

ECTR DNA-タンパク質複合体の単離と
テロメア結合タンパク質の解析

2003

橘 典子

ECTR DNA-タンパク質複合体の単離と
テロメア結合タンパク質の解析

橋 典子

目次

略語一覧.....	4	7. 各フラクションのタンパク質の濃縮、解析 A.....	29
緒論		8. 銀染色法.....	30
1. 末端複製問題.....	5	9. 各フラクションのタンパク質の濃縮、解析 B.....	30
2. テロメアとは.....	6	10. Western blot 解析.....	30
3. テロメア結合タンパク質の同定と機能.....	8	結果及び考察	
4. テロメラーゼの発現.....	11	1. 分裂期同調培養の条件検討.....	32
5. ALT 細胞の特徴.....	11	2. 細胞の調製.....	33
6. 老化、がん化とテロメアの関係.....	14	3. 冷却遠心機による遠心分離.....	33
7. 本研究の目的.....	15	4. ショ糖密度勾配超遠心による分離.....	35
I. ALT 細胞の特徴		5. リボソームの除去.....	37
序論.....	16	6. 各フラクションのタンパク質解析.....	40
材料及び方法		7. ECTR フラクションの再遠心、解析.....	42
1. 細胞培養.....	16	結論.....	43
2. telomere PNA FISH (分裂期の細胞).....	16	III. ECTR フラクションに含まれるタンパク質の同定	
3. telomere PNA FISH (間期の細胞).....	17	序論.....	44
4. テロメアDNAとタンパク質の二重染色.....	17	材料及び方法	
5. Southern blot解析.....	18	1. Western blot 解析.....	44
結果及び考察		2. 免疫沈降法.....	45
1. 分裂期の ALT 細胞を用いた telomere PNA FISH.....	19	3. 質量分析法.....	45
2. 間期の ALT 細胞を用いた telomere PNA FISH.....	20	4. テロメア DNA と Hsp70 の二重染色.....	46
3. APBs に存在するタンパク質とテロメア DNA の共局在の検討.....	21	結果及び考察	
4. KMST-6 細胞の Southern blot 解析.....	23	1. TRF2 の検出.....	46
結論.....	25	2. ECTR フラクションに含まれるタンパク質の質量分析による同定.....	49
II. ECTR DNA-タンパク質複合体の単離と複合体の特徴		3. Hsp70 とテロメアの共局在の検討.....	50
序論.....	26	結論.....	51
材料及び方法		総括.....	52
1. 分裂期 同調培養の条件検討.....	27	参考文献.....	53
2. 細胞の調製.....	27	謝辞.....	59
3. ECTR DNA-タンパク質複合体の分離.....	28		
4. フラクションからの DNA と RNA の抽出.....	28		
5. Southern blot 解析.....	29		
6. rRNA の検出.....	29		

略語一覧

ACN	:	acetonitrile
AGPC method	:	acid guanidinium-phenol-chloroform method
ALT	:	alternative lengthening of telomeres
APBs	:	ALT-associated PMLbodies
cycling-PRINS	:	cycling oligonucleotide-primed <i>in situ</i> synthesis
DAPI	:	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	:	Dulbecco's modified Eagle's medium
ECTR DNA	:	extra-chromosomal telomere repeat DNA
ESI	:	electrospray ionization
EtBr	:	ethidium bromide
FBS	:	fetal bovine serum
FISH	:	fluorescence <i>in situ</i> hybridization
FITC	:	fluorescein isothiocyanate
IP	:	immunoprecipitation
MALDI-TOF	:	Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Time of flight
PBS	:	phosphate buffered saline
PC	:	positive control
PDL	:	population doubling level
PMF	:	Peptide Mass Fingerprint
PML	:	promyelocytic leukemia
PNA	:	peptide nucleic acid
SDS-PAGE	:	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SSC	:	standard saline citrate
sup	:	supernatant
TAE buffe	:	Tris-Acetate-EDTA buffer
TCA	:	trichloroacetic acid
TRF	:	terminal restriction fragment
TRF1	:	telomere repeat binding factor 1
TRF2	:	telomere repeat binding factor 2

緒論

1. 末端複製問題

生物の特徴は、遺伝情報を担った DNA によって継承される。つまり、DNA が細胞分裂前に DNA ポリメラーゼによって半保存的に複製されることによって、生物の特徴が子孫に受け継がれていく。DNA ポリメラーゼは 5'→3' 方向に DNA を合成するため、非対称構造をとる複製フォークでは、5'→3' 方向の DNA 合成は連続的に行われるが、3'→5' 方向の DNA 合成は 5'→3' 方向に合成される岡崎フラグメントと呼ばれる短い DNA 分子を作ることによって不連続に行われる。連続的に合成される側の鎖をリーディング鎖、不連続に合成される側の鎖をラギング鎖という。また、DNA ポリメラーゼは、鋳型と塩基対を形成したポリヌクレオチド鎖の 3'-OH にしかヌクレオチドを付加することができないので、ラギング鎖合成時には特別のプライマーが必要となる。そこで、ラギング鎖では、プライマーゼによって短い RNA プライマーが合成され、DNA ポリメラーゼがこれを伸長し岡崎フラグメントが合成される。その後、DNA 修復系によって、RNA プライマーが除去され、DNA に置き換えられ、DNA リガーゼによってつながれ、長い DNA 鎖ができる。真核生物の染色体 DNA は線状であるため、リーディング鎖合成は染色体末端まで行われるが、ラギング鎖合成は末端まで行われないう可能性がある。これは、岡崎フラグメントの合成開始が染色体の最末端からおこるとは限らないためと、最末端の岡崎フラグメントの合成開始に用いられた RNA プライマーが最終的に DNA に置き換わる機構が知られていないためである。これらの問題のために、DNA 複製ごとに染色体 DNA の末端の長さが短くなっていく [1]。これを末端複製問題という (Fig. 1)。実際、正常な体細胞では、テロメアは完全には複製されず、細胞分裂ごとに染色体末端が 50~200bp ずつ短縮する。末端複製問題による染色体末端のテロメアの短縮が、細胞の分裂寿命の限界の決定に関係しており、細胞老化の機構となりうると考えられている [2]。

ところで、このメカニズムではラギング鎖の合成が問題となり、リーディング鎖合成でできた末端は平滑であるのに対して、ラギング鎖合成でできた末端は 3' 突出になり、全テロメアの半分が平滑末端、半分が 3' 突出末端になる。ところが、全てのテロメアは 3' 突出末端をもつことが明らかになり、新たな末端複製問題が提唱された [3]。3' 一本鎖突出側がラギング鎖合成の鋳型になり、これよりも相対的に短い側がリーディング鎖合成の鋳型となる。DNA 伸長後、後者の鋳型の 5' 末端はエキソヌクレアーゼによって削られ、新たな 3' 突出末端が形成される。これらの結果、Fig. 1 に示すように、リーディング鎖合成で出来た染色体は、鋳型となる親鎖が短いために、複製前の染色体よりも短縮したかたちになる。つまり末端複製問題は、リーディング鎖合成の問題となるということが出来る。

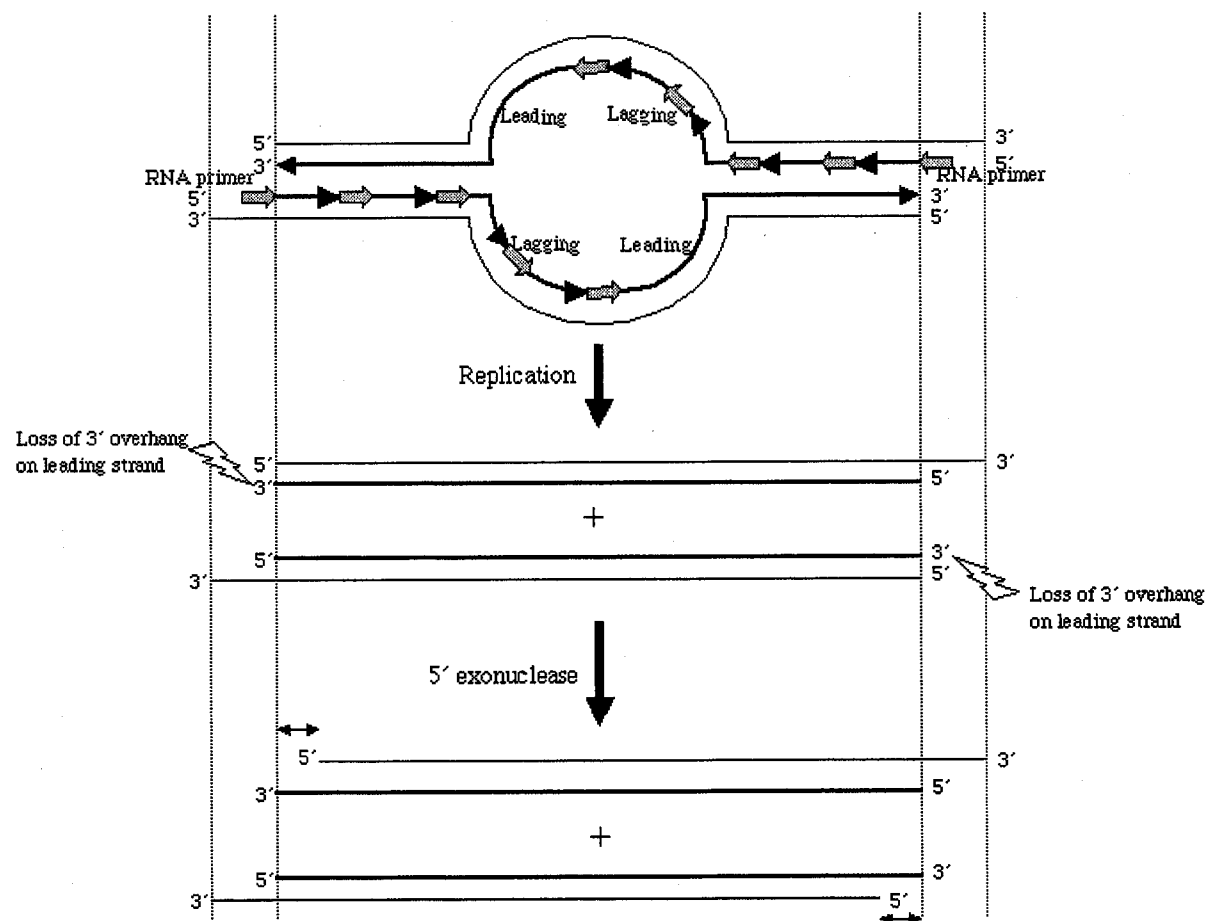


Fig. 1. The end replication problem

真核生物の染色体 DNA は線状であるため、リーディング鎖合成は染色体末端まで行われるが、ラギング鎖合成は末端まで行われない可能性がある。このために、DNA 複製ごとに染色体 DNA の末端の長さが短くなっていく。

2. テロメアとは

1930年代にMcClintockやMullerらによって、末端部分が、染色体融合から染色体を保護し、染色体を安定に維持するために必要であることが報告され、Mullerは、ギリシャ語の *telos* (ends) と *meros* (part) を組み合わせて染色体末端部分をtelomereと名付けた。1978年に、Blackburnらは、テトラヒメナ(*Tetrahymena pyriformis*)のテロメアが短いDNA配列の繰り返しからなることを報告した[4]。テロメア部分には細胞が生存する上で重要な遺伝子は存在せず、代わりに、テロメアDNAという特殊な塩基配列が進化してきており、多くの動植物で類似の構造を持ち、テロメア構造は進化上良く保存されている。ヒトを含む脊椎動物の場合、テロメアDNAの配列は5' (TTAGGG)3' の繰り返しである。テロメアDNAの長さは生物種によって大きな違いがあり、ヒトの体細胞では約10 kb、マウス体細胞では30-150 kb程度の長さになる。テロメア配列の内側には、Gに富むが配列が少し不規則に

なるサブテロメア領域がある。ヒトのサブテロメア繰り返し配列は、TTAGGGの他にTGAGGG, TCAGGG, TTGGGG等があり、テロメア部分はTTAGGGのみの繰り返しであるが、サブテロメア領域は染色体ごとに存在する繰り返し配列の組み合わせが異なることがある[5]。また、最末端部分は一本鎖が突出しており、ヒトでは約200塩基突出している[6]。この構造が染色体の安定性を保つのに必要と考えられている。

テロメアは細胞の生存に関わる重要な働きをしていることが明らかにされているが、中でもテロメアの重要な機能として、DNA ダメージ応答経路から染色体末端を隔離することと末端での不適切な DNA 修復 (ライゲーション等) を防ぐことが挙げられる。Griffith らは、電子顕微鏡によって、ヒトとマウスのテロメアは T ループ (telomere loop) と呼ばれるループ構造を形成することを示した[7, 8](Fig. 2)。テロメア DNA の末端は、G に富む一本鎖 DNA が突出しており、この一本鎖 DNA が二本鎖 DNA を一部開裂させて入り込むことによって D ループ (displacement loop) を形成し、その結果、染色体末端は大きな T ループを形成している。in vitro での T ループの形成は、染色体末端を保護する作用のあるテロメア結合タンパク質 TRF2 と 3' 突出末端に依存する。D ループの接合部に TRF2 が結合し、D ループを安定に保つために重要な働きをしていると考えられている。また、テロメア結合タンパク質である TRF1 は、T ループの折りたたみを助けているのではないかと考えられている。T ループは、DNA ダメージチェックポイント、DNA 修復酵素、テロメラーゼから染色体末端を隔離していると考えられている。また、T ループを形成するのに不十分な長さまでテロメアが短縮すると、この構造を形成できず染色体が安定に保てないために、細胞が増殖能を失うと考えられている。

酵母ではテロメアが近傍の遺伝子の発現を調節することが知られており[9]、これを TPE (telomere position effect) というが、ヒトの細胞にも TPE が存在することが示された[10]。TPE のメカニズムは、テロメア長と遺伝子までの距離の両方に依存している。テロメア近傍はヘテロクロマチンとなっており、この領域の遺伝子は発現しないが、テロメアの長さが変化することでテロメア近傍の遺伝子がヘテロクロマチン領域に含まれるか否かが変化し、それに伴い遺伝子の発現も変化する。

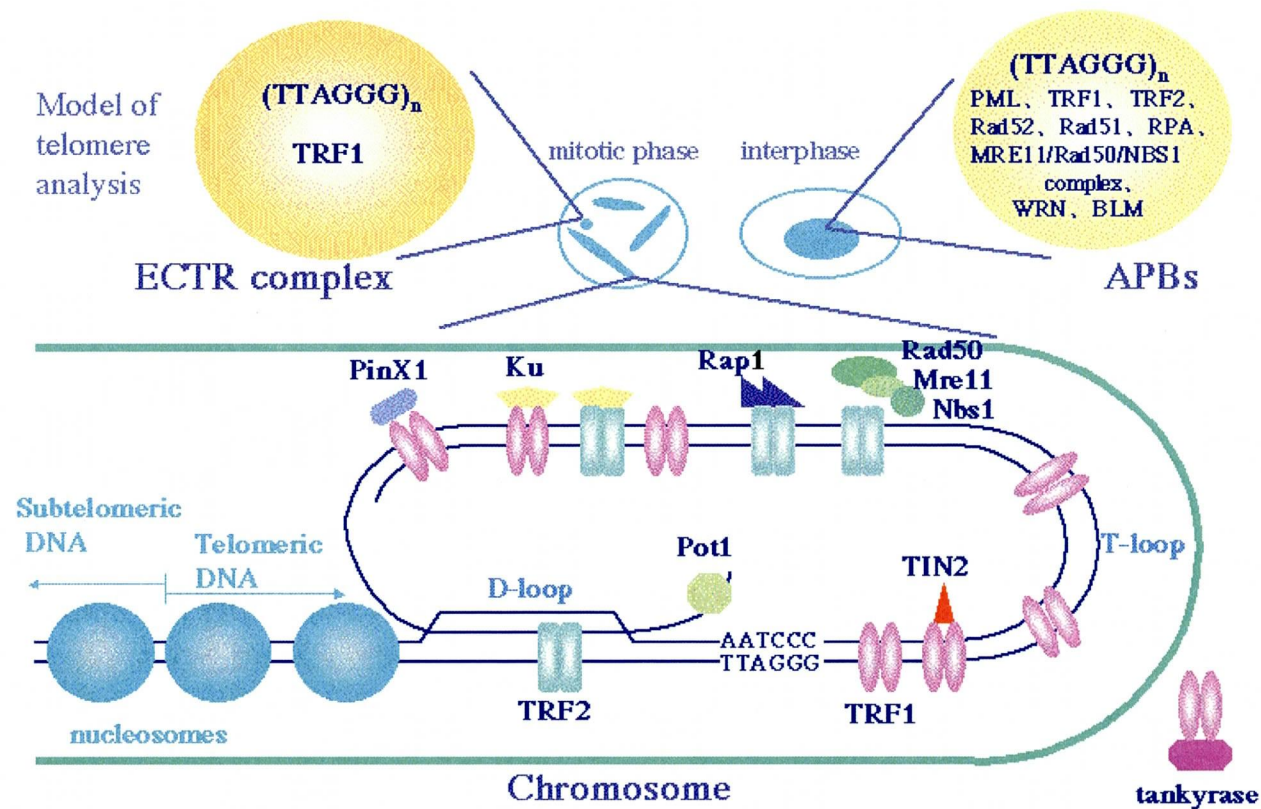


Fig. 2. Relationships among ECTR complex, APBs, and telomere of chromosome end

テロメアは、ゲノム DNA の末端部分とそれに付随するタンパク質等との機能的複合体であり、これまでにいくつかのテロメア結合タンパク質が同定されている。また、テロメアは T ループと呼ばれるループ構造を形成し、染色体末端を保護している。本研究では、分離が困難な染色体末端のテロメアに代わって、ECTR 複合体を染色体末端のテロメア解析のモデルと考え、ECTR-DNA に結合するタンパク質を明らかにすることによって、テロメア結合タンパク質複合体を解析することを目的に実験を行った。また、APBs に存在するテロメア繰り返し配列は、ECTR-DNA に相当すると考えている。

3. テロメア結合タンパク質の同定と機能

テロメアは、ゲノム DNA の末端部分とそれに付随するタンパク質等との機能的複合体である。これまでに同定されているヒトのテロメア結合タンパク質としては、テロメア二本鎖 DNA に結合する TRF1、TRF2、それらと相互作用するタンパク質 tankyrase、TIN2、PinX1、Ku、Rap1、MRE11/Rad50/NBS1 complex、G に富む一本鎖 DNA に結合する Pot1 等が挙げられる (Fig. 2)。

de Lange らは、ヒトのテロメア結合タンパク質を初めて同定した。まず、TRF (TTAGGG repeat binding factor)1 と呼ばれる、2 本鎖テロメア繰り返し配列に結合する可能性のある因子の存在を明らかにした [11, 12]。テロメアプローブを用いたゲルシフトアッセイによ

て結合活性を示し、1 本鎖テロメア配列には結合しないことも示した。また、2 本鎖のテロメア配列特異的に結合する性質を利用して、アフィニティークロマトグラフィーによって TRF1 を精製した。その後、間期と分裂期の両方の細胞で、テロメアプローブを用いた FISH と抗 TRF 抗体を用いた免疫染色によって、TRF1 が *in vivo* でテロメア領域に局在していることを示した [13]。TRF1 は、Myb DNA 結合ドメインをもち、酵母のテロメア結合タンパク質である Rap1 と弱いながらも相同性を示した。さらに、TRF1 は、テロメラーゼによるテロメア伸長反応を負に制御することも示された [14]。テロメラーゼ陽性でテロメアの長さが一定に保たれている細胞で TRF1 を過剰発現させるとテロメアは短縮した。一方、アミノ末端とカルボキシル末端を欠損し、内在性の TRF1 のテロメアへの結合を阻害するようなドミナントネガティブ TRF1 を発現させるとテロメアは伸長した。また、おそらく同じ遺伝子から alternative splicing によって 20 アミノ酸欠損したタンパク質が合成されており、これは、Pin2 と呼ばれている。Pin2/TRF1 が、細胞周期を制御している可能性も示されている [15, 16, 17]。

