

論文内容の要旨

論文題目 ヒトテロメアを特異的に切断するエンドヌクレアーゼに関する研究

氏名 吉武 和敏

[序論]

真核生物の遺伝情報は直線状の染色体に保存されており、その染色体の末端にはテロメアと呼ばれるリピート配列が存在する。繊維芽細胞など通常の体細胞のテロメアは、末端複製問題により細胞分裂の際に少しずつ短縮し、ある限界の長さよりも短くなると、細胞分裂が停止する。これは個体の老化になぞらえ、細胞の老化と呼ばれている。しかし、細胞老化の研究において、テロメアを極限まで短縮させるためには、シャーレの中で細胞を長期間培養する必要があった。そのため、培地交換によるストレスなどが生じ、テロメア短縮による老化ストレスと区別することが難しかった。そこで、短期間のうちに細胞老化を誘導するために、テロメアの高次構造を維持するタンパク質を欠損させてテロメアの高次構造を破壊し、極限まで短縮したテロメアを疑似的に再現した手法が考えられた。この実験系では、テロメア損傷時に p53 と p16INK4a (p16) の発現量がともに増加し、下流の CDK を阻害することで細胞老化が誘導されると報告されている(Smogorzewska et al. 2002)。一方、長期間繊維芽細胞を培養した実験系では、p16 には依存せずに細胞老化が誘導された(Beausejour et al. 2003)。どちらの実験系がテロメアの短縮による細胞老化を正しく反映しているのかこれまで不明であった。

繊維芽細胞など通常の体細胞ではテロメラーゼが発現しておらず、分裂回数に限りがあるが、半永久的に細胞分裂を繰り返すがん細胞では、約 80% の細胞株において、テロメラーゼがテロメアを伸長し、末端複製問題を回避している。また、残り 20% の細胞株では alternative lengthening of telomere (ALT) と呼ばれる機構で、テロメラーゼ活性がないにも関わらずテロメアが伸長される。このようにがん細胞においてテロメアの維持は極めて重要であり、今のところ報告されているがん細胞には、ある一定の長さ以上のテロメアが必ず存在する。そこで、がん細胞のテロメアを短縮させることができれば、がん細胞の種類に依らない遺伝子治療が可能であると期待されている。しかし、現在臨床試験に用いられているテロメラーゼ阻害剤では、細胞分裂に伴いテロメアが短縮するのを待つ必要があり、効果が現れるまでに 1 カ月以上の長い時間がかかる。また 20% と少数ではあるが ALT によってテロメアが維持されるがん細胞には効果が無いといった、原理的な問題点がある。

当研究室で発見された、カイコテロメアに特異的に転移する non-LTR レトロトランスポゾン TRAS1 は、カイコテロメア (TTAGG)_n を特異的に切断するエンドヌクレアーゼドメイン (TRAS1EN、以下 EN) をコードしている (図 1)。in vitro の研究から、EN はカイコテロメアと配列の似たヒトテロメア

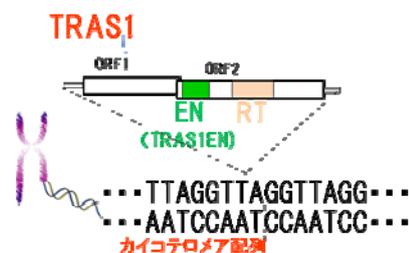


図 1 TRAS1 の模式図
カイコテロメアに転移する TRAS1 は ORF を二つコードしており、ORF2 にはエンドヌクレアーゼドメイン (EN) と逆転写酵素ドメイン (RT) がコードされている。

(TTAGGG)_n に対しても、弱いながらも特異的な切断活性を示した。そこで EN をヒト細胞で発現させて、ヒトテロメアを特異的に切断、短縮し、細胞老化を誘導することができるのではないかと考えた。本研究ではヒト細胞内でテロメアを切断する系を確立し、テロメアの短縮と細胞老化の関係について直接検証することを目的とし研究を行った。

