

---

染色体傷害応答によるテロメア  
維持機構に関する研究

---

16570145

平成十六年度～平成十七年度科学研究費補助金  
(基盤研究 (C)) 研究成果報告書



平成十八年五月

研究代表者 鍋谷 彰

京都大学大学院生命科学研究科助手

科研

2005

297

附図

---

# 染色体傷害応答によるテロメア 維持機構に関する研究

---

16570145

平成十六年度～平成十七年度科学研究費補助金

(基盤研究 (C)) 研究成果報告書

研究代表者：鍋谷 彰 (京都大学大学院生命科学研究科)  
研究分担者：田川 泰木 (京都大学大学院生命科学研究科)

交付決定額 (配分額)

年度	研究代表者	研究分担者
平成十六年度	1,700,000	1,400,000
平成十七年度	1,400,000	1,400,000
合計	3,100,000	2,800,000

平成十八年五月

研究科名

(1) 学会誌

著者名：Nishizawa, A., Yamaguchi, O. and Ishikawa, E.

表題：Localization of 53BP1 and its role in telomerase-sensitive DNA replication break-induced telomerase recruitment to human telomeres

雑誌名

研究代表者 鍋谷 彰

京都大学大学院生命科学研究科助手

生物の遺伝情報はDNAがその分子的な実体であり、細胞中では染色体と呼ばれる構造に含まれている。細胞増殖を通して遺伝情報が安定に受け継がれるには、染色体が正しく複製され、不要な再編成などを受けず、娘細胞に均等に分配されることが重要である。真核細胞の染色体は線状であるため、その末端構造であるテロメアが染色体の安定性に必須の機能を持っている。その機能の一つは、テロメアがDNA損傷によって生じたDNA末端と区別され、再結合や組換え反応の基質とならないように保護を受けることである。もう一つは、いわゆる末端複製問題に拮抗してテロメア配列を伸長し維持することである。無限増殖を行うほとんどの細胞では、テロメアDNAのG鎖を伸長合成するテロメラーゼが機能している。ところが一部のヒトガン細胞は、テロメラーゼを発現せずにテロメアを維持し、無限増殖能を獲得している。このようなテロメア維持機構はALT (alternative lengthening of telomeres) と呼ばれており、それにはテロメアDNA間の組換えが機能を果たしていることが示唆されている。テロメアでの再編成の阻害などの末端保護と、組換えに依存したテロメア長の維持という、一見矛盾する現象がどのように制御されているかは興味深い。この観点からALT細胞のテロメアにおける染色体傷害応答機構に注目して研究を行い、テロメアの維持機構に関する成果を得た。

## 研究組織

研究代表者：鍋谷 彰 (京都大学大学院生命科学研究科助手)

研究分担者：石川 冬木 (京都大学大学院生命科学研究科教授)

## 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成十六年度	1,700,000	0	1,700,000
平成十七年度	1,400,000	0	1,400,000
総計	3,100,000	0	3,100,000

## 研究発表

### (1) 学会誌

著者名：Nabetani, A., Yokoyama, O. and Ishikawa, F.

表題：Localization of hRad9, hHus1, hRad1, and hRad17 and caffeine-sensitive DNA replication at alternative lengthening of telomeres-associated promyelocytic leukemia body

雑誌名：J. Biol. Chem.

巻(号)頁(発行年)：279(24): 25849-25857. (2004)

著者名 : Nakamura, M., Nabetani, A., Mizuno, T., Hanaoka, F. and Ishikawa, F.  
表題 : Alterations of DNA and chromatin structures at telomeres and genetic instability in mouse cells defective in DNA polymerase  $\alpha$   
雑誌名 : Mol. Cell. Biol.  
巻 (号) 頁 (発行年) : 25(24): 11073-11088. (2005)

(2) 口頭発表

発表者 : Nabetani, A., Yokoyama, O. and Ishikawa, F.  
表題 : Localization of damage checkpoint proteins and caffeine-sensitive DNA synthesis at ALT-associated PML nuclear bodies  
会議名 (場所) (開催年) : The 5th UK-Japan Cell Cycle Workshop (Nara, Japan) (2004)

発表者 : 鍋谷彰、石川冬木  
表題 : ALT 細胞におけるテロメア DNA の構造的特徴  
会議名 (場所) (開催年) : 第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸) (2004)

発表者 : Nabetani, A. and Ishikawa, F.  
表題 : Structure of telomeric DNA and localization of damage response proteins in ALT cells.  
会議名 (場所) (開催年) : Keystone Symposia 'Genome Instability and Repair'(Taos, New Mexico, USA) (2005)

