

Elucidating the biological significance of the TRF2-ORC interaction at telomeres using the specific TRF2 mutants

比嘉, 允宣

<https://hdl.handle.net/2324/4060103>

出版情報 : Kyushu University, 2019, 博士 (創薬科学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)

氏 名	比嘉 允宣
論 文 名	Elucidating the biological significance of the TRF2-ORC interaction at telomeres using the specific TRF2 mutants (特異的 TRF2 変異体を利用した TRF2-ORC 相互作用のテロメアにおける生物学的重要性の解析)
論文調査委員	主 査 九州大学 教授 藤田 雅俊 副 査 九州大学 教授 片山 勉 副 査 九州大学システム生命科学府 教授 釣本 敏樹 副 査 山口東京理科大学 准教授 川上 広宣

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

真核生物の複製開始点形成は、ORC1 から ORC6 で構成される Origin recognition complex (ORC) に依存して複製ヘリカーゼのコアとなる Mini-chromosome maintenance (MCM) 複合体が DNA 上に装着されて完了する。先行研究により、*TERF2* 遺伝子にコードされるテロメア結合タンパク質 Telomere repeat binding factor 2 (TRF2) が Origin recognition complex subunit 1 (ORC1) と直接結合することなどを見出していた。しかし、TRF2-ORC 結合を特異的に阻害した解析はなされておらず、TRF2-ORC 結合およびテロメア内複製開始点の重要性は未だ不明であった。本研究では、ORC のみと結合できない TRF2 変異体 (特異的 ORC 結合欠損 TRF2 変異体) を探索・利用し、テロメアへの ORC リクルートを特異的に阻害することでその生物学的重要性を明らかにしようとした。

第一部では、*lacO*-*LacI* 法や生化学的解析により TRF2-ORC 結合の分子機構について詳細に解析した。*lacO*-*LacI* 法により ORC リクルートに関わる TRF2 領域を調べたところ、二量体形成に関わる TRFH ドメインのみで ORC リクルートに十分であった。また、二量体形成能を欠損した TRF2 (V52D/N53P) 変異体は ORC リクルート活性を有していなかったことから、TRF2 の二量体形成能が ORC リクルートに必要であることが示唆された。さらに、TRF2 のホモログである TRF1 は ORC リクルート活性をもたないことや、RNA や DNA は TRF2-ORC 結合に関与していないことも明らかにした。

第二部では、特異的 ORC 結合欠損 TRF2 変異体の探索とその変異体を用いた TRF2-ORC 結合の生物学的重要性の解析を行った。第一部の結果と TRFH ドメインの結晶構造に基づいて ORC1 結合に重要な TRF2 残基を予想し、それら残基のアラニン置換変異体を 6 種類作製した。種々の解析の結果、TRF2 (E111A/E112A) 変異体 (以下、TRF2 EE 変異体) は、ORC リクルート能を欠損しているが、二量体形成能および ORC 以外の TRF2 結合因子との結合は概ね維持していることがわかり、特異的 ORC 結合欠損 TRF2 変異体として適した性質を有していると考えられた。そこで、内在性 TRF2 を TRF2 EE 変異体で置換するため、*TERF2* 遺伝子編集 HeLa 細胞株を樹立した。ChIP-qPCR 法による解析の結果、テロメア結合 ORC1 量は TRF2 WT 株と比べて TRF2 EE 株で減少していた。これは、TRF2-ORC 結合が細胞内での ORC のテロメア結合に寄与していることを示唆している。次に、テロメア維持における TRF2-ORC 結合の重要性について調べるため、DNA 複製阻害剤であるヒドロキシウレア (HU) の低容量処理時におけるテロメアダメージ foci (TIFs) 陽性細胞の割合やテロメア含有微小核の割合を調べた。その結

果、TIFs 陽性細胞の割合は TRF2 EE 株では HU 処理によって増加したが HeLa 親株や TRF2 WT 株では増加しなかった。また、HU 処理時のテロメア含有微小核を持つ細胞の割合は、HeLa 親株や TRF2 WT 株と比べて TRF2 EE 株で高い水準にあった。以上の結果は、TRF2 にリクルートされた ORC が複製ストレス存在下でのテロメア恒常性維持に寄与していることを示唆している。

以上の結果は非常に興味深いものと考えられ、よって本学位請求論文は博士（創薬科学）の学位に値すると認めた。