[結果]

1. ヒトテロメア配列を特異的に切断するエンドヌクレアーゼの創出

最初に、EN 単体をヒト細胞で発現させ、テロメアが切断されるか調べたところ、有意な切断が見られなかった。そのため、ヒト細胞内でテロメアを切断するには、より高い活性をもったヒトテロメア切断酵素が必要であると考えられた。そこで EN によるヒトテロメアの切断を促進させる目的で、ヒトテロメアに結合する TRF1 を EN に融合させたキメラタンパク質を作成し、より高い活性をもつ酵素が得られるか調べることにした。TRF1 は中央の TRFH ドメインによって二量体化し、C 末端の Myb ドメインによってヒトテロメアに結合している。TRF1 の Myb ドメインもしくは全長と EN を融合したキメラタンパク質を作成し (図 2A)、大腸菌の発現系を用いて発現・精製を行った。精製したタンパク質を TTAGGG の 80 回の繰り返し配列を含むプラスミド pTR80 と、ヒトテロメア配列を含まないプラスミド pNTR に反応させ、EN 単体に対する各キメラタンパク質の相対活性を測定した (図 2B)。Myb ドメインを融合したコンストラクトについて見てみると、EN が C 末端にあるキメラ M-EN と、N 末端にあるキメラ EN-M、リンカーを長くした EN-NM の pTR80 に対する切断活性は、EN 単体と比較してそれぞれ 26、23、21 倍にまで上昇したのに対し、pNTR に対する切断活性はそれぞれ 4.3、4.4、5.5 倍であった。これより Myb ドメインと EN を融合したキメラは EN と比べ、ヒトテロメアに対してより特異的に高い切断活性をもつことが示された。さらに TRF1 全長とのキメラである T-EN と EN-T の pTR80 に対する切断活性は EN 単体と比較して 45、38 倍であり、TRFH ドメインを含めたキメラタンパク質のほうが、含まないものと比べると切断活性が高いことが明らかとなった。

2. テロメアの人為的な切断に対する細胞の応答

in vitro の実験でヒトテロメアをより高い活性で切断する酵素が得られたので、それらの遺伝子をアデノウイルスによってヒトがん細胞 U2OS に導入し、発現させた。3 日後にゲノム DNA を抽出し、テロメア配列をプローブとしてサザンブロッティングを

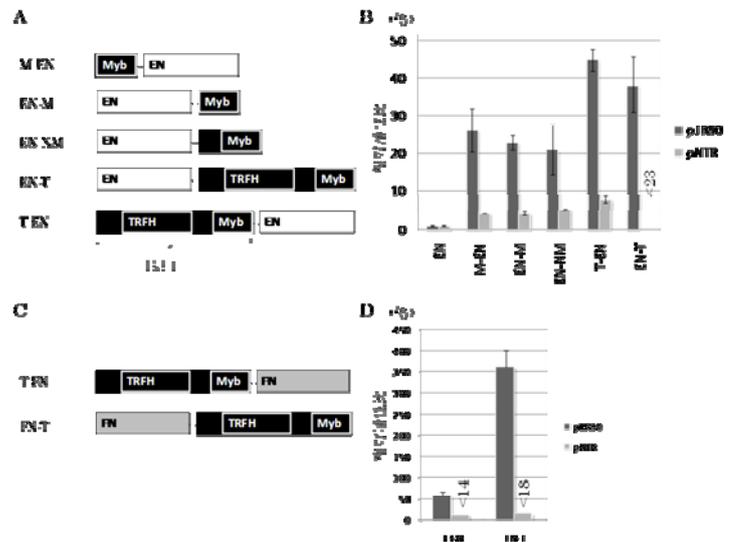


図2 TRF1と融合させたENとFNキメラタンパク質の相対活性比 (A)作成したENとTRF1のキメラタンパク質の模式図。(C)FNとTRF1のキメラタンパク質の模式図。(B, D)EN単体のpTR80に対する切断活性を1とした時のキメラタンパク質の相対活性。