発表者 : 鍋谷彰、石川冬木  
表題 : ALT 細胞テロメアの構造と損傷応答によるテロメア維持  
第 27 回日本分子生物学会年会 (福岡) (2005)

発表者 : Nabetani, A. and Ishikawa, F.  
表題 : Structure of telomeric DNA and localization of damage response proteins in telomerase-independent human immortalized cell lines  
会議名 (場所) (開催年) : Kyoto University COE Closing Symposium "Maintenance and Inheritance of Diverse Life by Chromosome Dynamics"(Kyoto, Japan) (2006)

## 研究成果

### 背景

ヒトのガン細胞には、テロメラーゼ活性を持たないにも関わらずテロメアを維持し、無限増殖能を獲得しているものがある。このようなテロメア維持機構は ALT (alternative lengthening of telomeres) と呼ばれている。従来の研究結果から、ALT 機構は遺伝的組換えによると考えられている。例えば ALT 細胞では、一部のテロメア DNA が APB (ALT-associated PML body) と呼ばれる特殊な核内ポディー構造体に含まれている。テロメラーゼ陽性細胞 (非 ALT 細胞) では観察されないこの APB には、Rad51、52 や Mre11/Rad50/NBS1 複合体などの DNA 組換えタンパク質が含まれている。染色体安定性のためには、テロメアでの DNA 再編成が抑制されることが重要であるため、ALT 細胞のテロメアでは組換え機構が適切に機能するように制御されて、その維持機構に関与しているはずである。

体細胞分裂周期において染色体上で組換えが誘発されるのは、主に染色体 DNA 上の傷害が修復される時である。その傷害は放射線や薬剤など細胞外からの影響や、染色体 DNA の複製が一時的に停止した時などの細胞自体の生理的条件下でも生じる。このような傷害部位を認識し、細胞周期の停止や組換え修復タンパク質の活性化などの細胞応答を誘発する機構として、DNA 損傷チェックポイント機構が知られている。特にこの損傷チェックポイント機構の上流、すなわち傷害部位の認識にはチェックポイント Rad タンパク質群が関与していることが知られている。このタンパク質群には、傷害部位の DNA に結合する分子クランプ (留め金) である Rad9-Rad1-Hus1 複合体と、その loader である RFC 様複合体を構成する Rad17 がある。これらが傷害部位に結合し、またチェックポイントのセンサーキナーゼである ATM および ATR が活性化することが、傷害の修復に重要な機能を担っている。本研究では主にこれらのチェックポイント Rad タンパク質に注目し、ALT 細胞のテロメアにおける局在と役割について解析した。

### ALT 細胞における損傷応答タンパク質の局在

テロメアにおける損傷チェックポイントタンパク質の機能を知るために、ALT 細胞とテロメラーゼ陽性細胞中での細胞内局在を解析した。Rad9 タンパク質と PML を間接蛍光抗体法で、テロメア DNA を FISH 法で同時に染色し観察を行った。5 種類の ALT と 3 種類のテロメラーゼ陽性細胞を観察した結果、ALT 細胞で Rad9 は核内フォーカス状構造に存在し、テロメア DNA および PML と共局在していることが明らかになった。(図 1) 対してテロメラーゼ陽性細胞では、このような共局在はほとんど観察されなかった。以上の結果は、Rad9 タンパク質は APB の構成成分であることを示している。Rad9 フォーカスおよび APB を持つ ALT 細胞の割



合は、中間期の細胞の 10 から 35%であるが、(表 1) これは従来の結果に良く一致している。また ALT 細胞の Rad9 フォーカスは、ほとんどがテロメア DNA および PML を含んでいた。(表 2) これは、Rad9 は構成的な APB 構成成分であることを示している。

Rad9 と PCNA 様クランプ構造体を形成する Hus1 および Rad1、またこれらクランプのローダーを構成する Rad17 の局在についても解析を行った。(図 2) Hus1 および Rad1 は、それぞれの HA 融合タンパク質を ALT 細胞である U2-OS 細胞で発現させたところ、テロメアタンパク質である TRF1 との共局在を示した。Rad17 は内在性タンパク質を間接蛍光抗体法で染色し、PML およびテロメア DNA との共局在を明らかにした。Rad17 フォーカスの形成頻度、および APB との共局在頻度は、Rad9 と良く一致していた。(表 3、4) 以上の結果は、Rad9-Rad1-Hus1 複合体と Rad17-RFC は、構成的な APB 構成成分であることを示す。

