

氏 名	いわのともひこ 岩 野 智 彦
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学位記番号	生 博 第 35 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	生命科学研究科統合生命科学専攻
学位論文題目	マウステロメア結合タンパク質 TRF1 によるテロメア構造維持に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 眞 貝 洋 一 教授 石 川 冬 木 教授 松 本 智 裕

論 文 内 容 の 要 旨

染色体末端構造テロメアは真核細胞染色体が安定に存在するために重要な役割を果たしている。テロメア DNA-タンパク質高次構造を構成する哺乳類テロメア結合タンパク質である TRF1 は、そのドミナントネガティブ型を発現させた細胞のテロメア長が伸長することから、テロメア長の負の制御に関わると考えられている。しかし、これまでの実験では TRF1 のテロメアに関する機能がまだ十分に示されているわけではないので、本研究において TRF1 の機能をより厳密に調べる目的で、ジーンターゲット法によるマウス TRF1 欠損 ES 細胞の樹立を試みた。*mTRF1* ヘテロノックアウト細胞は効率よく得られたが、再度ターゲティングを行うことによる *mTRF1* ホモノックアウト細胞は得られなかった。そこで 4-hydroxytamoxifen (OHT) 依存的に *mTRF1* をノックアウトできる ES 細胞を樹立し、OHT 処理した *mTRF1* ノックアウト細胞において細胞増殖やテロメアの解析を行った。*mTRF1* ノックアウト細胞では細胞増殖の遅延、テロメア構造の異常が確認され、さらに分裂を重ねると染色体末端同士の融合が観察された。また、TRF1 とは独立にテロメア結合するタンパク質 TRF2 のテロメア局在が TRF1 の局在と間接的に影響していることも示された。さらに、DNA 損傷部位特異的に検出されるヒストン H2AX のリン酸化が分裂期のテロメアにおいて強く観察された。これらの表現型は、全長の TRF1 タンパク質をさらに発現させることによって完全に回復することが確認された。

本研究において、TRF1 はこれまで考えられてきたようなテロメア長の調節機能以外にも、テロメア高次構造の維持や細胞増殖に関しても重要な役割を持つ可能性が示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

哺乳類のテロメア DNA 配列に結合するテロメアタンパク質 TRF1 は、テロメア DNA の長さを負に制御する因子として機能していることが示唆されてきた。本研究では、マウス TRF1 をホルモン依存的に欠損させることの出来る胚性幹 (ES) 細胞を樹立しその表現型を解析することで、テロメア構造やその機能に TRF1 がどのような役割を持っているかを検討したものであり、その評価できる内容は以下の通りである。

- 1) TRF1 を欠損させると細胞増殖が抑制されること、TUNEL 陽性細胞の割合が増加すること、細胞周期を同調させていない解析において S 期の細胞群の割合が低下することから、TRF1 を欠損したマウス ES 細胞では細胞周期チェックポイント機構が活性化され細胞死や細胞周期特異的な細胞増殖の停止が誘導されたことが示唆された。
- 2) TRF1 を欠損させたマウス ES 細胞においては、TRF1 を介してテロメアに局在すると考えられていたテロメアタンパク質 Tin2 のテロメア局在がほとんど消失すること、TRF1 と同様にテロメア 2 本鎖 DNA 配列に特異的に結合するタンパク質 TRF2 のテロメア局在が低下することが明らかとなった。
- 3) TRF1 を欠損させたマウス ES 細胞では、高頻度で染色体融合が観察され、しかもその融合点の多くではテロメア

DNA 配列の存在が確認された。さらに、そのような染色体融合を多く持つようになった TRF1 欠損細胞では、本来存在していたよりも極端に長いテロメア DNA 配列を持つ染色体部分が存在することが示された。このことから、TRF1 欠損により、高頻度でテロメア末端（テロメア DNA 配列）間での組み換えが誘導され、その結果染色体が融合したことが強く示唆された。

- 4) TRF1 を欠損させたマウス ES 細胞では、細胞増殖の低下やテロメアタンパク質のテロメア局在の低下が観察されるのと時期を同じくして、ヒストン H2A バリエーションの一つ H2AX のリン酸化がテロメア部分で強く誘導されることが観察された。H2AX のリン酸化は DNA 切断部位で早期に誘導される修飾であることから、TRF1 の欠損により、テロメア末端が DNA 切断末端としての認識を受けることになり、DNA 傷害チェック機構が活性化されたことが推察された。

以上の結果は、テロメア DNA の長さの調節だけでなく、テロメア構造維持ならびに染色体末端保護におけるマウス TRF1 の新たな機能を示唆したものであり、染色体研究分野に寄与するところが大きい。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。

なお、平成17年2月2日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（生命科学）の学位を授与される学力が十分にあるものと認めた。