テロメアの機能

1. 末端保護作用

現在では，真核生物のゲノム遺伝子は，核の中で染色体として機能することは当たり前のこととなっているが，遺伝子の本体がDNAであることが証明される前の20世紀前半では，そのことは自明ではなかった．しかし，多くの研究者たちが，核の中で特有の構造をとる染色体こそが生物に特有の性質を与える遺伝物質ではないかと気づいていた．特に，ショウジョウバエの唾腺染色体を用いた研究が遺伝子構造の理解に大きな貢献をした．

ショウジョウバエの幼虫では，唾腺腺をはじめとする

テロメアの機能と構造

石川冬木

京都大学大学院生命科学研究科

いくつかの組織は，唾液成分などの大量のタンパク質を合成する必要性から，細胞分裂を行わずに染色体DNAを連続して複製する．その結果，唾腺細胞1個あたりに含まれる染色体は，同じ配列をもった莫大なコピー数のDNAが正確に側面で並んだいわゆる唾腺染色体（あるいは唾腺染色体）をつくる．唾腺染色体は巨大であるため，分裂期ではなくとも顕微鏡で容易に観察できる．さらに，同じ配列をもつDNAが正確に並んでいるため，その塩基配列のかたよりや結合タンパク質の多寡によって，唾腺染色体は染色により，その位置によって特有の縞模様を呈する．

H. J. Muller は20世紀前半に活躍したショウジョウバエの遺伝学者である．彼は，ショウジョウバエにX線

連載開始にあたって：染色体テロメア：老化，がん化，進化

2009年のノーベル医学生理学賞は、テロメア研究の偉大な開拓者である Blackburn 博士、Greider 博士、そして Szostak 博士に贈られた。しかし、テロメア研究は、その概念の確立から、今日的な分子生物学までを含めると、20世紀前半に始まり、現在も活発に進展しつつある歴史の長い研究分野であり、3人の受賞者は、テロメアの分子基盤の理解を築きテロメラーゼの存在を証明した、いわば「中興の祖」である。

クロマチン研究の醍醐味のひとつは、いかに生物が細胞や個体内外の環境変化に反応して、自身のもつクロマチンの機能や構造を変化させ、最終的な環境変化に適応し生き延びることが可能な子孫を残すかを理解することである。このような現象は、長い時間をかけて起こる生物種の系統進化はもちろん、年や月の単位で起こる老化、がん化にも

大きく関係する。テロメアは細胞分裂のたびに短小化し、がん細胞ではテロメラーゼの活性化によってそれを阻止できたとしても、テロメア機能不全は染色体末端どうしの融合の原因となって、がん細胞に特徴的なゲノム不安定性を惹起する。このように、しばしば「染色体のアキレス腱」にたとえられるテロメアは、生物種やがん細胞の進化をもたらす原動力となる。

このシリーズでは、はじめの2回にわたって、テロメアの基本的な機能構造の分子生物学的知見を紹介し、後半の3回で、テロメアの機能不全がどのように細胞の老化やがん化をもたらすのかについて、最新の知見を紹介する。このシリーズにより、テロメア研究をさらに開拓しようとする若い研究者がひとりでも生まれれば望外の喜びである。

(石川冬木，京都大学大学院生命科学研究科)

を照射し、その個体から生まれる子孫の唾腺染色体の構造を調べていた。その結果、子孫個体が示すさまざまな表現型の異常と唾腺染色体の構造異常との間に相関があることを観察した。このことは、X線照射によって唾腺染色体の構造異常を誘導することができること、そして、より重要なことは、唾腺染色体の構造変化が表現型の変化をもたらす、すなわち唾腺染色体こそが遺伝物質

であることを示唆していた。

彼は、異常染色体の構造を解析する過程で、途中で切断された染色体断片どうしが切断点で融合することはあっても(図1-A)、正常染色体末端が他の染色体切断点と融合することがない(図1-B)ことを観察した。このことから、正常染色体末端は、人工的につくられた染色体断端とは異なり融合反応から保護されていると考え、これをテロメアと名付けた(図1-C)。すなわち、テロメアの第一の機能は染色体末端の保護である。