DNA の二重鎖切断部位では、ヒストン H2AX のリン酸化 ( $\gamma$ -H2AX) が起こっていることが知られている。もし APB のテロメアが DNA 傷害部位として認識されているならば、チェックポイント Rad に加えて  $\gamma$ -H2AX が局在している可能性がある。そこで  $\gamma$ -H2AX に対する特異的な抗体を使い、ALT 細胞での局在を解析した。その結果、ALT 細胞特異的に  $\gamma$ -H2AX フォーカスが Rad9、NBS1、およびテロメア DNA と共局在することが観察された。(図 3) これは  $\gamma$ -H2AX が APB の構成成分であることを示す。一方、 $\gamma$ -H2AX とテロメアおよび APB との共局在は、Rad9 や Rad17 に比べてずっと低い頻度であった。(表 5) これは H2AX のリン酸化は一部の APB で起こっていること、すなわち傷害応答機構の活性化は一部のテロメアでのみ起こっていることを示している。

### APB における新規 DNA 合成とチェックポイントタンパク質の制御

次にテロメアの複製を細胞学的に解析するため、FISH 法によりテロメアを、抗 BrdU 抗体を使った間接蛍光抗体染色法により DNA の新規合成部位を同時に可視化する実験系を確立した。この方法を ALT 細胞に適用したところ、一部の APB で BrdU フォーカスが観察された。(図 4) これは特定のテロメアで活発な DNA 複製が起こっていることを示している。細胞核中の BrdU フォーカスの形態での分類により、ALT 細胞のテロメア複製は細胞周期の S 期および S 期以外の間期両方で起こっていた。次にこの APB における新規 DNA 合成の制御を知るため、caffeine による影響を解析した。caffeine は DNA 損傷チェックポイント機構において傷害部位の認識に関与するキナーゼ ATM/ATR の阻害剤であることが知られている。解析した 3 種の ALT 細胞全てにおいて、APB での新規 DNA 合成が caffeine により阻害されることを見いだした。(図 5) 以上の結果は、DNA 傷害の認識に機能するチ

チェックポイントタンパク質が ALT 細胞のテロメアを認識し、その複製に関与していることを示唆している。

Rad9 や Rad17 のチェックポイント Rad タンパク質が構成的な APB 構成成分であるのに対し、 $\gamma$ -H2AX や新規 DNA 合成は一部の APB においてのみ観察された。このことは ALT 細胞のテロメア複製において、二つの制御段階が存在することを示唆する。一つは損傷チェックポイントタンパク質の局在、もう一つは実際にテロメア複製を誘発する活性化である。これを検討するため、損傷チェックポイントが活性化された時に ATM/ATR に依存して起こる Rad17 のリン酸化が、APB で観察されるかどうかを解析した。(表 6) その結果、Rad17 に比べて一部の APB のみがリン酸化 Rad17 が局在していた。さらに同調培養を行った U2-OS(ALT)細胞を用い、細胞周期の各ステージで解析したところ、S 期後期から G2 期にかけて、リン酸化 Rad17 と APB との共局在頻度が上昇した。(図 6) 以上の結果は、細胞周期の S 期後期から G2 期にかけて、一部のテロメアにおいて損傷チェックポイントが活性化されたことを示す。

#### ALT 細胞テロメアに見いだされた単鎖 DNA 構造

ALT 細胞の一部の APB もしくはテロメアで誘発される傷害応答は、何が引き金になっているか明らかにするため、ALT のテロメア DNA に構造的特徴について検討を行った。5 種類の ALT と 3 種類のテロメレーズ陽性細胞からゲノム DNA を調製し、電気泳動により分離後にサザン法によってテロメア長を測定した。この電気泳動を変性条件下でおこなったところ、ALT 細胞の DNA は、中性条件下より早い移動度を示した。(図 7) これは ALT 細胞では、高頻度にテロメア DNA に単鎖部分が存在する、すなわち nick や gap 等の切断が修復されずに保持されていることを示している。このような単鎖構造を持つテロメアまで複製フォークが進行した時、その一時停止が起こったため傷害応答機構を活性化し、テロメア間の組換えを誘発する、という機構が予想される。

#### 結語

今後は ALT 細胞のテロメア DNA に存在する単鎖構造は、何らかの DNA 代謝の産物、もしくは中間体を反映しているはずである。すなわちこの構造の詳細な解析により、ALT 細胞のテロメアにおける特異的な DNA 代謝が明らかになると期待できる。この過程に傷害応答機構がどのように関与しているか、特に複製フォークの進行と APB でのチェックポイント活性化との関連に注目して解析を行いたい。

