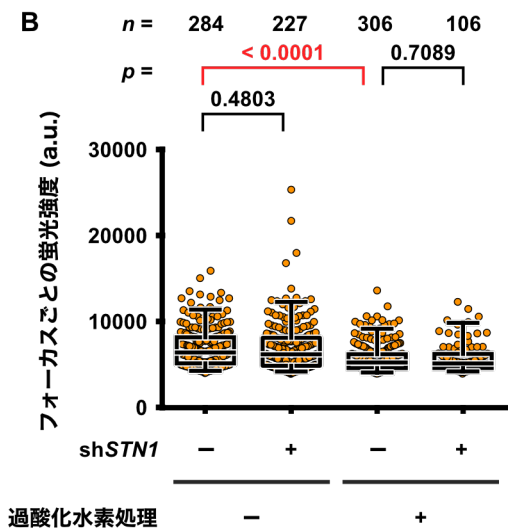
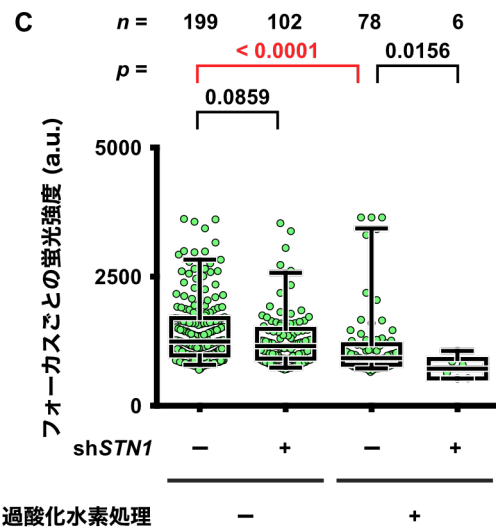
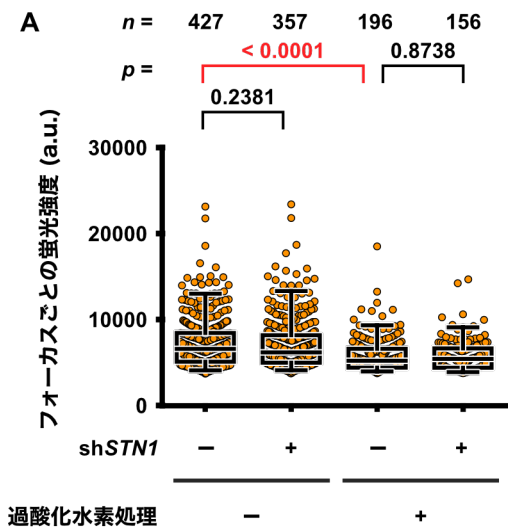
**A** EdU 陽性 U2OS *shSTN1* 細胞またはノックダウン対照細胞の核の代表例を示す。細胞種と過酸化水素処理の有無は左側に記載した。白色の正方形の部分拡大した画像が、最右端列の「拡大図」である。スケールバーは 10  $\mu$ m を表す。**B, C** EdU 陽性 (**B**) または陰性

(C)な U2OS 細胞の核内で検出された RAD51 のフォーカス数。 $n$  はサンプルごとに観察された核の数を表している。1回の実験あたり最低 40 個の細胞 (EdU 陽性および陰性細胞) を観察することを 3 回繰り返し、3 回分の合計値を図にまとめた。統計的有意差は Mann-Whitney  $U$  test に基づいて求めた。比較したサンプル間の上部に  $p$  値を記載した。D, E ノックダウン対照 (D) または shSTN1 (E) 細胞の核内で検出された 1 核あたりの EdU の平均蛍光強度と RAD51 のフォーカス数との相関。下部に凡例ごとのサンプル条件と  $n$  数を表している。破線は EdU の閾値 (1,800 (a.u.)) を示していて、平均蛍光強度が閾値以下の細胞を EdU 陰性、逆に閾値より大きな細胞を EdU 陽性と定めた。

#### 3-6-4 過酸化水素処理によってもたらされた RAD51 フォーカスの蛍光強度の減弱化

CST 複合体は複製中の DNA が酸化ストレスに曝された際に RAD51 が核内に局在するために必要であることが示唆された。HU 処理された HeLa 細胞でも、CTCI、STN1 または TEN1 それぞれをノックダウンすることで RAD51 フォーカスの数とシグナル強度は減弱した (Chastain M *et al.*, 2016; Lyu X *et al.*, 2021)。

ノックダウン対照細胞における同フォーカスの数と大きさが過酸化水素処理によって減少するという傾向が見られた (図 3-6-1 C および図 3-6-3 B)。フォーカスの大きさは蛍光強度と概ね一致していたため、フォーカスごとの蛍光強度を過酸化水素処理する前後で比較することでこの傾向に再現性があるか調べた (図 3-6-4)。その結果、代表的な顕微鏡画像 (図 3-6-1 B および図 3-6-3 A) で示されるような RAD51 フォーカスの特徴が統計的有意差によって裏付けられた (図 3-6-4 赤色で示したサンプル間)。この特徴がもたらされた原因として、フォーカスを自動検出するために用いた ImageJ マクロスクリプトの仕様が考えられる。このプログラムでは周囲と比べて「比較的」輝度が高い箇所をフォーカスとして定義した。そのため、特に過酸化水素処理された細胞核において RAD51 フォーカス数が過小評価されている可能性が否めない。しかし、特に過酸化水素処理された HeLa 細胞において、フォーカスごとの蛍光強度は STN1 ノックダウンによって変化しなかった。そのため、同ノックダウンに関係なく RAD51 フォーカスは認識されていると判断し、ImageJ マクロスクリプトの仕様が「過酸化水素処理された細胞核への RAD51 の集積は STN1 ノックダウンによって抑制される」という知見にもたらす影響は小さいと考えられた。



### 図 3-6-4 過酸化水素処理によって RAD51 フォーカスの蛍光強度は減弱する

3-6-1 および 3-6-3 の実験回ごとに、フォーカスあたりの蛍光強度を比較定量した。A および B が HeLa 細胞を用いた実験で、C から E が U2OS 細胞を用いた実験である。n はサンプルごとに観察されたフォーカスの数を表している。統計的有意差は Mann-Whitney U test に基づいて求めた。比較したサンプル間の上部に p 値を記載した。

## 3-7 CST 複合体と RAD51 によって制御される過酸化水素に対する感受性

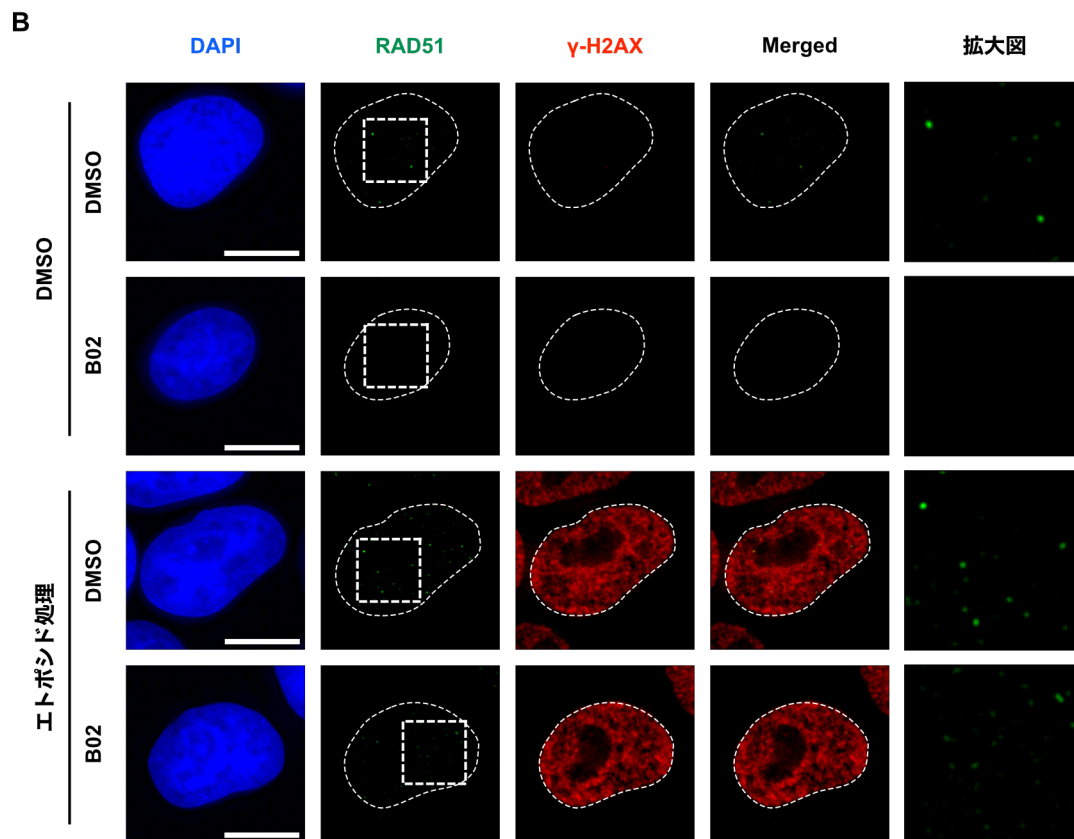
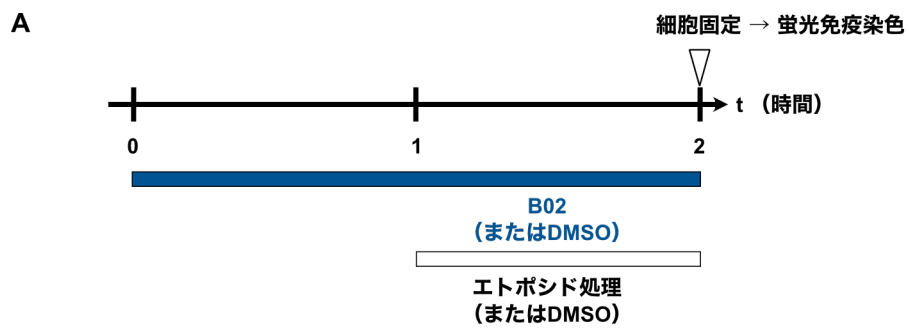
### 3-7-1 RAD51 阻害剤

