

DNA 損傷認識機構を巧みに利用したテロメア維持戦略

山崎 晴丈^{1,2}, 石川 冬木¹

1. はじめに

真核生物が持つ最大の特徴の一つに線状の染色体を持つことがあげられる。ほとんどの原核生物が持つ環状染色体ではなく線状染色体を持つことで、真核生物は減数分裂を可能にして種の多様性を増加させるという大きな利点を享受したと考えられている¹⁾。しかしそれと引き換えに、DNA 末端は異常な DNA 二重鎖切断部位として認識される可能性が生じた。さらに DNA 末端は DNA ポリメラーゼの作動原理のために複製のたびに短小化するという「末端複製問題」にも直面することになった。真核生物は染色体末端にテロメアと呼ばれる領域を形成してこれらの問題を回避している。

テロメアは、特有の繰り返し DNA 配列と、それに結合するシェルタリンと呼ばれるタンパク質複合体によって構成されている²⁾。一般に、DNA 二本鎖切断が生じると、DNA 損傷チェックポイントが活性化されて細胞周期停止や細胞死が引き起こされる。テロメアはシェルタリンによって保護されているため異常な DNA 損傷部位として認識されないと理解されているが、近年になってテロメア構造の維持には DNA 損傷を認識するキナーゼである ATM (ataxia telangiectasia mutated), ATR (ATM and Rad3-related) が必要であるという一見矛盾するような報告が蓄積してきた³⁻⁶⁾。本稿では、テロメア構造の維持に際してこうした矛盾がいかんして解消されているかについて、筆者らが明らかにした分裂酵母での知見を中心に概説したい。

2. テロメアの構造とシェルタリン, テロメララーゼ

テロメア DNA は 5' から 3' 方向が末端へ向かうグアニンに富む G 鎖とそれに相補的な C 鎖の繰り返し配列からなる。このテロメア繰り返し配列は、ヒトをはじめとする脊椎動物では G 鎖が 5'-TTAGGG-3' の繰り返し配列であり、分裂酵母ではグアニンの数などに多少のばらつきはあるものの 5'-GGTTACAGG-3' である^{7,8)}。G 鎖は 3' 末端が突出して一本鎖となっており G テイルと呼ばれる。G テイル部分は、テロメア G 鎖配列に相補的な鋳型 RNA 配列を含む逆転写酵素 (テロメララーゼ) により伸長され、その後 G テイル部分に相補的な C 鎖が DNA ポリメラーゼにより合成されることにより、末端複製問題を解消している。分裂酵母では、テロメララーゼは少なくとも逆転写酵素活性を持つ Trt1, 鋳型となるテロメララーゼ RNA である TER1, さらにそれに結合する Est1 から構成されている。

ヒトテロメア DNA には 6 因子 (TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1, POT1) からなるシェルタリンと呼ばれるタンパク質複合体が結合し、末端の保護やテロメララーゼのリクルートに機能することが明らかとなっている⁹⁾ (図 1A)。シェルタリンの中でも、TRF1, TRF2 はテロメア二本鎖 DNA 配列に直接結合しているのに対し、POT1 はテロメア一本鎖 G テイルに直接結合している。TRF1, TRF2 と POT1 の間を TIN2, TPP1 がタンパク質相互作用により架橋することにより、テロメア二本鎖 DNA と一本鎖 G テイルは間接的に結合可能となる。分裂酵母においては、二本鎖 DNA 部分には TRF1, TRF2 のオーソログである Taz1 が、一本鎖 G テイルには Pot1 が直接結合することが知られていたが、筆者らのグループにより Pot1 に結合する因子として Tpz1 (TPP1 オーソログ), Ccq1, Poz1 (TIN2 オーソログ) が同定され、既知の Rap1 も含めて 6 因子からなるシェルタリン複合体が分裂酵母にも存在することが明らかとなった⁹⁾ (図 1A)。ヒトテロメア同様、Taz1 と Pot1 の間を Rap1, Poz1, Tpz1 がタンパク質相互作用により架橋することにより、分裂酵母のテロメアでも二本鎖 DNA と一本鎖 G テイルは間接的に結合可能となる。このように、ヒトと分裂酵母ではテロメアを構成する因子に若干の違いがあるものの、全体のテロメア構造はよく保存されてい