表 1

Rad9 フォーカスおよび APB を持つ細胞の割合 (%)

Cell line	Rad9(+)	APB*(+)	Rad9(+)/APB*(+)	(no. of cells)
ALT cell line				
U2-OS	11.6	14.3	11.6	(147)
GM847	28.5	29.1	26.6	(158)
SUSM-1	25.9	28.4	25.3	(162)
SaOS-2	32.2	38.4	32.2	(146)
WI38 VA13/2RA	24.1	25.3	24.1	(170)
Telomerase-positive cell line				
GM639	26.8	0	0	(71)
HOS	9.1	0	0	(143)
BFT-3B	8.4	0	0	(83)

\*APB はテロメア DNA と PML の共局在フォーカスと定義した。

表 2

テロメア DNA および PML シグナル陽性の Rad9 フォーカスの割合 (%)

Cell line	telomeric DNA(+)	PML(+)	APB*(+)	(no. of foci)
ALT cell line				
U2-OS	91.0	94.0	91.0	(100)
GM847	96.3	100	96.3	(80)
SUSM-1	94.0	94.8	94.0	(116)
SaOS-2	91.6	92.6	90.5	(95)
WI38 VA13/2RA	86.6	83.2	83.2	(119)
Telomerase-positive cell line				
GM639	0.67	37.3	0	(150)
HOS	0	18.1	0	(39)
BFT-3B	0	22.1	0	(95)

\*APB はテロメア DNA と PML の共局在フォーカスと定義した。



表 3

Rad17 フォーカスおよび APB を持つ細胞の割合 (%)

Cell line	Rad17(+)	APB*(+)	Rad17(+)/APB(+)	(no. of cells)
ALT cell line				
U2-OS	17.0	20.8	17.0	(159)
GM847	28.8	32.3	28.8	(198)
SUSM-1	37.6	40.0	37.6	(125)
SaOS-2	35.3	38.7	35.3	(119)
WI38 VA13/2RA	32.3	35.5	30.6	(124)
Telomerase-positive cell line				
GM639	22.5	0.7	0	(138)
HOS	6.1	0	0	(132)
BFT-3B	18.1	0.7	0.7	(138)

\*APB はテロメア DNA と PML の共局在フォーカスと定義した。

表 4

テロメア DNA および PML シグナル陽性の Rad17 フォーカスの割合 (%)

Cell lines	telomeric DNA(+)	PML(+)	APB*(+)	(no. of foci)
ALT cell line				
U2-OS	97.7	96.6	96.6	(87)
GM847	97.9	97.9	97.4	(192)
SUSM-1	98.8	98.8	98.8	(173)
SaOS-2	90.1	93.4	90.1	(91)
WI38 VA13/2RA	89.2	90.3	88.7	(195)
Telomerase-positive cell line				
GM639	0	14.1	0	(64)
HOS	0	18.2	0	(11)
BFT-3B	3.5	22.8	3.5	(57)

\*APB はテロメア DNA と PML の共局在フォーカスと定義した。

表 5

 $\gamma$ -H2AX フォーカスを持つ細胞の割合 (%)

Cell lines	$\gamma$ -H2AX(+)	$\gamma$ -H2AX(+)/TRF1(+)	(no. of cells)
ALT cell line			
U2-OS	28.7	3.3	(150)
GM847	38.7	15.3	(150)
SUSM-1	38.0	12.7	(150)
Telomerase-positive cell line			
GM639	7.3	0.7	(150)
HOS	21.3	0.7	(150)

表 6

Rad17 またはリン酸化 Rad17 とおよび APB フォーカスを持つ細胞の割合 (%)

