

平成13年度

# 若手研究者奨励研究報告書

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

## 抗癌剤のターゲットとしてのテロメアの短縮をモニターする細胞周期チェックポイント関連分子の可能性

所属 名古屋市立大学 医学部 第二生化学  
研究者 丹伊田 浩行

### 要旨

染色体末端テロメアを監視し細胞周期を停止させる機構を明らかにする目的でテロメラーズ欠損 ES 細胞の増殖速度低下前後における細胞周期調節因子の発現を比較した。しかしながら P21, p53, Chk1 および Chk2 に関して違いは認められなかった。

### 1. 研究目的

抗癌剤の分子標的を、テロメア長を監視する細胞周期のチェックポイントを理解することから探ることにある。実際、不死化細胞である癌細胞由来の HeLa 細胞などはヒトの細胞分裂寿命により分裂を停止した細胞よりも短いテロメアでありながら、なお無限に分裂を繰り返している。このため正常なテロメア長の監視機構になんらかの破たんが生じていることも考えられる。現在までにテロメア短縮が細胞分裂寿命に重要であろうと提唱されているにもかかわらず、その分子レベルでのメカニズムの詳細はほとんど明らかにされていない。細胞がある一定回数分裂した後分裂できなくなるのは繰り返される分裂過程で有害な変異が蓄積するリスクを回避するためであろう。その基本をなす細胞分裂回数にともなうテロメア短縮がいかなるシグナルとなり、実際に細胞周期を停止させるのか、その際にこれまで明らかにされてきた細胞周期の調節機構に何らかの変化が起きているのか、また染色体の安定性を保つための複数のチェックポイントのいずれかが活性化されているのかなどについては未だに明らかにされていないことが多い。我々がこれらの点について理解することは、本来、細胞の無秩序な増殖を防ぐために健全な細胞が備えているであろう細胞周期を停止させるシステムが破壊されている癌細胞を制御するための様々なアイデアを我々に提示し、抗癌剤を創薬することを可能にするものと期待される。

### 2. 研究方法

#### 細胞

本来テロメラーズ活性があり、不死化細胞であるマウス ES 細胞を相同組み換え法により遺伝的にテロメラーズ活性を欠損させた細胞を用いる。

遺伝的バックグラウンドが同一な、テロメアの長さが異なる一連の細胞を研究材料とし、短縮に伴う細胞周期チェックポイント関連分子の量的、質的変化を解析する。

#### テロメア長の測定

樹立したテロメラーズ RNA 成分欠損 ES 細胞をアガロースゲル中で Proteinase K 処理とつづいて制限酵素 Hinf I にて genome DNA を消化する。次にパルスフィールドゲル電気泳動装置にて泳動をし、テロメアリピート配列の oligo DNA をプローブとして Southern blot を行う。これにより各分裂回数における平均テロメア長を測定する。

#### テロメラーズ活性欠損 ES 細胞の増殖速度

それぞれの分裂回数における分裂速度を計る。継代培養時に一定数の ES 細胞を培養し各分裂回数での平均ダブリングタイムを測定する。これによりテロメラーズ RNA 成分欠損細胞の増殖が阻害され始める前と後の分裂回数を確認する。

#### Fluorescence-activated Cell Sorter Analysis

テロメラーズ活性欠損 ES 細胞の増殖速度に変化が現れる前後の細胞において、細胞周期の各フェーズのプロフィールを DNA 含有量を指標とし FACS により測定する。

#### 転写産物およびタンパク質量の検出および定量

細胞周期チェックポイント関連分子の転写量、タンパク質量の比較、解析を行う。試料としては増殖速度に遅延が認められたテロメラーゼ RNA 成分欠損 ES 細胞と、テロメア長がまだ長く増殖速度においても野生型と差がない培養初期のテロメラーゼ RNA 成分欠損 ES 細胞を用いる。転写産物検出方法としては RT-PCR 法を、定量方法としては Northern blot により転写産物量についての検討を行う。また細胞中のタンパク質の同定と定量については Western blot を行う。これらの検討事項について対象とする分子としては p53, p21, Chk1, Chk2 とする。

