

テロメア構成タンパク質修飾とエピゲノム異常の関連性

大阪大学 微生物病研究所 遺伝子生物学分野
渡邊 すぎ子

1. はじめに 背景と目的

がんの発生・進展には、紫外線、喫煙等の環境因子や、生活習慣によって変動する代謝産物等の内的因子によって引き起こされるゲノムやエピゲノム異常の蓄積が重要な役割をもつ。これまでの研究により、正常な細胞が、発がんの原因となるRASやc-myc等のがん原性遺伝子の活性化によって持続的なDNA複製ストレスを受けた場合、まずはDNA損傷応答（DNA-damage response; DDR）が誘導され、細胞周期チェックポイント機構が働き、異常な状態が解消されないときには細胞老化またはアポトーシスへと導かれることによって、細胞の異常増殖が抑制されることが明らかになっている。しかしながら、細胞は加齢と共に、多様なシグナルに適応したクロマチン構造を獲得し、ゲノム不安定性をもったまま分裂し異常増殖する確率が増すことが解っている。この経路を制御する分子機構は、高齢化に伴うがんの発生率を効果的に制御する治療標的となりうると考える。

クロマチン構造の制御因子の中で、テロメア構成タンパク質（シェルタリン複合体等）は、メチル化、SUMO化、ポリADPリボシル化またユビキチン化といった多くの修飾を受け（図1、参考文献1）、DDRや細胞老化誘導等の分子制御を司り、ゲノムを安定化させる。また、テロメア長短縮等のテロメア機能不全が生じたときには、DDRにおけるクロマチンシグナル伝達のアダプター分子であるMDC1がテロメア部にリクルートされ、ATMリガーゼをはじめとする、重要な分子応答に重要な役割を示す（参考文献2）。同部の安定性とこれら因子は、異常増殖下でもテロメアを維持しながら細胞周期を進行させるがん特異的エピゲノムと密接に関連する。

これまでの研究で、DDRにおいてMDC1のメチル化がATMリガーゼのシグナル伝搬に必要なことを見出しており、今回、テロメア領域のクロマチン構造にも同様の役割を持つかを解析し、がん治療応用・発展を目指し、研究を進めた。

2. 方法

ヒト網膜色素上皮細胞株RPE1細胞を用い、テロメア機能不全を誘発させ、テロメア部へ集積するDDR応答因子を、クロマチンアダプター分子MDC1がメチル化する条件およびされない条件下で顕微鏡的に解析した。

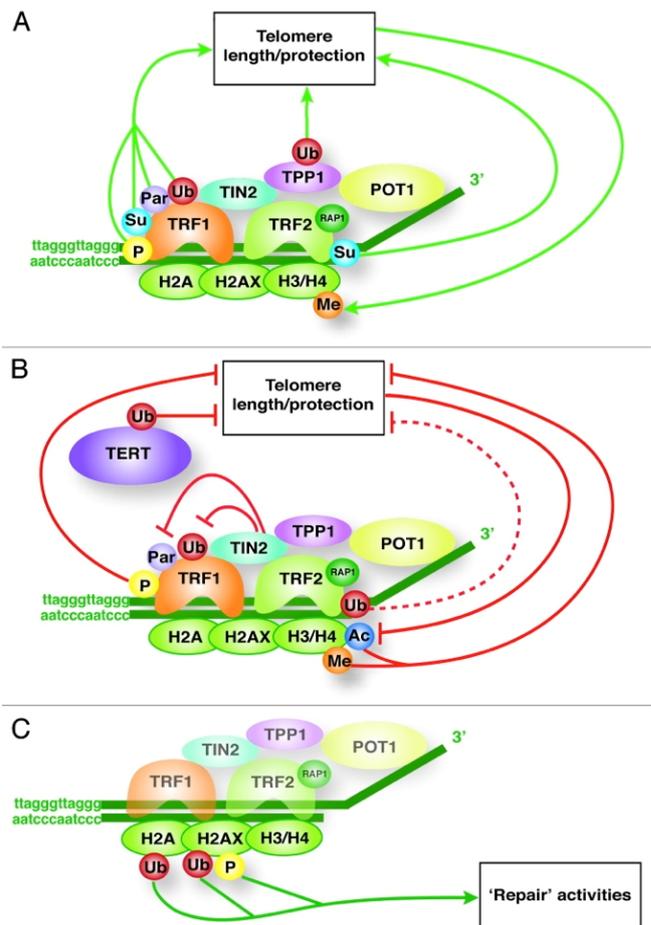


図1 : posttranslational modifications on mammalian telomeric chromatin

Cell Cycle, 11:1524-1534, 2012

1) テロメア機能不全の誘発：シェルタリン複合体の構成因子の一つであるTRF2のdominant negative分子(TRF2-DN)の発現を利用した。この分子は、細胞内に発現することによって正常なシェルタリン複合体の構成を阻害し、テロメア機能不全を誘発しうることが知られている(参考文献2)。そこで、今回レトロウィルスベクターを用い、同種指向性受容体(ecotrophic receptor)を発現するRPE1細胞に遺伝子導入し、TRF2-DNを発現させ、テロメア機能不全を誘発した。