**Rad17**

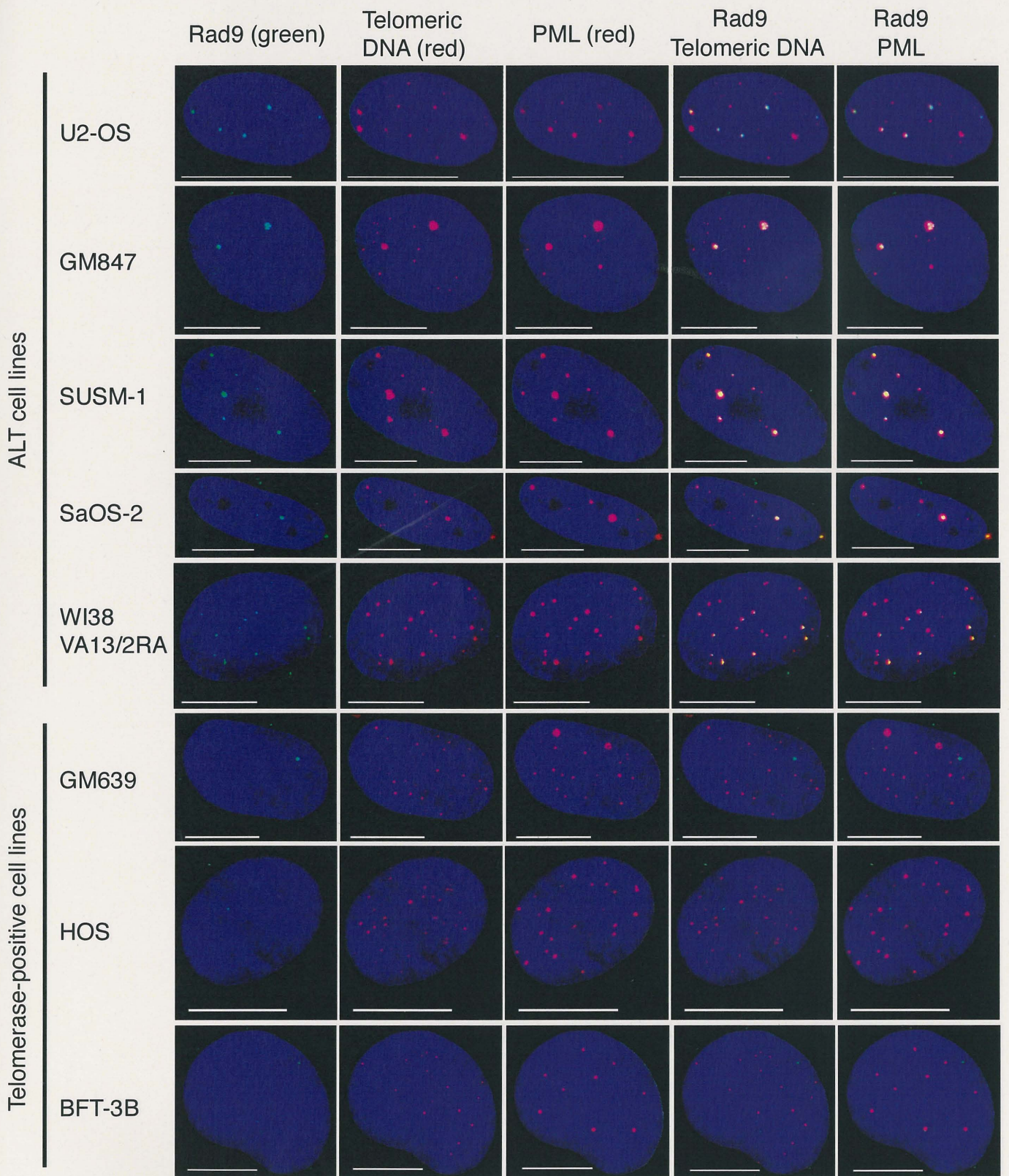
Cell line	Rad17	APB*	Rad17-APB	(cell no.)
U2-OS	19.1	18.6	18.6	(203)
GM847	35.1	35.1	35.1	(205)
SUSM-1	38.4	38.4	38.4	(211)

**Rad17P**

Cell line	Rad17P	APB	Rad17P-APB	(cell no.)
U2-OS	5.5	30.3	5.5	(271)
GM847	8.7	41.6	8.7	(219)
SUSM-1	14.3	40.8	14.3	(223)

