

平成 12 年度

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

研 究 報 告 書

老化に伴うゲノム構造変化の分子機構に関する研究

－早老症をモデルとして

平成 13 年 3 月

主任研究者 松浦 彰

## 平成 12 年度 研究報告書 目次

1. 総括研究報告-----	1
老化に伴うゲノム構造変化の分子機構に関する研究 －早老症をモデルとして-----	2
国立長寿医療研究センター老年病研究部 外科系総合診療研究室 室長 松浦 彰	
2. 分担研究報告-----	12
1. 早老症関連遺伝子産物によるゲノム構造維持機構に関する研究---	13
国立長寿医療研究センター老年病研究部 外科系総合診療研究室 室長 松浦 彰	
2. テロメラーゼによる末梢血管拡張性運動失調症（Ataxia telangiectasia）患者由来不死化細胞の樹立に関する研究----	21
国立長寿医療研究センター老年病研究部 東洋医学・薬物療法開発室 室長 本山 昇	
3. リボゾーム RNA 反復遺伝子の安定性を維持する機構の解析-----	34
岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所 遺伝子発現統御第二部門 助手 小林 武彦	
3. 研究成果の刊行物・別刷-----	39

# 1. 総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

総括研究報告書

老化に伴うゲノム構造変化の分子機構に関する研究—早老症をモデルとして

主任研究者 松浦 彰 国立長寿医療研究センター老年病研究部  
外科系総合診療研究室 室長

研究要旨

早老症 ataxia telangiectasia の原因遺伝子 *ATM*、Werner syndrome の原因遺伝子 *WRN* がゲノム DNA の監視・修復機構に関与していることが示唆されている。これらのタンパク質が DNA 代謝にどのように関わり、その欠損がゲノム上にどのような構造変化を引き起こすのか、を解析し、早老症をモデルとして老化・老年病の分子機序を解明することが本研究課題の最終的な目標である。本年度、早老症原因遺伝子産物の詳細な機能解析を行うことを目的に、モデル細胞である分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) におけるそれぞれのホモログである Rad3、Rqh1 の機能ドメインの同定と制御機構の解析を行い、1. *ATM* 関連因子が複数の経路を統合的に制御することで、ゲノムインテグリティの維持に関わっていること、2. Rqh1 のヘリカーゼ活性が必要とされないヘリカーゼドメイン機能が存在すること、N 末領域に紫外線耐性に関わる新たな機能ドメインが存在する可能性があること、を明らかにした。

早老症 AT 患者由来細胞(AT 細胞)において、テロメア長が迅速に短縮することが報告されており、このことと早期細胞老化との関係が示唆されている。AT 細胞にテロメラーゼの触媒サブユニット (hTERT) 遺伝子を導入し、細胞株を樹立した。hTERT 導入細胞では、テロメア長が顕著に伸張し、親株で見られる replicative senescence を回避できることが示された。

ゲノムの安定性維持のメカニズムの解明を目的とし、出芽酵母の反復配列 rDNA 内での組み換え制御配列の解析を行った。今年度は複製阻害活性に依存した rDNA の組み換え機構解明の第一段階として、組み換えに必須な DNA 配列 (EXP と命名) を rDNA リピートの非転写領域内に同定した。EXP は連続した約 500 bp からなる配列で、予想通り DNA 複製フォーク阻害点を含んでいたが、EXP の約 70%はそれとは無関係な配列であった。

松浦 彰 長寿医療研究センター  
老年病研究部  
外科系総合診療研究室  
室長

本山 昇 長寿医療研究センター  
老年病研究部  
東洋医学薬物療法開発室  
室長

小林武彦 岡崎国立共同研究機構  
基礎生物学研究所  
遺伝子発現統御第二部門  
助手

要であると考えられる。

本研究課題においては、早老症である Werner 症候群、毛細血管拡張性運動失調症(AT)の原因遺伝子 *WRN*、*ATM* に注目し、それらの遺伝子産物およびそのホモログが真核細胞中でのどのような機能を持ち、その異常がゲノムインテグリティの破綻をどのように誘起するか、について解明することを目標として酵母、培養細胞を用いた解析を行った。さらに、モデル生物酵母において、反復配列 rDNA のインテグリティを維持するメカニズムを DNA 配列の面から解析し、ゲノム維持に関与するシス因子の機能に関する研究を進めた。

#### A. 研究目的

遺伝的に早発老化症状を呈するいわゆる早老症の原因遺伝子の分子レベルでの解析が進み、ゲノムに対する種々のストレスに対する監視および修復機構の機能低下がヒトの老化過程の抑制において重要な役割を果たしていることが明らかになっている。老化、老年病に対する予防・治療薬の開発のためには、ゲノムストレスに対する生体応答機構、その破綻をもたらすゲノムレベルのグローバルな変化を詳細に解析することが必要であり、このため老化過程におけるゲノムレベルの変化を解析するためのモデルシステムの構築が重

#### B. 研究方法

分裂酵母の *ATM* ホモログ *rad3+* をプラスミド上にクローン化し、error-prone PCR により導入したランダム突然変異のなかから、温度感受性かつ separation-of-function 表現型を示す突然変異を探索した。*rqh1+* 遺伝子に関しては、プラスミド中で *nmt1* プロモーター下に連結し、さまざまな欠失型遺伝子、DNA ヘリカーゼ活性を失わせる変異を導入した遺伝子を構築した。タンパク質の発現レベルの解析は、付加したタグを用いたウエスタブロット解析により、またテロメア長の測定は、テロメア特異的一