図1 ■ Muller の X 線照射実験

(A) 染色体内部で位置が逆向きになることはしばしば観察された。これは、X線により、染色体内部の2箇所(矢頭で示す)で切断が起き、その後、切断部分が逆向きに融合修復されたものと解釈される。(B) しかし、染色体末端部分は、内部切断領域と融合することは観察されなかった。(C) 以上のことは、染色体の生理的な末端は、X線照射などによって生じた内部切断点と異なり融合反応をしないことを意味している。

2. テロメアの複製

1953年に、ワトソンとクリックによって、DNAの二本鎖構造が解明され、そのモデルから直ちに半保存的複製が予言された。一本のDNA鎖は、5'→3'方向の極性をもち、二本鎖DNAのそれぞれの鎖は逆向きの極性を示す(図2-A)。すべてのDNA合成酵素は、鋳型DNA鎖を3'→5'の向きに読んで、新生鎖を5'末端より3'末端に向かって合成する(図2-B)。今、DNA合成酵素が二本鎖DNAのそれぞれの鎖を鋳型に用いてDNAを複製しようとするとき(図2-C、右向きに複製が進んでいる)、以上の条件から、片方の新生鎖は、DNA合成酵素の進む向き(右向き)と同じ方向に合成され、もう一方の新生鎖は逆向き(左向き)に合成される。前者をリーディング鎖合成、後者をラギング鎖合成と呼ぶ。ラギング鎖合成では、短い岡崎フラグメントを合成しながらDNA合成酵素は後戻りをし、最終的には岡崎フラグメントが結合して一本の新生鎖となる。一つ一つの岡崎フラグメントの長さは、200~300塩基長である。また、こ

図2 ■ 末端複製問題

(A) 二本鎖 DNA のそれぞれの鎖の極性. (B) DNA 合成酵素は、鋳型 DNA 鎖を 3'→5' 方向に読み取りつつ、新生鎖を 5'→3' 方向に合成する. (C) 二本鎖 DNA の複製は、リーディング鎖合成とラギング鎖合成からなる. (D) ラギング鎖合成は、RNA プライマーを用いて合成が開始される岡崎フラグメントが不連続に合成されて起こる. (E) テロメア DNA のラギング鎖合成では、その末端が完全に複製されないことが予想される.

の場合、岡崎フラグメントの合成開始にあたって、約 10 塩基長の RNA プライマーが用いられる (図 2-D、波線). RNA プライマーは、上流より合成されてきた別の岡崎フラグメントの伸長によって最終的に DNA に置き換わる.

今、染色体 DNA 末端、すなわちテロメア DNA が複製されることを考えてみよう (図 2-E、DNA 末端は右端である). リーディング鎖合成は、鋳型末端まで合成を行なうが、ラギング鎖合成ではそれが難しいことがわかる. まず、鋳型 DNA の内側に向かって進む岡崎フラグメントの合成が、鋳型 DNA の真の末端より開始することが保証されていない. さらに、最末端の岡崎フラグメントには、さらに上流から合成を進めてくる岡崎フラグメントが存在しないため、その合成開始に用いられた RNA プライマーは DNA に置き換えることができないと予想される. 以上の 2 つの理由から、テロメア DNA のラギング鎖合成は不完全であり、複製のたびにテロメアは短小化すると予想された. これを末端複製問題と呼ぶ.

テロメア DNA 配列

それでは、末端複製問題は実際に生体内で起きているのでしょうか? その問いに答えるためには、テロメア DNA の長さ (以下、テロメア長と呼ぶ) を測定する必要があり、そのためには、テロメア DNA 配列 (以下、テロメア配列と呼ぶ) を知る必要がある. テロメア配列を同

定することには、多くの困難が伴った. 以下に述べるように、テロメア配列は単純な繰り返し配列であり、制限酵素切断部位が存在しないために、クローニングが容易ではなかった. また、テロメア配列には、タンパク質をコードするような遺伝子が存在せず、それを同定するためのユニークなプローブの設計が困難であった.