¹ 京都大学大学院生命科学研究科 (〒606-8501 京都府京都市左京区吉田近衛町)

² 新潟薬科大学応用生命科学部 (〒956-8603 新潟県新潟市秋葉区東島 265-1)

Telomere maintenance by DNA damage sensor kinases, ATM and ATR

Harutake Yamazaki¹ and Fuyuki Ishikawa² (¹Department of Gene Mechanisms, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Yoshida-Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan; ²Department of Applied Life Sciences, Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences, 265-1 Higashijima, Akiha-ku, Niigata, Niigata 956-8603, Japan)

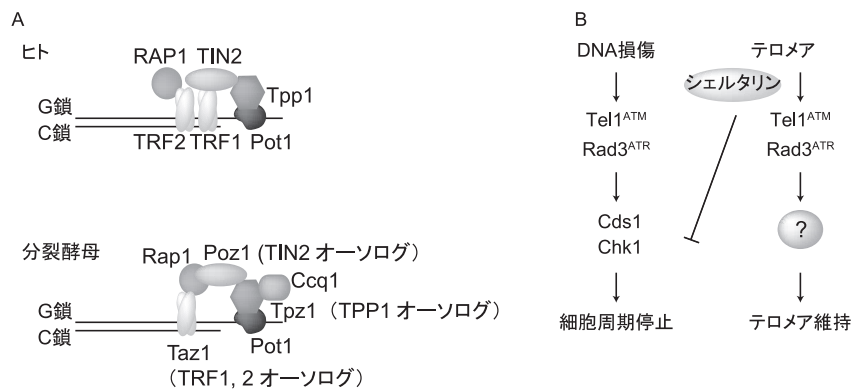


図1 テロメア構造とDNA損傷チェックポイント

(A) ヒトと分裂酵母のテロメア構造とシェルタリンの類似性。(B) 分裂酵母におけるDNA損傷部位とテロメアにおけるチェックポイントタンパク質の機能。DNA損傷部位では、DNA損傷を感知するTel1^{ATM}、Rad3^{ATR}が下流のCds1、Chk1をリン酸化により活性化すると細胞周期の停止が起こる。一方テロメアでは、シェルタリンによりチェックポイントの最終的な活性化は抑えられているが、テロメアの維持にはTel1^{ATM}、Rad3^{ATR}が機能している。しかしTel1^{ATM}、Rad3^{ATR}の標的は長い間未同定であった。

る。分裂酵母シェルタリンの中で、Taz1、Rap1、Poz1は欠失するとテロメア長が伸長することから、テロメラーゼの負の制御因子であり、逆にCcq1は欠失するとテロメアが徐々に短小化することから、テロメラーゼの正の制御因子であると考えられる。また、出芽酵母では短いテロメアDNAが優先的にテロメラーゼにより伸長されることが明らかになっていることから¹⁰、テロメアDNAがある一定の長さを保つために、テロメア長を測定してテロメラーゼのリクルートを制御するフィードバック機構が存在すると考えられている。その過程ではテロメラーゼを正負に制御可能なテロメア結合タンパク質が中心的な役割を担っていると考えられるが、分子レベルでの詳細な理解には至っていない。

3. DNA損傷チェックポイントとテロメアの維持

分裂酵母にはATM、ATRのオーソログとしてTel1、Rad3が存在する。クロマチン免疫沈降(chromatin immunoprecipitation: ChIP)を用いた解析により、Tel1、Rad3は細胞周期のS期、G2期に特異的にテロメアに局在することが明らかになっている¹¹。Rad3欠失株ではテロメア長が短くなること、さらにRad3とTel1の両者を欠失するとテロメアが完全に失われ、それでも生育可能な株は3本の染色体すべてが自己環状化していることから、Tel1、Rad3がテロメアの維持に必須の役割を果たすと考えられる¹。一方、DNA損傷によって引き起こされる細胞周期停止や細胞死は、Tel1、Rad3がチェックポイントキナーゼCds1、Chk1をリン酸化する過程を介して誘導されるが、Cds1、Chk1の片方もしくは両方を欠失した株のテロメア長は野