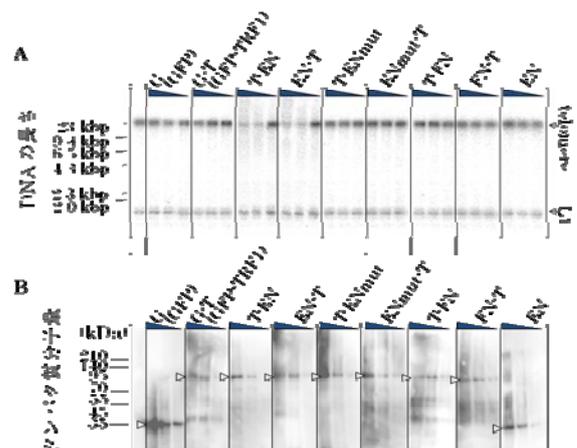


図3 U2OS細胞内におけるテロメアの切断 (A)各キメラタンパク質を発現するウイルスを感染させたU2OS細胞のテロメア長を測定した。内部標準としてL1の配列を用いた。各ウイルス濃度は左から順にMOI 100, 10, 1。(B)キメラタンパク質の発現量をHA抗体を用いたウェスタンブロットにより検出。

行い、テロメア長を測定した(図 3A)。U2OS 細胞は ALT によってテロメアが維持されているがん細胞で、そのテロメアは非常に長く、23 kbp 以上の長さがある。EN のキメラである T-EN、EN-T が組み込まれたアデノウィルスに感染させた細胞では MOI 100、10 のウィルス濃度でテロメアのシグナル強度が減少した。内部標準として、ヒトゲノムに最も多く含まれる転移因子である L1 の配列を用いたが、そのバンドパターンに変化はなく、T-EN、EN-T によるテロメアの特異的な切断が強く示唆された。EN の活性中心である 258 番目のヒスチジンをアラニンへと置換した切断活性のない変異体 ENmut のキメラタンパク質では、テロメアの切断が全く見られなかった。また、キメラタンパク質の発現量を解析したところ(図 3B)、ウィルス濃度に比例したタンパク質の発現が見られ、EN のキメラと ENmut のキメラとで発現量に差がないことが確かめられ、テロメアの切断は EN の活性によることが確認された。意外なことに *in vitro* ではヒトテロメア配列を切断した FN のキメラタンパク質は、*in vivo* では EN のキメラと同程度に発現しているにも関わらず全くテロメアを切断しなかった。細胞内では EN のキメラのほうが FN のキメラよりもテロメアを切断する活性が高いことが明らかとなった。

次に種々のキメラタンパク質を発現するアデノウィルスを U2OS および HFL-1 細胞に感染させ、細胞を培養した(図 4A)。その結果、EN-T を発現させた U2OS 細胞では 2 週間ほどで細胞増殖が阻害され始めた。切断活性のない ENmut-T を発現した細胞の増殖速度は、GFP を発現した細胞と有意な差がなく、EN の切断活性により増殖が阻害されていることを確認した。テロメアを伸長しない繊維芽細胞 HFL-1 では EN-T による増殖の阻害効果が著しく、17 日目には細胞の増殖が完全に停止していた(図 4B)。この細胞増殖の阻害が細胞老化によるものかを調べるため、細胞老化のマーカとして用いられている SA β ガラクトシダーゼ染色を行った(図 5)。EN-T を発

現した細胞は、SA β ガラクトシダーゼ染色陽性の割合が 70% に上昇し、老化した細胞に特徴的な扁平な形となっており、EN-T の発現により細胞老化が誘導されていることが明らかとなった。テロメアの切断が何日目から起こるのかサザンブロッティングによって調べたところ、感染後 7 日目にはテロメアの切断が観察された(図 6A)。ALT でテロメアが維持される U2OS 細胞においても、テロメアの切断、短縮によって細胞増殖が阻害されることが示された。また、EN-T を発現した細胞で、テロメア損傷に応答する遺伝子に変動しているか調べたところ、p53 はテロメア切断と同じく 7 日目から