2009 年のノーベル医学生理学賞を受賞した Blackburn は、このような難問をモデル生物を駆使することで見事に解決したのである. 繊毛虫は単細胞で生活する動物であり、細胞表面の繊毛を用いて水中で活発に運動をする. 繊毛虫は、大核と小核と呼ばれる 2 種類の核をもつ. 小核は他の生物の核と同じように、比較的少数の染色体を収納するが、それらの染色体上の遺伝子は転写されてタンパク質を生産することはない. 一方、大核は小核から誘導されて形成されるが、その過程で、小核にあった染色体サイズの長い DNA が個々の遺伝子サイズに切断される. さらに、rRNA をコードする rDNA など、その転写産物が大量に必要とされる遺伝子については、小核から大核が形成される過程でそのコピー数が増加する. 繊毛虫の中でも、テトラヒメナはしばしば実験に用いられ、その大核には数千から数万コピーの遺伝子サイズのミニ染色体が存在している. これらのミニ染色体は線状であり、それぞれにテロメアを有している. Blackburn は、繊毛虫大核がテロメアを大量に含むことに注目してテロメア配列を決定し、それが TTGGGG の 6 塩基配列の繰り返しであることを発見した⁽¹⁾.

ゲノム中に大量に存在する繰り返し配列は、ゲノム

DNA を熱変性させた後、温度を下げて DNA のアニーリングをさせると、コピー数が多いために速く二本鎖 DNA に戻る性質がある。このことを利用して、Moyzis らは、ヒトゲノム繰り返し配列のライブラリーを作成したところ、TTAGGG 繰り返し配列が高頻度で得られた。これがヒトのみならず調べられたすべての脊椎動物のテロメアに局在することを発見した。こうして、絨毛虫からヒトに至るまで、多くの真核生物のテロメア配列は、グアニンに富む短い DNA の繰り返し配列であることがわかった⁽²⁾。

ヒトテロメア配列が明らかにされると、テロメア長を測定することができる。1990 年、Harley と Greider は、ヒト正常線維芽細胞において、細胞分裂回数の亢進とともにテロメア長が短小化し、それがある長さまで短くなると、細胞は増殖を非可逆的に停止することを示した⁽³⁾。すなわち、末端複製問題は生体内で実際に起こるのである。

細胞増殖に伴うテロメアの短小化がどのような機構で起こるのかは、現在に至っても十分に明らかではない。ヒト細胞では、1 回の細胞分裂あたり約 50~200 塩基対のテロメアが短小化するといわれ、これは、岡崎フラグメントの分だけ失われると考えることでよく説明される。SV40 DNA を用いた試験管内複製系を用いても同様の結果が得られている⁽⁴⁾。一方、出芽酵母では、1 回の細胞分裂あたりに失われるテロメア DNA はわずかに数塩基であるとされ、これは岡崎フラグメントではなく、RNA プライマー分の長さに相当する。

テロメアクロマチン

テロメアが DNA 末端の保護やテロメア DNA の複製をはじめとする諸機能を果たすためには、テロメア繰り返し配列と、それに結合する多くのテロメア特異的あるいは非特異的な結合タンパク質がテロメアクロマチンを構成することが必要である。テロメア結合タンパク質には、ほぼ常にテロメアに結合していると考えられる構成的なタンパク質と、細胞周期のある特定の時期やテロメアが短小化したときなど、特異的な時期にはじめて結合するものとに分類することができる。今日、前者の構成的テロメア結合タンパク質は比較的良好に理解されており、6 種類のタンパク質からなる複合体シェルタリン (shelterin) が中心的な役割を果たすことが知られている。一方、機能・時期特異的なテロメアタンパク質は、DNA 損傷や細胞周期制御などのテロメアに限らない一般的な機能をもつタンパク質が、ある条件下ではテロメ