もう一つの 2 本鎖テロメア配列結合タンパク質である TRF2 は、TRF1 に関連した Myb モチーフをコードする cDNA フラグメントの情報に基づき同定された [18, 19]。TRF2 は、TRF1 と同様、カルボキシル末端に Myb DNA 結合ドメインをもつが、アミノ末端は TRF1 が酸性、TRF2 が塩基性である。TRF1、TRF2 共に、普遍的に発現し、分裂期の染色体でヒトのすべてのテロメアに局在する。また、アミノ末端に二量体を形成するためのドメインを持ち、ホモダイマーを形成するが、TRF1 と TRF2 でのヘテロダイマーは形成しない。機能的には、TRF2 は、染色体末端どうしの融合からテロメアを保護する [20]。アミノ末端の塩基性ドメインとカルボキシル末端の Myb DNA 結合ドメインを欠損し、内在性の TRF2 のテロメアへの結合を阻害するようなドミナントネガティブ TRF2 を発現させると染色体末端の融合が見られ、細胞が老化様の特徴を示して、増殖が停止する。TRF2 は、T ループ形成時、留め金の役割をになうが、TRF2 を欠損するとループがはずれ、染色体末端が露出して、末端融合を生じるのかもしれない [7]。また、一部の細胞では、TRF2 を欠損すると DNA ダメージチェックポイントの活性化と同様の ATM、p53 を介したアポトーシスが誘導される [21]。

Tankyrase (TRF1-interacting, ankyrin-related ADP-ribose polymerase) は、TRF1 を bait として用い、ヒト胎児肝臓の形質転換体のツーハイブリットライブラリーから、酵母ツーハイブリット法によって同定された [22, 23, 24]。tankyrase は、TRF1 と相互作用するためのアンキリンリピートを含み、TRF1 を ADP (adenosine diphosphate) リボシル化することによりテロメア二本鎖 DNA への結合を阻害することで、TRF1 の機能を負に制御していると言われている。

TIN2 (TRF1-interacting nuclear protein 2) は、TRF1 を bait として用い、ヒトの繊維芽細胞の酵母ツーハイブリット cDNA ライブラリーをスクリーニングすることによって同定された [25]。TIN2 は、テロメア DNA の長さを調節しており、アミノ末端を欠損させた TIN2

は、テロメラーゼに依存した方法でテロメアを伸長した。

PinX1 は、Pin2 を bait として用い、HeLa 細胞の酵母ツーハイブリット cDNA ライブラリーをスクリーニングすることによって同定された[26]。PinX1 は、テロメラーゼ活性を阻害し、さらに、tumor suppressor として腫瘍形成能に影響をおよぼしている。PinX1 は、テロメラーゼ触媒サブユニット hTERT に結合し、その活性を阻害する。PinX1 の過剰発現はテロメラーゼ活性を阻害し、テロメアを短縮させ、トランスフォーム細胞の増殖限界(crisis)を誘導した。内在性の PinX1 の抑制は、テロメラーゼ活性を増加させ、テロメアを伸長した。

DNA-PK (DNA-dependent protein kinase)は、触媒サブユニット(DNA-PKcs, catalytic subunit)とKuヘテロダイマー(70 kDaと80 kDaのサブユニット)の複合体で、DNA二本鎖切断部に結合して非相同末端結合にかかわることが知られている。ところが、一方で、Ku70とKu80とDNA-PKcsは、テロメアの保護にも貢献している[27, 28, 29, 30]。DNA-PKcs^{-/-}マウス由来のMEFs (mice embryo fibroblasts)では、染色体末端の融合が増加した。同様に Ku70^{-/-}とKu80^{-/-}マウス由来のMEFsでも、染色体末端の融合が増加した。この複合体は、TRF1またはTRF2と相互作用し、染色体末端に存在すると考えられているが、染色体末端に直接結合する可能性もある。

hRap1 (human repressor/activator protein 1)は、TRF2をbaitとして用い、HeLa細胞cDNAの酵母ツーハイブリットスクリーニングによって同定された[31]。hRap1は、酵母のテロメアタンパク質であるscRap1 (*Saccharomyces cerevisiae* Rap1)のオルソログである。しかし、scRap1は、テロメアと直接結合するが、hRap1は、TRF2を介してテロメアに局在する。hRap1を細胞内で過剰発現させるとテロメアが伸長したことから、hRap1は、scRap1と同様にテロメアの長さを調節する因子であると考えられている。

HeLa核抽出物をヘパリン-セファロースカラムで分画し、免疫沈降によってTRF2複合体を単離し、質量分析によって含まれるタンパク質を同定した結果、TRF2, Rap1の他にRad50が同定された[32]。間期核でRad50とMre11が、テロメアに局在することが示されたが、NBS1は、S期特異的にTRF2に結合し、S期でのみテロメアに局在した。MRE11/Rad50/NBS1 complexは、二本鎖切断の修復で、相同組み換えと非相同末端結合の両方の経路に関与し、減数分裂期組み換えにも関与することが知られている[33, 34]が、テロメアにおいては、MRE11 complexのエキソヌクレアーゼ活性がTループの形成に関与していると考えられている。

繊毛虫類(hypotrichous ciliates)のテロメアは50 bpと短く、ループを形成するには短すぎると考えられている。しかし、3'突出末端は、ssDNA (single strand DNA)結合タンパク質によって保護されている[35, 36]。この一本鎖テロメアDNAに特異的に結合するタンパク質は、 α - β タンパク質ヘテロダイマーである。データベース検索によって、*Oxytricha*と他の繊毛虫類のテロメアタンパク質の α サブユニットに相同性のあるタンパク質Pot1 (protection of telomeres 1)が、分裂酵母とヒトで同定された[37, 38]。Pot1は、それぞれのテ

ロメア配列のGに富む一本鎖DNAに結合し、分裂酵母で染色体末端を保護していることが示された。さらに、ヒトのPot1は、TRF1複合体と相互作用し、テロメラーゼを介したテロメア伸長をコントロールすることが示された[39, 40]。この調節は、酵母のテロメラーゼを調節するタンパク質であるCdc13と同様に、ポジティブな調節とネガティブな調節の両方であろうと考えられている[41, 42, 43]。Langeらは、TRF1複合体とPOT1の相互作用がPOT1の一本鎖テロメアDNAへの結合に影響し、その結果、テロメア長についての情報を、テロメラーゼが調節される部位であるテロメア末端に伝達しているという仮説をたてている[39]。

4. テロメラーゼの発現

1985年に、Greiderらは、染色体末端の一本鎖を5'→3'方向に、鋳型DNAなしで伸長する酵素、テロメラーゼの活性をテトラヒメナで初めて報告した[44]。テロメラーゼは、5'→3'のテロメアDNA配列に対する鋳型RNAを含んだ逆転写酵素である。1994年に、テロメラーゼ活性を容易に高感度に測定できる方法として、PCRを応用したTRAP (telomeric repeat amplification protocol)法が報告され[45]、様々な細胞で活性が測定されるようになった。ヒトの正常体細胞ではテロメラーゼは発現しておらず、DNA複製のたびにテロメアDNAが短縮する。一方、幹細胞ではわずかにテロメラーゼ活性が存在し、テロメアDNAの短縮を多少補うが、完全ではなく、徐々にテロメアDNAが短縮する。これに対して、無限分裂寿命をもつ生殖細胞やがん細胞の一部では、末端複製問題を回避するためにテロメラーゼがテロメアDNAを伸長する。ところが、腫瘍と腫瘍由来のcell lineとin vitroで不死化したcell lineのいくつかは、テロメラーゼ活性を示さないにも関わらず、テロメアを維持し、不死化していることが明らかになった[46, 47, 48]。

5. ALT細胞の特徴

テロメラーゼは、無限増殖のために必要と考えられているが、テロメラーゼ活性を示さないにも関わらず、テロメアを維持し、不死化している細胞も存在する[46, 47]。これらのテロメラーゼ陰性不死化細胞は、Alternative Lengthening of Telomeres (ALT)と呼ばれるメカニズムを利用してテロメアを維持している[48, 49, 50]。具体的なメカニズムは、明らかにされていないが、組み換えによりテロメアが維持されている可能性がいくつか示されている。テロメラーゼを欠損した酵母では、組み換えを利用してテロメアを維持し、生存しているという証拠が示されている[51, 52, 53]。DunhanらはヒトのALT細胞で、テロメアにDNAタグをつけることによってテロメア間での組み換え(inter-telomeric recombination)

がおこることを示した[54]。PDL (population doubling level)が増加するに従って、タグをつけたテロメアの数が増大することを FISH (fluorescence *in situ* hybridization)によって示した。さらに、Varley らは、染色体特異的でテロメアに近接するプライマーと TTAGGG, TGAGGG, TCAGGG, TTGGGG のどれかにアニールしテロメアに散在しているパターンに依存した長さの産物を生じるようなプライマーを用いた TVR (telomere variant repeat)-PCR によって、ALT の活性化の前後のサブテロメア領域の配列を決定した[55, 56, 57]。その結果、ALT 細胞のみで見られるテロメア間での変異(inter-telomere mutation)とテロメア内での変異(intra-telomere mutation)が明らかにされた。異なるテロメア繰り返し配列との間の置換によってテロメアの変異がおこっていると考えられる。また、テロメア内での変異(欠失や TTAGGG が TGAGGG や TTGGGG に変化すること)は、ALT 細胞でのテロメア不安定性に貢献していると考えられる。

ヒトの ALT 細胞の特徴としては、テロメアの長さが不均一であるということが挙げられる。ヒトの生殖細胞のテロメアは、約 15 kb で維持されている。また、正常な体細胞では、テロメアは、細胞分裂ごとに 50~200 bp ずつ短縮し、5~8 kb 位まで短縮すると細胞は分裂増殖できなくなる。さらに、ほとんどのテロメラーゼ陽性不死化細胞のテロメアは、平均 10 kb 未満で、比較的均一である。これに対して、ALT 細胞のテロメア長は不均一である。Southern blot 解析で、極端に長い TRF (terminal restriction fragment)長から短い TRF 長まで、広い範囲で様々な長さの TRF 長が示されることが知られている[46, 47]。それは、細胞によっても異なるが、3 kb 未満から 50 kb 以上ともいわれている。FISH によっても、いくつかの染色体末端は、テロメアシグナルが検出されないが、同じ細胞で他の染色体末端は強いテロメアシグナルを持つことが示されている[50]。 *in vitro* で培養中に不死化し、ALT メカニズムが活性化される細胞では、細胞の不死化と同じ時期に、ALT 細胞に特徴的なテロメア長が示されるようになる[58]。

他の ALT 細胞の特徴として、間期核が、ALT-associated PML (promyelocytic leukemia) bodies (APBs)と呼ばれる nuclear aggregates を持つことが挙げられる[58] (Fig. 2)。PML bodies は、正常細胞の核で見られるドーナツ状の構造で、PML と他のタンパク質を含む[59, 60]。PML タンパク質の名前の由来は、前骨髄球性白血病(promyelocytic leukemia)で、染色体の転座によって生じた融合タンパク質の一部として発見されたことによる。PML bodies の機能は明らかにされていないが、腫瘍抑制、細胞周期調節、老化、アポトーシス、免疫と炎症応答、タンパク質のリフォールディングと分解、分化に関係していると考えられている。APBs は、ALT 細胞に特徴的なタンパク質や DNA を含む PML bodies で、大きなドーナツ状の構造を示し、有限寿命細胞やテロメラーゼ陽性不死化細胞では、認められない。Yeager らは、間期の ALT 細胞を用いて、APBs には、FISH によってテロメア繰り返し配列が存在することを明らかにし、さらに、免疫染色によってテロメア結合タンパク質である TRF1, TRF2、組み換えと複製に関係しているタンパク質 Rad52, Rad51, RPA が共存することを示した[58]。さらに、不死化の段階で、ALT 細胞に特徴的なテロメア長が示されるのと同

じ時期に APBs が現れることも示した。また、Wu らは、NBS1, Mre11 も APBs に含まれることと、NBS1 は細胞周期の late S/G₂ phase に PML bodies に局在することを示した[61]。さらに、BLM, WRN も APBs に含まれることが示された[62, 63]。APBs は、相同組み換えが最も活性化される late S/G₂/M phase に現れることも示された[61, 64]。APBs は、ALT メカニズムが機能するためのプラットホームかもしれないと考えられている。また、ALT メカニズムの副産物かもしれないとも考えられている。または、ダメージとして認識されたテロメア DNA を修復するために存在するのかもしれないとも考えられている。

さらに、他の ALT 細胞の特徴として、ECTR-DNA を持つということが挙げられる[65] (Fig. 2)。ECTR-DNA は、当研究室の Tokutake らによって、分裂中期染色体を用いて存在が明らかにされた DNA で、染色体外にありテロメア繰り返し配列を持つ DNA である。また、Tokutake らと同時期に、Ogino らによってもテロメラーゼ陰性不死化細胞にのみ染色体外のテロメア DNA が存在することが示された[66]。Tokutake らによって、ECTR-DNA は、テロメラーゼ陰性不死化細胞である KMST-6 細胞、SUSM-1 細胞、VA13 細胞で観察され、この順にその出現頻度が高いことが示された[65]。さらに、細胞をアガロースプラグに包埋しアルカリ融解した後、アルカリアガロース電気泳動し、Southern blot 解析を行った結果、ゲノム中のテロメア配列とは別に 2-6 kb にテロメアシグナルが認められた。このシグナル強度も KMST-6 細胞、SUSM-1 細胞、VA13 細胞の順で強く、このシグナルが ECTR-DNA の本体であると考えられた。また、KMST-6 細胞の間期核で、ECTR-DNA を表していると考えられる巨大なテロメアシグナルが認められ、全細胞ではなく 10-20%の細胞のみが ECTR-DNA を持つことがわかった。さらに、核内の ECTR-DNA のシグナルは TRF1 と共局在した。ECTR-DNA の機能としては、ECTR-DNA が鋳型として働き、ALT 細胞の特徴である長い TRF 長の生成に関与する可能性または、プライマーとして働き、末端複製問題を回避する可能性が考えられている。Yeager らによって示された APBs に存在するテロメア繰り返し配列は、ECTR-DNA に相当すると考えることができる[58]。

Reddel らは、ALT 細胞での組み換えによるテロメア維持のメカニズムに関して、いくつかの仮説を提唱している[50, 7] (Fig. 3)。テロメア間での組み換えや T-loop 上での複製に加えて、ECTR-DNA が ALT メカニズムに関与しているという仮説も考えられている。3' テロメア末端が相同なテロメア繰り返し配列に入り込み D-loop 様の構造を形成する。この構造は複製フォークと似ており、DNA 複製と同様のメカニズムによって、入り込んだ 3'鎖の伸長がおこるのかもしれない。ラギング鎖の合成は、D-loop を鋳型にするのかもしれない。または、分岐点移動によって、新しく合成された 3'鎖を鋳型にするのかもしれない。

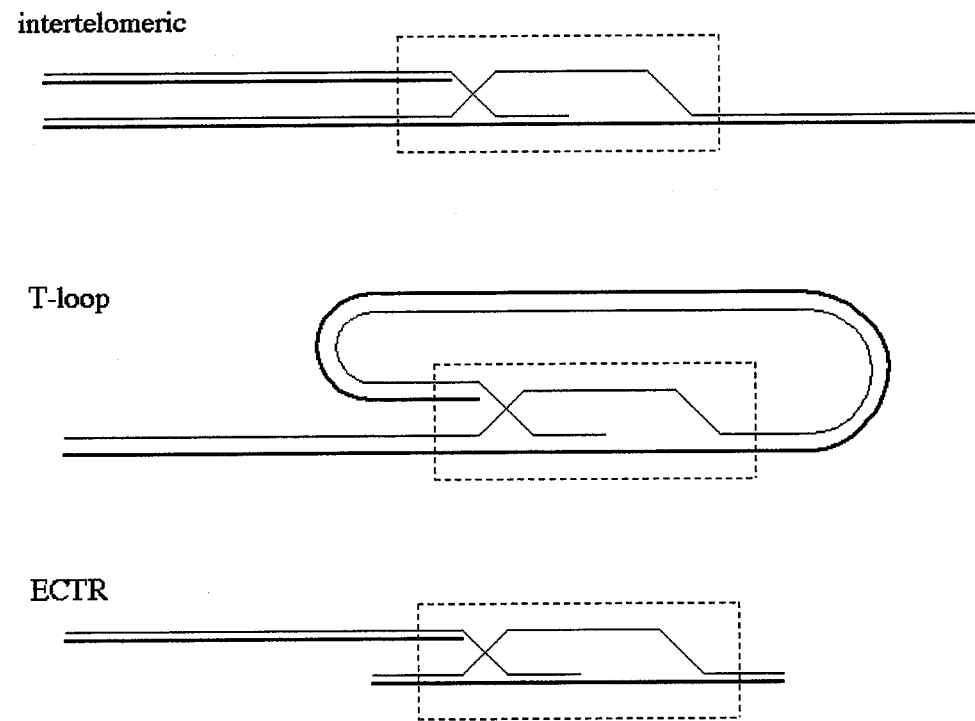


Fig. 3. Proposed ALT mechanisms

ALT メカニズムに関して、テロメア間での組み換えや T-loop 上での複製に加えて、ECTR-DNA が関与しているという仮説も考えられている。3'テロメア末端が相同なテロメア繰り返し配列に入り込み D-loop 様の構造を形成する。点線で囲んだ部分は同一の構造であり、D-loop 様の構造を示す。この構造は複製フォークと似ており、DNA 複製と同様のメカニズムによって、入り込んだ3鎖の伸長がおこるのかもしれない。

6. 老化、がん化とテロメアの関係

テロメアの長さや細胞分裂寿命との関係が示唆されており、ヒトの正常細胞で、継代を続けるに従ってテロメアが短縮すること、ヒトの組織の細胞で、年齢とともにテロメアが短縮することが示されている[67, 68]。個体の老化は、様々な要因によっておこると考えられるが、ヒト体細胞が短いテロメアを持つことから、テロメア短縮による細胞老化もその一因に含まれると考えられる。また、がん細胞は細胞分裂の制御機構から逸脱し、永久に増殖する能力を獲得しているが、細胞が不死化するためにはテロメアが維持されることが不可欠である。よって、テロメアの制御のメカニズムの解明は、老化、がん化現象の研究において重要な位置を占めると考えられる。

7. 本研究の目的

テロメアはゲノム DNA の末端部分とそれに付属するタンパク質等との機能的複合体であり、染色体末端を安定に保つために必要な構造である。これまでに 2 本鎖テロメア繰り返し配列特異的に結合する TRF1、TRF2、それらと相互作用するタンパク質、G に富む一本鎖 DNA に結合するタンパク質等いくつかのテロメア結合タンパク質が明らかにされている。しかし、テロメアはヘテロクロマチンを形成しており、ヘテロクロマチンを形成するにはさらに多くのタンパク質が必要と考えられることから、同定されていないタンパク質が存在する可能性がある。しかし、染色体末端のテロメアを分離し、直接テロメア結合タンパク質を解析することは困難である。制限酵素で切断してテロメア領域の染色体を分離することは可能かもしれないが、ここにはサブテロメア領域の結合タンパク質も含まれるからである[69]。

そこで、当研究室の Tokutake らが存在を明らかにした、extra-chromosomal telomere repeat (ECTR) DNA を染色体末端のテロメア解析のモデルとして用いることを考えた(Fig. 2)。ECTR-DNA は、染色体末端のテロメア DNA の配列と同じ 5' (TTAGGG)3' の繰り返しであることから、2 本鎖テロメア繰り返し配列特異的に結合する TRF1、TRF2 と結合している可能性がある。単離した ECTR 複合体に含まれるタンパク質を明らかにすることによって、これらのタンパク質が、実際に ECTR 複合体で 5' (TTAGGG)3' の繰り返し配列に結合していることを示すことができる。さらに、これらのタンパク質と相互作用する新たなタンパク質を同定することが可能である。また、TRF1、TRF2 以外のテロメア繰り返し配列特異的に結合するタンパク質が同定されることも期待できる。本研究の最終的な目的は、同定されたタンパク質が染色体末端のテロメアに結合しているタンパク質であることを確認し、モデルで得られた結果を基にして染色体末端のテロメア結合タンパク質複合体の構成と機能を明らかにすることである。また、ECTR-DNA が ALT メカニズムに関与しているという仮説が提唱されている。ECTR 複合体に含まれるタンパク質を同定することによって、同定されたタンパク質の機能から ECTR 複合体の機能の解明と同時に ALT メカニズムの解明が進むことが期待される。