生型株と同程度であったことから、Cds1、Chk1はテロメアの維持には必須ではない¹²。すなわちテロメアにおけるTel1、Rad3の標的はCds1、Chk1以外の因子であると考えられるが、十余年の長きにわたりその標的因子は不明であった(図1B)。

4. Tel1^{ATM}、Rad3^{ATR}のテロメアにおける標的

これらの知見を背景に、筆者らはTel1、Rad3の標的となりうる因子として、テロメア長を正に制御するシェルタリン構成タンパク質であるCcq1に着目して研究を行った¹³。Tel1、Rad3はPIKK(phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase)ファミリーに属するリン酸化酵素であり、標的タンパク質のSQ/TQ配列のセリンもしくはトレオニン残基をリン酸化する。Ccq1には11個のSQ/TQ配列が存在するため、それらのAQ置換体を作出したところ、93番目のセリン残基をアラニン残基に置換したCcq1-T93Aを発現する株ではテロメア長が生育とともに徐々に失われた(図2A)。逆に93番目のトレオニン残基以外の10個すべてのSQ/TQをAQに置換したCcq1-93T(10A)を発現する株はテロメア長に変化はみられなかった。さらにChIP解析から、Ccq1-T93Aを発現する株ではTrt1のテロメア局在が極端に減少していること(図2B)が明らかとなった。以上のことから、Ccq1の93番目のトレオニン残基はテロメラーゼをテロメアヘリクルートするために必要であると考えられた。これをさらに検証するため、Ccq1がテロメラーゼを異所的にリクルートすることができるかについて検討した。大腸菌においてlacO配列にLacIタンパク質が特異的に結合することを利用し、大腸菌由来のlacO