RAD51 に対する蛍光免疫染色によって、過酸化水素処理された細胞核に RAD51 が局在するためには CST 複合体が必要であることが示唆された。過酸化水素処理された HeLa shSTN1 細胞がより低い生存率を示すことと STN1 ノックダウンによって RAD51 フォーカス数が減少したこととの関連性を明らかにするために、RAD51 の DNA 結合を薬剤処理によって阻害した上で過酸化水素処理後の生存率を調べた。

RAD51 の DNA 結合を阻害するために B02 という薬剤を用いた。B02 は RAD51 の ATPase ドメインに結合することで、一本鎖 DNA 上での RAD51 フィラメント形成とそれに伴う DNA 鎖交換反応を阻害する (Huang F, *et al.*, 2011; Huang F, *et al.*, 2012)。

実験目的に適した B02 の実効濃度を検討するために、エトポシドによる二本鎖 DNA 切断を加える前に B02 を前処理することで RAD51 の核内フォーカス数が減少することを確かめた (図 3-7-1 A)。阻害剤およびエトポシド処理をどちらも行わなかった HeLa 細胞の核内で形成されていた RAD51 フォーカスの数は B02 によって減少した。そして、エトポシドのみ処理することによって RAD51 フォーカス数は顕著に増加したが、B02 を前処理された細胞核内で同フォーカスは形成されなかった (図 3-7-1 B および C)。同様の傾向は U2OS 細胞でも観察された (図 3-7-1 D)。また、これらの細胞内で検出された RAD51 フォーカスの蛍光強度を定量したことで、顕微鏡写真 (図 3-7-1 B) で示されるようにエトポシドのみ処理された細胞の RAD51 フォーカスは小さくなる傾向が分かった (図 3-7-1 D および E)。

したがって、B02 によって RAD51 の DNA 結合が阻害されることが明らかになった。また、蛍光免疫染色によって観察できる RAD51 フォーカスの多くは DNA に結合した状態の RAD51 に基づいている可能性も得られた。



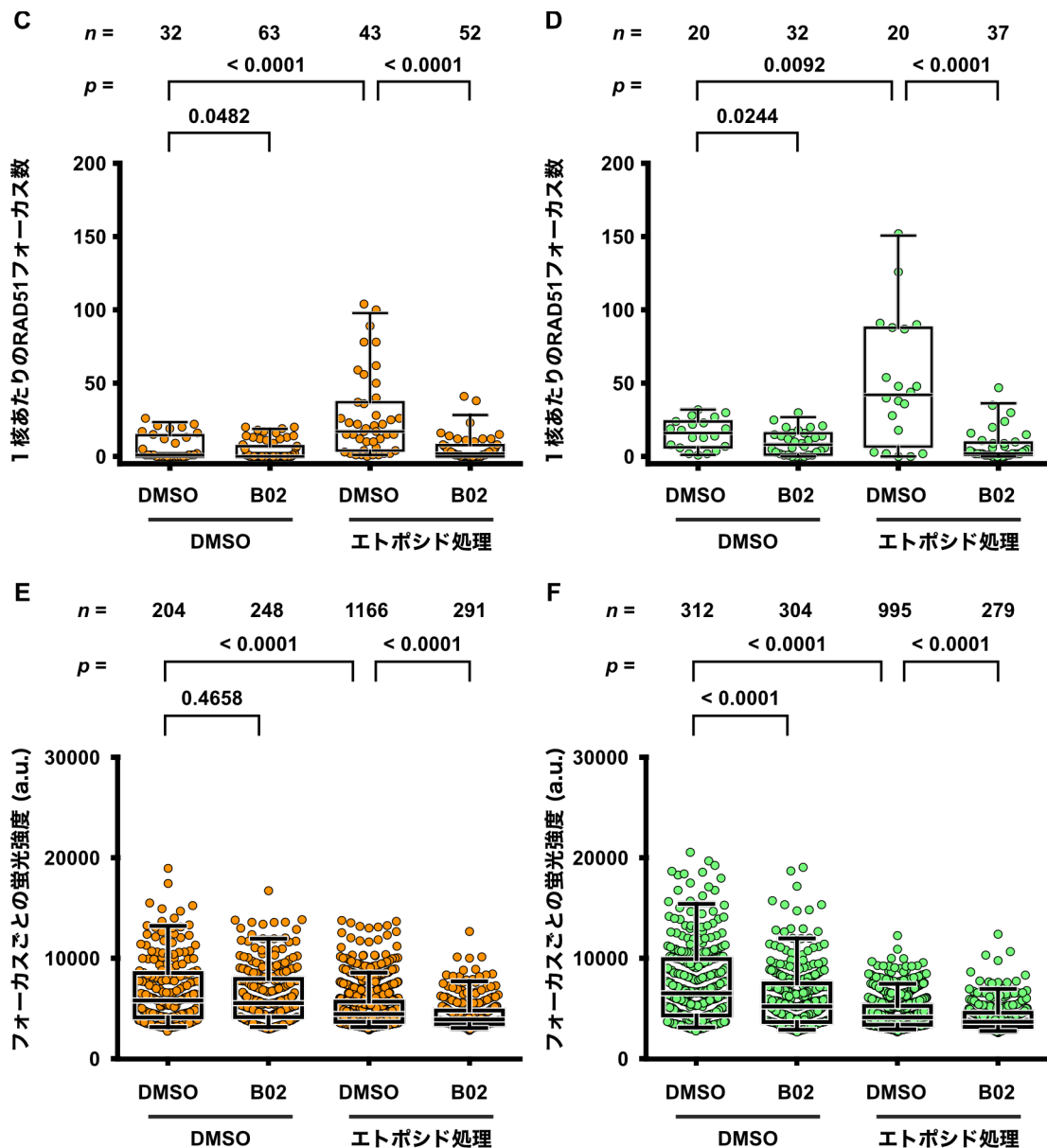


図 3-7-1 RAD51 の DNA 結合を阻害することで RAD51 のフォーカス数は減少する

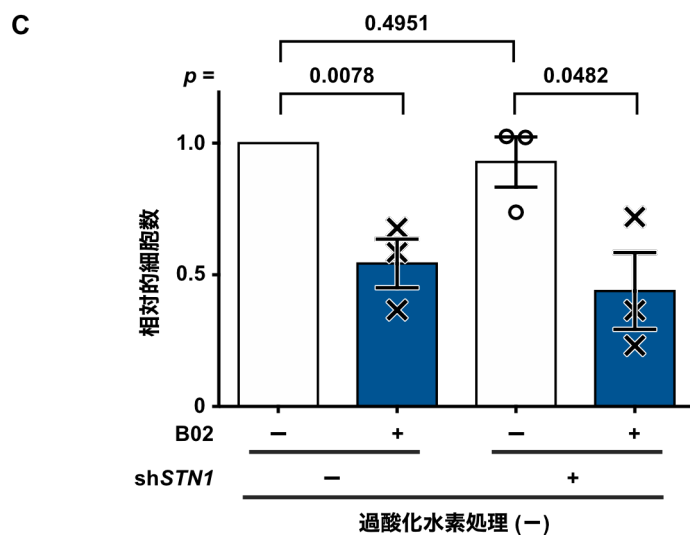
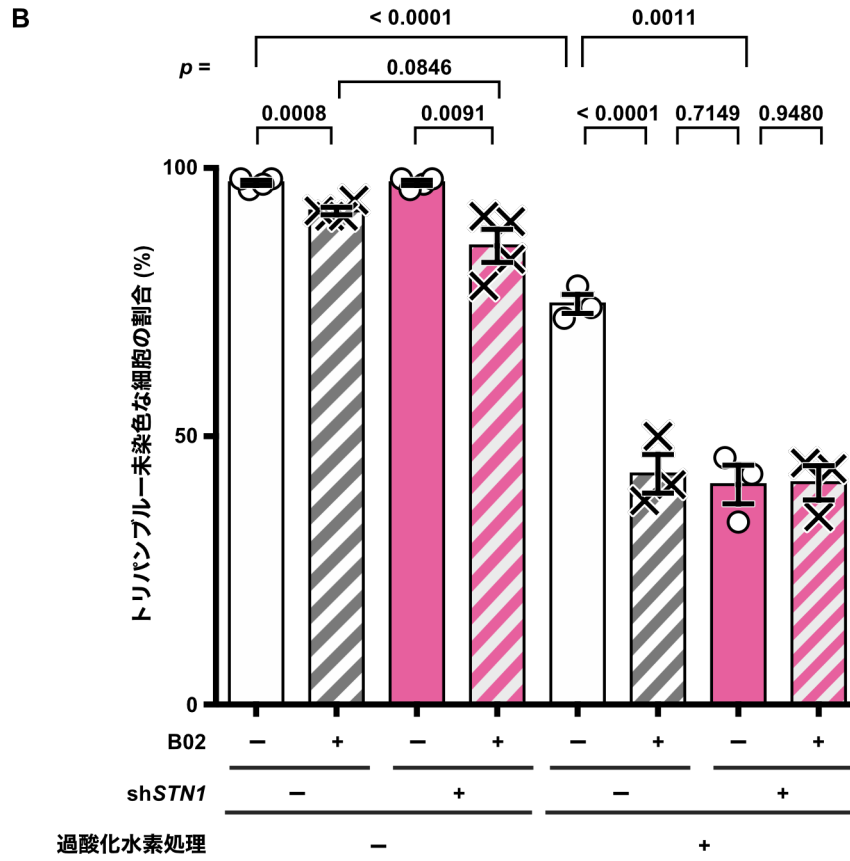
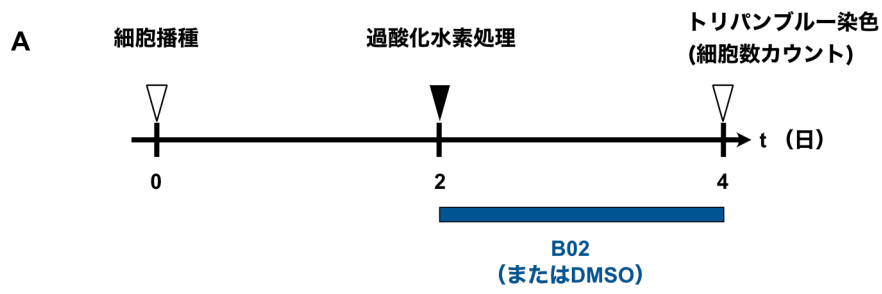
**A** 実験の流れ図。t=1(時間)で RAD51 阻害剤の B2(または陰性対照として溶媒の DMSO)を含む培地を除去せずエトポシドまたは DMSO を添加した。A B2 またはエトポシドによって薬剤処理された HeLa 細胞の核の代表例を示す。B2 またはエトポシド処理の有無は左側に記載した。白色の正方形の部分拡大した画像が、最右端列の「拡大図」である。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$  を表す。C, D HeLa(C)または U2OS(D)細胞の核内で検出された RAD51 のフォーカス数。n はサンプルごとに観察された核の数を表している。E, F HeLa(E)または U2OS(F)細胞において検出された、フォーカスあたりの蛍光強度を比較定量した。n はサンプルごとに観察されたフォーカスの数を表している。統計的有意差は Mann-Whitney U test に基づいて求めた。比較したサンプル間の上部に p 値を記載した。