I. ALT 細胞の特徴

序論

ヒトの ALT 細胞の特徴としては、1. テロメアの長さが不均一である、2. ECTR-DNA を持つ、3. 間期核は、APBs と呼ばれる nuclear aggregates を持つなどが挙げられる。

本研究を始めるにあたり、まず、これらの ALT 細胞の特徴を示し、同時に、ECTR DNA-タンパク質複合体の単離に使用する KMST-6 細胞が ECTR-DNA を持つことを確認した。

材料及び方法

1. 細胞培養

<使用細胞>

KMST-6: ヒト全胎児由来繊維芽細胞 KMS-6 を ^{60}Co ガンマ線照射によって変異させることで樹立された不死化細胞株。テロメラーゼ陰性で ALT メカニズムを用いてテロメアを維持[70]。

SUSM-1: ヒト胎児肝臓由来繊維芽細胞 AD387 を 4-nitroquinoline 1-oxide 処理によって変異させることで樹立された不死化細胞株。テロメラーゼ陰性で ALT メカニズムを用いてテロメアを維持[46, 70]。

TIG-3: 東京都老人総合研究所で樹立された正常ヒト胎児肺由来繊維芽細胞。分裂寿命は約 80 PDL (population doubling level)。

<培養方法>

細胞は、10% FBS (HyClone)、0.5% antibiotic-antimycotic (GIBCO) を添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (SIGMA) を用いて、 CO_2 インキュベーター (5% CO_2 , 37 °C) 中で培養した。

2. Telomere PNA FISH (分裂期の細胞)

対数増殖期にある細胞に終濃度 100 ng/ml の colcemid を加え、1.5 時間培養した。物理的な力によって、分裂期細胞を遊離させ、回収し、2 ml の低張液(75 mM KCl)を加えて細胞を懸濁し、37 °C で 15~20 分間放置した。2 ml の固定液(methanol : acetic acid = 3:1)を以下の手順で加えた。パスツールピペットで 1 滴落とし、遠心チューブを指ではじく操作を 10 回ほど繰り返した後、0.5 ml の固定液を加えて懸濁し、次に残りの固定液を加えた。1,200 rpm, 5 分間遠心し、上清を除いた。さらに、2 ml の固定液を加えて細胞を懸濁し、1,200 rpm, 5 分間遠心し、上清を除いた。この操作をさらに 2 回繰り返した後、50~200 μl の固定液で細胞を懸濁した。90% ethanol で洗い、純水に浸して 6~10 °C で保存しておいたスライド

グラスを 37 °C ウォーターバスの中に置いた試験管立ての上に水平に置いた。表面が濡れた状態のスライドグラス上に、細胞懸濁液 1 滴を落とし、風乾した。65 °C, 2-3 時間処理後、2 x SSC で 2 分間洗浄し、70% EtOH (-20 °C)、100% EtOH (-20 °C) に 2 分間ずつ浸した後、風乾した。70% formamide/2 x SSC を用いて、72 °C で 2 分間処理後、70% EtOH (-20 °C)、100% EtOH (-20 °C) に 2 分間ずつ浸し、風乾した。80 °C ブロックにスライドグラスを 5 分間のせ、hybridization mixture も 80 °C のブロックで加熱した。スライドグラスに加熱した hybridization mixture を 30 μl のせ、すばやくカバーグラスをのせ、ペーパーボンドでシールした。加湿チェンバーに移し、37 °C で 14 時間ハイブリダイズさせた。50% formamide/2 x SSC に室温で 15 分間浸した後、0.05% Tween20/PBS で 5 分間の洗浄を 2 回繰り返し、PBS で 1 回洗浄した。0.1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI/fluorescent mounting medium (DAKO) で封入した[71, 72]。

[hybridization mixture]

0.3 $\mu\text{g/ml}$ FITC-labeled telomere (C_3TA_2)₃ PNA probe

70% formamide

33 $\mu\text{g/ml}$ salmon testis DNA

10 mM Tris (pH7.2)

3. Telomere PNA FISH (間期の細胞)

細胞を MAS コートスライドグラス (MATSUNAMI) 上に播種し、methanol : acetone = 1:1 を用いて -20 °C で 10 分間処理することによって固定し、風乾した。プラスチックコプリンジャーに冷蔵の 0.1 M citrate buffer (pH 6.0) を 70 ml 入れ、その中にスライドグラスを入れ、さらにコプリンジャーをタッパーに立てて周りに氷をいれ、マイクロウェーブオーブンで 500 W、2450 MHz、5 分間の加熱をした。5 分間室温に放置後、さらに 3 分間の加熱をした。10 分間室温に放置後、cold PBS でリンスした。スライドグラスを cold 70% EtOH、cold 85% EtOH、cold 99% EtOH に順番に 1 分間ずつ浸した後、乾燥させた。hybridization mix (1.2 $\mu\text{g/ml}$ FITC-labeled telomere PNA probe, 70% formamide, 100 $\mu\text{g/ml}$ salmon testis DNA を含む PBS) を作成し、80 °C ブロックにスライドグラスを 5 分間載せ、hybridization mix も 80 °C のブロックで加熱した。スライドグラスに 70% formamide を 20 μl のせ、すぐに加熱した hybridization mix を 10 μl のせた。すばやくカバーグラスをのせ、加湿チェンバーに移し、遮光して 37 °C で 1 晩ハイブリダイズさせた。50% formamide/2 x SSC に室温で 15 分間浸した後、0.05% Tween20/PBS で 5 分間の洗浄を 2 回繰り返し、PBS で 1 回洗浄した。0.1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI/fluorescent mounting medium (DAKO) で封入した。

4. テロメアDNAとタンパク質の二重染色

細胞を MAS コートスライドグラス (MATSUNAMI) 上に播種し、3.7% PFA (paraformaldehyde) を用いて室温で 10 分間処理することによって固定し、0.1% Triton X-

100/PBS を用いて室温で 2 分間処理することによって細胞膜の透過性を亢進させた。3% BSA, 0.05% Tween20/PBS でブロッキング後、室温で 1 時間、1 次抗体反応を行った。洗浄は 0.05% Tween20/PBS で 5 分間を 3 回行った。2 次抗体反応は、室温で 1 時間行った。洗浄は 0.05% Tween20/PBS で 5 分間を 2 回と PBS で 1 回行った。3.5% formaldehyde/PBS をのせ、インキュベート後、PBS で 3 回洗浄した。テロメア DNA の検出は、「3. telomere PNA FISH (間期の細胞)」を参照して行った。

[1次抗体液、2次抗体液、プローブの濃度]

primary antibody

- 2 μ g/ml mouse anti-Rad50 monoclonal antibody (Gene Tex), 1%BSA/PBS
- 2.5 μ g/ml mouse anti-RPA monoclonal antibody (Oncogene), 1%BSA/PBS
- 2 μ g/ml mouse anti-PML monoclonal antibody (Santa Cruz), 1%BSA/PBS
- 1/500 rabbit anti-Rad51 polyclonal antibody (Oncogene), 1%BSA/PBS
- 1/1000 rabbit anti-hMre11 polyclonal antibody (Novus Biologicals), 1%BSA/PBS
- 1/1000 rabbit anti-NBS 1 polyclonal antibody (Novus Biologicals), 1%BSA/PBS
- 4 μ g/ml goat anti-TRF2 polyclonal antibody (Santa Cruz), 1%BSA/PBS

secondary antibody

- 5 μ g/ml Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (Molecular Probes), 1%BSA/PBS
- 5 μ g/ml Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes), 1%BSA/PBS
- 5 μ g/ml Alexa Fluor 568 donkey anti-goat IgG (Molecular Probes), 1%BSA/PBS

probe

- 0.4 μ g/ml Cy3-labeled telomere PNA probe (FASMAC)
- 0.4 μ g/ml FITC-labeled telomere PNA probe (Sawady)

5. Southern blot解析

細胞からの全DNAの抽出は、DNA isolation kit MagExtractor (Toyobo)を用いて行った。Southern blot解析は、TeloTAGGG Telomere Length Assay (Roche)を応用して行った。1 μ gのゲノムDNAを20 UのHinf Iを用いて37 °Cで一晩、制限酵素処理した。制限酵素処理したゲノムDNAと処理していないゲノムDNAを1 x Tris-Acetate-EDTA (TAE) buffer中で0.7% アガロースゲルを用いて電気泳動した。0.5 μ g/ml EtBr (ethidium bromide)で染色後、ゲル中のDNAを0.25 M HClで5-10分間処理し、0.5 M NaOH-1.5 M NaClで15分間の処理を2回行うことによりアルカリ変性させ、0.5 M Tris-HCl (pH7.5)-1.5 M NaClで15分間の処理を2回行うことにより中和させた。その後、DNAをキャピラリーブロットング法により20 x SSC (3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate)を用いて一晩、nylon membrane Hybond-N (Amersham Biosciences)へトランスファーし、UVクロスリンクした。

Aluフラグメントはplasmid Blur8 [73, 74]からBamHIで切り出し、アガロースゲル電気泳

動によってベクター領域と分離し、QIA quick Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて精製した。

Aluフラグメントと(TTAGGG)_n telomeric oligonucleotideは、DIG oligonucleotide tailing kit (Roche)を用いてジゴキシゲニンでラベルし、ハイブリダイゼーションプローブとして用いた。テロメアプローブは1 pmol/mlの濃度で、Aluプローブは0.1 pmol/mlの濃度で用いた。

テロメアプローブでのハイブリダイゼーションは、DIG Easy Hyb (Roche)中で、42 °Cで一晩行った。メンブレンは、0.1% SDS/2 x SSCに浸し、室温で5分間の洗浄を2回行い、その後、0.1% SDS/0.2 x SSCに浸し、50 °Cで20分間の洗浄を2回行った。テロメアプローブは、TeloTAGGG Telomere Length Assayに従ってアルカリホスファターゼ標識された抗ジゴキシゲニン抗体との結合後、化学発光反応によって検出した。

次に、ハイブリダイゼーション後のメンブレンを水で1分間洗い、0.2 N NaOH-0.1% SDSで37 °C、20分間のインキュベーションを2回行い、2 x SSCで洗い、プローブを除去した。

Aluプローブでのハイブリダイゼーションの前に、Aluプローブを5分間沸騰させて変性させ、直ちに氷水で急冷した。ハイブリダイゼーションは、DIG Easy Hyb (Roche)中で、42 °Cで2時間行った。メンブレンは、0.1% SDS/2 x SSCに浸し、室温で5分間の洗浄を2回行い、その後、0.1% SDS/0.2 x SSCに浸し、50 °Cで20分間の洗浄を2回行った。Aluプローブは、TeloTAGGG Telomere Length Assayに従ってアルカリホスファターゼ標識された抗ジゴキシゲニン抗体との結合後、化学発光反応によって検出した。

結果及び考察

1. 分裂期の ALT 細胞を用いた telomere PNA FISH

ALT 細胞の特徴を示すために、分裂期の細胞でテロメアプローブを用いて FISH を行った。Tokutake らは、cycling-PRINS (cycling oligonucleotide-primed *in situ* synthesis)によって、ECTR-DNA の存在を明らかにし[65]、さらに、5'-ビオチン化 (TTAGGG)_n プローブを用いた FISH によっても ECTR-DNA を示した[75]。そこで今回は、さらに異なる方法、PNA (peptide nucleic acid)プローブを使用した telomere PNA FISH によって、分裂期の細胞でそれを示した。PNA は、塩基がリン酸結合ではなくペプチド結合によってつながる化合物であり、相補的な塩基配列を持つ核酸に対して、非常に特異的かつ強力に結合する[76]。PNA/DNA 複合体の安定性は DNA/DNA 複合体よりも高いことが知られている。

分裂期の細胞を用いた telomere PNA FISH の結果からも、ALT 細胞が染色体外に ECTR-DNA を持つことが確認できた(Fig. 4)。同時に、染色体末端のシグナルの強さが様々であることも確認できた。そのシグナルは、強いものから弱いものまであり、また、シグナル

が認められない染色体も見られた。このことは、ALT 細胞が不均一な長さのテロメア長を持つことを示している。

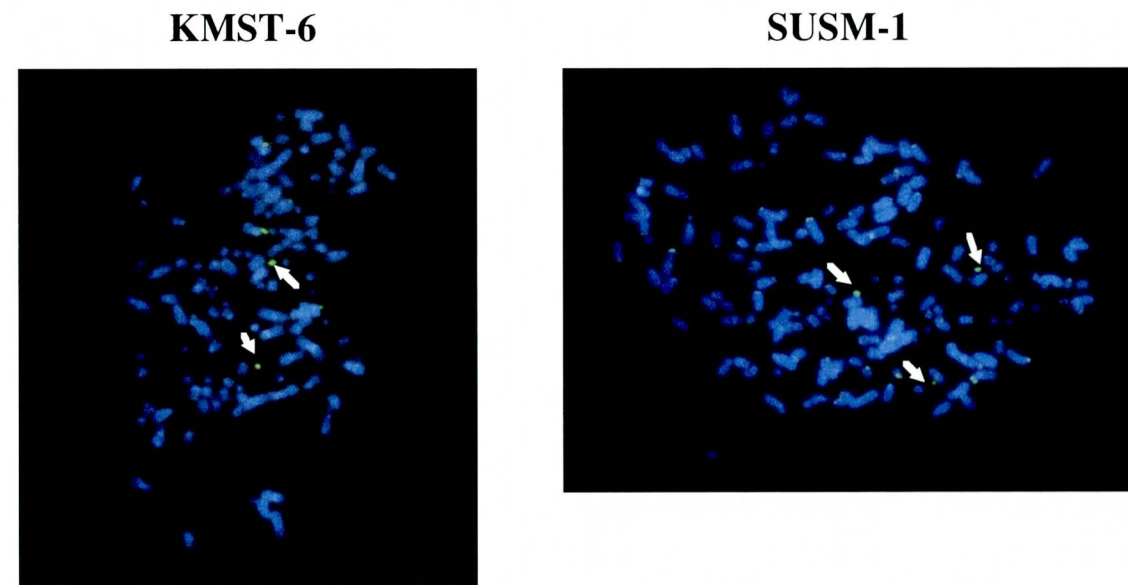


Fig. 4. FISH on metaphase ALT cells with a telomere probe

分裂期のALT細胞で、FITC標識したtelomere PNA probeを用いてFISHを行った。矢印で示したのがECTR-DNAである。

2. 間期のALT細胞を用いた telomere PNA FISH

次に、間期の細胞でテロメアプローブを用いて FISH を行った(Fig. 5)。コントロールとして、テロメラーゼが陰性で、ECTR-DNA を含んでいない normal human fibroblast である TIG-3 細胞を用いた。TIG-3 では、比較的均一の小さなテロメアシグナルが認められた。これに対して、ALT 細胞である KMST-6, SUSM-1 の核内では、巨大なシグナルから小さなシグナルまで様々な大きさのテロメアシグナルが認められた。これは、ALT 細胞が不均一な長さのテロメア長を持つことと矛盾しない。また、巨大なテロメアシグナルは、分裂期の細胞でみられた ECTR-DNA を表しているとも考えられている。

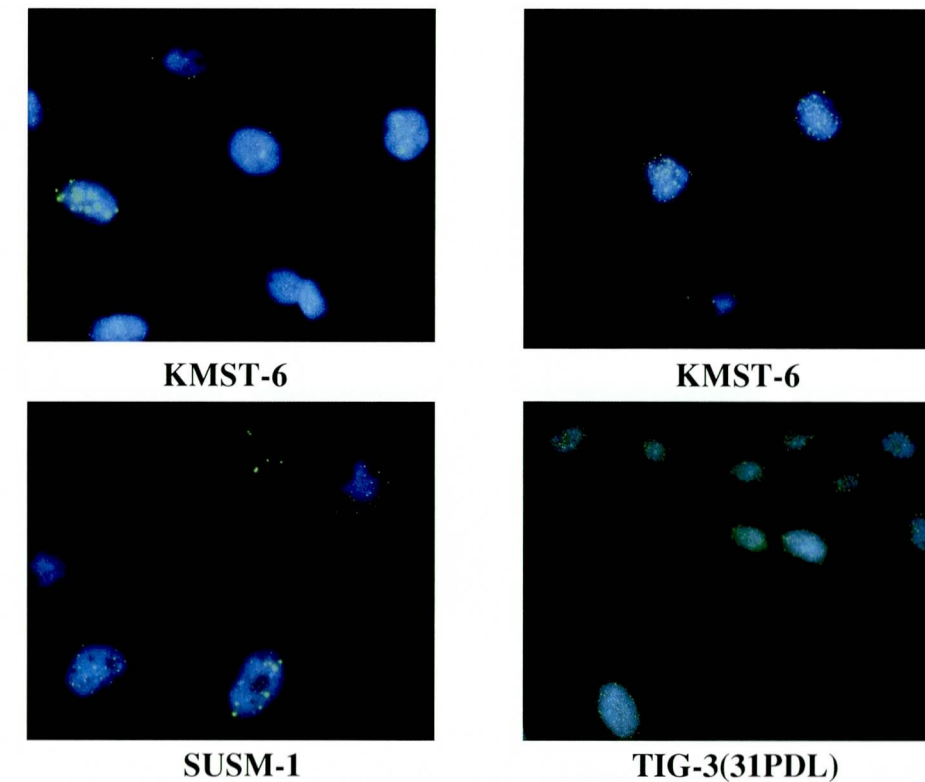


Fig. 5. FISH on interphase cells with a telomere probe

間期の細胞で、FITC 標識した telomere PNA probe を用いて FISH を行った。KMST-6 は、2つの異なる視野を示した。ALT 細胞である KMST-6, SUSM-1 の核内では、様々な大きさのテロメアシグナルが認められた。

3. APBs に存在するタンパク質とテロメア DNA の共局在の検討

間期の ALT 細胞で見られる APBs には、FISH と免疫染色によって、PML、テロメア繰り返し配列、テロメア結合タンパク質(TRF1、TRF2)、組み換えと複製に関係しているタンパク質(Rad52、Rad51、RPA、MRE11/Rad50/NBS1complex)が共存することが示されている[58, 61]。この APBs に存在するテロメア繰り返し配列は、ECTR-DNA に相当すると考えることができる。そこで、本研究で使用する KMST-6 細胞を用いて、タンパク質とテロメア DNA の二重染色を行い、これらのタンパク質とテロメア配列が共存することを確認した。

確認したタンパク質は、TRF2、PML、NBS1、Mre11、Rad50、RPA、Rad51 である。これらのタンパク質のシグナルと巨大なテロメアシグナルは共局在した(Fig. 6)。この結果から、これらのタンパク質が ECTR DNA-タンパク質複合体に含まれる可能性が考えられる。