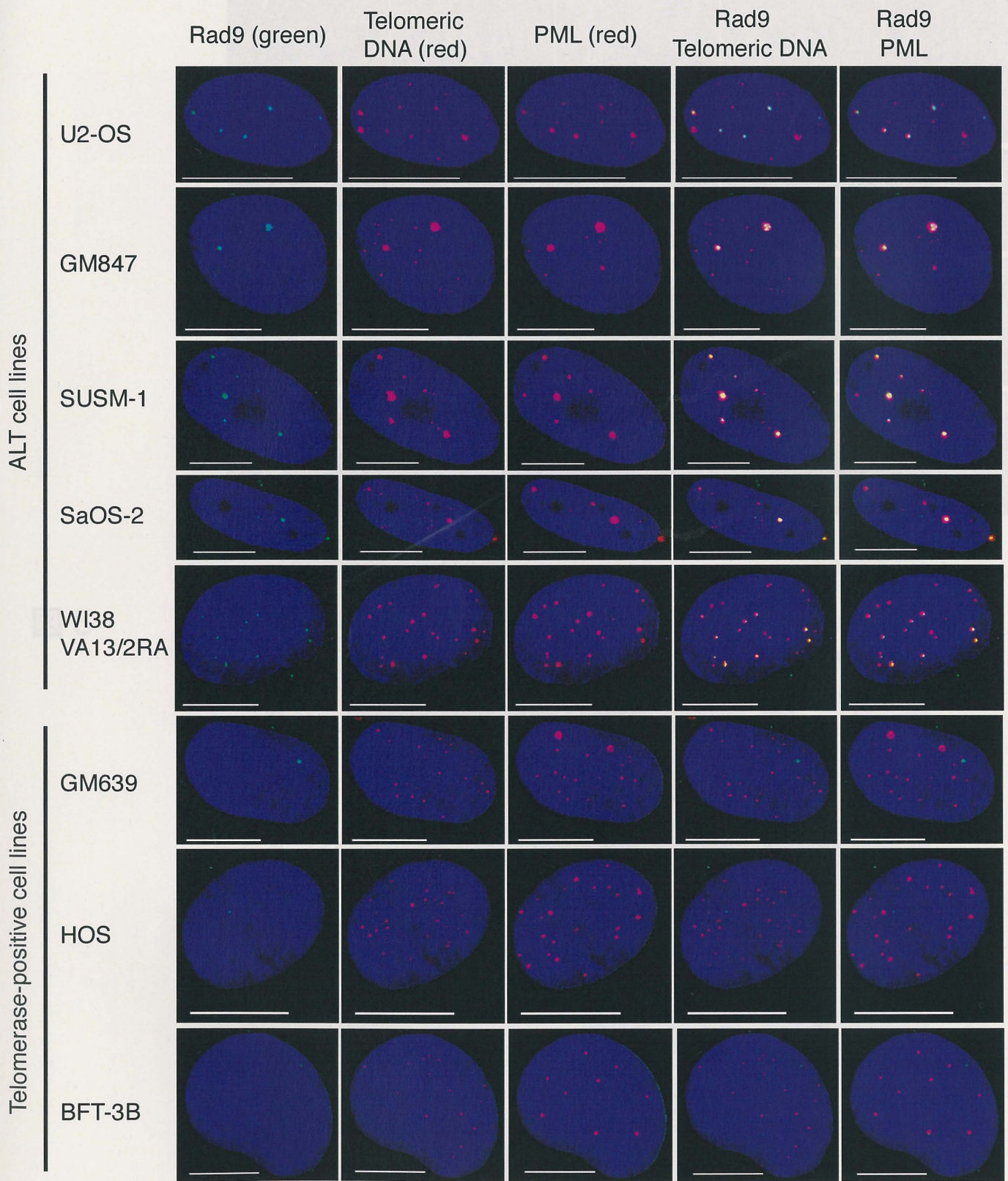
\*APB はテロメア DNA と PML の共局在フォーカスと定義した。

Figure 1





1



U2-OS (117) (114) GM847 (65) (89) SUSM-1 (65) (70)