### 3-7-2 CST 複合体と RAD51 が過酸化水素処理された HeLa 細胞の生存に及ぼす影響

前項の実験によって、RAD51 のフォーカス形成は B02 を含む培地で 2 時間培養することで阻害されることが分かった。

この結果に基づき B02 処理時間をさらに長くする（2 時間→2 日間）ことで RAD51 の DNA 結合を阻害し、RAD51 が過酸化水素処理後の生存率に及ぼす影響を調べた（**図 3-7-2 A**）。過酸化水素処理を行わず B02 のみを添加した場合、*STN1* ノックダウンに関わらず生存率が減少した（**図 3-7-2 B**）。また、B02 に曝された細胞の数は B02 を添加しなかった場合と比べて有意に減少した（**図 3-7-2 C**）。そして、ノックダウン対照細胞の生存率は過酸化水素処理によって約 70%に減少し、さらに B02 を添加したことで 50%未満まで減少した。過酸化水素と B02 を連続的に処理されたノックダウン対照細胞の生存率は、過酸化水素処理のみ施された *shSTN1* 細胞の生存率と等しかった。また、過酸化水素処理された *shSTN1* 細胞の生存率は B02 処理の影響を受けなかった。なお、B02 は十分作用したと考えられる一方、*STN1* の発現は完全に抑制されていなかった（**図 3-1-1 B**）。しかし、過酸化水素処理された *shSTN1* 細胞の生存率は過酸化水素処理と B02 処理を連続的に加えたノックダウン対照細胞の生存率と等しかった。この原因として、3つのサブユニットのうち1つが欠けると DNA 結合が不安定になるという先行研究（Miyake Y *et al.*, 2009; Feng X *et al.*, 2018）が関連すると考えられる。すなわち、ヘテロ三量体を構成する際に橋渡し役となる *STN1* が欠失したことで CST 複合体は減少し、ゲノム安定性を維持するために必要な量を下回った可能性がある。

以上の結果は、酸化ストレスを受けた DNA 鎖上に CST 複合体と RAD51 が結合しなかったため過酸化水素処理後の生存率が減少したことを示唆している。さらに、B02 は過酸化水素処理された *shSTN1* 細胞の生存率には影響しなかったため、CST 複合体と RAD51 は同じ経路上にあることと、同複合体は RAD51 の上流で過酸化水素処理された HeLa 細胞の生存に寄与することが示唆された。





### 図 3-7-2 RAD51 阻害剤は STN1 ノックダウンと同等の効果を過酸化水素処理された細胞の生存率にもたらす

**A** 実験の流れ図。t=2(日)で過酸化水素処理を終えた直後に B02(または陰性対照として溶媒の DMSO)を含む培地に交換した後2日間培養した。**B** 過酸化水素または B02 で処理された HeLa shSTN1 細胞の生存率。各棒グラフ上の記号は各実験での生存率を表し、棒グラフの高さは平均値を表している。誤差線は3または4回の独立した実験の標準誤差を示す。統計的有意差は Unpaired *t* tests に基づいて求めた。比較したサンプル間に *p* 値を記載した。**C** 過酸化水素処理されなかった HeLa shSTN1 細胞およびノックダウン対照細胞の t=4 における相対的細胞数。B02 処理されていないノックダウン対照細胞の細胞数を 1.0 と定める。各棒グラフ上の記号は各サンプルの相対的細胞数を表し、棒グラフの高さは平均値を表している。誤差線は3回の独立した実験の標準誤差を示す。細胞種間での相対的細胞数の差について、グラフの上部に *p* 値を記載した。統計的有意差は Unpaired *t* tests に基づいて求めた。

## 第四章 考察

## 4-1 概要

CST 複合体はテロメアを維持するためだけでなく、複製ストレス後に DNA 複製を再開させるために全ゲノム上で必要とされる。しかし、複製フォークの進行停止に伴って生じる DNA 鎖切断（フォーク構造の解消）とその修復反応にも寄与するかは不明だった。そこで、酸化ストレスに曝された細胞内で同複合体が DNA 修復反応に関与するか調べるために本研究を行った。

その結果、CST 複合体は複製中の細胞に過酸化水素処理に対する感受性をもたらすことが分かった。過酸化水素が細胞周期を問わず DNA 損傷を引き起こしたことは、フローサイトメトリー解析で検出された $\gamma$ -H2AX シグナルに反映された。しかし、細胞周期を G1/S 境界に同調させた上で過酸化水素処理を行ったところ、同複合体は特に S 期の細胞が生存するために必要であることが分かった。そのため DNA 複製との関連性に着目し、STN1 の欠失によって過酸化水素処理後の新生鎖 DNA 合成反応が妨げられることを見出した。また、過酸化水素処理された STN1 ノックダウン細胞の核では RAD51 フォーカスが形成されず、RAD51 阻害剤は過酸化水素処理後の生存率に対して STN1 ノックダウンと同等の効果をもたらした。すなわち、CST 複合体が RAD51 の DNA 結合を促すことで、新生鎖 DNA 合成反応の再開が促され細胞の生存に繋がるという可能性が得られた。また、過酸化水素処理された細胞において断片化した DNA が STN1 ノックダウンによって増した。したがって、詳細な分子機構は本研究で解明できなかったものの、CST 複合体によって過酸化水素処理後の DNA 修復反応が促されたと推察された。

これらの結果は CST 複合体が増殖性の細胞にてゲノム安定性維持に重要な役割を担っていることを示唆する。以下では、DNA 代謝における CST 複合体の潜在的な役割について考察する。

## 4-2 過酸化水素によってもたらされた表現型に CST 複合体が及ぼす影響

過酸化水素処理によって HeLa 細胞および U2OS 細胞の生存率は損なわれた。同処理後の総細胞数（生細胞数 + 死細胞の合計数）は、培地に過酸化水素を加えなかった場合の総細胞数を下回った。原因として、「1. DNA 損傷応答の活性化に伴う細胞周期の一時停止」「2. 細胞死による恒常性の破綻と細胞形態の変化（分解）」が考えられる。

「1.」は Chk1 および Chk2 が過酸化水素処理後 6 時間後もなおリン酸化されていた結果に基づく。フローサイトメトリー解析の実験 (3-2-3) にて細胞は過酸化水素を添加して 10 分後に固定されたため、過酸化水素処理が細胞周期に及ぼす影響を探るためには不十分な時間の長さだった。そのため、過酸化水素を培地に添加して 2 時間後にも細胞周期解析を行った。その結果、過酸化水素処理は HU 処理とは異なり細胞周期を特定の段階に同調させないことが分かった (3-5-1)。しかし、過酸化水素処理後の細胞に EdU

を取り込ませたところ EdU 陽性率と 1 核あたりの平均蛍光強度は共に大きく減少した (3-5-2)。すなわち、過酸化水素処理された細胞では新生鎖 DNA 合成反応が一時的に抑制されていたことが示唆された。同反応が抑制された原因の 1 つとして、チェックポイントキナーゼが CDC25 の分解を通して複製前複合体の形成を阻害した可能性がある (Willis N *et al.*, 2009)。この可能性は Chk1 および Chk2 が過酸化水素処理後もリン酸化されていたウエスタンブロットの結果 (3-2-1) とも一致している。

「2.」は未固定な HeLa 細胞に取り込まれた PI の量を比較定量したことで示唆された (3-1-3)。過酸化水素処理によって、特に PI 陽性細胞の分散が大きくなった。また、PI 陰性率に基づく生存率には反映されていないが、同処理後は FSC および SSC の閾値を下回る粒子の数と割合が増加した。これらの特徴は過酸化水素処理によってもたらされたと考えられ、細胞死の進行に伴い細胞が分解された可能性を支持した。