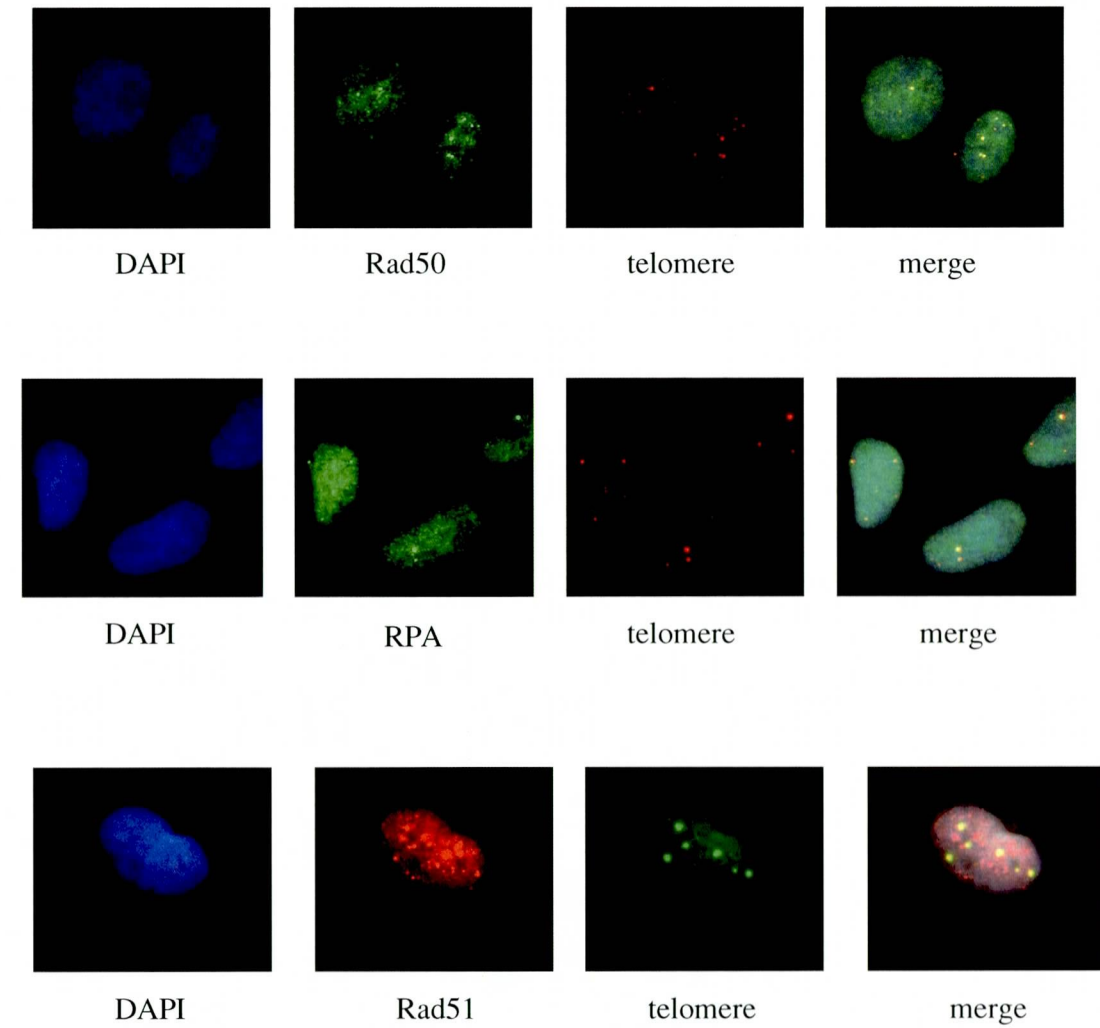
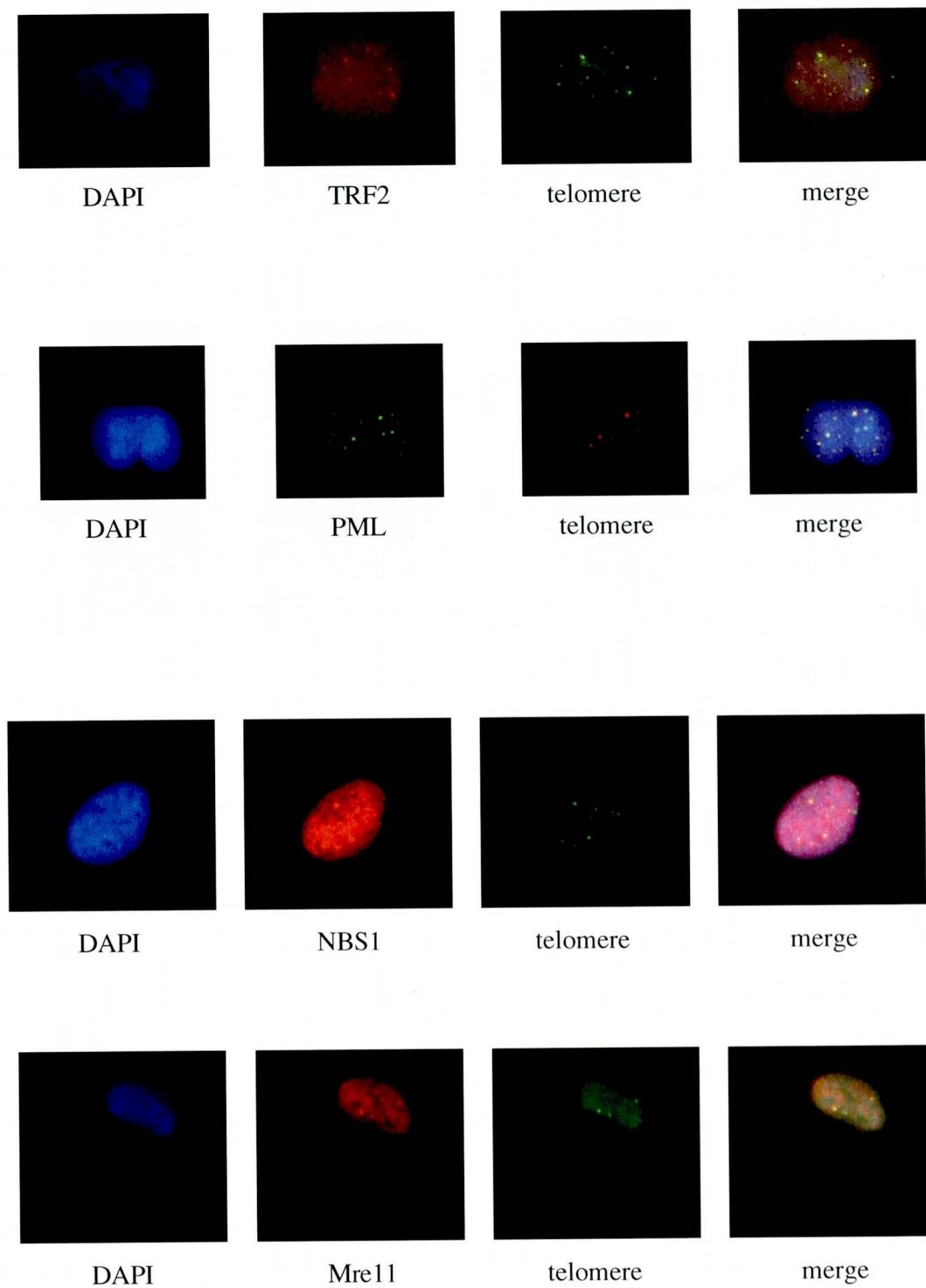


Fig. 6. Double staining of interphase KMST-6 cells with a telomere probe and antibodies of proteins found in APBs

KMST-6 細胞を用いて、APBs 含まれるタンパク質の免疫染色と telomere PNA FISH による二重染色を行い、これらのタンパク質とテロメア配列が共存することを確認した。

4. KMST-6 細胞の Southern blot 解析

テロメアプローブと Alu プローブを用いて Southern blot 解析を行った。解析には、ALT 細胞の中でも ECTR-DNA が多いことが知られており、本研究で使用する KMST-6 細胞を用いた。

はじめに、テロメアプローブを用いた Southern blot 解析でテロメアの長さを測定した(Fig.

7)。テロメアの長さは、TRF 長で示されるが、これは、切断される認識配列が比較的高い頻度で現れる 4 塩基認識制限酵素でサブテロメア領域を切断し、そこから染色体末端までの長さを測定したものである。コントロールとして用いた TIG-3 細胞の場合、49PDL で 5~8 kbp 位になった。これに対して、KMST-6 細胞では、極端に長い TRF 長から短い TRF 長まで、広い範囲で様々な長さの TRF 長が示された。このことと FISH の結果は、ALT 細胞が不均一な長さのテロメア長を持つことを示している。また、*Hinf* I 処理の有無に関係なく KMST-6 細胞のみで低分子側にスミアなテロメアシグナルが認められた。このシグナルは、ALT 細胞以外には存在せず、ECTR-DNA を反映していると考えられる。さらに、ヒトゲノムのマーカーである Alu のプローブを用いてリプロービングすると、制限酵素処理していない場合、低分子側のシグナルは認められなかった。このことから、KMST-6 細胞のみで認められたシグナルは、染色体が断片化されて検出されたものではないと考えられる。また、ECTR-DNA は Alu 配列を含んでいないということも言える。*Hinf* I 処理した DNA で見られる Alu プローブによるシグナル (低分子量) は、ゲノム DNA によるものである。

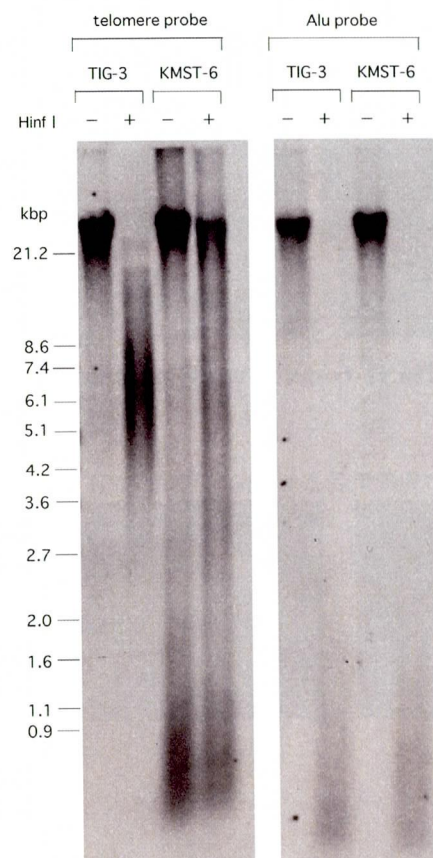


Fig. 7. Southern blot analysis of KMST-6 cells

制限酵素(*Hinf* I)処理したゲノム DNA と処理していないゲノム DNA で、テロメアプローブを用いて Southern blot 解析を行い、その後、Alu プローブを用いてリプロービングした。コントロールとして用いた TIG-3 は、49PDL (population doubling level)である。

結論

ALT 細胞の 3 つの特徴を示すことができた。特に、本研究で使用する KMST-6 細胞は、分裂期の細胞を用いた telomere PNA FISH と Southern blot 解析の結果から、ECTR-DNA を持つことが確認できた。また、TRF2, PML, NBS1, Mre11, Rad50, RPA, Rad51 のシグナルと ECTR-DNA を表していると考えられる巨大なテロメアシグナルが共局在することも確認した。この結果から、ECTR DNA-タンパク質複合体に上記のタンパク質が含まれることが期待される。

II. ECTR DNA-タンパク質複合体の単離と複合体の特徴

序論

新たなテロメア解析の方法として、ECTR DNA-タンパク質複合体を単離し、モデルとして用いることを考えた。ECTR DNA-タンパク質複合体は、染色体外に存在し、染色体に比べてサイズが小さい。そこで、ECTR DNA-タンパク質複合体と染色体のピークが異なるフラクションにあらわれるような条件で遠心することによって、ECTR 複合体と染色体の分離が可能であると考えられる(Fig. 8)。細胞は、ALT 細胞の中でも ECTR-DNA が多いことが知られている KMST-6 細胞を用いた。ECTR 複合体分離の概要は Fig. 9 に示す通りである。今回、遠心によってこの複合体を分離する条件を決定し、同時にこれまで明らかにされていなかった ECTR DNA-タンパク質複合体の特徴も示した。

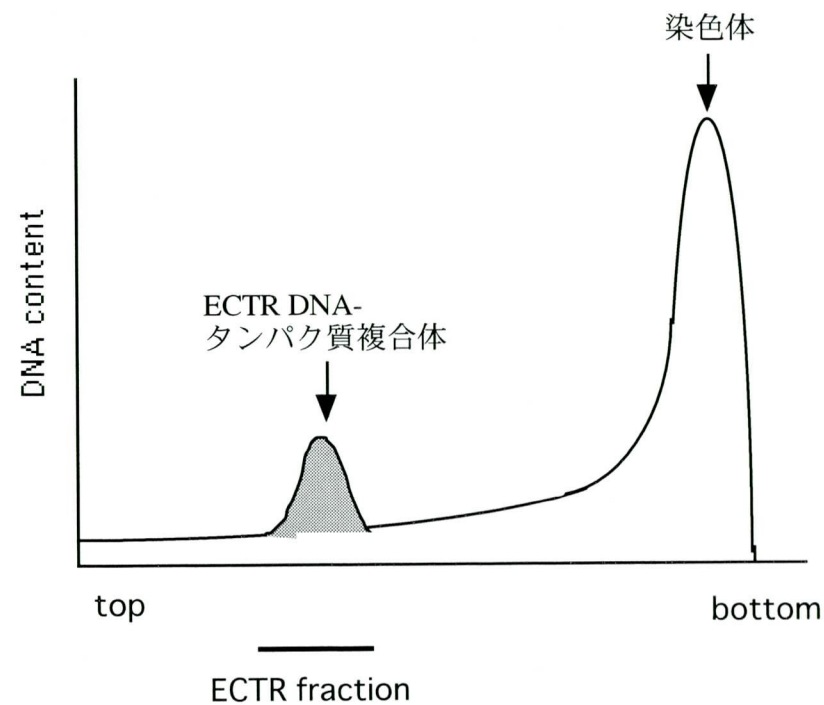


Fig. 8. Prediction of ECTR fraction

ECTR DNA-タンパク質複合体と染色体のピークが異なるフラクションにあらわれるような条件で遠心することによって、ECTR 複合体と染色体の分離が可能であると考えられる。

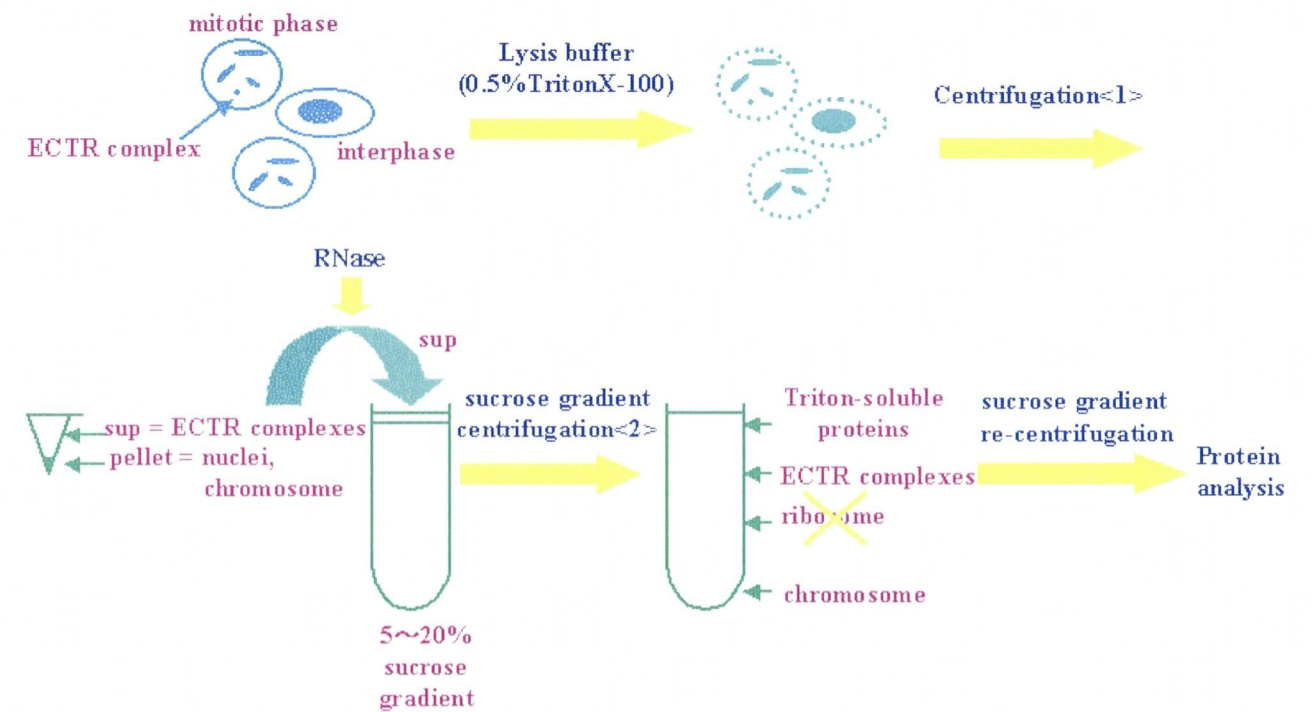


Fig. 9. Separation of ECTR DNA-protein complexes

0.5% Triton X-100 を用いて、分裂期の KMST-6 細胞を融解し、2 回の遠心と RNase 処理によって ECTR 複合体を分離した。

材料及び方法

1. 分裂期同調培養の条件検討

細胞分裂阻害剤として、TN-16, Colcemid, Nocodazole を用いて条件検討を行った[77]。まず、薬剤処理後、位相差顕微鏡下で、一定の範囲内 (dish にマーク) の球形化した細胞の数を数え、同時に死細胞の量も観察し、大体の条件 (処理時間、濃度) を決めた。次に、全細胞を回収し、I の「2. telomere PNA FISH (分裂期の細胞)」を参照して、低張液処理後、methanol : acetic acid = 3:1 で固定し、染色体標本をつくり、0.1 μ g/ml DAPI で染色し、分裂指数 (分裂期にある細胞の全細胞に占める割合) を算定した。

2. 細胞の調製

100 mm ディッシュに 0.5×10^6 個の対数増殖期にある KMST-6 細胞を植え込み(20 枚)、

約 60 時間培養した。培地を吸引除去し、細胞を PBS で 1 回洗浄後、終濃度 100 nM の TN-16 を加えた新しい培地で、8 時間培養した。ピペットで液を吹きつけたり、ディッシュを揺すって液面を激しく動かすなどの物理的な力によって、分裂期細胞を遊離させ、浮遊した分裂期細胞を遠心(1,000 rpm, 5 min) して回収した。PBS で細胞を洗った後、1 ml の低張液 (75 mM KCl) を加えて細胞を懸濁し、on ice で 30 分間静置した。2,500 rpm, 5 min 遠心後、KCl を除き、チューブの底を叩いてペレットを浮遊させてから、lysis buffer (-Triton X-100) を 1 ml 加え、細胞を懸濁した。その後、終濃度 0.5% の TritonX-100 を加え、時々混和しながら、4 °C に 10 分間置き細胞融解させた。

[lysis buffer]

- 10 mM HEPES-KOH (pH7.5)
- 3 mM Mg (OAc)₂
- 0.3 mM EDTA
- 10% glycerol
- 50 mM KCl
- 7 mM 2-mercaptoethanol
- 0.5% Triton X-100
- 1 x Complete Mini Protease inhibitor cocktail (Roche)

3. ECTR DNA-タンパク質複合体の分離

はじめに、エッペンドルフ冷却遠心機 5417R を用いて遠心を行った。14,000 rpm (20,800 x g), 15, 30, 60 min, 4 °C と 12,000 rpm (15,300 x g), 20, 28, 40 min, 4 °C の条件で条件検討をし、冷却遠心の条件は 12,000 rpm, 40 min, 4 °C に決定した。RNase 処理をする場合は、上清をチューブに取った後、終濃度 2 mg/ml の RNase を加え、4 °C で 1 時間インキュベートした。

超遠心は、日立分離用超遠心機 55P-72 で行った。日立密度勾配フラクシオネータ (DGF-U) を用いて lysis buffer (-Triton X-100) で 5-20% ショ糖密度勾配を作成し、冷却遠心の上清を重層した。P28S スイングロータによって遠心後、DGF-U を用いて 2.5 ml 毎に分画 (計 14 サンプル) し、-80 °C に保存した。17,000 rpm (52,000 x g), 1 hr, 10 °C; 20,000 rpm (72,000 x g), 8 hr, 4 °C; 20,000 rpm (72,000 x g), 24 hr, 4 °C の順に条件検討をし、超遠心の条件は 20,000 rpm (72,000 x g), 24 hr, 4 °C に決定した。