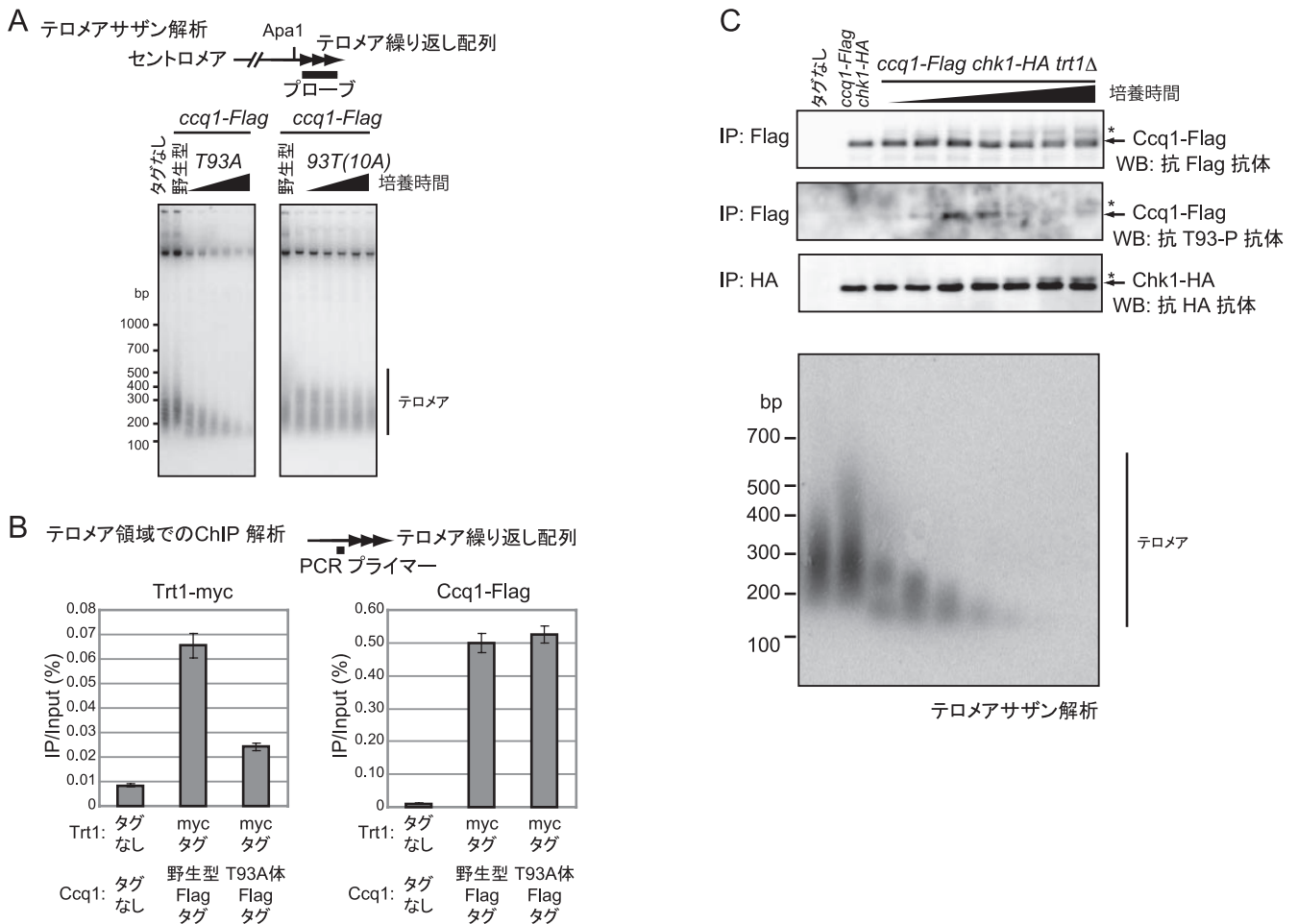


図2 テロメラーゼのリクルートとテロメアの維持に重要な Ccq1 のリン酸化

(A) Ccq1-T93A および Ccq1-93T (10A) (93SQ 以外のすべての SQ/TQ を AQ に置換) を発現する株のテロメア長検出. ゲノム DNA をテロメア近傍で切断する ApaI で消化し, テロメア G 鎖検出プローブを用いたサザンハイブリダイゼーションにより経時的に解析した. (B) ChIP によるテロメラーゼホロ酵素である Trt1 のテロメア局在解析. Ccq1-T93A 体のテロメア局在は正常だが (右), Ccq1-T93A 体を発現する株では Trt1 のテロメア局在が阻害された (左). (C) ヘテロ二倍体から *ccq1-Flag chk1-HA trt1Δ* 株を作成し, テロメア長が短小化する過程でのテロメア長変化 (下) と Ccq1 の 93 番目のトレオニン残基のリン酸化と Chk1 のリン酸化を検出 (上). Ccq1 の 93 番目のトレオニン残基のリン酸化は, それを認識するリン酸化特異的抗体 (抗 T93-P 抗体) を作製して検出した. IP: 免疫沈降, WB: ウェスタンブロッティング, *: リン酸化バンド. ChIP データは平均に標準誤差を付して示した.

リピート配列が染色体の *ade6+* 領域に挿入された株において, Ccq1 と LacI との融合タンパク質を発現させる系を構築したところ, Ccq1-LacI が *ade6+* 領域に局在化するのに伴い, Trt1 も *ade6+* 領域に局在することが ChIP 解析により示された. この Ccq1 の Trt1 を異所的にリクルートする能力は, Ccq1-T93A 体では大きく損なわれること, さらに Tell, Rad3 依存的事であることも明らかとなった. これらのことから Ccq1 の 93 番目のトレオニン残基がテロメラーゼをテロメアヘリクルートする際に必須の役割を果たしていることが示された. またその過程で Ccq1 の 93 番目のセリン残基が Tell, Rad3 によりリン酸化されることが重要である可能性が考えられた.