これらの実験結果から、過酸化水素処理後、数時間以内に細胞死が誘導され始めること推察された。実際に、過酸化水素処理を終えて 6 時間後に細胞死 (アポトーシス) が進んでいることを示唆する結果も得られた (3-3-2)。したがって、過酸化水素処理された shSTN1 細胞では二本鎖 DNA 切断が生じやすいこと (3-3-1) や、同細胞における EdU シグナル強度 (3-5) および RAD51 フォーカス数 (3-6) についての観察結果が、細胞死によってもたらされた可能性を排除できない。すなわち、DNA 断片化か細胞死のどちらが優勢でもう片方の表現型をもたらしたかという問題を解決する必要がある。この問題に関連した先行研究では、アポトーシス阻害剤を用いた実験から PARP 阻害剤で処理された BRCA1 欠損細胞における DNA 断片化は細胞死によって促進されることが見出された (Cong K *et al.*, 2021)。本研究でも同様に細胞死が DNA 断片化や新生鎖 DNA 合成、RAD51 に及ぼした影響を検討する必要がある。

過酸化水素処理によって EdU 陽性率と 1 核あたりの平均蛍光強度が減少した (3-5-1)。この結果は過酸化水素処理によって新生鎖 DNA を合成する速度が低下したか不可逆的に停止したことを示唆した。過酸化水素処理後の新生鎖 DNA 合成反応は特に STN1 ノックダウンによって著しく阻害され、同ノックダウン細胞への EdU の取り込み (新生鎖 DNA 合成反応) は過酸化水素を培地から除去して 6 時間後も行われなかった。この原因は幾つか考えられる。1 つはコメットアッセイから示唆される DNA 鎖切断で、STN1 ノックダウン細胞では過酸化水素を培地から除去して 5 時間後も二本鎖 DNA が切断されたままだったため、複製フォークを進ませることが出来なかったと考えられる。あるいは、STN1 の欠失によって RAD51 や DNA ポリメラーゼ $\alpha$ /プライマーゼ複合体がリクルートされなかったため、DNA 複製が再開しなかった可能性もある (Stewart JA *et al.*, 2012; Wang F *et al.*, 2014; Chastain M *et al.*, 2016)。CST 複合体の有無に関わらず、DNA 鎖の伸長速度は DNA 損傷を受けることで遅くなる (Elvers I *et al.*, 2011 ; Vallerga MB *et al.*, 2015)。特に、Vallerga らは異なる 2 種類のチミジンアナログを DNA 損傷 (紫外線

照射)の前後にゲノム DNA に取り込ませ、DNA ファイバーアッセイを行うことで RAD51 が DNA 複製の再開に寄与することを示した。また、紫外線による DNA 損傷を加えた場合、照射直前に S 期だった細胞以外にも EdU を取り込む (Limsirichaikul S *et al.*, 2009)。Limsirichaikul らは紫外線照射した細胞に EdU を取り込ませた後、細胞増殖マーカーの Ki-67 と共染色することで非増殖性の (DNA 複製中ではない) 細胞も EdU を取り込んだことを見出した。このような先行研究が報告されているが、上述のように本研究では過酸化水素処理された HeLa sh*STN1* 細胞で新生鎖合成反応の再開が抑制された原因と、CST 複合体が DNA 複製の再開または DNA 修復のいずれ (または両方) に寄与しているかを特定することはできなかった。その主な理由は、EdU が BrdU と同一鎖に連続的に取り込まれているかについて確証が得られなかったためである。過酸化水素処理された細胞で CST 複合体が DNA 複製の再開または DNA 修復に寄与する分子機構を明らかにするためには、先行研究と同様の実験系でさらなる検証が行われるべきである。

CST 複合体と RAD51 が関与する、酸化ストレスに曝されたゲノムの恒常性を維持するための分子機序を解明するために追加の検証が必要である。しかし、本研究で得られた一連の結果から過酸化水素処理された細胞の核内に RAD51 が集積する際には CST 複合体が必要であることが明らかになった。これらの結果と CST 複合体と RAD51 との蛋白質間相互作用に関する先行研究 (Lei KH *et al.*, 2021) に基づき、CST 複合体と RAD51 は同一経路上に存在する可能性が得られた。なお、RNA 干渉によるノックダウンでは CST 複合体のサブユニットを完全に欠失できなかった (3-3-1)。そのため、この可能性の更なる検証は各遺伝子を後天的にノックアウトした細胞で行われることが望ましい。

#### 4-3 本研究から新たに示唆された CST 複合体の機能

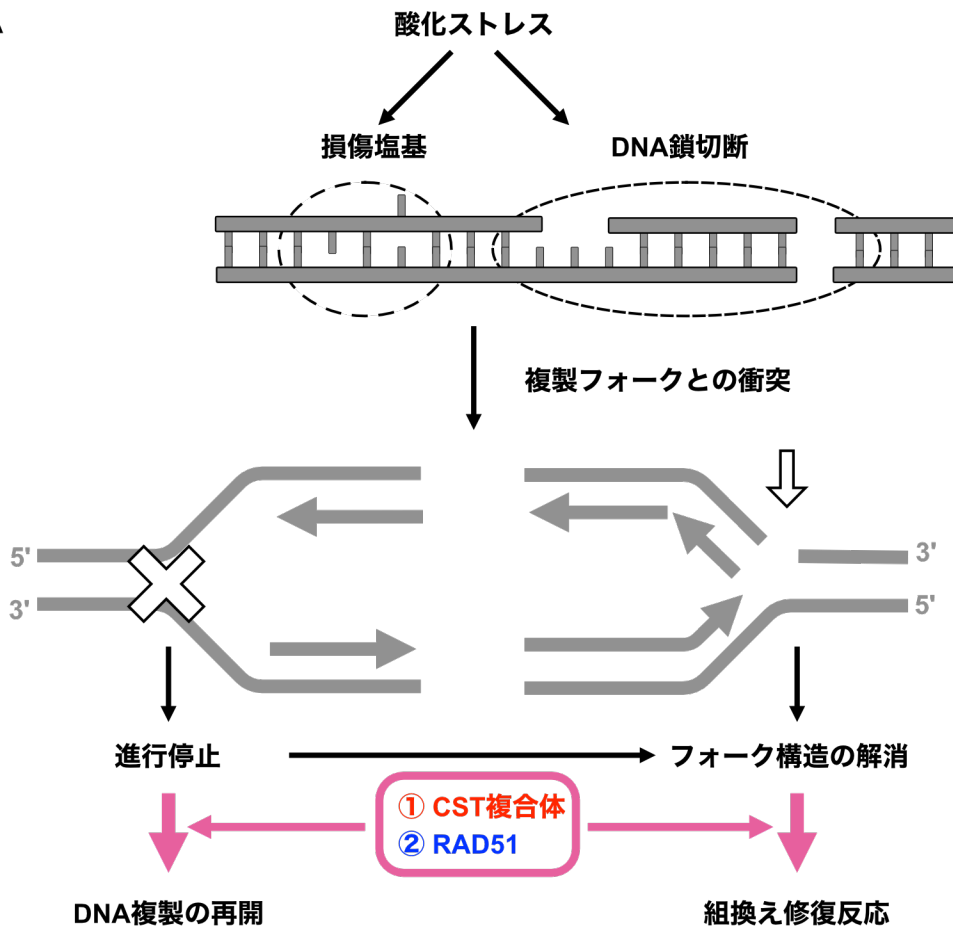
過酸化水素によって引き起こされる DNA 損傷の中に、8-オキシグアニンなどの損傷塩基が含まれる。損傷塩基も複製フォークの進行を阻害するため、先行研究 (Stewart JA *et al.*, 2012; Chastain M *et al.*, 2016; Lyu X *et al.*, 2021) と同様に過酸化水素処理後も CST 複合体によって DNA 複製の再開が促された可能性は否めない。しかし、従来までの研究と本研究との相違点は DNA 鎖切断を加える DNA 損傷源を用いた点である。実際に、HU を含む培地で 3 時間培養された細胞から一本鎖および二本鎖 DNA 鎖切断は検出されなかった (3-3-1)。一方、過酸化水素は一本鎖 DNA 鎖切断を引き起こす。一本鎖 DNA 鎖切断部位と複製フォークが衝突すると、進行停止した状態を経ずに二本鎖 DNA 切断が生じる (Regairaz M *et al.*, 2011; Vrtis KB *et al.*, 2021)。そのため、CST 複合体は二本鎖 DNA 切断部位の末端部に結合することで MRE11 のようなヌクレアーゼから一本鎖 DNA を保護しつつ、RAD51 をリクルートすることで相同組換え修復を促すというモデ

ルが新たに考えられた (図 4)。CST 複合体だけでなく BRCA2 も RAD51 の一本鎖 DNA への結合を促す (Scully R *et al.*, 2019)。しかし、過酸化水素処理された sh*STN1* 細胞の RAD51 フォーカス数はノックダウン対照細胞を下回った (3-6-1 および 3-6-3)。HeLa 細胞や U2OS 細胞中の BRCA2 が RAD51 をリクルートすると仮定した場合、フォーカスが形成されなかった原因として過酸化水素処理された sh*STN1* 細胞ではヌクレアーゼによって二本鎖 DNA 切断部位の一本鎖 DNA が分解された可能性がある。したがって、CST 複合体は RAD51 が結合するための一本鎖 DNA 領域を保護しつつ DNA 結合を促したと考えられた。