4. フラクシオンからの DNA と RNA の抽出

各フラクシオンに、終濃度 0.5% の SDS, 100 μg/ml の proteinaseK, 10 mM の EDTA を加え、時々穏やかに混ぜながら、55 °C で 1 時間インキュベート後、37 °C で一晩インキュベートした。等量の Tris 飽和フェノール (pH 8.0) を加え、充分攪拌し、3,000 rpm, 20 min, 4 °C 遠心した。水層を新しいチューブに移し、等量の PCI (phenol:chloroform :isoamyl

alcohol =25:24:1) を加え、充分攪拌し、3,000 rpm, 20 min, 4 °C 遠心した。水層を新しいチューブに移し、等量の CIA (chloroform:isoamyl alcohol=24:1) を加え、充分攪拌し、3,000 rpm, 20 min, 4 °C 遠心した。水層を新しいチューブに移し、終濃度 0.3 M NaCl と等量の isopropanol を加え、-20 °C に一晩置いた。遠心(15,000 rpm, 30 min, 4 °C) し、上清を除去後、70% ethanol で沈澱と管壁を洗い、ペレットを乾かし、20 μl の TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0) に融解した。

5. Southern blot 解析

フラクシオンから抽出した DNA を用いて、I の「5. Southern blot 解析」を参照して行った。

6. rRNA の検出

total RNA は、AGPC (acid guanidinium-phenol-chloroform) 法によって抽出した [78]。培地を取り除いた後、dish に直接 10⁷ 細胞当たり 1 ml の変性溶液を加え、ピペットを用いて数回ピペッティングを行い、高分子量の DNA を切断した。チューブに移し、0.1 ml の 2 M sodium acetate (pH 4.0)、1 ml の H₂O 飽和フェノール、0.2 ml の chloroform /isoamyl alcohol (49:1) の順に加え、それぞれの段階で良く混ぜた。氷中で 15 分間インキュベート後、10,000 rpm, 20 min, 4 °C で遠心した。中間層を取らないように上清を新しいチューブに移し、1 ml の isopropanol を加えて、-20 °C で 20 分間冷却した。14,000 rpm, 15 min, 4 °C 遠心後、上清を捨て、0.3 ml の変性溶液を加えて沈澱を溶かした。0.3 ml の isopropanol を加えて、-20 °C で 30 分間冷却した。14,000 rpm, 15 min, 4 °C 遠心後、上清を捨て、75% ethanol を 0.5 ml 加えて、沈澱を懸濁した。14,000 rpm, 5 min, 4 °C 遠心後、上清を捨て、乾燥させ、100 μl の H₂O に溶かした。

フラクシオンから抽出した核酸 と total RNA は 1% 非変性アガロースゲルを用いて電気泳動し、0.5 μg/ml ethidium bromide で染色し、UV トランスイルミネーターで可視化した。

[変性溶液]

- 4 M guanidium thiocyanate
- 25 mM sodium citrate (pH7.0)
- 0.1 M 2-mercaptoethanol
- 0.5% sarcosyl

7. 各フラクシオンのタンパク質の濃縮、解析 A

各フラクシオンを Ultrafree-4 Centrifugal Filter Biomax-10K NMWL Membrane (Millipore) を用いて限外濾過濃縮法によって濃縮し、さらに TCA 沈澱法によって濃縮した。TCA 沈澱は以下の手順で行った。限外濾過濃縮法によって濃縮したタンパク質溶液と等量の冷却

20% (w/v) TCA (trichloroacetic acid)/acetone 溶液を加え、攪拌後、-20 °C で数時間冷却した。さらに、タンパク質溶液の 3~5 倍量の冷却 acetone を加え、攪拌後、-20 °C で数時間冷却した。10,000 rpm, 15 min, 4 °C で遠心後、上清を丁寧に除き、diethyl ether で洗浄した。10,000 rpm, 15 min, 4 °C で遠心後、上清を丁寧に除き、乾燥させ、1 x SDS-PAGE sample buffer に溶解させた。SDS-PAGE は、Laemmli の方法に従って行った[79]。サンプルを 3 分間熱湯につけた後、8.0%の SDS-polyacrylamide gel を用いて電気泳動し、銀染色した。

[1 x SDS-PAGE sample buffer]

62.5 mM Tris-HCl (pH6.8)

1% SDS

1% 2-mercaptoethanol

0.002% bromophenol blue

10% glycerol

[SDS-PAGE 泳動 buffer]

25 mM Tris

192 mM glycine

0.1% SDS

8. 銀染色法

Silver Stain kit (ATTO)を用いてキットの説明書に従って行った。

9. 各フラクションのタンパク質の濃縮、解析 B

各フラクションを上記の TCA 沈澱法によって濃縮した。その後、acetone に溶解しなかったショ糖が原因で形成されたと考えられる下層を残し上層を除去した。等量の冷却 10% TCA/H₂O を加え、攪拌後、on ice で 15 分以上冷却した。10,000 rpm, 15 min, 4 °C で遠心後、上清を丁寧に除き、diethyl ether で洗浄した。10,000 rpm, 15 min, 4 °C で遠心後、上清を丁寧に除き、乾燥させた。1 x SDS-PAGE sample buffer に溶解させた後、SDS-PAGE を行った。サンプルを 3 分間熱湯につけた後、8.0%の SDS-polyacrylamide gel を用いて電気泳動し、銀染色した。

10. Western blot 解析

ポジティブコントロールとしては、KMST-6 細胞に SDS extraction buffer を加え、3 分間熱湯につけた後、14000rpm、5 分間、4 °C で遠心し、上清を回収したものをを用いた。タンパク濃度の測定の可能なサンプルは、CBB 色素試液 (ナカライテスク) を用いて Bradford 法に従って測定した。SDS-PAGE は、Laemmli の方法に従って行った。サンプルに 4 x SDS-PAGE sample buffer を加え、3 分間熱湯につけた。8.0%の SDS-polyacrylamide gel を用

いて電気泳動した。泳動後、分離したタンパク質を PVDF 膜へ転写 (2 mA/cm²、75 分) した。ブロッキングは、5% skim milk/PBS-T (0.05% Tween-20/PBS)を用いて室温で 1 時間行った。一次抗体反応は、4 °C で一晩行った。一次抗体として、rabbit anti-hMre11 polyclonal antibody (Novus Biologicals)を PBS-T で 5000 倍希釈したものをを用いた。洗浄は PBS-T で 10 分を 3 回行った。二次抗体反応は、PBS-T で 100,000 倍希釈した Anti-Rabbit Ig, HRP-Linked F (ab')₂ Fragment (Amersham Biosciences)を用いて、室温で 40 分間行った。洗浄は PBS-T で 10 分を 3 回行った。その後 ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences)を用いて検出した。

[SDS extraction buffer]

62.5 mM Tris-HCl (pH6.8)

1% SDS

7 mM 2-mercaptoethanol

[transfer buffer]

20 mM Tris

150 mM glycine

20% methanol

0.05% SDS

結果及び考察

1. 分裂期同調培養の条件検討

同調培養とは、細胞集団を細胞周期のある時期にそろえて培養することである。ECTR-DNA は、分裂期には染色体外に存在し、間期には、ほとんどが核内に存在していると考えられている。間期の細胞では ECTR 複合体と染色質がからみ合う危険性があることから、ECTR 複合体を分離するためには、大量の分裂期の細胞が必要になると考えられる。そこで、同調培養の条件検討を行い、大量の分裂期の細胞を回収できる条件を決定した。

分裂中期停止剤として、TN-16 (3-(1-Anilinoethylidene)-5-benzylpyrrolidine-2,4-dione), Colcemid, Nocodazole を用いた。薬剤処理後、位相差顕微鏡下で、球形化した細胞の数を数え、大体の条件を決定した。その後、Table 1 に示した条件下で 12 時間培養し、染色体標本を DAPI 染色後、分裂指数を算定した。400 nM TN-16, 60 ng/ml Colcemid, 320 ng/ml Nocodazole の条件では、位相差顕微鏡下で観察時、他と比べ断片化された細胞の量が多かったため選択からは除外した。死細胞の数が比較的少なく、分裂指数が高かった 100 nM TN-16, 15 ng/ml Colcemid, 40 ng/ml Nocodazole の条件を選択し、さらにこれらの条件下で 8 時間培養後、分裂指数を算定した (Table 2)。その結果、どの条件下でも 10% 以上の分裂指数が得られたため、その中でも比較的断片化された細胞の量が少なく KMST-6 細胞に対する毒性が低い TN-16 を用いて 100nM で 8 時間処理するという条件を選択した。

Table 1. Mitotic index of KMST-6 cells after 12h of continuous exposure to the various concentrations of three drugs

Treatment	Concentration	Mitotic index (%)
Control		0.9
TN-16	25 nM	4.4
	100 nM	16.8
	400 nM	17.3
Colcemid	3.75 ng/ml	10.4
	15 ng/ml	14.0
	60 ng/ml	13.2
Nocodazole	5 ng/ml	8.5
	40 ng/ml	12.6
	320 ng/ml	9.9

KMST-6 細胞を TN-16, Colcemid, Nocodazole で 12 時間処理し、分裂指数を算定した。

Table 2. Mitotic index of KMST-6 cells after 8h of continuous exposure to three drugs

Treatment	Concentration	Mitotic index (%)
Control		2.4
TN-16	100 nM	12.2
Colcemid	15 ng/ml	11.5
Nocodazole	40 ng/ml	12.7

KMST-6 細胞を TN-16, Colcemid, Nocodazole で 8 時間処理し、分裂指数を算定した。

2. 細胞の調製

分裂期細胞の集積したシャーレに培地をふきつけ、分裂期細胞が剥がれ易いことを利用して、間期細胞と分けて採取した。次に、分裂期細胞を 75 mM KCl 溶液中で膨潤させ、細胞内の染色体と ECTR 複合体を分散させた。膨潤させた細胞を 0.5% Triton X-100 を用いて、細胞膜は壊すが核膜は壊さない条件で細胞融解した。

3. 冷却遠心機による遠心分離

はじめに、エッペンドルフ冷却遠心機 5417R を用いて遠心分離し、間期の核や大部分の染色体を沈澱させ、ECTR 複合体を含む上清を回収した。

回転数を一定にし、遠心時間を以下のように変えて条件検討をした。回転数は 14,000 rpm (20,800 x g)、温度は 4 °C で 15 分、30 分、60 分間遠心した (Fig. 10. a)。上清とペレットを回収し、DNA を抽出後、テロメアプローブを用いた Southern blot 解析を行った結果、上清のレーンで低分子側にスメアなシグナルが認められた。このシグナルが、ECTR-DNA であると考えられる。このシグナルは、遠心条件が強くなるに従って弱くなった。60 分遠心では上清からテロメアシグナルがほとんど消失し、ECTR-DNA がほとんど上清に回収されなくなると考えられる。また、ヒトゲノムのマーカーである Alu プローブを用いてリプローブした結果、ペレットからの高分子 DNA 領域に Alu シグナルが認められた。このことは、染色体と核がペレットに回収されたことを意味していると考えられる。しかし、上清のレーンの高分子側にもシグナルが認められることから染色体の一部が上清に回収されたと考えられる。このシグナルは、遠心条件を強くすることによって軽減した。そこで、

ゲノムの混入は認められるが、ECTR-DNA の回収率の良い 15 分と 30 分の間でさらに条件検討を行うことにした。

14,000 rpm、60分の遠心条件では、ECTR複合体がほとんど沈澱に回収されるため、条件が強すぎることは明らかである。そこで、さらに弱い条件で検討するため、今回は、12,000 rpm (15,300 x g)で条件検討を行った。回転数は12,000 rpm (15,300 x g)に固定し、温度は4 °Cで20分、28分、40分間遠心した(Fig. 10. b)。Southern blot解析の結果から、ゲノムの混入がなるべく少なく、ECTR-DNAの回収率が比較的良好な条件ということで、12,000 rpm, 40 min, 4 °Cで行い、この遠心によって得られた上清を回収することにした。

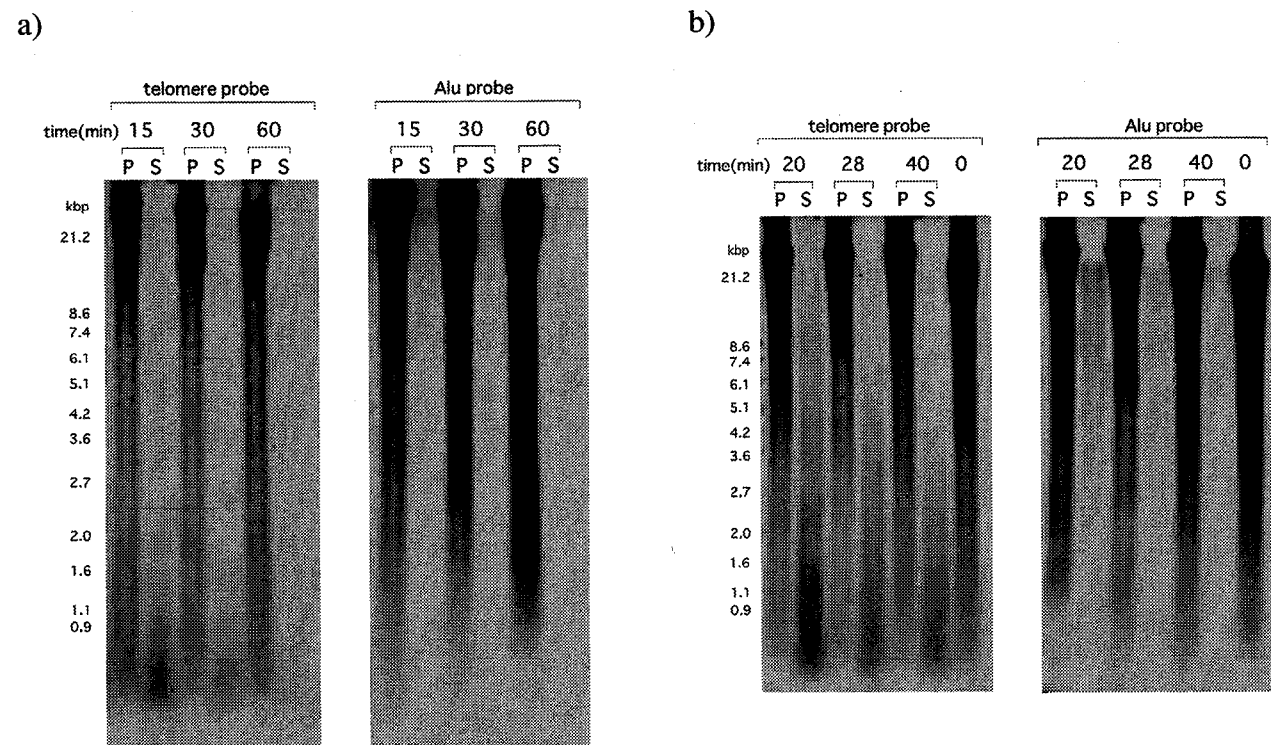


Fig. 10. Examination of the centrifugal conditions

回転数を一定にし、遠心時間を変えて条件検討を行った。上清とペレットを別々に回収し、DNAを抽出後、テロメアプローブとAluプローブを用いてSouthern blot解析を行った。Sは上清(supernatant)、Pはペレット(pellet)を示す。

a) 回転数は14,000 rpm (20,800 x g)、温度は4 °Cで15分、30分、60分間遠心し、条件検討した。上清のレーンで、細胞数に換算するとペレットのレーンの7倍に相当する量のDNAを泳動した。

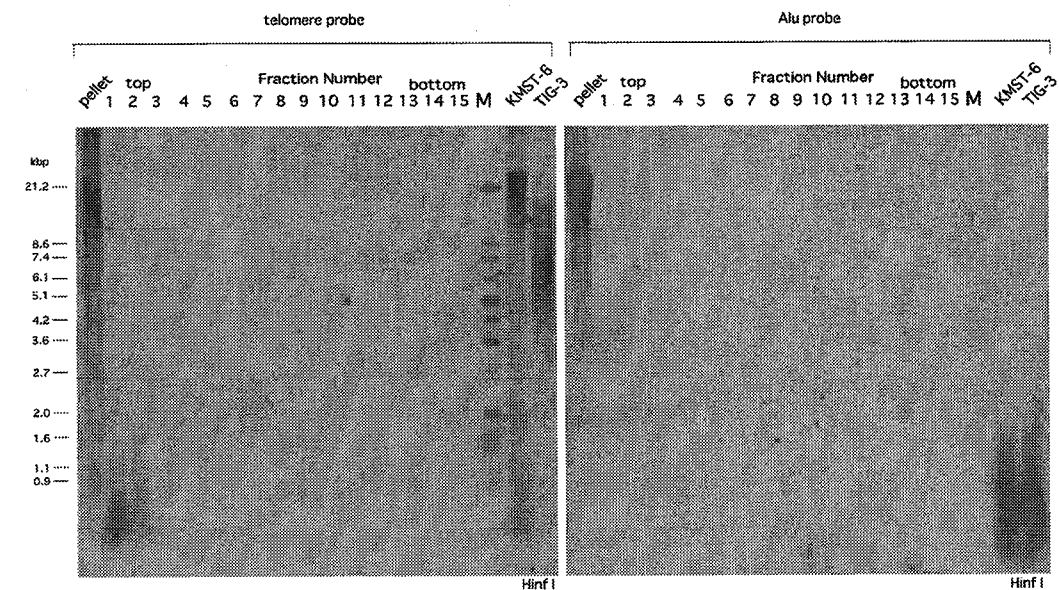
b) 回転数は12,000 rpm (15,300 x g)、温度は4 °Cで20分、28分、40分間遠心し、条件検討した。上清のレーンで、細胞数に換算するとペレットのレーンの15倍に相当する量のDNAを泳動した。

4. ショ糖密度勾配超遠心による分離

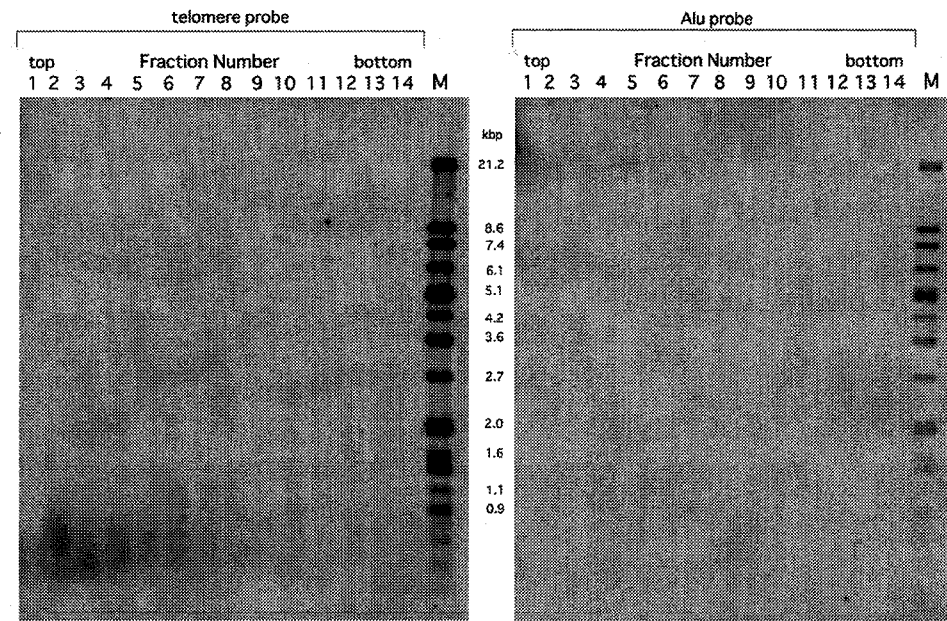
上記で得られた上清を回収後、5-20%ショ糖密度勾配に重層し、遠心した。この遠心の目的は、ECTR複合体を精製するために、Triton可溶性タンパク質とECTR複合体を分離することである。

はじめに、10 °Cで52,000 x g、1時間の遠心を行い、各フラクションを回収し、DNAを抽出後、テロメアプローブを用いたSouthern blot解析でECTR複合体を確認した(Fig. 11. a)。トップフラクション周辺にECTR-DNAのシグナルが認められたことから、ここにECTR複合体が回収されたと考えられる。しかし、トップフラクション周辺には、Triton可溶性のタンパク質が多量に含まれていると予測できるため、遠心条件をさらに強くした。4 °Cで72,000 x g、8時間遠心では、ECTR複合体が充分沈降しなかったが(Fig. 11. b)、この結果から、さらに遠心条件を強くすることによって、ECTR複合体を中間よりやや下のフラクションにまで沈降させることが可能であることが予測できる。2回の条件検討の結果を基に遠心時間を3倍にし、4 °Cで72,000 x g、24時間遠心した(Fig. 11. c)。その結果、ECTR複合体を遠心チューブの中間よりも下層(フラクション8-11)にまで沈降させることができた。また、Aluシグナルはほとんど検出されなかったが、これは、エッペンドルフ冷却遠心機5417Rを用いた遠心でかなり除かれたため、多少混入した染色体はボトムフラクションに回収されていると考えられる。

a)



b)



c)