アにおいて重要な役割を果たしていることが多い。今回は、シェルタリンについて解説し、機能・時期特異的なテロメアタンパク質については、第 2 回で概説したい。

すでに述べたように、脊椎動物テロメア DNA は、(TTAGGG・CCCTAA) の 6 塩基対からなるテロメア繰り返し配列がタンデムに繰り返して構成されており、ヒトの場合、約 20~5 kb の長さを示す。グアニンに富む鎖を G 鎖、シトシンに富む鎖を C 鎖と呼ぶ。このテロメア繰り返し配列よりも内側（セントロメア側）は、サブテロメア配列と呼ばれ、テロメア繰り返し配列と、それとは別の繰り返し配列であるサブテロメア繰り返し配列が混成する領域である。ヒトでは、サブテロメア領域には遺伝子はほとんど存在しない。

一方、テロメア繰り返し配列の真の末端は、二本鎖 DNA ではなく、TTAGGG の繰り返しからなる約 50~200 塩基の一本鎖 DNA である。これを G テイルと呼ぶ。

このように、テロメアは、サブテロメア領域、二本鎖テロメア繰り返し領域、末端の G テイルの 3 種類の DNA から構成されるため、これらに結合するタンパク質も、これらの領域ごとに異なると予想される。以下、3 種類のクロマチンタンパク質に関して述べる。

1. ヌクレオソーム

テロメアクロマチンにヒストンオクタマーからなるヌクレオソームが存在するののか否かはまだ明確ではない。二本鎖テロメア繰り返し領域にもヌクレオソームが存在することが報告された⁽⁵⁾。しかし、以下に述べるテロメア特異的なタンパク質とヌクレオソームがいかなる比率でどのように混在しているのかは明らかではない。

2. シェルタリン

de Lange らの精力的な研究により、哺乳類二本鎖テロメア繰り返し DNA に特異的に結合するタンパク質として TRF1 および TRF2 (telomere repeat factors 1 and 2) が同定された。これらは、タンパク質 C 末端領域に DNA 結合に関わる Myb ドメインを共通してもつものの、その生理的機能は大きく異なる。

TRF1 は、テロメレーズがテロメア DNA に作用することに拮抗し、その負の制御因子である。長いテロメアは、多くの TRF1 が結合しているためにテロメレーズへの拮抗作用が強く、結果としてテロメレーズは作用しにくいと考えられている。最近、TRF1 は、テロメア DNA の複製に重要な役割を果たしていることが報告された。一方、TRF2 は、テロメア末端保護に必須であり、そのノックアウト細胞では、テロメア末端が互いに融合す

図3 ■ ヒトシェルタリン (A) および分裂酵母シェルタリン (B)
ともに、二本鎖テロメア DNA と末端の一本鎖テロメア DNA を架橋する構造をとり得る。

る。このように、テロメアの重要な機能であるテロメア DNA 複製と末端保護は、TRF1 と TRF2 が分業して貢献している。

Cech らのグループによって、繊毛虫の一本鎖テロメア配列に特異的に結合する二量体タンパク質複合体が生化学的に同定された。その後、分裂酵母およびヒトでそのホモログが同定され、Pot1 (protection of telomeres) および TPP1 と呼ばれている。これらのタンパク質の際立った特徴は、それぞれが OB-fold (oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold) と呼ばれる一本鎖 DNA 結合やタンパク質間相互作用に関わるドメインを複数もつことである。Pot1 は、その OB-fold を介して G テイルに直接的に結合する。一方、TPP1 は、Pot1 と結合して、その DNA 結合能を亢進させるとともに、自身はテロメラーゼと相互作用をして、その活性制御に関わるものと信じられている。