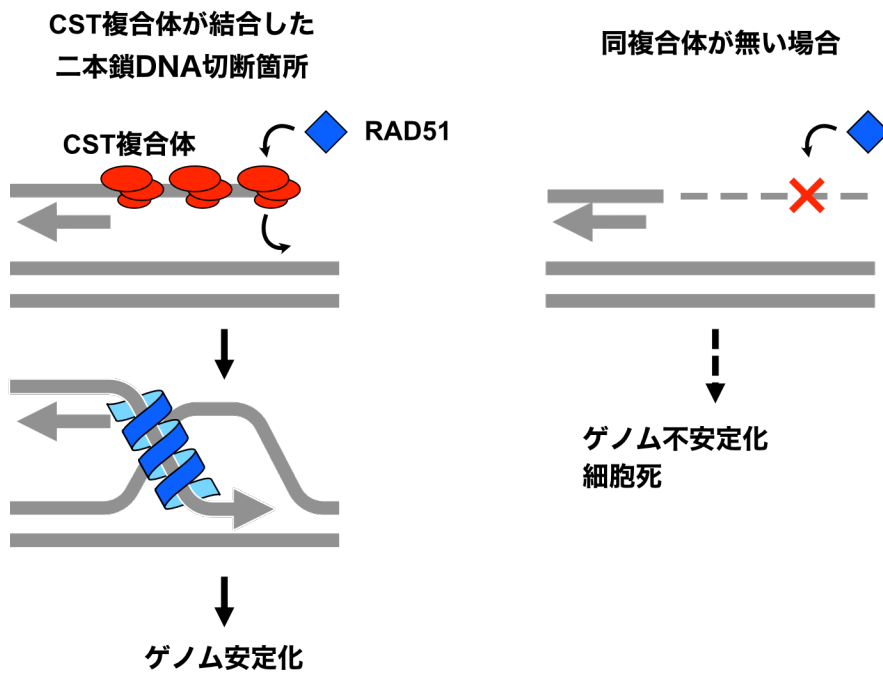
DNA 損傷をもたらす要因として、過酸化水素や HU などの DNA 損傷試薬だけでなく DNA 自体が引き起こす問題もある。例えばテロメアなどの反復配列からグアニン四重鎖と呼ばれる高次構造が自発的に形成される。これらの高次構造や転写装置との衝突によって複製フォークは停止する (Primo LMF, Teixeira LK, 2020)。しかし、過酸化水素等に曝されていない HeLa 細胞では *STN1* ノックダウンの有無に関わらず  $\gamma$ -H2AX シグナルは検出されなかった (3-2-2 損傷源なし)。このような通常条件下の細胞では *STN1* ノックダウンの影響は見られず、生存率 (3-1-3 など) やコメットアッセイ (3-3-1) も無傷な状態を示唆した。さらに RAD51 阻害剤のみを培地に加えた場合、生存率と細胞数は *STN1* ノックダウンの有無に関わらず減少した (3-7-2)。すなわち、内在的な DNA 損傷を修復する過程に CST 複合体は積極的に関与していないか、関与しているとしても損傷の程度が小さければ CST 複合体の有無は生存に影響しないことが示唆された。同複合体が特に必要とされる場合は、培地に加えられた DNA 損傷試薬によって  $\gamma$ -H2AX が形成されるほど大きな DNA 損傷が生じた時であると推察される。

なお、ゲノム領域に関わらず CST 複合体は DNA 修復に関与すると予想される。先行研究 (Chastain M *et al.*, 2016) で CST 複合体は「グアニンとシトシンに富む反復配列」に結合することが分かったが、そのような配列 (テロメア DNA や CpG アイランドなど) の単位長あたりのグアニンの含有割合は全ゲノムの平均よりも高い。そのため CST 複合体が結合する DNA 配列は酸化ストレスによる DNA 損傷を受けやすいと考えられ、過酸化水素処理後の細胞を ChIP-seq 解析に供した場合でも HU 処理と同様の傾向が得られると予想される。

A



B



#### 図 4 酸化ストレスに曝されたゲノムの安定性を維持する上で CST 複合体と RAD51 は重要な役割を果たす

**A** 過酸化水素によってもたらされた酸化ストレスは、一本鎖または二本鎖 DNA 切断、損傷塩基の形成など様々な DNA 損傷を引き起こす。このような DNA 損傷によって複製フォークの進行停止やフォーク構造の解消が起きる。その後も細胞が生存するために、CST 複合体と RAD51 が機能している可能性が得られた。**B** 本研究では特に、これまで着目されていなかった CST 複合体と複製フォークの修復機構が関連していることを示唆する結果が得られた。複製フォークの構造が解消されると、非対称な二本鎖 DNA 切断が生じる。CST 複合体は突出した一本鎖 DNA をヌクレアーゼ活性から保護すると共に同部位へ RAD51 をリクルートすると考えられる。一方、同複合体を欠いた細胞では、同部位の一本鎖 DNA が分解されたため RAD51 は結合先を失った可能性がある。CST 複合体と RAD51 が機能することで、過酸化水素処理後に DNA 複製の再開や細胞としての恒常性維持が促されていると予想される。

#### 4-4 結論

本研究では CST 複合体が DNA 修復反応に寄与する可能性を調べ、同複合体は特に複製中の細胞が過酸化水素に対して示す感受性に関与していることが新たに分かった。生体内では、種々の要因から生じた活性酸素種が絶えず DNA を攻撃している。修復不能な程度の DNA 損傷に変化する前に、ゲノムを迅速にかつ正確に修復する分子機構は重要である。本研究は、酸化ストレスに着目することで CST 複合体がゲノム安定性を維持するために果たす役割の一端を解明した。

#### 4-5 今後の展望

本研究から CST 複合体と DNA 修復との関連性が新たに示唆されたが、実験結果や先行研究から生じた下記 2 点の疑問を解消するために、今後の研究で分子機序を詳細に調べる必要がある。

まず、CST 複合体が一本鎖 DNA 鎖切断や損傷塩基を修復する塩基除去修復に直接関与するか不明である。過酸化水素処理後もミモシン処理を継続して施した場合 *STN1* ノックダウンに関わらず細胞は殆ど生存した (図 3-4-2 オレンジ色の棒グラフ)。*STN1* ノックダウンによってグリコシラーゼの発現が抑制され大腸がん細胞の活性酸素種に対する感受性が亢進した先行研究 (Nguyen DD *et al.*, 2023) と不一致だが、過酸化水素処理によって引き起こされた HeLa 細胞中の DNA 損傷は CST 複合体に依らず修復されることが示唆された。酸化ストレスに曝された DNA を修復する際に、姉妹染色分体を要する相同組換え修復は S 期または G2 期で行われる。一方、非同相末端連結や塩基除去



修復は姉妹染色分体を必要とせず二本鎖 DNA 上で完結するため G1 期でも行われる (Krokan HE, Bjørås M, 2013; Scully R *et al.*, 2019)。過酸化水素処理とミモシン処理を連続的に受けた *STN1* ノックダウン細胞も殆ど生存したという結果から、少なくとも HeLa 細胞の CST 複合体は相同組換え修復以外で必要とされていない可能性が得られた。

2点目の疑問は、二本鎖 DNA 切断を修復する際に CST 複合体が2つの相反する反応を制御している可能性である。本研究や複製ストレスとの関連性を調べた先行研究 (Chastain M *et al.*, 2016; Lyu X *et al.*, 2021) とは対照的に、CST 複合体は相同組換え修復を阻害するとも報告されている (Barazas M *et al.*, 2018; Mirman Z *et al.*, 2018)。これらの先行研究では、CST 複合体によって二本鎖 DNA 切断部位の末端部に DNA ポリメラーゼ $\alpha$ がリクルートされるモデルが提唱された。このモデルは、「1. CST 複合体と DNA ポリメラーゼ $\alpha$ /プライマーゼ複合体」と「2. CST 複合体とシールドイン複合体 (SHLD1-3 と REV7 によって構成されるヘテロ四量体)」の2つの蛋白質間相互作用に基づいている。シールドイン複合体は二本鎖 DNA 切断部位に集積する 53BP1 や RIF1 と結合するため、「1.」および「2.」を介して DNA ポリメラーゼ $\alpha$ /プライマーゼ複合体が切断部位にリクルートされる。したがって二本鎖 DNA 切断部位で DNA ポリメラーゼ $\alpha$  による 3'末端の埋め戻し反応が起きるため、一本鎖 DNA 領域 (RAD51 の結合先) が失われ相同組換え修復は抑制された。そのため、*Brcal* をノックアウトした MEF (Mouse embryonic fibroblast) 細胞の *Ctcl* または *Stn1* をノックダウンすると、RAD51 のフォーカス数が回復するなどした。また、CST 複合体を欠失させたことで二本鎖 DNA 切断部位の非相同末端連結が抑制されたため、PARP 阻害剤に対する抵抗性がもたらされた。このように CST 複合体は、二本鎖 DNA 切断部位の 3'末端に RAD51 を付加させることで相同組換え修復を促進する一方、3'末端の突出を防ぐことで非相同末端連結も促進するという二面性を併せ持つ。

これらの CST 複合体に関わる制御機構は、細胞種や遺伝的背景、あるいは細胞周期や DNA 損傷試薬に依存すると考えられる。DNA 鎖切断部位において CST 複合体と共に RPA 複合体や RAD51 などの DNA 複製・修復・組換えに関連する因子が協調して相同組換え修復を促進する分子機構はまだ完全に解明されておらず、その詳細を理解するためにはさらなる研究が必要である。

本研究成果は CST 複合体についての理解を加速させ、同複合体と DNA 複製・修復・組換え (DNA 代謝) との関連を明らかにするための基盤となることが期待される。例えば、*CTCI* または *STN1* を責任遺伝子とする Coats-plus 症候群の患者でみられる染色体異常と症状の原因解明に寄与する可能性がある。症例として報告済の *CTCI* 変異が RAD51 との相互作用を阻害する (Wang Y, Chai W, 2018) ことから、CST 複合体は DNA 代謝を通じて細胞や生体の恒常性に影響していると考えられる。また、今後の研究で CST 複合体と DNA 代謝との関連性が明白になることは、がん治療などにも還元されう