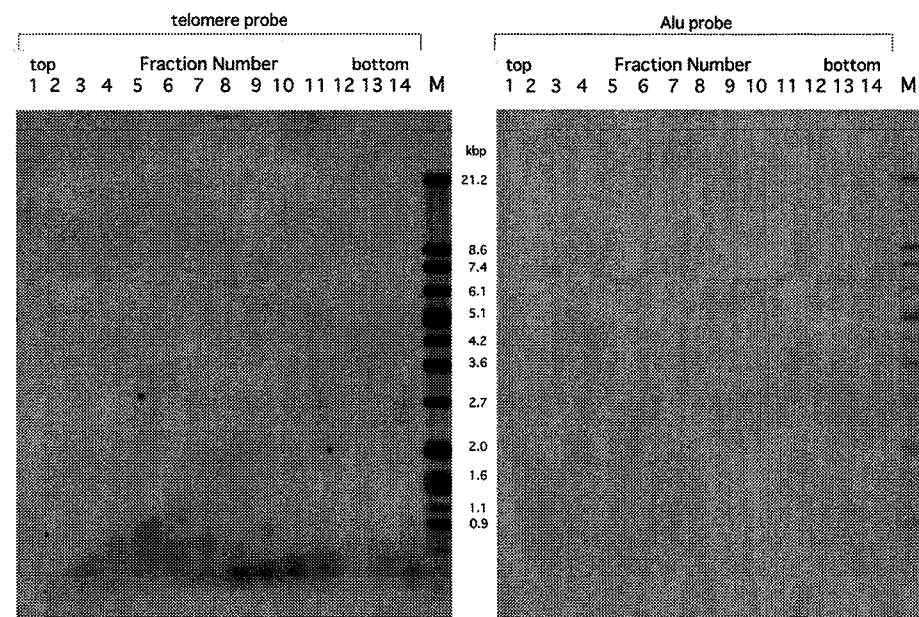


Fig. 11. Examination of the sucrose density gradient centrifugal conditions

冷却遠心の上清を回収後、シヨ糖密度勾配に重層し、遠心の条件検討を行った。各フラクションを回収し、DNAを抽出後、テロメアプローブとAluプローブを用いてSouthern blot解析を行った。Mは、分子量マーカを示す。

a) 17,000 rpm (52,000 x g), 1 hr, 10 °Cで遠心した。pelletは、冷却遠心後のペレットから抽出したDNAを用いた。KMST-6細胞、TIG-3細胞から抽出したDNAは制限酵素(*Hinf*I)処理後を用いた。

b) 20,000 rpm (72,000 x g), 8 hr, 4 °Cで遠心した。

c) 20,000 rpm (72,000 x g), 24 hr, 4 °Cで遠心した。

5. リボソームの除去

Fig. 12は、Fig. 11のSouthern blot解析時のアガロースゲル電気泳動後のethidium bromide染色の結果だが、ECTR-DNAのシグナルが認められるフラクションと同じか、やや下のフラクションに核酸のシグナルが認められる。DNA抽出過程でRNase処理を行っていないことから、特にFig. 12cに見られるシグナルは、rRNAと考えられる。

そこで、リボソームとの分離を見るため、各フラクションから核酸を抽出して、total RNAと同時に泳動し、28S, 18S rRNAのバンドを確認した(Fig. 13)。28S, 18S rRNAのバンドの殆どが、フラクション12-14に認められ、殆どのリボソームがボトム付近にまで落ちていることがわかった。フラクション8-11には18S rRNAのみが認められ、リボソームのsmall subunitが存在したものと考えられた。Fig. 11.cの結果では、ECTR複合体は、遠心チューブの中間よりも下層(フラクション8-11)に認められ、上記の結果と比較するとECTR複合体は、リボソームのsmall subunitに近いサイズをもつと考えられる。一方、Fig. 7, 10, 11のSouthern blot解析の結果から、ECTR-DNAのサイズは不均一ではあるが、約1kb以下と小さいことがわかった。これらの結果から、ECTR-DNAは、タンパク質と相互作用し、その結果大きな複合体を形成していると考えられる。また、Tokutakeらが示したアルカリアガロースゲル電気泳動とSouthern blot解析の結果では、ECTR-DNAのシグナルは2~6kb付近に認められた[65]。しかし、今回のフェノール抽出とSouthern blot解析の結果から、ECTR-DNAのサイズは約1kb以下であることが示された。この違いの原因は、アルカリアガロースゲルでは、タンパク質が十分に除けず、その結果、ECTR-DNAの移動度が変化したためではないかと考えられる。この結果からもECTR-DNAとタンパク質が相互作用し、大きな複合体を形成していると考えられる。

以上のことから、遠心によってECTRフラクションからリボソームを除くのは困難であると考えられる。そこで、RNase処理を行い、rRNAを壊すことによってリボソームの立体構造を壊し、リボソームがECTRフラクションに存在しないようにした。まず、4 °CでのRNase処理の条件検討を行い、終濃度2 mg/mlのRNaseで1時間処理することによって、rRNAが、EtBrでは検出不可能なレベルにまで分解されることを確認した。エッペンドルフ冷却遠心機5417Rを用いた遠心の上清を上記の条件でRNase処理後、シヨ糖密度勾配に重層した。4 °Cで72,000 x g, 24時間遠心した後の各フラクションのrRNAについて調べた結果、RNAは全く認められなかった(Fig. 14)。この結果、ECTRフラクションに存在していたリボソームはほとんど除けたと考えられる。

また、同じサンプルを用いたSouthern blot解析で、テロメア配列は、フラクション8-14に見られた(Fig. 15)。Fig. 11.cに比べて、ボトム付近まで分布が広がっており、これは、実験上の誤差かもしれないが、リボソームを壊すことによってECTR複合体の沈降に何らかの影響があったのかもしれない。しかし、テロメアシグナルが認められるフラクションの幅に関しては、Fig. 15の結果でもFig. 11と同様、幅が広がった。これらの結果からECTR複合体のサイズは不均一であるということが考えられる。この結果は、分裂期の細胞の

FISH (Fig. 4)で染色体外のシグナルである ECTR-DNA のシグナルの大きさが様々であったこととも矛盾しない。

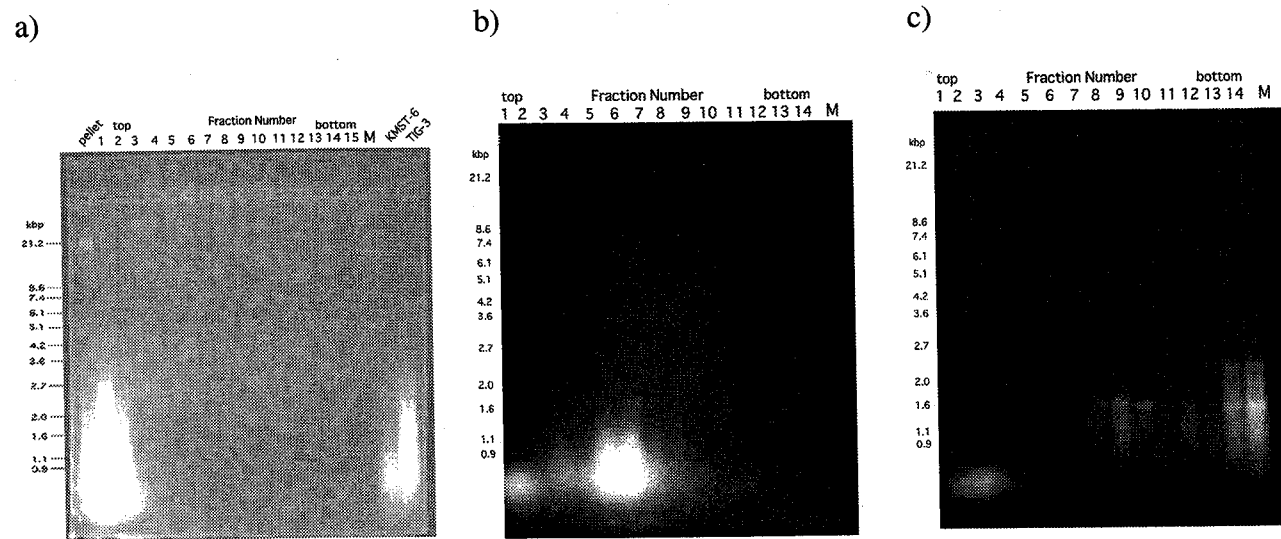


Fig. 12. Electrophoresis of nucleic acid fractionated on sucrose gradients

Fig. 11 の Southern blot 解析時のアガロースゲル電気泳動後の ethidium bromide 染色の結果を示した。

- a) 17,000 rpm (52,000 x g), 1 hr, 10 °Cで遠心した。
- b) 20,000 rpm (72,000 x g), 8 hr, 4 °Cで遠心した。
- c) 20,000 rpm (72,000 x g), 24 hr, 4 °Cで遠心した。

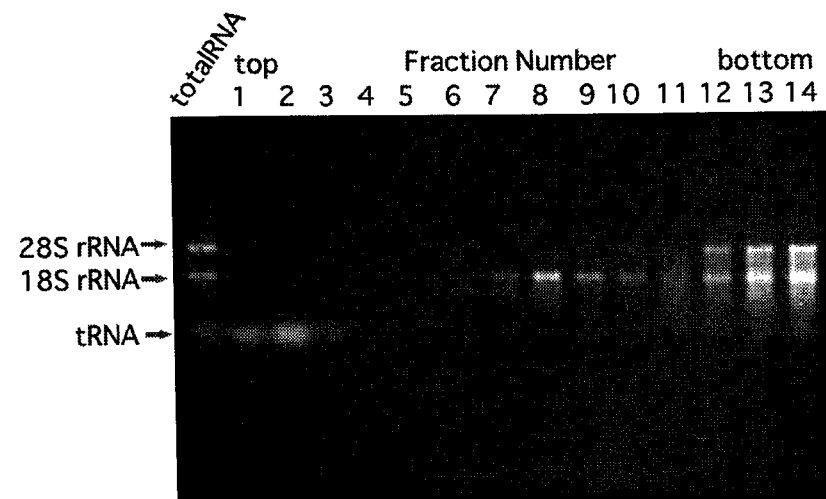


Fig. 13. Detection of rRNAs

Fig. 11. c と同じサンプルの一部と total RNA を同時に電気泳動し、0.5 μg/ml ethidium bromide で染色後、28S, 18S rRNA のバンドの位置を確認した。

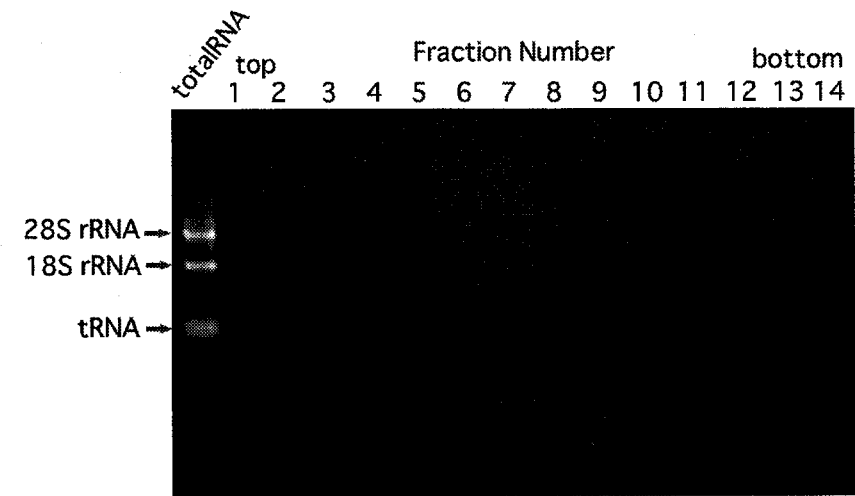


Fig. 14. Detection of rRNAs after RNase treatment

冷却遠心の上清を RNase 処理後、シヨ糖密度勾配に重層し、4 °C で 72,000 x g, 24 時間遠心した後、各フラクションを回収し、DNA と RNA を抽出後、total RNA と同時に電気泳動し、0.5 μg/ml ethidium bromide で染色した。

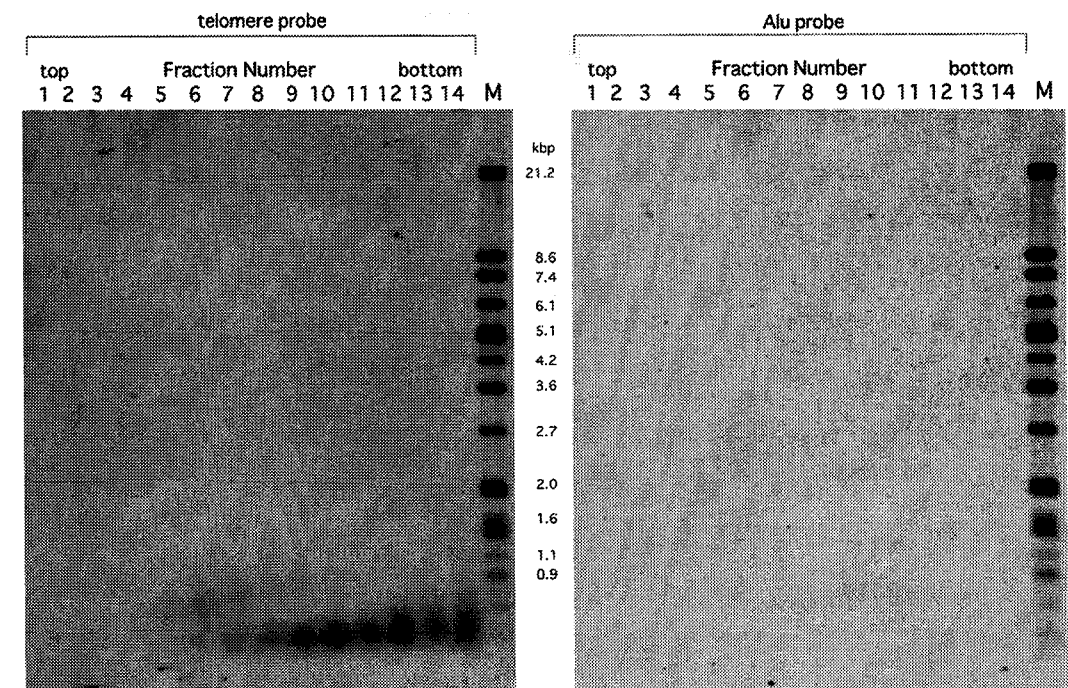


Fig. 15. Southern blot analysis of DNA from ECTR complexes fractionated on sucrose gradients after RNase treatment

Fig. 14と同じサンプルで、テロメアプローブとAluプローブを用いてSouthern blot解析を行った。

6. 各フラクションのタンパク質解析

各画分を Ultrafree-4 Centrifugal Filter Biomax-10K NMWL Membrane (Millipore)を用いて限外濾過濃縮法によって濃縮し、サンプルのボリュームを減少させた。しかし、限外濾過濃縮では、サンプル中のショ糖が原因で膜透過効率が悪く、濃縮にも長時間を要し、さらに、TritonX-100 が濃縮されて残るといった問題点がある。そこで、限外濾過濃縮法によって濃縮したサンプルを 10% TCA/acetone を用いて沈澱させることによって濃縮した。SDS-PAGE 後、銀染色し、各フラクションのタンパク質を検出した。トップフラクション周辺では、多数のバンドが認められ、ボトムに近づくに従ってバンドの数、シグナル強度共に減少した(Fig. 16)。また、ECTR フラクションには、この条件では、ほとんどバンドが認められなかった。このことから、高濃度に存在する Triton 可溶性タンパク質は密度勾配の上層部に回収されたと考えられる。この結果と Fig. 15 の結果、さらにフラクション 14 には染色体が含まれている可能性のあることから、ECTR 複合体のタンパク質の解析にはフラクション 8-13 を用いることにした。

しかし、限外濾過濃縮法は、膜への非特異的な吸着が多く、ある程度のロスを考慮に入れなければならない。さらに、核内タンパク質は特異的に吸着される可能性があり、注意が必要である。そこで、TCA 沈澱法のみでの濃縮を行った。各画分を 10% TCA/acetone を用いて濃縮した。その後、acetone に溶解しなかったショ糖が原因で形成されたと考えられる下層を回収し、10% TCA/H₂O を用いて沈澱させることによって濃縮した。SDS-PAGE 後、銀染色し、各フラクションのタンパク質を確認した結果、ボトムに近づくに従ってバンドの数、シグナル強度共に減少してはいるが、フラクション 8-13 にも多数のバンドが認められた(Fig. 17)。これは、濃縮方法を変えたため、前回に比べタンパク質の回収率が良くなったことを意味していると考えられる。さらに、銀染色での発色段階の時間の違いも関係しているかもしれない。この多数のバンドは、高濃度に存在する Triton 可溶性タンパク質が、タンパク質の分布の裾野としてボトムにまで落ちてくることによって、細胞内に多く存在するタンパク質のバンドが検出されたために認められたと考えられる。さらにこれを分離するために再遠心することにした。

しかし、その前に、各画分の一部を用いて Western blot 解析を行った。I の「3. APBs に存在するタンパク質とテロメア DNA の共局在の検討」で、Mre11 が、KMST-6 細胞の間期核で ECTR-DNA に相当すると考えられるシグナルと共局在することを示した。この結果から、ECTR フラクションにバンドが認められることが期待されたが、今回の条件では認められなかった(Fig. 18)。しかし、今回は、用いたサンプル量が微量であったため ECTR フラクションに Mre11 が存在するかどうかは判断できないと考えられる。また、トップフラクションを中心にバンドが認められボトムに近づくに従ってシグナル強度が減少した。Fig. 16 の結果から、この付近のフラクションには、Triton 可溶性のタンパク質が多量に含まれていると考えられる。Mre11 は細胞質に存在し、DNA 二重鎖切断が発生すると NBS1 によって、細胞質から切断部位にリクルートされる。これらのことから、細胞質に存在す