その可能性を検討するために, 筆者らはまず精製タンパ

ク質を用いて *in vitro* キナーゼ解析を行い, その結果, Ccq1 の 93 番目のトレオニン残基は Tell, Rad3 によってリン酸化されることが示された. さらに *in vivo* においても Ccq1 の 93 番目のトレオニン残基がリン酸化されることや, そのリン酸化の程度が Tell もしくは Rad3 を欠失した場合には著しく減少することも明らかとなった. 筆者らのグループとは独立に, Nakamura らのグループも, Ccq1-T93A 体はテロメラーゼをテロメアヘリクルートする能力に欠損があることや, *in vivo* で Ccq1 の 93 番目のトレオニン残基が Tell, Rad3 依存的にリン酸化されることを示した. さらに彼らは興味深いことに, 93 番目のトレオニン残基がリン酸化された Ccq1 がテロメラーゼ複合体を構成するタンパク質の一つである Est1 と結合することも示した¹⁴⁾.

これらのことから、Ccq1 の 93 番目のトレオニン残基が Tel1, Rad3 によりリン酸化されると、それを指標としてテロメラーゼ複合体がテロメアヘリクルートされ、テロメアの伸長が起きるものと結論された。

5. 分子スイッチとしての Ccq1

先にも述べたが、出芽酵母では短いテロメアが優先的にテロメラーゼにより伸長されることがわかっている¹⁰⁾。その機構が分裂酵母にも存在するとすれば、テロメラーゼのリクルートに重要な Ccq1 の 93 番目のトレオニン残基のリン酸化の程度がテロメア長により違いがあるのではないかと考えた。そこでテロメラーゼ触媒サブユニット Tt1 の欠失株を作出し、末端複製問題により分裂のたびにテロメアが徐々に短くなっていく過程での Ccq1 のリン酸化の程度について検討した。するとテロメア長が短くなるにつれて Ccq1 の 93 番目のトレオニン残基のリン酸化の程度が亢進していることが明らかとなった (図 2C)。そのリン酸化の程度はテロメア長が短くなる途中にピークを迎え、さらに極端にテロメア長が短くなる培養後期では減少に転じ、最終的には観察されなくなった。興味深いことに、Ccq1 のリン酸化の程度のピークと入れ替わるように、DNA 損傷チェックポイントの過程において Tel1, Rad3 にリン酸化され活性化する Chk1 のリン酸化の程度が亢進していた。Ferreira らのグループは、テロメアにおいて DNA 損傷チェックポイントが最終的に活性化しない機構について詳細に検討している¹⁵⁾。DNA 損傷を認識するキナーゼである Rad3 の活性化が細胞周期の停止につながるためには Chk1 の活性化が必要であるが、そのためには Crb2 (分裂酵母の 53BP1 オーソログ) により Chk1 が DNA 損傷部位にリクルートされる必要がある。その Crb2 が DNA 損傷部位にリクルートされるためには、Rad3 の下流で働く Cut5 や、C 末端側がリン酸化されたヒストン H2A [γ H2A (高等真核生物の γ H2AX)], さらに 20 番目のリシン残基がジメチル化されたヒストン H4 が損傷部位に局在する必要があることがわかっている。彼らは ChIP 解析によって、テロメアには Cut5 や γ H2A が局在していることを示した。その一方で、20 番目のリシン残基がジメチル化されたヒストン H4 は検出されなかった。しかしチェックポイントが活性化している *ccq1⁻* を欠失した株では Crb2 がテロメアに局在すること、その局在はヒストン H4 をジメチル化することができる Set9 を欠失すると阻害されることも明らかとなった。これらのことから Ferreira らは、Ccq1 に依存した何らかの機構によってヒストン H4 の 20 番目のリシン残基のジメチル化の程度が抑制されているので、Crb2 がテロメアに局在できないと考えている。それに伴い Chk1 がテロメアにリクルートされず、細胞周期の

