

(論文内容の要旨)

テロメアは、染色体末端の G-rich な 6 塩基配列の繰り返し DNA と様々な結合因子からなる機能的クロマチン構造で、DNA 損傷応答反応からの認識を制御し、テロメア DNA 長のテロメラーゼによる付加伸長や短小化の制御を行うことで、染色体の安定性を保証する。近年の研究により、このテロメア構造・機能を制御する 6 種類のテロメア局在因子 (TRF1, TRF2, TIN2, TPP1, POT1) は、複合体 (shelterin/telosome という名前) として存在していることが明らかとなった。その shelterin 構成因子の一つである TRF1 は、テロメア二本鎖配列に特異的に結合する因子である。TRF1 を欠損させると、他の shelterin 構成因子のテロメア局在が強く阻害され、テロメア構造の異常や染色体の不安定性が誘導される。本研究では、TRF1 が果たしているテロメア構造・機能制御の実体を明らかにするために、内因性の TRF1 非依存的に TRF1 以外の shelterin 構成因子をテロメアに局在できる TRF1 欠損 ES 細胞を樹立し、TRF1 欠損細胞で観察される表現型がどのように相補されるかを解析し、各表現型がどの shelterin 構成因子に依存しているのかを分類することで、TRF1 の機能や他のタンパク質の関連性について迫っていくこととした。

まず、テロメア DNA に結合できるが TIN2 と結合できないニワトリマウスキメラ TRF1 分子 (cmTRF1) を細胞内に導入したが、cmTRF1 は shelterin 構成因子のテロメア局在を回復させることができず、それ以外の TRF1 欠損による表現型もなんら相補することができなかった。次に、TRF1 欠損細胞で TIN2 がテロメアに局在できる細胞を作成するために、TIN2 と cmTRF1 の融合タンパク質 (TIN2-cmTRF1) を発現する細胞や TRF2 を過剰に発現する細胞を樹立し、解析した。その結果、TIN2-cmTRF1 では TRF1 以外の shelterin 構成タンパク質のテロメア局在が回復しており、両方の細胞株において、TRF1 欠損で誘導される染色体の不安定性、細胞増殖不全、 γ H2AX のテロメア蓄積は完全に相補されたものの、分裂中期染色体で観察される異常なテロメアシグナルは抑制されなかった。この結果は、テロメアシグナルの異常は TRF1 欠損による shelterin 構成因子のテロメア局在の欠損以外に由来していることを示唆した。さらに、これらの TRF1 欠損細胞でテロメア長の変化について解析を行ったところ、TRF2 過剰発現 TRF1 欠損細胞で著しいテロメア伸長が見られた。TRF2 過剰発現細胞では TIN2, TPP1, POT1 のテロメア局在は消失したままであったため、cmTRF1 及び TIN2-cmTRF1 を利用して、このテロメア伸長と shelterin 構成因子のテロメア局在との関係について調べた。その結果、TIN2-cmTRF1 発現により shelterin 構成因子がテロメア局在を表している状態でも、TRF1 欠損によるテロメア DNA 長の伸長は不完全にしか抑制されなかった。さらに、細胞増殖不全および γ H2AX のテロメア蓄積の原因因子について詳細に調べるために、TIN2-或いは TPP1-cmTRF1 融合蛋白質を TRF1 欠損細胞に発現させた結果、TRF2 のテロメア局在だけが回復しない細胞では細胞増殖不全、 γ H2AX のテロメア蓄積は完全に相補されたが、POT1 のテロメア局在が消失した細胞ではそれらは相補されなかった。このことから、TRF1 欠損細胞において、細胞増殖不全および γ H2AX のテロメア蓄積は POT1 のテロメア局在の有無に由来することが強く示唆された。

以上の結果より、TRF1 のテロメア構造・機能制御には、shelterin 構成因子のテロメア局在を保障することで発揮されているものと、それでは説明できない、TRF1 特有の機能によって発揮されている機構がある事が強く示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

申請者の研究室では、哺乳類の二本鎖テロメア配列結合因子TRF1のテロメア構造・維持における役割を明らかにする目的で、条件的にTRF1が欠損するマウスES細胞が樹立され、その表現型の解析が行われた。TRF1欠損ES細胞では、細胞増殖の低下、染色体の不安定性、異常なテロメアシグナルやDNA損傷修復反応などが誘導されてくる。また、TRF1を含むテロメア局在因子複合体 (shelterin /telosomeと呼ぶ) の構成成分の多くがテロメア局在を消失することも分かっている。

今回、申請者は、これらのTRF1欠損ES細胞で観察される様々な表現型がどのようにして誘導されているのか、TRF1欠損によりテロメア局在が消失或いは低下するTRF1以外のshelterin蛋白質との関連から明らかにすることを試みた。

まず、TRF1を介してテロメア局在が保障されているTIN2を機能的TRF1非依存的にテロメアに局在させると、TRF1欠損ES細胞の表現型のうち、shelterin蛋白質のテロメア局在不全、細胞増殖不全、染色体の不安定性ならびにDNA損傷修復反応誘導は相補された。しかし、細胞分裂中期染色体のspreadsで観察される異常なテロメアシグナルは相補されなかった。さらに、TIN2のテロメア局在により相補された細胞増殖不全、染色体不安定性、DNA損傷修復反応が、shelterinのどの蛋白質に依存して誘導されるのかを明らかにする目的で、機能的TRF1非依存的に二本鎖テロメア配列結合因子TRF2或いは一本鎖テロメア配列結合因子POT1以外のshelterin蛋白質のテロメア局在を回復させた。その結果、POT1がテロメア局在できない場合は、増殖不全、染色体不安定性やDNA損傷修復反応は相補されなかったのに対して、TRF2のテロメア局在回復ができなない場合では、いずれの表現型も相補されることが明らかとなった。以上のことより、TRF1はshelterin蛋白質、特にTIN2-TPP1-POT1のテロメア局在を保障することで、テロメアの末端保護機能を維持していることが明らかとなった。

一方、外因性のTRF2を過剰発現しているES細胞でTRF1を欠損させると、顕著なテロメア長の伸長が観察された。この細胞では、TIN2-TPP1-POT1のテロメア局在は回復していないので、TRF1欠損によるテロメア長の伸長におけるTIN2-TPP1-POT1の関与を検討した。解析の結果、TIN2-TPP1-POT1のテロメア局在は、TRF1欠損によるテロメア長の伸長を部分的に抑制した。以上の結果より、TRF1のテロメア長制御の一端はTIN2-TPP1-POT1のテロメア局在により担われていること、しかし、それ以外の制御系が存在する可能性も示唆された。

以上、TRF1欠損ES細胞にTRF1非依存的にshelterin蛋白質のテロメア局在を回復させた様々な実験の結果により、TRF1により制御されているテロメア構造・維持には、TRF1によりテロメア局在が保障されているshelterin蛋白質によって担われている部分と、それでは今のところ説明できないような“よりTRF1分子に依存した機構”によりなされている部分があることが示された。

今回の研究により明らかにされたことは、哺乳類細胞におけるTRF1の重要性および機能を理解する上で意味のある成果であり、この分野の研究の進展に貢献した、と評価できる。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。さらに、平成20年8月8日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行なった結果、合格と認めた。