る Mre11 が認められたか、もしくは、操作途中で DNA からはずれた Mre11 が認められたのではないかと考えられる。

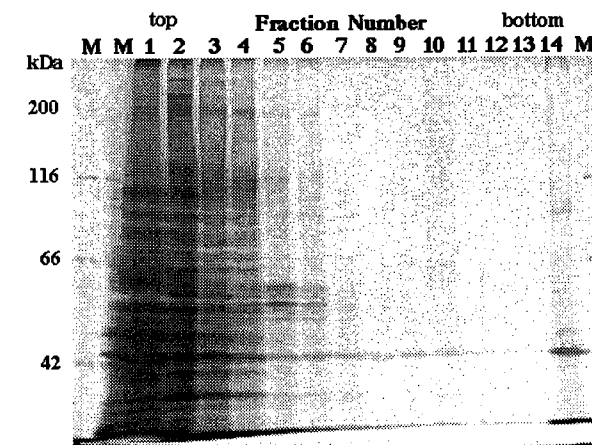


Fig. 16. Silver staining of proteins fractionated on sucrose gradients

各フラクションを回収し、限外濾過濃縮後、10% TCA/acetone を用いて沈澱させることによって濃縮した。SDS-PAGE 後、銀染色した。

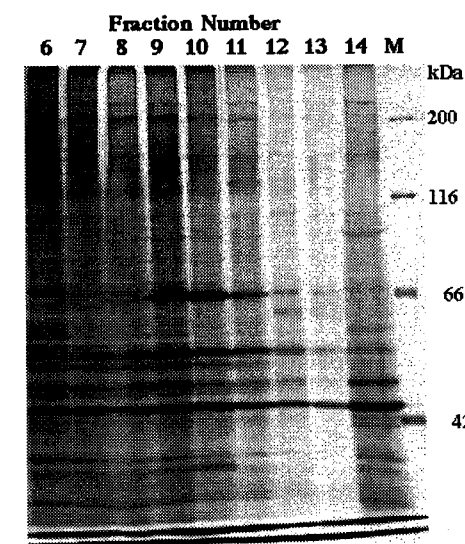


Fig. 17. Silver staining of proteins fractionated on sucrose gradients

各フラクションを回収し、10% TCA/acetone を用いて沈澱させることによって濃縮した。SDS-PAGE 後、銀染色した。

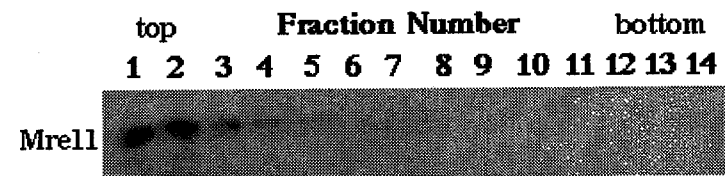


Fig. 18. Detection of Mre11 fractionated on sucrose gradients

各フラクションを回収し、各フラクションあたり 37.5 μ l を用いて抗 Mre11 抗体を用いた Western blot 解析を行った。

7. ECTR フラクシオンの再遠心、解析

Fig. 17 で示したように、高濃度に存在する Triton 可溶性タンパク質が、タンパク質の分布の裾野としてボトムにまで落ちているのが確認されたため、ECTR フラクシオンを再度遠心分離した。限外濾過濃縮法は、タンパク質を変性させることなく濃縮が可能であることから、ECTR 複合体の存在するフラクション 8-13 をまとめて、限外濾過濃縮法によって濃縮した。このサンプルを再度、5~20%のショ糖密度勾配に重層し、20,000 rpm (72,000 x g), 24 hr, 4 °C で遠心後、分画した。その後、各フラクションを TCA 沈澱法によって濃縮し、タンパク質を解析した。濃縮されたサンプルを使用し、SDS-PAGE を行い、銀染色した結果、フラクション 8-11 を中心にタンパク質のバンドが認められ、トップフラクション周辺にはほとんどバンドが認められなかった(Fig. 19)。裾野として混入していたタンパク質は、ほとんど除くことができたと考えられる。再遠心に用いたフラクション 8-13 のうち、バンドが多数認められたフラクション 8-11 に、再遠心後もバンドが多数認められたのは、多少データが極端ではあるが、納得の行く結果である。

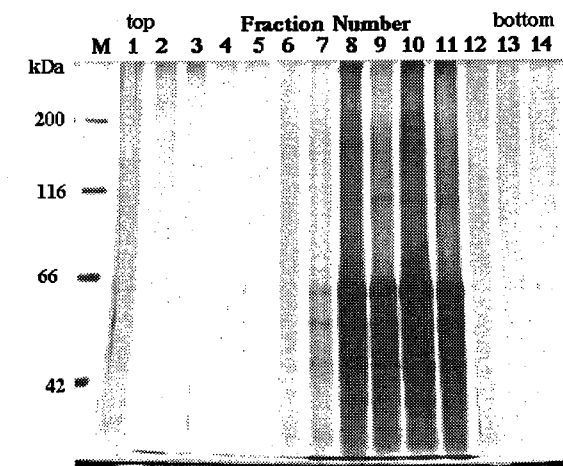


Fig. 19. Silver staining of proteins fractionated on sucrose gradients

ECTR フラクシオン(8-13)をまとめて1つにし、限外濾過濃縮法によって濃縮し、再度、ショ糖密度勾配超遠心によって分画した。10%TCA/acetone を用いて沈澱させることによって濃縮後、SDS-PAGE を行い、銀染色した。

結論

今回、遠心によってECTR複合体を分離することが可能であることを示した。決定したECTR複合体の分離の条件をまとめると以下のようになる。まず、エッペンドルフ冷却遠心機5417Rを用いて、4 °Cで12,000 rpm, 40分間遠心し、核及び染色体を含む画分を沈澱させECTR複合体を含む画分を上清として分離した。遠心上清を終濃度2 mg/mlのRNaseで4 °C, 1時間処理後、ショ糖密度勾配に重層した。超遠心は、4 °C で72,000 x g, 24時間行い、Triton 可溶性タンパク質からECTR複合体を分離した。

遠心によって ECTR 複合体を分離した結果、これまで明らかにされていなかったこの複合体の特徴がいくつか明らかになり、その結果から以下のことが考えられた。テロメアシグナルが認められるフラクションの幅が広いことから、さまざまな大きさの ECTR 複合体が存在すると思われる。また、ECTR-DNA のサイズは不均一ではあるが約 1 kb 以下と小さいことと、ECTR 複合体のサイズはリボソームの small subunit に近いことから、ECTR-DNA は、タンパク質と相互作用し、いくつかの ECTR-DNA とタンパク質によって大きな複合体を形成していると考えられる。

III. ECTR フラクシオンに含まれるタンパク質の同定

序論

APBs に存在するタンパク質としては、TRF1, TRF2, Rad52, Rad51, RPA, MRE11/Rad50/NBS1complex, WRN, BLM が挙げられる。また、これまでに同定されている染色体末端のテロメアに結合するタンパク質としては、TRF1, TRF2, tankyrase, TIN2, Pot1, Rap1, Ku, MRE11/Rad50/NBS1complex, PinX1 等が挙げられる。しかし、同定されていないタンパク質が存在する可能性も考えられる。そこでまず、両者に含まれる TRF2 が分離した ECTR 複合体に含まれることを確認した。TRF2 は、テロメア二本鎖 DNA に結合するタンパク質でテロメアの保護作用をすると考えられている。さらに、MALDI-TOF 型の質量分析計を用いて、ECTR フラクシオン特異的に現れるタンパク質の同定を試みた。

ところで、約 10 年前に ESI (electrospray ionization)法と MALDI (Matrix-assisted Laser Desorption Ionization)法という 2 種類のイオン化法が開発され、質量分析によって、微量タンパク質を高精度に、短時間に同定できるようになった。質量分析は、イオン化の段階と質量を測定する段階の 2 段階から成る。MALDI 法では、レーザー光を吸収しそのエネルギーを試料分子に与えるマトリックスと呼ばれる低分子と試料を混合し、プレート上で結晶化させた後、真空中でレーザー光を当て、試料を気化させる。また、質量を測定する段階は、TOF (Time of flight)型の質量分析計の場合、すべての試料イオンに同じ運動エネルギーを与えたとき、軽いイオンほど速く飛ぶ原理を利用し、サンプルの飛行時間から質量を求める。

材料及び方法

1. Western blot 解析

II の「10. Western blot 解析」を参照して、TRF2 の検出を行った。また、検出後のメンブレンを抗体除去バッファー中で、50 °C で 30 分間インキュベート後、PBS-T で 10 分間の洗浄を 2 回行った。その後、II の「10. Western blot 解析」のブロッキング以降を参照して Mre11 の検出を行った。

[1 次抗体、2 次抗体の濃度]

primary antibody : 1 μ g/ml mouse anti-TRF2 antibody (Transduction Laboratories)
secondary antibody : 1/100,000 Anti-Mouse Ig, HRP-Linked whole antibody
(Amersham Biosciences)

[抗体除去バッファー]

62.5 mM Tris-HCl (pH6.8)
2% SDS
100 mM 2-mercaptoethanol

2. 免疫沈降法

60 μ l の Protein G Sepharose (Amersham Biosciences) を加え、4 °C で 2 時間、ローテーターで攪拌後、2,000 x g, 5 min, 4 °C で遠心し、上清を回収することによって、非特異的に免疫沈降物に混入する物質を除いた。mouse anti-TRF2 antibody (Transduction Laboratories)を 2 μ g 加え、4 °C で一晩、ローテーターで攪拌することによって、抗原-抗体複合体を形成させた。その後、60 μ l の Protein G Sepharose を加え、4 °C で 2 時間、ローテーターで攪拌することによって、生じた複合体を吸着させた。免疫沈降物は II の「2. 細胞の調製」と同様の lysis buffer で 5 回洗浄することによって、非特異的に吸着したものを除いた。免疫沈降物を等量の 2 x SDS-PAGE sample buffer に懸濁し、3 分間煮沸することで免疫複合体を分解した後、遠心(15,000 rpm, 5 min)上清をサンプルとして用いた。免疫沈降物を用い Western blot 解析および、銀染色を行った。

3. 質量分析法

Fig. 17 でフラクシオン 9-11 を中心に認められる 66 kDa 付近のバンドをゲルから切り出し、100 μ l の脱色液 (15 mM potassium ferricyanide, 50 mM sodium thiosulfate)を加え、室温で 10 分間振とうした。ゲル片を吸い込まないように、脱色液を取り除き、500 μ l の水を入れ、室温で 15 分間振とうし、水を取り除いた。この操作をさらに 2 回繰り返した後、100 μ l の ACN (acetonitrile)を加え、室温で 5 分間振とうし、ACN を取り除いた。真空デシケータを用いてゲルを乾燥させ、100 μ l の還元液(10 mM DTT, 25 mM ammonium bicarbonate)を入れ、56 度で 1 時間インキュベートした。室温に戻し、液を取り除き、100 μ l の洗浄用 buffer (25 mM ammonium bicarbonate)を入れ、10 分間振とうした。液を取り除き、100 μ l のアルキル化液(55 mM iodoacetamide, 25 mM ammonium bicarbonate)を入れ、遮光、室温で 45 分間振とうした。液を取り除き、100 μ l の洗浄用 buffer を入れ、10 分間振とうした。液を取り除き、200 μ l の脱水液(50% ACN, 25 mM ammonium bicarbonate)を加え、室温で 10 分間振とうし、さらにこの操作を一回繰り返した後、真空デシケータを用いてゲルを乾燥させた。トリプシン溶液を入れ、30 min 氷上で放置後、余分なトリプシン溶液を取り除き、37 °C で 16 時間反応させた。50 μ l の抽出液(50% ACN, 5% TFA(trifluoroacetic acid))を加え、室温で 30 分間振とうした後、液を新しいチューブに回収し、さらに 25 μ l の抽出液を加え、室温で 30 分間振とうした後、液を回収した。2 回の抽出液を合わせて、減圧濃縮遠心機で 5~10 μ l になるまで濃縮した。

次に、ペプチド断片を含む溶液を Zip Tip (Millipore)を用いて脱塩後、プレート上に結晶

化させた。操作はまず、濃縮した試料に 1~5% TFA を約 1/10 量加え、TFA の終濃度を 0.1%~0.5%とした。P20 のマイクロピペットを 10 μ l に合わせ、ZipTip をつけ、50% ACN を吸い上げ、廃液用のチューブに捨てる操作を 3 回繰り返す、樹脂を前処理した。0.1% TFA を吸い上げ、廃液用のチューブに捨てる操作を 3 回繰り返す、平衡化後、試料をゆっくり 5 回ピペッティングし樹脂に添着させた。0.1% TFA を吸い上げ、廃液用のチューブに捨てる操作を 3 回繰り返す、塩等を洗い流した後、マトリックス溶液(2 mg/ml CHCA in 50% ACN, 0.1% TFA)2 μ l 中でゆっくり 5 回ピペッティングして溶出し、プレート上でマトリックスを結晶化させた。MALDI (Matrix-assisted Laser Desorption Ionization)-TOF (Time of flight)型の質量分析計 Biflex (BRUKER)を使用し質量を測定後、PMF (Peptide Mass Fingerprint)法によってデータベース検索(Mascot Search, <http://www.matrixscience.com>)し、タンパク質を同定した。

4. テロメア DNA と Hsp70 の二重染色

I の「4. テロメア DNA とタンパク質の二重染色」を参照して行った。

[1次抗体、2次抗体、プローブの濃度]

primary antibody	: 5 μ g/ml Anti-Hsp70 monoclonal antibodies (Calbiochem)
secondary antibody	: 5 μ g/ml Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (Molecular Probes)
probe	: 0.4 μ g/ml Cy3-labeled telomere PNA probe

結果及び考察

1. TRF2 の検出

ECTR 複合体は、テロメア結合タンパク質のうちの 1 つである TRF2 を含んでいることが予測されるため、このことを確認した。II の「7. ECTR フラクシオンの再遠心、解析」で再遠心後濃縮されたサンプルのうちフラクシオン 8-11 を用い、各フラクシオンを 1 つにまとめ、抗 TRF2 抗体を用いて Western blot 解析を行った。その結果、薄いながらも TRF2 のバンドが検出された(Fig. 20)。

次に、エッペンドルフ冷却遠心機 5417R を用いた遠心の上清を用いて、抗 TRF2 抗体で免疫沈降を行い、抗 TRF2 抗体を用いた Western blot 解析によって免疫沈降物を解析した

結果、TRF2 のバンドが認められた(Fig. 21)。冷却遠心の上清には、染色体末端のテロメアとも ECTR-DNA と結合していない TRF2 も含まれていると考えられるが、検出された TRF2 の一部は、ECTR 複合体に含まれる TRF2 である可能性がある。また、この抗体を用いて TRF2 の免疫沈降が可能であることも確認できた。しかし、TRF2 タンパク質の量はかなり少なく、銀染色では、非特異的なバンドのみで、予想分子量付近にはバンドは認められなかった。

次に、Fig. 20 とは異なる方法でフラクシオンを濃縮し、TRF2 の存在を確認した。ECTR 複合体の存在するフラクシオン 8-13 をまとめて 1 つにし、抗 TRF2 抗体で免疫沈降を行い、抗 TRF2 抗体を用いた Western blot 解析によって免疫沈降物を解析した。その結果、わずかではあるが TRF2 のバンドが認められた(Fig. 22)。また、抗体除去後、同じメンブレンで抗 Mre11 抗体を用いた Western blot 解析を行ったが、バンドは認められなかった。ECTR 複合体に Mre11 が存在すると仮定した場合、存在量は TRF2 に比べかなり少ないと考えられることから、これは妥当な結果である。Fig. 20 と Fig. 22 の結果から ECTR フラクシオンに TRF2 が存在することがわかった。この TRF2 は、ECTR 複合体に含まれているものであることが期待される。

II の「5. リボソームの除去」で、ECTR-DNA のサイズが小さいこと、ECTR 複合体はリボソームの small subunit に近い沈降定数をもつと考えられることから、ECTR-DNA は、タンパク質と相互作用し、その結果大きな複合体を形成していると考えられると考察した。その後、異なる 2 つの方法でフラクシオンを濃縮し、ECTR フラクシオンに TRF2 が存在することを確認した。間接的ではあるが、これらの結果から、TRF2 を含むいくつかのタンパク質と ECTR-DNA が大きな複合体を形成していると考えられることができる。

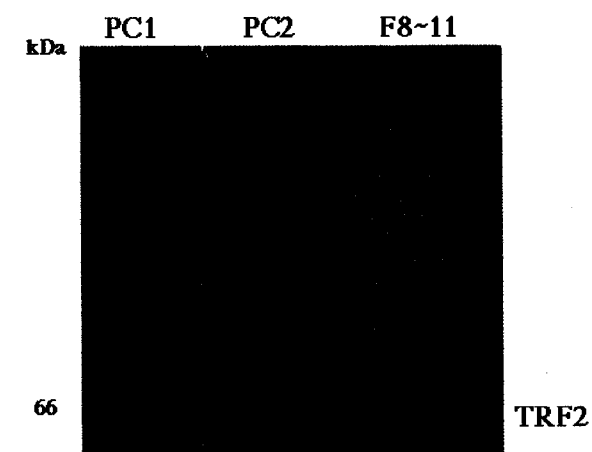


Fig. 20. Detection of TRF2 after TCA concentration in ECTR fractions

再遠心後、フラクシオン 8-11 のみを用い、抗 TRF2 抗体を用いて Western blot 解析を行った。KMST-6 細胞から SDS によってタンパク質を抽出し、ポジティブコントロール(PC)として用いた。PC1 は 20 μ g、PC2 は 1 μ g 泳動した。

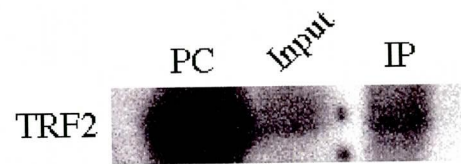


Fig. 21. Detection of TRF2 after immunoprecipitation in the supernatant fraction by refrigerated centrifugation

冷却遠心の上清を用いて、抗TRF2抗体で免疫沈降を行い、抗TRF2抗体を用いたWestern blot解析によって免疫沈降物を解析した。KMST-6細胞からSDSによってタンパク質を抽出し、ポジティブコントロール(PC)として用いた。Inputとして、免疫沈降に用いた冷却遠心の上清の10%を泳動した。IPは免疫沈降(immunoprecipitation)の結果を示す。

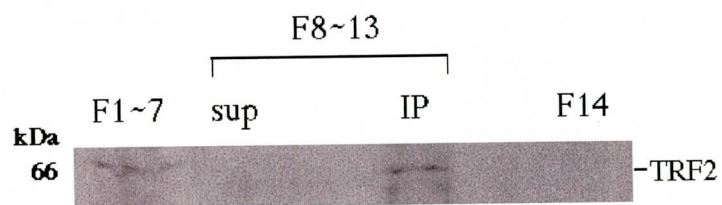


Fig. 22. Detection of TRF2 after immunoprecipitation in ECTR fractions

ECTRフラクシオン(8-13)をまとめて1つにし、抗TRF2抗体で免疫沈降を行い、抗TRF2抗体を用いたWestern blot解析によって免疫沈降物を解析した。IPは免疫沈降(immunoprecipitation)の結果を示す。supは、免疫沈降後の上清(supernatant produced by IP)を示す。フラクシオン1-7,フラクシオン14, supは限外濾過濃縮法によって濃縮後、一部を泳動した。

2. ECTR フラクシオンに含まれるタンパク質の質量分析による同定

Fig. 17、Fig. 19 で ECTR-DNA のピークと類似した位置に現れる共通のバンドが認められる。Fig. 17 ではフラクシオン 9-11、Fig. 19 ではフラクシオン 8-11 の分子量 66 kDa 付近のバンドは、ECTR-DNA タンパク質複合体構成成分の一つと考えられる。そこで、Fig. 17 の分子量 66 kDa 付近のバンドをゲルから切り出し、質量分析によってタンパク質を同定した。その結果、このタンパク質は Hsp70 であることがわかった。Hsp70 は、新生タンパク質のフォールディングや会合、変性タンパク質の凝集阻害と修復など細胞内タンパク質品質管理を行っていることから、Hsp70 が ECTR 複合体の構成成分であるとすれば、複合体の構造を維持するための役割を持っている可能性がある[80]。真核生物の Hsp70 は、細胞内での役割が十分には解明されていない。今後、ECTR 複合体の中での Hsp70 の役割が解明されることによって、Hsp70 の機能の解明に貢献することが期待される。

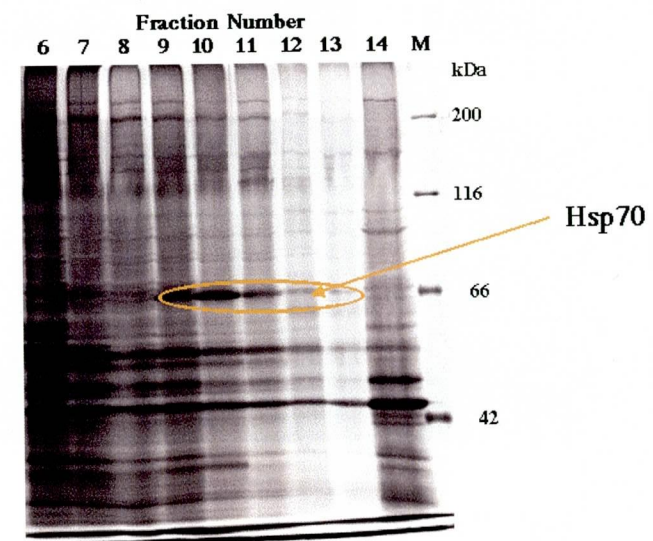


Fig. 23. MALDI-TOF-MS analysis of ECTR fraction

66 kDa 付近のバンドを切り出し、質量分析によってタンパク質を同定した。

3. Hsp70 とテロメアの共局在の検討

KMST-6 細胞を用いて、Hsp70 とテロメア DNA の二重染色を行い、これらの共局在を検討した。今回の結果からは、Hsp70 とテロメアの共局在は確認されなかった(Fig. 24)。これは、Hsp70 が細胞内に豊富に存在するタンパク質であるため、たとえテロメアに局在するものがあったとしても、細胞質等に局在する Hsp70 のシグナルにくらべると、シグナルが弱すぎて確認できなかった可能性がある。