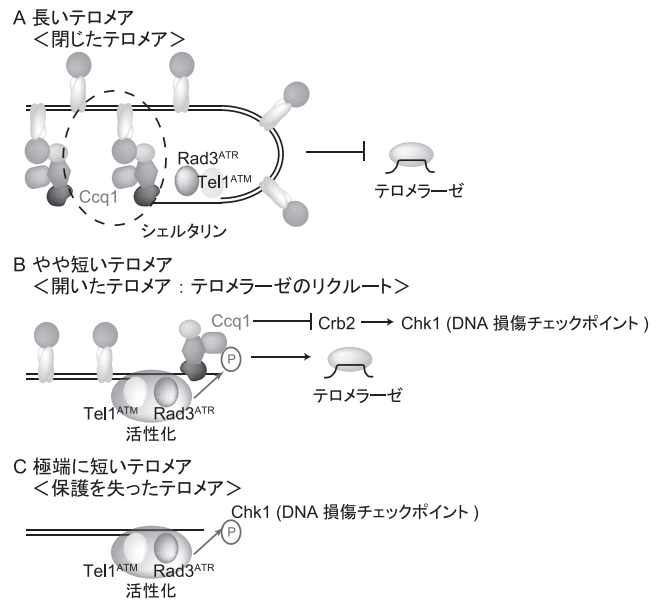


図 3 ATM, ATR を利用したテロメア維持機構のモデル
詳細は本文参照。

停止が起こらない。これらのことを考え合わせ、筆者らはテロメア伸長の際に DNA 損傷認識機構が果たす役割について、以下のようなモデルを考えている¹³⁾ (図 3)。

まずテロメアが十分に長い場合には、二本鎖 DNA 部分に結合する Taz1 がテロメアに十分量存在している。すると、一本鎖 G テイル部分に結合している Pot1 が、Rap1, Poz1, Tpz1 を介して Taz1 と結合することができる機会が多くなると考えられる。この場合、シェルタリンを介して一本鎖 G テイル部分と二本鎖 DNA 部分が閉じた構造をとりますと予想される。すなわち、テロメアは安定したシェルタリンと DNA/タンパク質高次構造を形成することにより保護されており、Tel1^{ATM}, Rad3^{ATR} が活性化することもなく、またテロメアを伸長する逆転写酵素テロメラーゼも作用しない (図 3A)。テロメアが短小化することで Taz1 が二本鎖 DNA 部分に十分に結合できなくなると、G テイルに結合している Pot1 が Rap1, Poz1, Tpz1 を介して Taz1 と結合する機会が減少するため、テロメアは安定した高次構造をとれず、開いた状態になると予想される。すると Tel1^{ATM}, Rad3^{ATR} が活性化し、Ccq1 の 93 番目のトレオニン残基をリン酸化する。このリン酸化を指標にテロメラーゼがテロメアにリクルートされ、テロメア DNA を伸長する。このときにはまだ Ccq1 の働きにより Crb2 がテロメアに局在できないために、Chk1 の活性化は抑制されている (図 3B)。さらにテロメアが短小化した場合には、Ccq1 を含むシェルタリン構成因子が染色体末端から失われるために、Tel1^{ATM}, Rad3^{ATR} によって Chk1 が活性化し、細胞周期の停止や DNA 損傷修復が引き起こされる (図 3C)。

テロメアは細胞分裂のたびに短小化するため、短くなったテロメアではテロメラーゼをリクルートし、テロメアDNAを伸長する必要がある。この過程で、Ccq1が「テロメア短小化によって誘導されるDNA損傷チェックポイントのシグナルの下流(Chk1)への伝達を抑制」しつつ「自らがTel1^{ATM}、Rad3^{ATR}によってリン酸化されることでテロメラーゼをリクルートする起点となりテロメア長を回復させる」という巧妙な方法によって短小化したテロメアにテロメラーゼを作用させているのではないかと考えられる。