以上のように、テロメア繰り返し配列の二本鎖部分に結合する TRF1, TRF2 と末端の一本鎖部分に結合する Pot1-TPP1 が同定された。その後、これらの DNA 結合タンパク質にタンパク質間相互作用を介して結合するタンパク質として、TRF2 結合タンパク質 Rap1, TRF1 と TRF2 の両方に結合する TIN2 が同定された。さらに興味深いことに、TIN2 は TPP1 と結合することから、TRF1, 2 と Pot1 は TIN2, TPP1 を介して、二本鎖テロメア繰り返し領域と一本鎖領域を架橋しうる 6 種類のタンパク質からなる複合体を形成することが明らかになった。これをシェルタリンと呼ぶ (図 3-A)⁽⁶⁾。

シェルタリンは、テロメア機能を発現するための基本構造と考えられている。それは、分裂酵母でも同様の構造が同定されているからである (図 3-B)⁽⁷⁾。

3. CST 複合体

しばしば、出芽酵母、分裂酵母、ヒトは互いに同じ程度の系統学的距離があるといわれる。すなわち、出芽酵母と分裂酵母は、酵母としてひとくりにされるが、進化上は大きく異なる道筋をたどった。先に述べたように、分裂酵母とヒトは同じシェルタリン複合体をもち、テロメア構造に関してきわめてよく似ているように見える。一方、これまで、出芽酵母テロメアに関しては、精力的な研究がなされてきたものの、シェルタリン様構造は発見されていない。出芽酵母テロメアクロマチンで特徴的な複合体として、一本鎖テロメア DNA に結合する Cdc13-Stn1-Ten1 複合体がある。これは、テロメア保護に必須であり、またテロメラーゼ制御とテロメア DNA 複製にも関わるということが報告されている。本複合体構成因子の特徴は、Pot1 や TPP1 と同様に、OB-fold を複数もち、それらを介して複合体形成をしたり一本鎖テロメア DNA と結合することである。最近、出芽酵母 Cdc13-Stn1-Ten1 複合体のヒトホモログ Ctc1-Stn1-Ten1 複合体 (CST 複合体) が報告された⁽⁸⁾。出芽酵母およびヒト CST 複合体は、OB-fold をもつ 3 因子が三量体を形成するという点で、DNA 複製に必要な RPA (replication protein A) 複合体と類似している。ヒト CST 複合体は、テロメアの一部に共局在する一方、明らかにテロメアではない領域にも点状に局在することから、その機能はテロメア特異的なものとそうでないものを併せもつことが想像される。本複合体の機能解析が待たれる。

*

テロメア研究の歴史の概略と、テロメア構成因子について述べた。今回は、テロメラーゼをはじめとするテロメアの細胞周期特異的な機能について解説したい。

文献

- 1) E. H. Blackburn & J. G. Gall : *J. Mol. Biol.*, **120**, 33 (1978).
- 2) R. K. Moyzis, J. M. Buckingham, L. S. Cram, M. Dani, L. L. Deaven, M. D. Jones, J. Meyne, R. L. Ratliff & J. R. Wu : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 6622 (1988).
- 3) C. B. Harley, A. B. Futcher & C. W. Greider : *Nature*, **345**, 458 (1990).
- 4) R. Ohki, T. Tsurimoto & F. Ishikawa : *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 5753 (2001).
- 5) V. L. Makarov, S. Lejnine, J. Bedoyan & J. P. Langmore : *Cell*, **73**, 775 (1993).
- 6) W. Palm & T. de Lange : *Annu. Rev. Genet.*, **42**, 301 (2008).
- 7) T. Miyoshi, J. Kanoh, M. Saito & F. Ishikawa : *Science*, **320**, 1341 (2008).
- 8) Y. Miyake, M. Nakamura, A. Nabetani, S. Shimamura, M. Tamura, S. Yonehara, M. Saito & F. Ishikawa : *Mol. Cell*, **36**, 193 (2009).