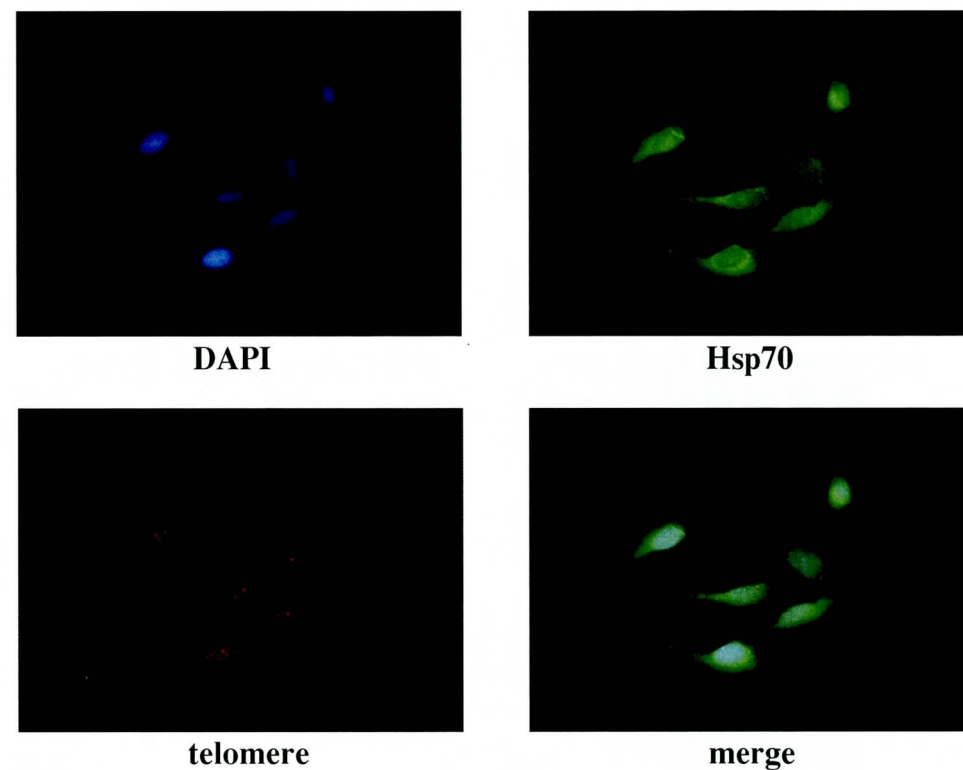


Fig. 24. Double staining of interphase KMST-6 cells with a telomere probe and an antibody of Hsp70

KMST-6細胞を用いて、Hsp70の免疫染色とtelomere PNA FISHによる二重染色を行い、Hsp70とテロメア配列の共局在を検討した。

結論

ECTR フラクシオンに TRF2 が存在することから、ECTR-DNA が TRF2 を含むいくつかのタンパク質と相互作用をし、その結果大きな複合体を形成していると考えられる。また、ECTR-DNA のピークと比較的類似した位置に現れるタンパク質のバンドを質量分析によって同定した結果、Hsp70 であることがわかった。Hsp70 とテロメアの共局在は確認できなかったが、ECTR 複合体が Hsp70 を含む可能性が完全に否定されたわけではない。ECTR 複合体の構造を維持するために Hsp70 が複合体に含まれている可能性はある。

総括

ECTR 複合体は、テロメラーゼ陰性不死化細胞にのみ存在し、染色体外にあり、テロメア繰り返し配列を持つ ECTR-DNA を含む。今回の結果から明らかにされた ECTR 複合体の特徴をまとめると以下のようになる。

1. ECTR-DNA は約 1 kb 以下と小さく、サイズが不均一である。
2. ECTR 複合体のサイズは不均一ではあるが、リボソームの small subunit に近い沈降定数を持つと考えられる。
3. 分画した ECTR フラクシオンは TRF2 を含む。
4. ECTR-DNA は約 1kb 以下と小さいことと ECTR 複合体のサイズはリボソームの small subunit 程度であることから、ECTR-DNA がタンパク質と相互作用し、その結果大きな複合体を形成していると考えられる。
5. 分画した ECTR 複合体は Hsp70 を含む可能性がある。

ところで、Ogino らによって ECTR-DNA の大多数が直線状であることが示されている[66]が、ECTR-DNA は約 1 kb 以下であり、ループを形成するのは不可能であると考えられる。よって、ECTR-DNA の末端が DNA ダメージチェックポイントを活性化する可能性が考えられる。しかし、今回、ECTR-DNA がタンパク質と相互作用している可能性を示しており、短いテロメアを持つ繊毛虫類のように、ECTR-DNA の末端がタンパク質によって保護されている可能性も考えられる。

また、ECTR-DNA は、ALT 細胞にのみ存在し、有限寿命細胞やテロメラーゼ陽性不死化細胞では、認められないことから、ECTR-DNA が ALT メカニズムに関与している可能性がある。ALT メカニズムでは、組み換えによりテロメアが維持されている可能性がいくつか示されているが、ECTR 複合体に含まれるタンパク質を明らかにすることによって、ECTR 複合体の機能が明らかにされると同時に ALT メカニズムの解析もさらに進むと考えられる。ALT メカニズムの分子機構が解明され、さらに正常細胞での抑制機構が解明されることによって、がん治療に大きく貢献することが期待される。

一方、分離された ECTR 複合体は、さらに精製が必要かもしれないが、分離が困難な染色体末端のテロメアに代わって、テロメア結合タンパク質複合体の解析のモデルとして利用可能であると考えられる。テロメア結合タンパク質の同定が進み、テロメア構造がより明らかにされることによって、テロメアの生体内での役割もさらに明確になり、その結果、老化、がん化のメカニズムの解明に寄与すると考えられる。

参考文献

1. Watson, J. D. (1972). Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat. New Biol.* 239 197-201.
2. Olovnikov, A. M. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J. Theor. Biol.* 41 181-90.
3. Lingner, J., Cooper, J. P., and Cech, T. R. (1995). Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem? *Science* 269, 1533-1534.
4. Blackburn, E. H., and Gall, J. G. (1978). A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J. Mol. Biol.* 120, 33-53.
5. Allshire, R. C., Dempster, M., and Hastie, N. D. (1989). Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly. *Nucleic Acids Res.* 17, 4611-4627.
6. Wright, W. E., Tesmer, V. M., Huffman, K. E., Levene, S. D., and Shay, J. W. (1997). Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev.* 11, 2801-2809.
7. Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H., and de Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97, 503-514.
8. Stansel, R. M., de Lange, T., and Griffith, J. D. (2001). T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *EMBO J.* 20 5532-5540.
9. Gottschling, D. E., Aparicio, O. M., Billington, B. L., and Zakian, V. A. (1990). Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell* 63 751-762.
10. Baur, J. A., Zou, Y., Shay, J. W., and Wright, W. E. (2001). Telomere position effect in human cells. *Science* 292, 2075-2077.
11. Zhong, Z., Shiue, L., Kaplan, S., and de Lange, T. (1992). A mammalian factor that binds telomeric TTAGGG repeats in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 12, 4834-4843.
12. Hanish, J. P., Yanowitz, J. L., and de Lange, T. (1994). Stringent sequence requirements for the formation of human telomeres. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91, 8861-8865.
13. Chong, L., van Steensel, B., Broccoli, D., Erdjument-Bromage, H., Hanish, J., Tempst, P., and de Lange, T. (1995). A human telomeric protein. *Science* 270, 1663-1667.
14. van Steensel, B., and de Lange, T. (1997). Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 385, 740-743.
15. Shen, M., Haggblom, C., Vogt, M., Hunter, T., and Lu, K. P. (1997). Characterization and cell cycle regulation of the related human telomeric proteins Pin2 and TRF1 suggest a role in mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94, 13618-13623.
16. Kishi, S., Wulf, G., Nakamura, M., and Lu, K. P. (2001). Telomeric protein Pin2/TRF1 induces mitotic entry and apoptosis in cells with short telomeres and is down-regulated in human breast tumors. *Oncogene* 20, 1497-1508.

17. Nakamura, M., Zhou, X. Z., Kishi, S., Kosugi, I., Tsutsui, Y., and Lu, K.P. (2001). A specific interaction between the telomeric protein Pin2/TRF1 and the mitotic spindle. *Curr. Biol.* 11, 1512-1516.
18. Bilaud, T., Koering, C. E., Binet-Brasselet, E., Ancelin, K., Pollice, A., Gasser, S. M., and Gilson, E. (1996). The telobox, a Myb-related telomeric DNA binding motif found in proteins from yeast, plants and human. *Nucleic Acids Res.* 24, 1294-1303.
19. Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L., and de Lange, T. (1997). Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat. Genet.* 17, 231-235.
20. van Steensel, B., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell.* 92, 401-413.
21. Karlseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S., and de Lange, T. (1999). p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 283, 1321-1325.
22. Smith, S., Gariat, I., Schmitt, A., and de Lange, T. (1998). Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* 282, 1484-1487.
23. Smith, S., and de Lange, T. (2000). Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Curr. Biol.* 10, 1299-1302.
24. Cook, B. D., Dynek, J. N., Chang, W., Shostak, G., and Smith, S. (2002). Role for the related poly(ADP-Ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres. *Mol. Cell Biol.* 22, 332-342.
25. Kim, S. H., P. Kaminker, and J. Campisi. (1999). TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat. Genet.* 23, 405-412.
26. Zhou, X. Z., and Lu, K. P. (2001). The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor. *Cell* 107, 347-359.
27. Bailey, S. M., Meyne, J., Chen, D. J., Kurimasa, A., Li, G. C., Lehnert, B. E., and Goodwin, E. H. (1999). DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96, 14899-14904.
28. Song, K., Jung, D., Jung, Y., Lee, S.G., and Lee, I. (2000). Interaction of human Ku70 with TRF2. *FEBS Lett.* 481, 81-85.
29. Hsu, H. L., Gilley, D., Galande, S. A., Hande, M. P., Allen, B., Kim, S. H., Li, G. C., Campisi, J., Kohwi-Shigematsu, T., and Chen, D. J. (2000). Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining. *Genes. Dev.* 14, 2807-2812.
30. Bailey, S. M., Cornforth, M. N., Kurimasa, A., Chen, D. J., and Goodwin, E. H. (2001). Strand-specific postreplicative processing of mammalian telomeres. *Science* 293, 2462-2465.
31. Li, B., Oestreich, S., and de Lange, T. (2000). Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell* 101, 471-483.
32. Zhu, X. D., Kuster, B., Mann, M., Petrini, J. H., and de Lange, T. (2000). Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat. Genet.* 25, 347-352.
33. Carney, J. P., Maser, R. S., Olivares, H., Davis, E. M., Le Beau, M., Yates, J. R. 3rd., Hays, L., Morgan, W. F., and Petrini, J. H. (1998). The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* 93, 477-486.
34. Petrini, J. H. (1999). The mammalian Mre11-Rad50-nbs1 protein complex: integration of functions in the cellular DNA-damage response. *Am. J. Hum. Genet.* 64, 1264-1269.
35. Fang, G., and Cech, T. R. (1993). Oxytricha telomere-binding protein: DNA-dependent dimerization of the alpha and beta subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90, 6056-6060.
36. Horvath, M. P., Schweiker, V. L., Bevilacqua, J. M., Ruggles, J. A., and Schultz, S. C. (1998). Crystal structure of the Oxytricha nova telomere end binding protein complexed with single strand DNA. *Cell* 95, 963-974.
37. Baumann, P., and Cech, T. R. (2001). Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science* 292, 1171-1175.
38. Baumann, P., Podell, E., and Cech, T. R. (2002). Human Pot1 (protection of telomeres) protein: cytolocalization, gene structure, and alternative splicing. *Mol. Cell Biol.* 22, 8079-8087.
39. Loayza, D., and De Lange, T. (2003). POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature* 423, 1013-1018.
40. Colgin, L. M., Baran, K., Baumann, P., Cech, T. R., and Reddel, R. R. (2003). Human POT1 facilitates telomere elongation by telomerase. *Curr. Biol.* 13, 942-946.
41. Evans, S. K., and Lundblad, V. (1999). Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. *Science* 286, 117-120.
42. Evans, S. K., and Lundblad, V. (2000). Positive and negative regulation of telomerase access to the telomere. *J. Cell Sci.* 113 3357-3364.
43. Chandra, A., Hughes, T. R., Nugent, C. I., and Lundblad, V. (2001). Cdc13 both positively and negatively regulates telomere replication. *Genes Dev.* 15, 404-14.
44. Greider, C. W., and Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43, 405-413.
45. Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L., and Shay, J. W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011-2015.
46. Bryan, T. M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S., and Reddel, R.R. (1995). Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J.* 14, 4240-4248.
47. Bryan, T. M., Englezou, A., Dalla-Pozza, L., Dunham, M.A., and Reddel, R.R. (1997). Evidence

- for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat. Med.* 3, 1271-1274.
48. Bryan, T. M., and Reddel, R. R. (1997). Telomere dynamics and telomerase activity in *in vitro* immortalised human cells. *Eur. J. Cancer* 33, 767-73.
 49. Reddel, R. R., Bryan, T. M., Colgin, L. M., Perrem, K. T., and Yeager, T. R. (2001). Alternative lengthening of telomeres in human cells. *Radiat. Res.* 155, 194-200.
 50. Henson, J. D., Neumann, A. A., Yeager, T. R., and Reddel, R. R. (2002). Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene* 21, 598-610.
 51. Wang, S. S., and Zakian, V. A. (1990). Telomere-telomere recombination provides an express pathway for telomere acquisition. *Nature* 345, 456-458.
 52. Lundblad, V., and Blackburn, E. H. (1993). An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues *est1* senescence. *Cell* 73, 347-360.
 53. Nakamura, T. M., Cooper, J. P., and Cech, T. R. (1998). Two modes of survival of fission yeast without telomerase. *Science* 282, 493-496.
 54. Dunham, M. A., Neumann, A. A., Fasching, C. L., and Reddel, R. R. (2000). Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat. Genet.* 26, 447-450.
 55. Baird, D. M., Jeffreys, A. J., and Royle, N. J. (1995). Mechanisms underlying telomere repeat turnover, revealed by hypervariable variant repeat distribution patterns in the human Xp/Yp telomere. *EMBO J.* 14, 5433-5443.
 56. Coleman, J., Baird, D. M., and Royle, N. J. (1999). The plasticity of human telomeres demonstrated by a hypervariable telomere repeat array that is located on some copies of 16p and 16q. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1637-1646.
 57. Varley, H., Pickett, H. A., Foxon, J. L., Reddel, R. R., and Royle, N. J. (2002). Molecular characterization of inter-telomere and intra-telomere mutations in human ALT cells. *Nat. Genet.* 30, 301-305.
 58. Yeager, T. R., Neumann, A. A., Englezou, A., Huschtscha, L. I., Noble, J. R., and Reddel, R. R. (1999). Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res.* 59, 4175-4179.
 59. Lamond, A. I., and Earnshaw, W. C. (1998). Structure and function in the nucleus. *Science* 280, 547-553.
 60. Hodges, M., Tissot, C., Howe, K., Grimwade, D., and Freemont, P. S. (1998). Structure, organization, and dynamics of promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *Am. J. Hum. Genet.* 63, 297-304.
 61. Wu, G., Lee, W. H., and Chen, P. L. (2000). NBS1 and TRF1 colocalize at promyelocytic leukemia bodies during late S/G2 phases in immortalized telomerase-negative cells. Implication of NBS1 in alternative lengthening of telomeres. *J. Biol. Chem.* 275, 30618-30622.
 62. Yankiwski, V., Marciniak, R. A., Guarente, L., and Neff, N. F. (2000). Nuclear structure in normal and Bloom syndrome cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97, 5214-5219.
 63. Johnson, F. B., Marciniak, R. A., McVey, M., Stewart, S. A., Hahn, W.C., and Guarente, L. (2001). The *Saccharomyces cerevisiae* WRN homolog Sgs1p participates in telomere maintenance in cells lacking telomerase. *EMBO J.* 20, 905-913.
 64. Grobelny, J. V., Godwin, A. K., and Broccoli, D. (2000). ALT-associated PML bodies are present in viable cells and are enriched in cells in the G(2)/M phase of the cell cycle. *J. Cell Sci.* 113, 4577-4585.
 65. Tokutake, Y., Matsumoto, T., Watanabe, T., Maeda, S., Tahara, H., Sakamoto, S., Niida, H., Sugimoto, M., Ide, T., and Furuichi, Y. (1998). Extra-chromosomal telomere repeat DNA in telomerase-negative immortalized cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247, 765-772.
 66. Ogino, H., Nakabayashi, K., Suzuki, M., Takahashi, E., Fujii, M., Suzuki, T., and Ayusawa, D. (1998). Release of telomeric DNA from chromosomes in immortal human cells lacking telomerase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248, 223-227.
 67. Harley, C. B., Futcher, A. B., and Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460.
 68. Hastie, N. D., Dempster, M., Dunlop, M. G., Thompson, A. M., Green, D. K., and Allshire, R. C. (1990). Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 346, 866-868.
 69. Hatakeyama, S., and Ishikawa, F. (1997). ICE: a novel and efficient method for isolation of chromosomal ends. *Genet. Anal.* 14, 45-46.
 70. Sugihara, S., Mihara, K., Marunouchi, T., Inoue, H., and Namba, M. (1996). Telomere elongation observed in immortalized human fibroblasts by treatment with ⁶⁰Co gamma rays or 4-nitroquinoline 1-oxide. *Hum. Genet.* 97, 1-6.
 71. Lansdorp, P. M., Verwoerd, N. P., van de Rijke, F. M., Dragowska, V., Little, M.-T., Dirks, R. W., Raap, A. K., and Tanke, H. J. (1996). Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum. Mol. Genet.* 5, 685-691.
 72. Zijlmans, J. M., Martens, U. M., Poon, S. S., Raap, A. K., Tanke, H. J., Ward, R. K., and Lansdorp, P. M. (1997). Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T₂AG₃ repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7423-7428.
 73. Rubin, C. M., Houck, C. M., Deininger, P. L., Friedmann, T., and Schmid, C. W. (1980). Partial nucleotide sequence of the 300-nucleotide interspersed repeated human DNA sequences. *Nature* 284, 372-374.
 74. Deininger, P. L., Jolly, D. J., Rubin, C. M., Friedmann, T., and Schmid, C. W. (1981). Base sequence studies of 300 nucleotide renatured repeated human DNA clones. *J. Mol. Biol.* 151, 17-33.

75. 徳武巧記 (1998). ウエルナー遺伝子領域のゲノム解析と不死化細胞のテロメア解析、学位論文
76. Nielsen, P. E., Egholm, M., Berg, R. H., and Buchardt, O. (1991). Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 254, 1497-1500.
77. Zieve, G. W., Turnbull, D., Mullins, J. M., and McIntosh, J. R. (1980). Production of large numbers of mitotic mammalian cells by use of the reversible microtubule inhibitor nocodazole. Nocodazole accumulated mitotic cells. *Exp. Cell Res.* 126, 397-405.
78. Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
79. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
80. Hartl, F. U., and Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852-1858.

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始御指導をしていただきました広島大学大学院医歯薬学総合研究科の井出利憲先生に心から感謝申し上げます。

本論文の審査にあたり、適切な御助言をしていただきました広島大学大学院医歯薬学総合研究科の杉山政則先生、藤元貴啓先生に心から感謝申し上げます。

また広島大学大学院理学研究科の泉俊輔先生に実験上の御指導をいただきました。心から感謝申し上げます。

最後に、困難な状況で研究を続けることに対して、暖かく見守って下さった友人達に心から感謝いたします。