#### Kinase assay

Chk1 および Chk2 については kinase assay も行い活性化される細胞周期チェックポイントについてその活性化の有無を調べる。

### 3. 結果

#### テロメラーゼ活性欠損 ES 細胞の増殖と細胞周期

Wt14, DKO301 および DKO741 は平均分裂回数 250 回あたりまではほぼ同じ増殖速度にて分裂した。しかしおよそ 250 回を境に DKO301 と DKO741 の増殖速度は徐々に低下していった。DKO301, DKO741 の増殖速度が低下しだしてすぐの平均分裂回数 270 回のときの細胞を用いて細胞周期の解析を FACS により行った。コントロールとしては同じ日数培養した、平均分裂回数 290 回の WT14 の細胞を用いた。

DNA 含量を指標に細胞周期の G1, S および G2/M 期にいる細胞を比べると、WT14 に比較して DKO301, DKO741 とともに G1 期の割合が減り G2/M 期にある細胞数が増えてた (Fig. 1)。テロメラーゼ RNA 成分欠損 ES 細胞である DKO301 と DKO741 はテロメラーゼ活性が検出されないため染色体末端のテロメアは分裂が進むに従って短くなっていく。一般に 1 回の細胞分裂でテロメアは約 0.1 Kb なり実際 DKO301, DKO741 のテロメア長もこのとき 20-25 Kb にまで短縮していた (Fig.2)。この短縮が原因となり増殖速度の低下が起こったものと考えられた。この変化により、増殖速度低下前の DKO301, DKO741 や同程度に細胞分裂を経た WT14 と細胞内の既知の細胞周期の調節因子である p21, p53 の転写量とタンパク質量に違いが見られるかを RT-PCR, Northern blot と Western blot にて WT と比較した。しかし p21 および p53 の転写量、タンパク質量ともに大きな差はみられなかった。またこの増殖速度の低下が細胞老化が誘導されたために起こったのかを知る目的で酸性条件下にて検出される  $\beta$ -galactosidase 活性を測定したが DKO301, DKO741 とともにその活性は認められなかった。次にテロメアが短くなったことで G2/M 期に細胞の蓄積が見られたので G2/M 期の細胞周期チェックポイントに働く Chk1 および Chk2 について発現量とタンパク質量およびその kinase 活性を測定した。しかし増殖速度低下前の DKO301, DKO741 や同程度に細胞分裂を経た WT14 に比べ転写量、タンパク質量および kinase 活性に大きな差は見られなかった。またチェックポイントが活性化されているときの指標となる Chk1, Chk2 の Western blot における泳動距離の短縮も認められなかった。

### 4. 考察

テロメラーゼ活性を遺伝的に欠損させた ES 細胞は分裂回数が 250 回を越えると徐々に増殖速度が低下してゆく。この低下はテロメア短縮を監視している機構により細胞周期の調節因子に情報が伝えられた結果起こるものと考えられる。そこで既知の細胞周期進行の制御に関わる分子、p21, p53, Chk1 および Chk2 について主にその発現、タンパク質量に注目し調べたが大きな差が増殖速度低下前や同分裂回数を経た WT との間に認められなかった。しかしながら FACS 解析から若干ではあるが増殖速度低下後の DKO 細胞に G2/M 期における細胞の蓄積が認められた。このことはテロメアが短縮し染色体末端の融合などが起こり始めたため、姉妹染色体の分離がうまくいかなかったためと推測される。そこで細胞周期の複製やダメージチェックポイントに働いている Chk1, Chk2 に大きな変化がなかったことから、スピンドルチェックポイントの関連分子分子を調べる必要があるものと思われる。

### 5. まとめ

テロメアが短縮することにより誘導された細胞増殖速度の低下を制御している細胞周期関連分子の同

定を目的に、p21, p53, Chk1 および Chk2 の挙動を転写とタンパク質量の両面から調べたが候補となるものを見いだすに至らなかった。FACS 解析では若干ながら増殖速度の低下したテロメラーゼ RNA 欠損細胞が G2/M 期に蓄積していることが認められた。以上の結果はテロメア短縮に伴う増殖速度の低下は DNA 複製やダメージチェックポイントが活性化されたためではないであろうことを示唆する。