る。抗酸化物質の投与や生体内の抗酸化経路の制御などで、活性酸素種の量を調節することができる。そのため、そのような調節剤と活性酸素種を誘発する化学療法・放射線療法を併用したがん治療を確立するための治験が行われた。しかしその成果は再現性に乏しく、さらなる前臨床研究が必要とされている (Srinivas US *et al.*, 2019)。本研究によって、CST 複合体が欠失している増殖性の細胞が酸化ストレスに曝された際に、DNA代謝の異常によって活性酸素種に対する感受性が亢進されることが明らかになった。CST 複合体のサブユニットの遺伝子発現量や変異導入率ががん細胞ごとに異なることは TCGA などのデータベースから既に示唆されている。さらに臨床技術の発達によって患者から摘出された腫瘍を対象とした遺伝子解析が一般的になった際に、CST 複合体という DNA 代謝に広く関わる因子を対象とした本研究も下地となって個別化医療は一層推進するだろうと予想される。

## 参考文献

Anderson BH, Kasher PR, Mayer J, Szykiewicz M, Jenkinson EM, Bhaskar SS, Urquhart JE, Daly SB, Dickerson JE, O'Sullivan J, Leibundgut EO, Muter J, Abdel-Salem GM, Babul-Hirji R, Baxter P, Berger A, Bonafé L, Brunstom-Hernandez JE, Buckard JA, Chitayat D, Chong WK, Cordelli DM, Ferreira P, Fluss J, Forrest EH, Franzoni E, Garone C, Hammans SR, Houge G, Hughes I, Jacquemont S, Jeannet PY, Jefferson RJ, Kumar R, Kutschke G, Lundberg S, Lourenço CM, Mehta R, Naidu S, Nischal KK, Nunes L, Ounap K, Philippart M, Prabhakar P, Risen SR, Schiffmann R, Soh C, Stephenson JB, Stewart H, Stone J, Tolmie JL, van der Knaap MS, Vieira JP, Vilain CN, Wakeling EL, Wermenbol V, Whitney A, Lovell SC, Meyer S, Livingston JH, Baerlocher GM, Black GC, Rice GI, Crow YJ. Mutations in CTC1, encoding conserved telomere maintenance component 1, cause Coats plus. *Nat Genet.* 2012 Jan 22;44(3):338-42. <https://doi.org/10.1038/ng.1084> PMID: 22267198.

Barazas M, Annunziato S, Pettitt SJ, de Krijger I, Ghezraoui H, Roobol SJ, Lutz C, Frankum J, Song FF, Brough R, Evers B, Gogola E, Bhin J, van de Ven M, van Gent DC, Jacobs JLL, Chapman R, Lord CJ, Jonkers J, Rottenberg S. The CST Complex Mediates End Protection at Double-Strand Breaks and Promotes PARP Inhibitor Sensitivity in BRCA1-Deficient Cells. *Cell Rep.* 2018 May 15;23(7):2107-2118. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.046> PMID: 29768208.

Berniak K, Rybak P, Bernas T, Zarębski M, Biela E, Zhao H, Darzynkiewicz Z, Dobrucki JW. Relationship between DNA damage response, initiated by camptothecin or oxidative stress, and DNA replication, analyzed by quantitative 3D image analysis. *Cytometry A.* 2013 Oct;83(10):913-24. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22327> PMID: 23846844.

Bhat KP, Cortez D. RPA and RAD51: fork reversal, fork protection, and genome stability. *Nat Struct Mol Biol.* 2018 Jun;25(6):446-453. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0075-z> PMID: 29807999.

Bhattacharjee A, Stewart J, Chaiken M, Price CM. STN1 OB Fold Mutation Alters DNA Binding and Affects Selective Aspects of CST Function. *PLoS Genet.* 2016 Sep 30;12(9):e1006342. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006342> PMID: 27690379.

Blackford AN, Jackson SP. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol Cell.* 2017 Jun 15;66(6):801-817.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.015> PMID: 28622525.

Bonilla B, Hengel SR, Grundy MK, Bernstein KA. RAD51 Gene Family Structure and Function. *Annu Rev Genet.* 2020 Nov 23;54:25-46. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-021920-092410> PMID: 32663049.

Cai SW, Zinder JC, Svetlov V, Bush MW, Nudler E, Walz T, de Lange T. Cryo-EM structure of the human CST-Pol $\alpha$ /primase complex in a recruitment state. *Nat Struct Mol Biol.* 2022 Aug;29(8):813-819. <https://doi.org/10.1038/s41594-022-00766-y> PMID: 35578024.

Casteel DE, Zhuang S, Zeng Y, Perrino FW, Boss GR, Goulian M, Pilz RB. A DNA polymerase- $\alpha$  • primase cofactor with homology to replication protein A-32 regulates DNA replication in mammalian cells. *J Biol Chem.* 2009 Feb 27;284(9):5807-18. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807593200> PMID: 19119139.

Chastain M, Zhou Q, Shiva O, Fadri-Moskwik M, Whitmore L, Jia P, Dai X, Huang C, Ye P, Chai W. Human CST Facilitates Genome-wide RAD51 Recruitment to GC-Rich Repetitive Sequences in Response to Replication Stress. *Cell Rep.* 2016 Aug 2;16(5):1300-1314. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.077> Erratum in: *Cell Rep.* 2016 Aug 16;16(7):2048. PMID: 27487043.

Chen LY, Redon S, Lingner J. The human CST complex is a terminator of telomerase activity. *Nature.* 2012 Aug 23;488(7412):540-4. <https://doi.org/10.1038/nature11269> PMID: 22763445.

Chen Q, Bian C, Wang X, Liu X, Ahmad Kassab M, Yu Y, Yu X. ADP-ribosylation of histone variant H2AX promotes base excision repair. *EMBO J.* 2021 Jan 15;40(2):e104542. <https://doi.org/10.15252/embj.2020104542> PMID: 33264433.

Cong K, Peng M, Kousholt AN, Lee WTC, Lee S, Nayak S, Kraus J, VanderVere-Carozza PS, Pawelczak KS, Calvo J, Panzarino NJ, Turchi JJ, Johnson N, Jonkers J, Rothenberg E, Cantor SB. Replication gaps are a key determinant of PARP inhibitor synthetic lethality with BRCA deficiency. *Mol Cell.* 2021 Aug 5;81(15):3128-3144.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.06.011> Erratum in: *Mol Cell.* 2021 Aug 5;81(15):3227. PMID: 34216544.

de Feraudy S, Limoli CL, Giedzinski E, Karentz D, Marti TM, Feeney L, Cleaver JE. Pol eta is

required for DNA replication during nucleotide deprivation by hydroxyurea. *Oncogene*. 2007 Aug 23;26(39):5713-21. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210385> PMID: 17369853.

de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*. 2005 Sep 15;19(18):2100-10. <https://doi.org/10.1101/gad.1346005> PMID: 16166375.

Doksani Y, de Lange T. The role of double-strand break repair pathways at functional and dysfunctional telomeres. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Sep 16;6(12):a016576. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016576> PMID: 25228584.

Driessens N, Versteijhe S, Ghaddhab C, Burniat A, De Deken X, Van Sande J, Dumont JE, Miot F, Corvilain B. Hydrogen peroxide induces DNA single- and double-strand breaks in thyroid cells and is therefore a potential mutagen for this organ. *Endocr Relat Cancer*. 2009 Sep;16(3):845-56. <https://doi.org/10.1677/ERC-09-0020> PMID: 19509065.

Elvers I, Johansson F, Groth P, Erixon K, Helleday T. UV stalled replication forks restart by re-priming in human fibroblasts. *Nucleic Acids Res*. 2011 Sep 1;39(16):7049-57. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr420>. PMID: 21646340.

Feng X, Hsu SJ, Bhattacharjee A, Wang Y, Diao J, Price CM. CTC1-STN1 terminates telomerase while STN1-TEN1 enables C-strand synthesis during telomere replication in colon cancer cells. *Nat Commun*. 2018 Jul 19;9(1):2827. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05154-z> PMID: 30026550.

Gaillard H, García-Muse T, Aguilera A. Replication stress and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015 May;15(5):276-89. <https://doi.org/10.1038/nrc3916> PMID: 25907220.

Ganduri S, Lue NF. STN1-POLA2 interaction provides a basis for primase-pol  $\alpha$  stimulation by human STN1. *Nucleic Acids Res*. 2017 Sep 19;45(16):9455-9466. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx621> PMID: 28934486.

Garvik B, Carson M, Hartwell L. Single-stranded DNA arising at telomeres in *cdc13* mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. *Mol Cell Biol*. 1995 Nov;15(11):6128-38. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.11.6128> Erratum in: *Mol Cell Biol* 1996 Jan;16(1):457. PMID: 7565765.

Goulian M, Heard CJ. The mechanism of action of an accessory protein for DNA polymerase alpha/primase. *J Biol Chem*. 1990 Aug 5;265(22):13231-9. Erratum in: *J Biol Chem* 1990 Nov 5;265(31):19369. PMID: 2376593.

Goulian M, Heard CJ, Grimm SL. Purification and properties of an accessory protein for DNA polymerase alpha/primase. *J Biol Chem*. 1990 Aug 5;265(22):13221-30. PMID: 2165497.

Grandin N, Damon C, Charbonneau M. Ten1 functions in telomere end protection and length regulation in association with Stn1 and Cdc13. *EMBO J*. 2001 Mar 1;20(5):1173-83. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.5.1173> PMID: 11230140.

Grandin N, Reed SI, Charbonneau M. Stn1, a new *Saccharomyces cerevisiae* protein, is implicated in telomere size regulation in association with Cdc13. *Genes Dev*. 1997 Feb 15;11(4):512-27. <https://doi.org/10.1101/gad.11.4.512> PMID: 9042864.

Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*. 1999 May 14;97(4):503-14. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80760-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80760-6) PMID: 10338214.