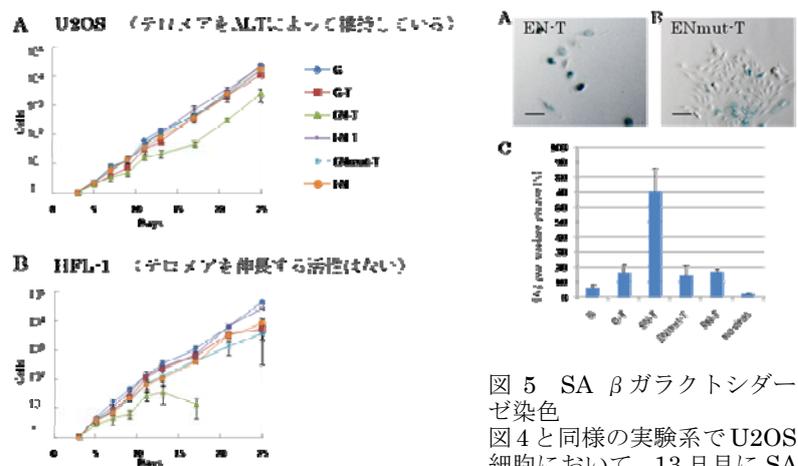


図 4 EN-T による細胞増殖の抑制
各タンパク質を発現するアデノウィルスを 8.8×10^5 pfu/ml の濃度で培地に加え、培養後 8 日目と細胞数を測定した。(A) U2OS 細胞、(B) HFL-1 細胞

図 5 SA β ガラクトシダーゼ染色
図 4 と同様の実験系で U2OS 細胞において、13 日目に SA β ガラクトシダーゼ染色を行った。(A, B) 細胞の染色像。(C) SA β ガラクトシダーゼの割合と細胞数を測定した。(A) U2OS 細胞、(B) HFL-1 細胞

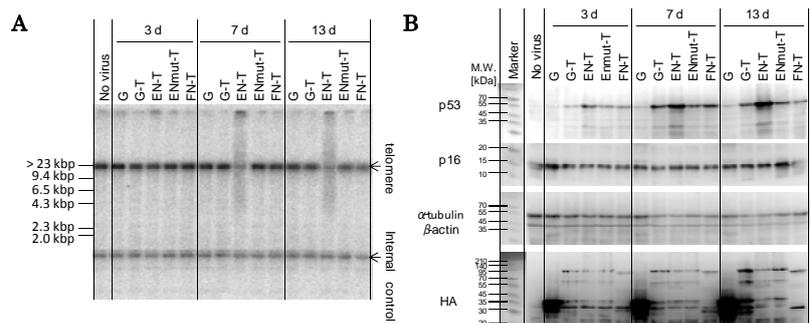


図 6 テロメアの切断とテロメア損傷シグナルの活性化
図 4 と同様の実験系で U2OS 細胞に関するテロメアの切断の経時変化(A)と、p53、p16 の発現量の経時変化を調べた(B)。コントロールとして α -tubulin と β -actin を用いた。また、HA タグによるキメラタンパク質の検出により、EN-T と ENmut-T の発現量が等しいことを確認した。

発現量が増加していたが、p16は13日目になっても変化は見られなかった(図6B)。テロメアが短縮した際の応答として、繊維芽細胞を長期間培養する実験系ではp53のみが活性化し、テロメアの高次構造を維持するタンパク質を欠損させる実験系ではp53、p16がともに活性化することが報告されていたが、本研究の結果からは前者の結果が支持された。