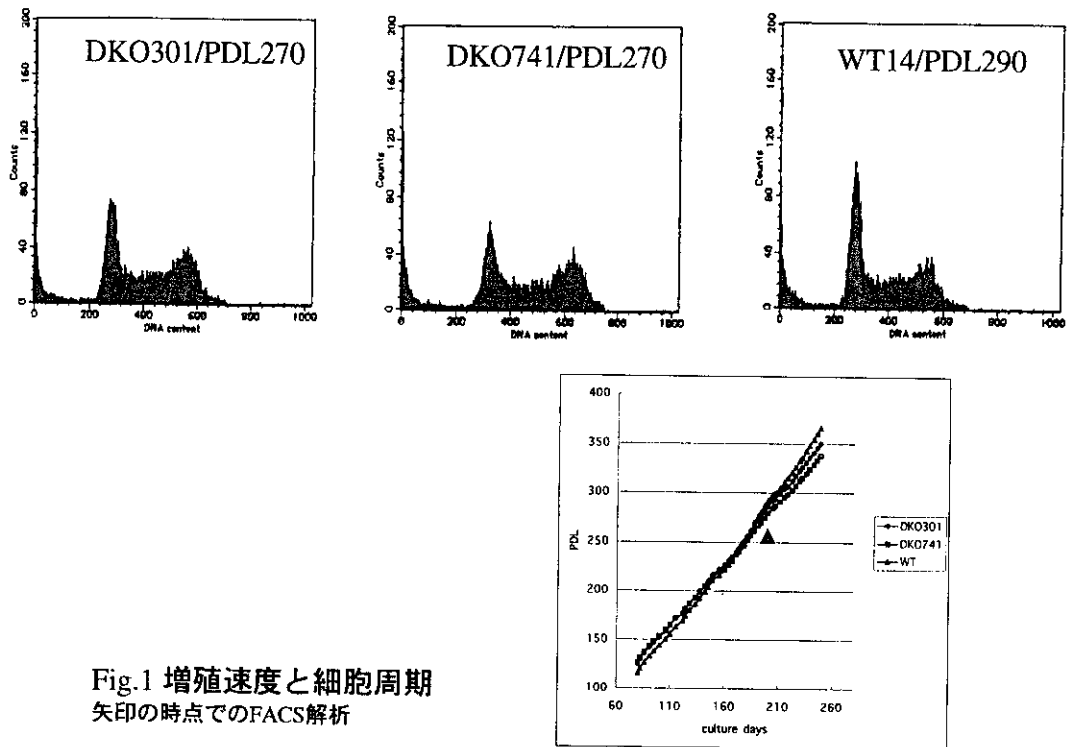


Fig.1 増殖速度と細胞周期  
矢印の時点でのFACS解析

probe TTAGGG<sub>3</sub>  
DKO301 DKO741 WT14  
PDL 136 358 468 137 345 513 376 813

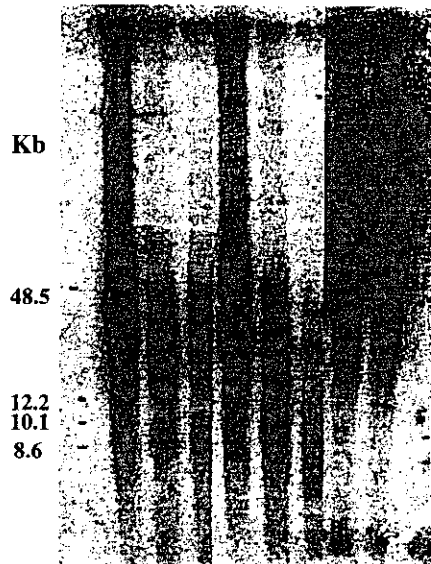


Fig.2 細胞分裂に伴う  
テロメアの短縮

---

平成13年度

創業等ヒューマンサイエンス総合研究事業  
若手研究者奨励研究報告書

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社