6. おわりに

本稿では、分裂酵母においてDNA損傷認識機構がテロメラーゼをテロメアにリクルートする際の役割について概説してきた。動物細胞においてはテロメラーゼのリクルートにDNA損傷認識機構の働きが機能しているかは未解明な部分が多いが、DNA損傷認識機構がテロメアの維持に何かしらの重要な役割を果たしていることは広く生物種を超えて保存されているものと考えられている。しかし動物細胞ではCcq1に相当する因子は未同定である。分裂酵母においてDNA損傷チェックポイントの最終的な活性化を抑制し、かつテロメラーゼのリクルートにも作用する重要な因子であるCcq1に相当する因子が動物細胞にも存在するのか、またCcq1を介して動物細胞でも分裂酵母と同様な機構でテロメア長を維持しているのかどうかを明らかにすることは、単にテロメア維持機構の全貌解明に迫るだけでなく、真核生物が線状染色体を獲得した進化の過程を明らかにするという点でも非常に興味深い。今後のテロメア研究のさらなる発展を期待するとともに、我々も精力的に研究を進めていきたいと考えている。

著者寸描

●山崎晴丈 (やまざき はるとけ)



新潟薬科大学助教(応用生命科学部)。博士(農学)。

■略歴 1975年神奈川県に生る。99年東京大学農学部卒業。2001年同大学院農学生命科学研究科博士前期課程。06年同博士後期課程修了(太田明德教授)。07~11年京都大学大学院生命科学研究科研究員(石川冬木教授)。12年より現職。

■研究テーマと抱負 非増殖細胞でのテロメア維持機構の研究を進めており、生物進化とテロメア維持の関係性の理解をより深めたいと考えています。

■趣味 スキー、ハンドボール、読書(ポピュラーサイエンス、哲学)。

謝辞

静岡大学の山本歩先生、イリノイ大学のToru Nakamura先生には実験材料を供与していただいた。この場を借りて感謝申し上げます。

- 1) Naito, T., Matsuura, A., & Ishikawa, F. (1998) *Nat. Genet.*, 20, 203-206.
- 2) Palm, W. & de Lange, T. (2008) *Annu. Rev. Genet.*, 42, 301-334.
- 3) Metcalfe, J.A., Parkhill, J., Campbell, L., Stacey, M., Biggs, P., Byrd, P.J., & Taylor, A.M. (1996) *Nat. Genet.*, 13, 350-353.
- 4) Smilenov, L.B., Morgan, S.E., Mellado, W., Sawant, S.G., Kastan, M.B., & Pata, T.K. (1997) *Oncogene*, 15, 2659-2665.
- 5) Vespa, L., Couvillion, M., Spangler, E., & Shippen, D.E. (2005) *Genes Dev.*, 19, 2111-2115.
- 6) Moser, B.A., Subramanian, L., Khair, L., Chang, Y.T., & Nakamura, T.M. (2009) *PLoS Genet.*, 5, e1000622.
- 7) Leonardi, J., Box, J.A., Bunch, J.T., & Baumann, P. (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 15, 26-33.
- 8) Webb, C.J. & Zakian, V.A. (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 15, 34-42.
- 9) Miyoshi, T., Kanoh, J., Saito, M., & Ishikawa, F. (2008) *Science*, 320, 1341-1344.
- 10) Teixeira, M.T., Arneric, M., Sperisen, P., & Lingner, J. (2004) *Cell*, 117, 323-335.
- 11) Moser, B.A., Subramanian, L., Chang, Y.T., Noguchi, C., Noguchi, E., & Nakamura, T.M. (2009) *EMBO J.*, 28, 810-820.
- 12) Matsuura, A., Naito, T., & Ishikawa, F. (1999) *Genetics*, 152, 1501-1512.
- 13) Yamazaki, H., Tarumoto, Y., & Ishikawa, F. (2012) *Genes Dev.*, 26, 241-246.
- 14) Moser, B.A., Chang, Y.T., Kost, J., & Nakamura, T.M. (2011) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 18, 1408-1413.
- 15) Carneiro, T., Khair, L., Reis, C.C., Borges, V., Moser, B.A., Nakamura, T.M., & Ferreira, M.G. (2010) *Nature*, 467, 228-232.