3. テロメア切断による細胞増殖阻害効果の応用

EN-Tによるテロメアの切断により細胞増殖が抑制されることがわかったので、がん細胞特異的にEN-Tを発現させることができれば、がん細胞の増殖を特異的に抑制することができると考えた。がん細胞の80%ではテロメラーゼが活性化しており、そのプロモーター(hTERTプロモーター)は多くのがん細胞で活性がある。EN-Tをがん細胞で十分量発現させるために、hTERTプロモーターによって、がん細胞で特異的に増殖するアデノウイルスベクター(CRAd)に

EN-Tを組み込んだ。CRAdが増殖可能ながん細胞LoVo, HT-1080,

HeLaとCRAdが増殖しないと考えられる繊維芽細胞HFL-1の計4つの細胞に対する細胞毒性を比較した。その結果CRAd EN-Tは、4つの細胞すべてにおいて、コントロールとなるCRAd G, CRAd G-Tよりも低濃度で細胞の増殖を阻害することが明らかとなった(図7)。さらに、現在臨床研究で用いられるp53よりもEN-Tを発現するCRAdのほうが細胞に対する毒性が高かった。p53の細胞増殖を阻害する効果は、p53が欠損したがん細胞では高いが、これら3つのがん細胞株では全てp53自体は正常に機能しているため、p53の強制発現による増殖の阻害は起こりづらいと考えられる。EN-Tはp53が正常に機能しているこれらのがん細胞でも効果的に細胞増殖を阻害しており、治療用遺伝子としてp53より幅広いがん細胞で有効であることが示唆された。問題は、繊維芽細胞HFL-1においてもCRAd EN-Tによる増殖阻害が見られた点である。原因はわからないが、タンパク質の発現量がHFL-1でも増加してしまっただけでなく、今後、CRAdとは別の遺伝子導入系を用いてこの問題を解決し、がん細胞特異的にEN-Tを発現することができれば、がんの新しい遺伝子治療法となりうると期待される。

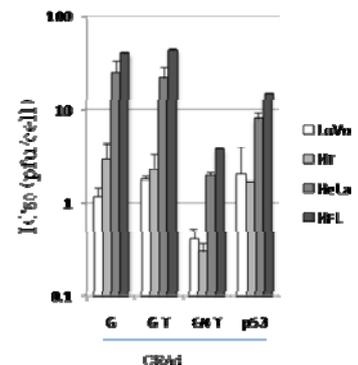


図7 細胞毒性の比較
各ウイルスの50%増殖阻害濃度(IC₅₀)を測定した。IC₅₀の値は低いほど細胞に対する毒性が高いことを示す。

[結論]

ENとTRF1の融合により、テロメアを特異的に切断するエンドヌクレアーゼを創出することができた。これまで短期間のうちに細胞内でテロメアを短縮させることは不可能であったが、本研究において実際にテロメアを切断すると、p53の発現上昇が起これ、短期間で細胞老化が誘導された。テロメアの高次構造を破壊する実験系と比較して、本手法はテロメアの短縮を伴う自然な状態に近い細胞老化を誘導しうると考えられ、本研究によってテロメアの短縮に起因する細胞老化にはp16の活性化が不要であると示唆された。また、EN-Tの発現により、テロメラーゼを発現しているLoVo, HT-1080, HeLa細胞のみならず、テロメラーゼ阻害剤が機能しないALTによるテロメア伸長を行うU2OS細胞においても細胞増殖が阻害されていた。細胞増殖に必要な不可欠なテロメアを切断することで、広範ながん細胞の増殖を妨げることが可能であり、将来的に治療用遺伝子としての応用が期待される。

[発表論文]

- [Yoshitake K.](#), Waki S., Ueda H. Dimerization-based homogeneous fluorosensor proteins for the detection of specific dsDNA. Biosens Bioelectron. 14;23(8):1266-71. (2008)
- [Yoshitake K.](#), Aoyagi H., Fujiwara H. Creation of a novel telomere-cutting endonuclease based on the EN domain of telomere-specific non-LTR retrotransposon, TRAS1. in press.