图 4

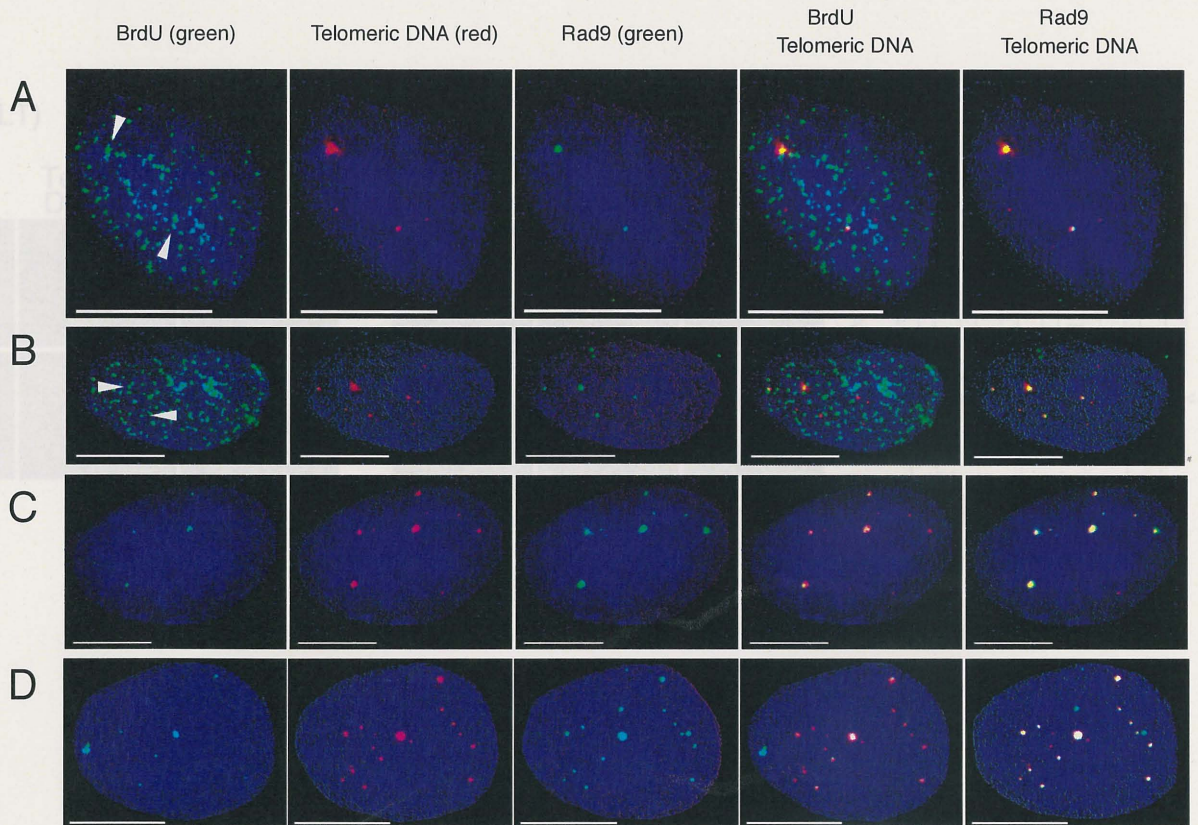
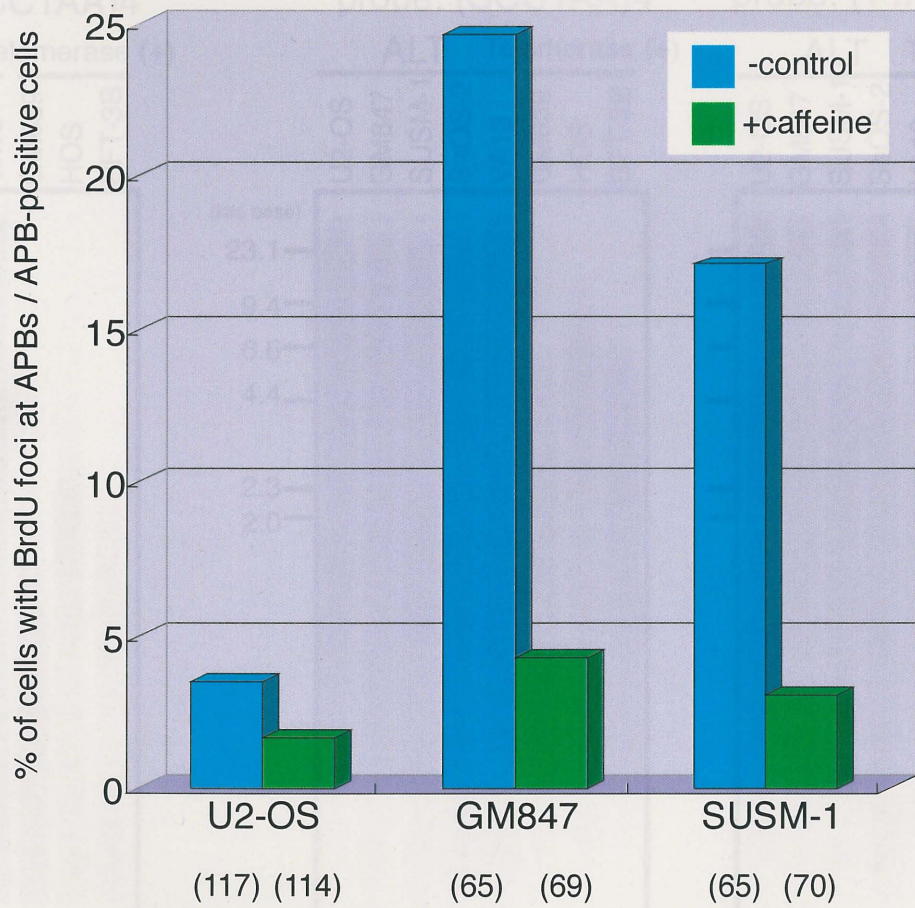