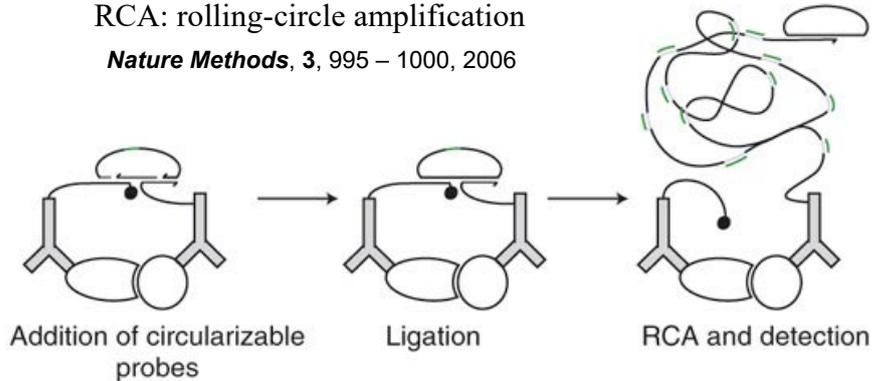
2) MDC1のメチル化条件：これまでの研究で見出してきた、DDRの過程で変動するMDC1のメチル化に対する責任酵素を、RNA干渉を用いてノックダウンし、コントロール細胞と比較することによって、MDC1のメチル化が入るまたは起こりにくい条件下でテロメア機能不全部におけるDDRの評価を行った。

3) テロメア機能不全部のモニター：シェルタリン複合体の構成因子のうちTRF1は、dominant negativeのTRF2存在下においてもテロメア領域に結合することが既に証明されており、この因子を同部のモニターとして、近傍に存在する因子(DDR因子)を、proximity ligation assay(図2, 参考文献3)においてシグナルを解析することにより、テロメア機能不全部への集積を評価した。

図2：Schematic presentation of proximity ligation assay.

RCA: rolling-circle amplification

Nature Methods, 3, 995 – 1000, 2006



3. 結果 研究成果

RNA干渉を用いてMDC1のメチル化責任酵素をノックダウンしたRPE1細胞、つまりMDC1のメチル化が抑制された細胞において、クロマチンアダプターMDC1のテロメア機能不全部への集積はコントロール細胞と同程度に認められるのに対し、MDC1を足場として周囲のクロマチンにリン酸化シグナルを伝搬するATMリガーゼの同部への集積は著しく低下した。この結果からMDC1のメチル化は、MDC1それ自身のテロメア機能不全部への集積には影響を与えないが、それにリクルートされるATMリガーゼの集積を制御しているといえる。このMDC1のメチル化責任酵素のノックダウン細胞におけるATMリガーゼの分子動態は、MDC1自身をノックダウンしたときのATMリガーゼテロメア不全部集積異常と同様であり(参考文献2)、MDC1のメチル化は、MDC1が持つDDRのいわゆるハブ機能それ自身に、テロメア部においても極めて重要な役割を持っていることを示唆している。

4. まとめ 考察

テロメア機能不全部でも、通常のDDRで作用するクロマチンアダプタータンパク質MDC1がリクルートされ、そのメチル化に依存してATMリガーゼが周囲クロマチンにリン酸化シグナルを拡散することを見出した。このとき作用するMDC1のメチル化責任酵素は、癌でしばしば高発現することが知られており、癌がテロメア機能不全をovercomeして異常増殖しうるのに役割を持つことが示唆される。

癌細胞に見られる異常増殖刺激下では、テロメア領域もまた高い増殖刺激のストレスにさらされている。さらに、癌抑制因子の不活性化によりチェックポイントもかかりにくい状態にあるために、異常事態に対応する時間的猶予も限られていると考えられる。このような極限的な状況で細胞として生存していくためには、テロメア機能不全に対する迅速なDDRが必要とされ、稼働していることが予測される。

癌で高発現するMDC1のメチル化酵素を阻害することは、テロメア機能不全部のDDRを不活性化することによってそれまで対応してきた異常増殖ストレスへの応答を不可能なものとし、細胞死や異常分裂死を誘導できるのではないかと考えている。さらに、既存の抗がん剤感受性へも影響を与えうることが十分予測され、治療標的としての発展性が大いに期待できる。

5. 発表論文、参考文献

本研究の研究成果は現在論文発表にむけ、更なる解析を進めているところである。

参考文献

- 1) Peuscher MH and Jacobs JJ., Posttranslational control of telomere maintenance and the telomere damage response. *Cell Cycle*. 2012; 11: 1524-34.
- 2) Dimitrova N and de Lange T., MDC1 accelerates nonhomologous end-joining of dysfunctional telomeres. *Genes Dev*. 2006 ; 20 : 3238-43.
- 3) Söderberg O et al., Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods*. 2006 ;3: 995-1000.