Groth P, Ausländer S, Majumder MM, Schultz N, Johansson F, Petermann E, Helleday T. Methylated DNA causes a physical block to replication forks independently of damage signalling, O(6)-methylguanine or DNA single-strand breaks and results in DNA damage. *J Mol Biol*. 2010 Sep 10;402(1):70-82. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.07.010> PMID: 20643142.

Gu P, Chang S. Functional characterization of human CTC1 mutations reveals novel mechanisms responsible for the pathogenesis of the telomere disease Coats plus. *Aging Cell*. 2013 Dec;12(6):1100-9. <https://doi.org/10.1111/acel.12139>. Epub 2013 Sep 4. PMID: 23869908.

Gyori BM, Venkatachalam G, Thiagarajan PS, Hsu D, Clement MV. OpenComet: an automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biol*. 2014 Jan 9;2:457-65. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.020> Erratum in: *Redox Biol*. 2021 Apr;40:101876. PMID: 24624335.

Hanada K, Budzowska M, Davies SL, van Drunen E, Onizawa H, Beverloo HB, Maas A, Essers J, Hickson ID, Kanaar R. The structure-specific endonuclease Mus81 contributes to replication

restart by generating double-strand DNA breaks. *Nat Struct Mol Biol.* 2007 Nov;14(11):1096-104. <https://doi.org/10.1038/nsmb1313> PMID: 17934473.

He Q, Lin X, Chavez BL, Agrawal S, Lusk BL, Lim CJ. Structures of the human CST-Pol $\alpha$ -primase complex bound to telomere templates. *Nature.* 2022 Aug;608(7924):826-832. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05040-1> PMID: 35830881.

Hom RA, Wuttke DS. Human CST Prefers G-Rich but Not Necessarily Telomeric Sequences. *Biochemistry.* 2017 Aug 15;56(32):4210-4218. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00584> PMID: 28726394.

Hsiang YH, Lihou MG, Liu LF. Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Res.* 1989 Sep 15;49(18):5077-82. PMID: 2548710.

Huang C, Dai X, Chai W. Human Stn1 protects telomere integrity by promoting efficient lagging-strand synthesis at telomeres and mediating C-strand fill-in. *Cell Res.* 2012 Dec;22(12):1681-95. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.132> PMID: 22964711.

Huang F, Mazina OM, Zentner IJ, Cocklin S, Mazin AV. Inhibition of homologous recombination in human cells by targeting RAD51 recombinase. *J Med Chem.* 2012 Apr 12;55(7):3011-20. <https://doi.org/10.1021/jm201173g> PMID: 22380680.

Huang F, Motlekar NA, Burgwin CM, Napper AD, Diamond SL, Mazin AV. Identification of specific inhibitors of human RAD51 recombinase using high-throughput screening. *ACS Chem Biol.* 2011 Jun 17;6(6):628-35. <https://doi.org/10.1021/cb100428c> PMID: 21428443.

Inano S, Sato K, Katsuki Y, Kobayashi W, Tanaka H, Nakajima K, Nakada S, Miyoshi H, Knies K, Takaori-Kondo A, Schindler D, Ishiai M, Kurumizaka H, Takata M. RFD3-Mediated Ubiquitination Promotes Timely Removal of Both RPA and RAD51 from DNA Damage Sites to Facilitate Homologous Recombination. *Mol Cell.* 2020 Apr 2;78(1):192. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.03.026> Erratum for: *Mol Cell.* 2017 Jun 1;66(5):622-634.e8. PMID: 32243829.

Karnani N, Dutta A. The effect of the intra-S-phase checkpoint on origins of replication in human cells. *Genes Dev.* 2011 Mar 15;25(6):621-33. <https://doi.org/10.1101/gad.2029711>

PMID: 21406556.

Kasbek C, Wang F, Price CM. Human TEN1 maintains telomere integrity and functions in genome-wide replication restart. *J Biol Chem*. 2013 Oct 18;288(42):30139-30150. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.493478> PMID: 24025336.

Katsube T, Mori M, Tsuji H, Shiomi T, Wang B, Liu Q, Neno M, Onoda M. Most hydrogen peroxide-induced histone H2AX phosphorylation is mediated by ATR and is not dependent on DNA double-strand breaks. *J Biochem*. 2014 Aug;156(2):85-95. <https://doi.org/10.1093/jb/mvu021> PMID: 24682951.

Kopp B, Khoury L, Audebert M. Validation of the  $\gamma$ H2AX biomarker for genotoxicity assessment: a review. *Arch Toxicol*. 2019 Aug;93(8):2103-2114. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02511-9> PMID: 31289893.

Krokan HE, Bjørås M. Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Apr 1;5(4):a012583. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012583> PMID: 23545420.

Kurose A, Tanaka T, Huang X, Traganos F, Dai W, Darzynkiewicz Z. Effects of hydroxyurea and aphidicolin on phosphorylation of ataxia telangiectasia mutated on Ser 1981 and histone H2AX on Ser 139 in relation to cell cycle phase and induction of apoptosis. *Cytometry A*. 2006 Apr;69(4):212-21. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20241> PMID: 16528719.

Lei KH, Yang HL, Chang HY, Yeh HY, Nguyen DD, Lee TY, Lyu X, Chastain M, Chai W, Li HW, Chi P. Crosstalk between CST and RPA regulates RAD51 activity during replication stress. *Nat Commun*. 2021 Nov 5;12(1):6412. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26624-x> PMID: 34741010.

Lim CJ, Barbour AT, Zaug AJ, Goodrich KJ, McKay AE, Wuttke DS, Cech TR. The structure of human CST reveals a decameric assembly bound to telomeric DNA. *Science*. 2020 Jun 5;368(6495):1081-1085. <https://doi.org/10.1126/science.aaz9649> PMID: 32499435.

Lim CJ, Cech TR. Shaping human telomeres: from shelterin and CST complexes to telomeric chromatin organization. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021 Apr;22(4):283-298. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00328-y> Erratum in: *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021 Feb 19;: PMID: 33564154.



Limsirichaikul S, Niimi A, Fawcett H, Lehmann A, Yamashita S, Ogi T. A rapid non-radioactive technique for measurement of repair synthesis in primary human fibroblasts by incorporation of ethynyl deoxyuridine (EdU). *Nucleic Acids Res.* 2009 Mar;37(4):e31. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp023> PMID: 19179371.

Lowndes NF, Toh GW. DNA repair: the importance of phosphorylating histone H2AX. *Curr Biol.* 2005 Feb 8;15(3):R99-R102. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.029> PMID: 15694301.

Lue NF, Chan J, Wright WE, Hurwitz J. The CDC13-STN1-TEN1 complex stimulates Pol  $\alpha$  activity by promoting RNA priming and primase-to-polymerase switch. *Nat Commun.* 2014 Dec 12;5:5762. <https://doi.org/10.1038/ncomms6762> PMID: 25503194.

Lue NF, Zhou R, Chico L, Mao N, Steinberg-Neifach O, Ha T. The telomere capping complex CST has an unusual stoichiometry, makes multipartite interaction with G-Tails, and unfolds higher-order G-tail structures. *PLoS Genet.* 2013;9(1):e1003145. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003145> PMID: 23300477

Lyu X, Lei KH, Biak Sang P, Shiva O, Chastain M, Chi P, Chai W. Human CST complex protects stalled replication forks by directly blocking MRE11 degradation of nascent-strand DNA. *EMBO J.* 2021 Jan 15;40(2):e103654. <https://doi.org/10.15252/embj.2019103654> PMID: 33210317.

Mirman Z, Sasi NK, King A, Chapman JR, de Lange T. 53BP1-shieldin-dependent DSB processing in BRCA1-deficient cells requires CST-Pol $\alpha$ -primase fill-in synthesis. *Nat Cell Biol.* 2022 Jan;24(1):51-61. <https://doi.org/10.1038/s41556-021-00812-9> PMID: 35027730.

Miyake Y, Nakamura M, Nabetani A, Shimamura S, Tamura M, Yonehara S, Saito M, Ishikawa F. RPA-like mammalian Ctc1-Stn1-Ten1 complex binds to single-stranded DNA and protects telomeres independently of the Pot1 pathway. *Mol Cell.* 2009 Oct 23;36(2):193-206. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.08.009> PMID: 19854130.

Murzin AG. OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. *EMBO J.* 1993 Mar;12(3):861-7. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05726.x> PMID: 8458342.

Nakaoka H, Nishiyama A, Saito M, Ishikawa F. *Xenopus laevis* Ctc1-Stn1-Ten1 (x CST) protein complex is involved in priming DNA synthesis on single-stranded DNA template in *Xenopus* egg extract. *J Biol Chem*. 2012 Jan 2;287(1):619-627. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.263723> PMID: 22086929.

Nguyen BC, Tawata S. The Chemistry and Biological Activities of Mimosine: A Review. *Phytother Res*. 2016 Aug;30(8):1230-42. <https://doi.org/10.1002/ptr.5636> PMID: 27213712.

Nguyen DD, Kim E, Le NT, Ding X, Jaiswal RK, Kostlan RJ, Nguyen TNT, Shiva O, Le MT, Chai W. Deficiency in mammalian STN1 promotes colon cancer development via inhibiting DNA repair. *Sci Adv*. 2023 May 10;9(19):eadd8023. <https://doi.org/10.1126/sciadv.add8023> PMID: 37163605.

Novo E, Parola M. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2008 Oct 13;1(1):5. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-1-5> PMID: 19014652.

Olovnikov AM. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol*. 1973 Sep 14;41(1):181-90. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(73\)90198-7](https://doi.org/10.1016/0022-5193(73)90198-7) PMID: 4754905.

Petermann E, Orta ML, Issaeva N, Schultz N, Helleday T. Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. *Mol Cell*. 2010 Feb 26;37(4):492-502. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.021> PMID: 20188668.