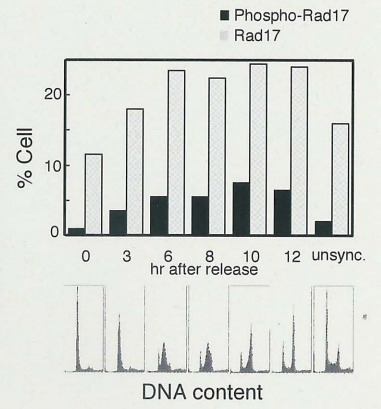
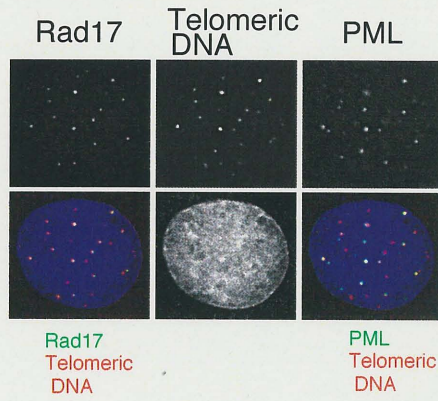
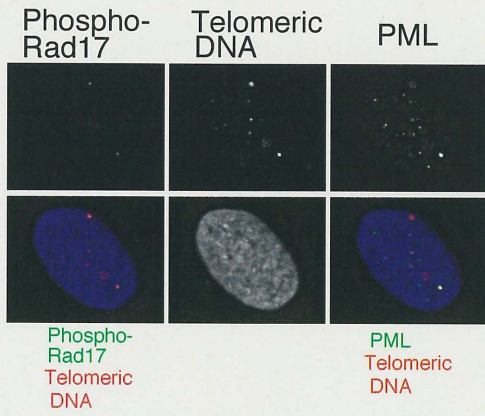
图 5





☒ 6

U2-OS (ALT)



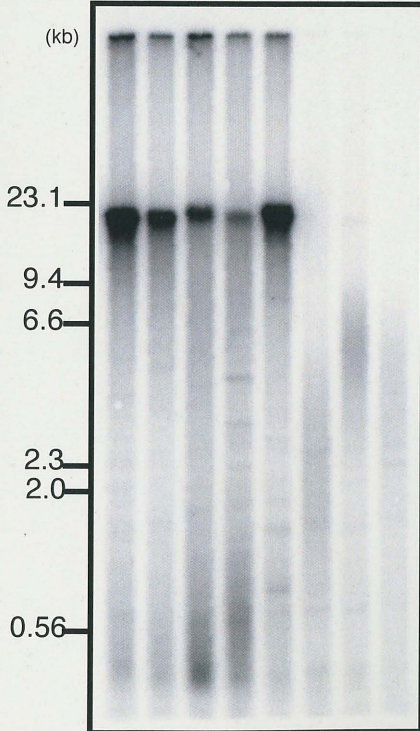
☒ 7

Neutral gel (ds DNA)

probe: (CCCTAA)<sub>4</sub>

ALT    Telomerase (+)

U2-OS    GM847    SUSM-1    SaOS-2    VA13    GM639    HOS    BFT-3B



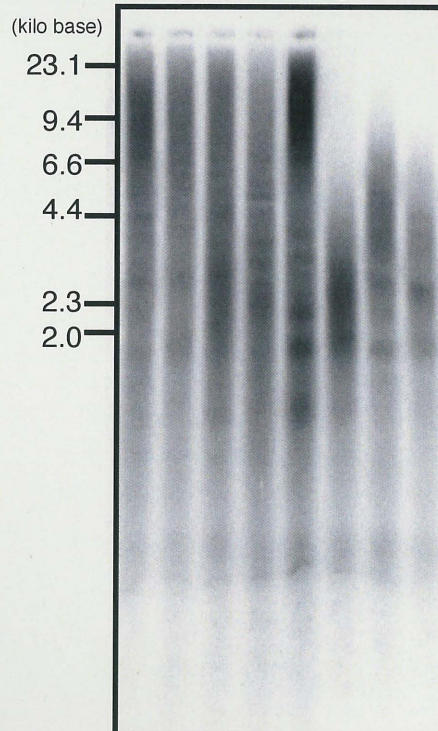
Alkaline gel (ss DNA)

probe: (CCCTAA)<sub>4</sub>

probe: (TTAGGG)<sub>4</sub>

ALT    Telomerase (+)

U2-OS    GM847    SUSM-1    SaOS-2    VA13    GM639    HOS    BFT-3B



ALT    Telomerase (+)

U2-OS    GM847    SUSM-1    SaOS-2    VA13    GM639    HOS    BFT-3B

