

(続紙 1)

京都大学	博士（生命科学）	氏名	村木慶子
論文題目	アフリカツメガエル卵抽出液を用いたテロメア蛋白質 TRF2 の機能解析		
(論文内容の要旨)			
真核生物の染色体末端に位置するテロメアは、染色体末端を二本鎖切断による DNA 損傷と区別し、DNA 損傷チェックポイントの活性化やヌクレアーゼによる分解、末端結合反応による染色体末端融合を抑制するのに必要である。哺乳類においてテロメア DNA は (TTAGGG)/(CCCTAA) 6 塩基の繰り返し配列からなり、その末端はグアニンに富む方の配列 (G 鎖) の 3'末端が一本鎖 DNA として突出した構造 (G-tail) をとっている。シェルタリンは、二本鎖テロメア DNA に直接結合する TRF1、TRF2 および、これらの蛋白質を介してテロメアに結合する Rap1、TIN2、TPP1 および POT1 の 6 種類の蛋白質から構成される、テロメアに局在する蛋白質複合体であり、テロメア機能を制御している。哺乳類では、TRF1 および TRF2 は細胞周期を通じてテロメアに結合し、TRF1 はテロメア DNA 複製、TRF2 はテロメアの末端保護に機能していることが報告されている。当研究室では TRF1、TRF2、POT1 のアフリカツメガエルホモログ（それぞれ xTRF1、xTRF2、xPOT1）を同定した。アフリカツメガエル卵抽出液中で再構成されたクロマチンの解析の結果、xTRF1は、分裂期ではクロマチンに結合しているが、間期にはクロマチンから解離する一方、xTRF2 は細胞周期を通じてクロマチンに結合していることが明らかになった。このことは、哺乳類においてテロメア DNA 複製に必要な TRF1 の機能を、アフリカツメガエルにおいては TRF1 以外の蛋白質が担っていることを示唆する。そこで本研究では、アフリカツメガエルにおいては、xTRF2 がテロメアの末端保護とともにテロメア DNA の複製にも関与する可能性を考え、テロメア DNA 複製およびテロメア末端保護における xTRF2 の機能解析を行った。 xTRF2 は哺乳類 TRF2 と同様テロメアへの局在を示した。xTRF2 が免疫除去された卵抽出液中でクロマチンを再構成したところ、xPOT1 のクロマチン結合が失われ、xTRF2 はシェルタリンの構造維持に重要なことが分かった。また、xTRF2 の免疫除去によりテロメア末端保護機能の異常を示す telomere dysfunction-induced focus (TIF) の形成や ATM の活性化が見られたことから、xTRF2 はテロメア末端保護に関与しており、xTRF2 を除去したテロメアは DNA 損傷として認識されることが確かめられた。さらに、xTRF2 非存在下ではゲノム DNA 全体の複製効率が低下していた。この複製効率の低下は、ATM の阻害によっては回復しなかったが、ATR および Chk1 の阻害により回復した。xTRF2 除去下での複製依存的にテロメア FISH (fluorescence <i>in situ</i> hybridization) シグナルが消失したことから、xTRF2 非存在下でのテロメア DNA 複製の異常が ATR を活性化し、ゲノム DNA 全体の複製を阻害しているというモデルが考えられた。TRF2 を免疫除去した卵抽出液にリコンビナント xTRF2 を添加した後に再構成されたクロマチンでは、テロメア FISH シグナルの減少やゲノム DNA 全体の複製効率の低下は回復したが、TIF は消失しなかった。また、TRF2 を免疫除去した卵抽出液に geminin を加えることでゲノム DNA 全体の複製を阻害した場合に再構成されたクロマチンでは、テロメア FISH シグナルの減少は起こらなくなったが、TIF は消失しなかった。これらの結果から、テロメアの末端保護とテロメア DNA 複製は異なる制御を受けていることが示唆された。			

(論文審査の結果の要旨)

染色体末端テロメアは、テロメア DNA 繰り返し配列とテロメア蛋白質から構成される DNA・蛋白質複合体であり、テロメア DNA 複製を保証しつつ、DNA 末端を保護する。哺乳類細胞では、二本鎖テロメア DNA 結合蛋白質である TRF1 と TRF2 を含めた 6 種類の蛋白質からなるシェルトリン蛋白質複合体がテロメア機能の遂行に必要であり、特に、TRF1 はテロメア DNA 複製に、TRF2 はテロメア末端保護に機能分担している。

学位申請者が所属する研究室では、アフリカツメガエル卵抽出液を用いた再構成クロマチンを用いて、カエル TRF2 (xTRF2)は、細胞周期にわたってテロメアクロマチンに存在する一方、カエル TRF1 (xTRF1)は、分裂期にのみテロメアクロマチンに局在し、S 期を含む間期にはテロメアには存在しないことを既に見出していた。このことは、哺乳類細胞と異なり、カエル再構成核ではテロメア DNA 複製反応に TRF1 を必要としないことを示唆している。学位申請者は、本論文において、xTRF2 が細胞周期にわたって果たす役割について詳細に検討した。

その結果、1) xTRF1 と xTRF2 は互いに独立してテロメアに結合すること、2) 抗 xTRF2 抗体を用いて卵抽出液から xTRF2 を免疫除去すると、ATM と ATR の活性化を伴うテロメア DNA 損傷チェックポイントの活性化とゲノム全体にわたる複製反応効率の低下が起こること、の二点を発見した。これらの事実は、カエル卵抽出液再構成核では、哺乳類細胞と異なり、TRF2 が末端保護作用とテロメア DNA 複製の両者に必要であることを示している。

さらに、申請者は、複製 DNA 新生鎖を臭化デオキシウリジンで標識し、セシウムクロライドを用いた密度勾配遠心法により新生鎖を分取することで、カエル卵抽出液再構成核において、テロメア、セントロメア、5S rDNA 遺伝子が S 期の異なる時期に複製されることを見出し、本実験系が、複製開始と伸長反応のカイネティックスを解析する上で有用であることを示している。

以上まとめると、本論文は、カエル卵抽出液再構成核を巧妙に用いて、xTRF2 の機能を詳細に解析し、それが、哺乳類細胞で知られていることと必ずしも一致しない特徴的な機能分担を行うことを生化学的に初めて示したものであり、テロメア機能の分子機構を明らかにする上で、重要な貢献をするものと判断された。よって、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。

また平成 23 年 5 月 13 日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日