Poetsch AR. The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis. *Comput Struct Biotechnol J*. 2020 Jan 7;18:207-219. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.12.013> PMID: 31993111.

Primo LMF, Teixeira LK. DNA replication stress: oncogenes in the spotlight. *Genet Mol Biol*. 2019 Dec 13;43(1 suppl 1):e20190138. <https://doi.org/10.1590/1678-4685GMB-2019-0138> PMID: 31930281.

Regairaz M, Zhang YW, Fu H, Agama KK, Tata N, Agrawal S, Aladjem MI, Pommier Y.

Mus81-mediated DNA cleavage resolves replication forks stalled by topoisomerase I-DNA complexes. *J Cell Biol.* 2011 Nov 28;195(5):739-49. <https://doi.org/10.1083/jcb.201104003> PMID: 22123861.

Renkawitz J, Lademann CA, Jentsch S. Mechanisms and principles of homology search during recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Jun;15(6):369-83. <https://doi.org/10.1038/nrm3805> PMID: 24824069.

Sakaguchi K, Ishibashi T, Uchiyama Y, Iwabata K. The multi-replication protein A (RPA) system--a new perspective. *FEBS J.* 2009 Feb;276(4):943-63. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06841.x>. PMID: 19154342.

Sarek G, Vannier JB, Panier S, Petrini JHJ, Boulton SJ. TRF2 recruits RTEL1 to telomeres in S phase to promote t-loop unwinding. *Mol Cell.* 2015 Feb 19;57(4):622-635. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.12.024> Erratum in: *Mol Cell.* 2016 Mar 3;61(5):788-9. Erratum in: *Mol Cell.* 2016 Mar 3;61(5):788-789. PMID: 25620558.

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012 Jun 28;9(7):676-82. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>. PMID: 22743772.

Scully R, Panday A, Elango R, Willis NA. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 Nov;20(11):698-714. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0152-0> PMID: 31263220.

Simon AJ, Lev A, Zhang Y, Weiss B, Rylova A, Eyal E, Kol N, Barel O, Cesarkas K, Soudack M, Greenberg-Kushnir N, Rhodes M, Wiest DL, Schiby G, Barshack I, Katz S, Pras E, Poran H, Reznik-Wolf H, Ribakovsky E, Simon C, Hazou W, Sidi Y, Lahad A, Katzir H, Sagie S, Aqeilan HA, Glousker G, Amariglio N, Tzfati Y, Selig S, Rechavi G, Somech R. Mutations in STN1 cause Coats plus syndrome and are associated with genomic and telomere defects. *J Exp Med.* 2016 Jul 25;213(8):1429-40. <https://doi.org/10.1084/jem.20151618> PMID: 27432940.

Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol.* 2019 Jul;25:101084. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101084> PMID: 30612957.

Stewart JA, Wang F, Chaiken MF, Kasbek C, Chastain PD 2nd, Wright WE, Price CM. Human CST promotes telomere duplex replication and general replication restart after fork stalling. *EMBO J.* 2012 Aug 29;31(17):3537-49. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.215> PMID: 22863775.

Surovtseva YV, Churikov D, Boltz KA, Song X, Lamb JC, Warrington R, Leehy K, Heacock M, Price CM, Shippen DE. Conserved telomere maintenance component 1 interacts with STN1 and maintains chromosome ends in higher eukaryotes. *Mol Cell.* 2009 Oct 23;36(2):207-18. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.017> PMID: 19854131.

Tanaka T, Halicka D, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Cytometric analysis of DNA damage: phosphorylation of histone H2AX as a marker of DNA double-strand breaks (DSBs). *Methods Mol Biol.* 2009;523:161-8. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-190-1\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-190-1_11) PMID: 19381940.

Vallerga MB, Mansilla SF, Federico MB, Bertolin AP, Gottifredi V. Rad51 recombinase prevents Mre11 nuclease-dependent degradation and excessive PrimPol-mediated elongation of nascent DNA after UV irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Dec 1;112(48):E6624-33. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508543112> PMID: 26627254.

Vaurs M, Naiman K, Bouabboune C, Rai S, Ptasińska K, Rives M, Matmati S, Carr AM, Géli V, Coulon S. Stn1-Ten1 and Taz1 independently promote replication of subtelomeric fragile sequences in fission yeast. *Cell Rep.* 2023 May 25;42(6):112537. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112537> PMID: 37243596.

Vrtis KB, Dewar JM, Chistol G, Wu RA, Graham TGW, Walter JC. Single-strand DNA breaks cause replisome disassembly. *Mol Cell.* 2021 Mar 18;81(6):1309-1318.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.12.039> PMID: 33484638.

Wang F, Stewart JA, Kasbek C, Zhao Y, Wright WE, Price CM. Human CST has independent functions during telomere duplex replication and C-strand fill-in. *Cell Rep.* 2012 Nov 29;2(5):1096-103. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.10.007> PMID: 23142664.

Wang F, Stewart J, Price CM. Human CST abundance determines recovery from diverse forms of DNA damage and replication stress. *Cell Cycle.* 2014;13(22):3488-98. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.964100> PMID: 25483097.

- Wang Y, Chai W. Pathogenic CTC1 mutations cause global genome instabilities under replication stress. *Nucleic Acids Res.* 2018 May 4;46(8):3981-3992. <https://doi.org/10.1093/nar/gky114> PMID: 29481669.
- Ward IM, Chen J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem.* 2001 Dec 21;276(51):47759-62. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100569200> PMID: 11673449.
- Wassing IE, Esashi F. RAD51: Beyond the break. *Semin Cell Dev Biol.* 2021 May;113:38-46. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.08.010> PMID: 32938550.
- Watson JD. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol.* 1972 Oct 18;239(94):197-201. <https://doi.org/10.1038/newbio239197a0> PMID: 4507727.
- Willis N, Rhind N. Regulation of DNA replication by the S-phase DNA damage checkpoint. *Cell Div.* 2009 Jul 3;4:13. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-4-13> PMID: 19575778.
- Wu P, Takai H, de Lange T. Telomeric 3' overhangs derive from resection by Exo1 and Apollo and fill-in by POT1b-associated CST. *Cell.* 2012 Jul 6;150(1):39-52. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.026> PMID: 22748632.
- Wyatt MD, Pittman DL. Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. *Chem Res Toxicol.* 2006 Dec;19(12):1580-94. <https://doi.org/10.1021/tx060164e> PMID: 17173371.
- Yamamoto I, Nakaoka H, Takikawa M, Tashiro S, Kanoh J, Miyoshi T, Ishikawa F. Fission yeast Stn1 maintains stability of repetitive DNA at subtelomere and ribosomal DNA regions. *Nucleic Acids Res.* 2021 Oct 11;49(18):10465-10476. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab767> PMID: 34520548.
- Zaug AJ, Goodrich KJ, Song JJ, Sullivan AE, Cech TR. Reconstitution of a telomeric replicon organized by CST. *Nature.* 2022 Aug;608(7924):819-825. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04930-8> PMID: 35831508.
- Zhang K, Zheng DQ, Sui Y, Qi L, Petes TD. Genome-wide analysis of genomic alterations

induced by oxidative DNA damage in yeast. *Nucleic Acids Res.* 2019 Apr 23;47(7):3521-3535.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz027> PMID: 30668788.

Zhou Q, Chai W. Suppression of STN1 enhances the cytotoxicity of chemotherapeutic agents in cancer cells by elevating DNA damage. *Oncol Lett.* 2016 Aug;12(2):800-808.  
<https://doi.org/10.3892/ol.2016.4676> PMID: 27446354.

## 謝辞

本研究を行うという大変貴重な機会を与えて下さり、大学院入院前より常に幅広い見識から終始懇切なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました、指導教員の石川冬木名誉教授に深く感謝し、厚く御礼申し上げます。学位申請に際して主査となっていた上村匡教授に心より感謝致します。実験の計画段階から学術論文公表に至るまでの研究全般に渡り懇切丁寧な御指導を賜りました、中岡秀憲助教と理化学研究所の三好知一郎チームリーダーに深く感謝致します。実験を行った際に、必要な実験プロトコルや機器類・ソフトウェアをご提供いただいた高原和彦准教授と高田穰特任教授に厚く御礼申し上げます。学術論文を投稿した際に、的確な英文校正と学術的なアドバイスを下さった James Alan Hejna 特命教授に深く感謝致します。研究内容や進路に関する御助言を数多く与えて下さり、研究者としての道筋をお示しいただいた京都府立大学の森川耿右博士に心より感謝致します。

本研究の起点となった実験データをもたらして下さった嶋祐輔氏に深く感謝の意を表します。研究室離籍後も折に触れてお気遣いを下さり御助言いただいた林眞理客員准教授と東京理科大学の定家真人准教授に心より感謝致します。共通試薬の作製等で研究を支えて下さった技術専門職員の渡邊祐三氏、研究室における事務処理を一手に引き受けて下さると共に励ましやお気遣いの言葉を常に掛けて下さった、秘書の白淵愛依子氏、木村恵子氏、林奈緒美氏、津田貴子氏、平田陽子氏、ならびに阪本真弓氏に深く感謝の意を表します。

充実した研究生生活を思う存分に行い、人間性・社会性・研究面で大きく成長した7年間を共に過ごした石川研究室の皆様に深く感謝致します。

最後に、最大の理解者として研究生生活を物心両面から応援して下さいました家族に深く感謝し、厚く御礼申し上げます。謝辞にかえさせていただきます。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Hara T, Nakaoka H, Miyoshi T, Ishikawa F. The CST complex facilitates cell survival under oxidative genotoxic stress. PLoS One. 2023 Aug 17;18(8):e0289304.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0289304> PMID: 37590191.