

Title	TRF1 is a critical trans-acting factor required for de novo telomere formation in human cells
Author(s)	岡部, 潤
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/42673
DOI	
rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	おがべ じゅん 岡部 潤
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 15796 号
学位授与年月日	平成12年12月11日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科病理系専攻
学位論文名	TRF1 is a critical <i>trans</i> -acting factor required for <i>de novo</i> telomere formation in human cells. (TRF1はヒト・テロメア形成に必須な <i>trans</i> 因子である)
論文審査委員	(主査) 教授 堀井 俊宏 (副査) 教授 野島 博 教授 米田 悦啓

論文内容の要旨

【目的】

染色体の末端に位置するテロメアは、染色体の安定化に必要な不可欠な構造体である。正常な体細胞において、染色体末端のテロメア DNA は通常の DNA 合成酵素では完全に複製することができないため、細胞分裂に伴い短小化する。そして、テロメア DNA がある一定の長さ以下にまで短縮すると、染色体が不安定になり、細胞死を引き起こすと考えられている。一方、大部分の腫瘍細胞ではテロメア DNA を付加するテロメラーゼがテロメア DNA の短小化に拮抗してテロメア構造を維持することで、不死化を獲得していると考えられている。このように、テロメア・テロメラーゼは細胞の癌化や老化にも密接に関わっている。

脊椎動物においては、TTAGGG の繰り返しである二重鎖 DNA (テロメア配列) がテロメア機能を果たす上で必要な *cis* 配列であることが明らかとなっている。テロメア配列を末端にもつ DNA を動物細胞に導入すると、染色体が切断されて新たな末端が形成される現象 (テロメア形成、テロメア・シーディング) が観察される。この現象は、導入したテロメア配列がテロメア機能を獲得できるかどうかを忠実に再現しており、*in vivo* でのテロメア機能を解析するのに有効であると考えられる。

本研究では、テロメア形成が起こる頻度を指標に、*in vivo* におけるテロメア機能に必要な *trans* 因子の探索および同定を試みた。

【方法ならびに成績】

1. テロメア形成能に影響を与える細胞内因子の探索

500bp のテロメア配列を末端にもつ直鎖状 DNA (pMYAC1) を10種のヒト由来細胞株にエレクトロポレーション法で導入し、この DNA が染色体に安定に取り込まれた細胞クローンについて、pMYAC1の染色体上における位置を Southern blotting 法および Bal 31感受性試験により解析した。その結果、細胞種間で pMYAC1が新たなテロメアになる頻度に有意な差 (88-0%) が認められた。そのため、各細胞におけるテロメラーゼ活性、テロメア長、染色体数を測定し、テロメア形成の頻度と相関する細胞内因子の探索を行った。その結果、不死化細胞株間でのテロメア形成の頻度は、テロメラーゼ活性ではなく細胞本来の持つテロメアの長さに逆相関しており、テロメアが短い (<3kb) 細胞では約70%以上の高い頻度で起こるのに対し、HeLa-LT 細胞などのテロメアの長い (>10kb) 細胞では、

約40%以下に低下していた。また、有限寿命の細胞においてはテロメア形成は認められなかった。

これらの結果から、1) 内在性のテロメア配列と pMYAC1のテロメア配列と競合的に結合し、2) 不死化細胞株に多く発現している因子が *in vivo* におけるテロメア機能に必要なテロメア配列の長さを決めている可能性が示唆された。

2. TRF1はテロメア形成の頻度に影響を与える因子である

以上の条件を満たす候補として、テロメア配列結合蛋白質である TRF1と TRF2があげられた。これらは de Lange らにより *in vitro* アッセイ系で二重鎖テロメア配列に結合する活性をもとに同定された蛋白質である。そこで、定量的 Western blotting 法により各細胞内の TRF1と TRF2の量を測定し、テロメア形成能との相関を検討した。

その結果、1) 有限寿命細胞における TRF1量は不死化細胞株に比べ著しく少なく、2) 細胞が維持するテロメア DNA の長さあたりの TRF1分子数比が高い細胞ほどテロメア形成が頻度よく起こっており、両要素との間に強い相関 ($r=0.991, P<0.0001$) が認められた。一方、TRF2においてはこのような相関は認められなかった。

さらに、テロメア形成能が低い HeLa-LT 細胞に FLAG-TRF1発現ベクターを導入して、野生型 TRF1を安定に過剰発現させた細胞クローンを樹立した。これらの細胞に pMYAC1を導入すると、細胞が保持しているテロメア長とは無関係にすべての細胞クローンで高頻度 (73-83%) のテロメア形成が認められた。

【総括】

本研究の結果より、TRF1はテロメア配列が *in vivo* でテロメアの機能を獲得するために必須な *trans* 因子であることを明らかにした。さらに、TRF1は細胞の不死化に関与している可能性が示唆された。これまでに TRF1はテロメア長を負に調節する因子であることが報告されているが、これとは別の新たな生理学的意義を持っていることが示された。また、テロメア配列を伸長する酵素であるテロメラーゼは、テロメラーゼ陰性細胞でもテロメア形成が起こることから、テロメア形成に必須な因子ではないことを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

テロメアは染色体の末端に位置し、染色体を安定に維持するために必須な構造体であると考えられている。動物細胞において、TTAGGGの繰り返しからなる DNA (テロメア配列) がテロメア機能を果たす上で必須な *cis* 配列であることが明らかとなっている。しかし、*in vivo* でテロメア配列が染色体末端として機能するために必要な *trans* 因子やどのようにして染色体の安定化をもたらしているのかについては、全く明らかにされていなかった。

本研究では、テロメア配列を末端にもつ DNA を動物細胞に導入した場合に、導入したテロメア配列をもとに新たな染色体末端が形成される現象 (テロメアシーディング) を指標に、*in vivo* でのテロメア機能に必要な *trans* 因子の解析を行った。その結果、テロメア結合タンパク質である TRF1がその候補としてあげられ、1) 不死化細胞株での TRF1の量が有限寿命細胞に比べて著しく多いこと、2) TRF1の availability とテロメア形成能との間に密な相関があること、3) TRF1が過剰に存在すると、テロメア形成が起こりやすくなることが示された。以上の結果から、TRF1が *in vivo* においてテロメア配列がテロメア機能を獲得するために必須な *trans* 因子であることが明らかにした。また、TRF1が細胞の不死化に関与している可能性も示唆した。

本研究は、テロメアが染色体を核内で安定に維持するために必須な因子を明らかにしただけでなく、染色体安定化が大きく関与する老化・不死化の分子機構の解明に貢献すると考えられる研究であり、学位の授与に値するものと評価できる。