本鎖プローブを用いたサザンブロット解析により行った。

Phenix-A パッケージ細胞に pMX hTERT を導入して hTERT レトロウイルスを産生した。得られたウイルスを AT 細胞および健康人由来皮膚繊維芽細胞の培養上清に加え、puromycin 耐性細胞を選択した。hTERT の発現は RT-PCR および TRAP 法により検出した。また、Terminal restriction fragment (TRF)法によりテロメア長を測定した。

rDNA のように多コピーで存在する遺伝子の *cis* に機能する配列の決定は、すべてのコピーからある特定の配列のみを欠損させることは不可能なことから非常に困難である。この問題を解決するために、遺伝学的手法を用いて約 150 コピーある rDNA を 2 コピーまで減らした株を作成した。この株を用い、rDNA の組み換えに関与が予想される非転写領域に対して変異を導入し、rDNA の増幅に影響を及ぼす領域を特定した。

## C. 研究成果と考察

### 1. 分裂酵母の早老症原因遺伝子関連因子 *rad3*, *rqh1* によるゲノムインテグリティ制御機構

我々はこれまでに、分裂酵母の二つの ATM 関連遺伝子 *rad3*<sup>+</sup>、*tell*<sup>+</sup>を同時に欠損した株において、テロメア

が極端に短縮し、その結果細胞の生存率が低下することを見いだしている (Nature Genetics 1988)。また、*rad3* の単独変異ではテロメア長の短小化が観察されるものの、*tell* 変異のみでは異常が観察されないことから、Rad3 がテロメア維持に関して主要な機能を果たし、Tel1 は Rad3 欠損時において相補的な機能を果たしていると考えられる。

Rad3 はチェックポイント Rad の一つとして Carr らにより同定されており、Chk1、Cds1 の二つのキナーゼをリン酸化することにより DNA 損傷に応答して細胞周期停止を誘導する機能を持つことが既に報告されている。我々はテロメア維持機能が、細胞周期チェックポイント機能とは独立であることを遺伝学的に示しているが (Genetics 1999)、さらに Rad3 によるテロメア制御機能を解析するために *rad3* の温度感受性変異を単離し、その表現型を解析した。

単離した変異の一つである *rad3-h4* は、DNA 損傷に対して正常に細胞応答を行うことができることから、チェックポイント機能は正常であることが示された。一方、この株はテロメア長に関しては *rad3* の欠損株と同程度に短縮したことから、テロメア機能のみに欠損をもつことがわかった。このことから、チェックポイン

ト制御とは異なる機能を Rad3 が有していることがあらためて確認された。

Rad3、Tel1 の両タンパク質の欠損により見いだされるゲノムインテグリティーの低下および生存率の低下は、*rad3-h4 tel1* の二重変異株では観察されない。このことは Rad3-h4 変異タンパク質がもつチェックポイント機能がゲノム構造変化を抑制している可能性を示している。そこで、*rad3-h4 tel1* 変異株にさらにチェックポイント変異 *cds1 chk1* を導入したところ、*rad3 tel1* 完全二重欠損株と同様なテロメアの消失、生存率の低下が観察された。

以上の結果は、Rad3 にはチェックポイントを制御する機能、それとは独立の、テロメア長を正常に維持する機能、の二つの機能があること、さらに両機能がテロメア構造維持を介したゲノムインテグリティー制御に協調的に関与していることを示している。哺乳類においても ATM タンパク質が、チェックポイント機能および DNA 修復を制御する機能を有していることが明らかとされている。本研究の結果は、複数の経路を統合的に制御していることが、ゲノムインテグリティーの維持における ATM ファミリータンパク質の重要性をもたらしていることを示唆している。支配下にある複数の経路は、それぞ

れが独立な機能を果たしているというよりは、むしろ相補的に作用することでゲノムインテグリティーの破綻をもたらすような DNA の構造異常を未然に防いでいることが考えられる。

早老症 Werner syndrome の原因タンパク質 WRN は、DNA ヘリカーゼドメインを持ち、核内で機能していることが示されている。WRN と構造的に類似したタンパク質は真核生物において広く保存されていることから、WRN が DNA 上でおきる何らかの普遍的な反応に直接あるいは間接的に関与していることが考えられるが、その詳細は未だ明らかとされていない。

分裂酵母における WRN ホモログは Rqh1 タンパク質である。Rqh1 の欠損株は紫外線(UV)などによる DNA 損傷、HU による複製阻害に対して超感受性を示すことが知られている。Rqh1 が関与する DNA 修復経路を明らかにする目的で、Rqh1 タンパク質の持つ機能ドメインの検索を行った。

まず我々は、Rqh1 の全長を *nmt1* プロモーターにより過剰発現した場合に細胞増殖が阻害されることを見いだした。Rqh1 の DNA ヘリカーゼ活性を消失させる変異タンパク質 (Rqh1-HD) の発現によっても同様な表現型が観察されることから、この現

象には DNA ヘリカーゼ活性自体は必要ではないことが考えられる。また、Rqh1 タンパク質の N 末、C 末を欠失したタンパク質によっては増殖の阻害が起こらず、Rqh1 タンパク質の全長がこの表現型の発現に必須であることが示された。

HU に対する抵抗性に関しては、Rqh1、Rqh1-HD のいずれの発現によっても *rqh1* 欠損による超感受性表現型の回復がみられた。この結果は、DNA 複製の阻害に対する抵抗性に関しても、Rqh1 の DNA ヘリカーゼ活性が必要でないことを示している。しかしながら、ヘリカーゼドメインを欠失した変異タンパク質によっては表現型の回復は観察されない。ヘリカーゼドメインの持つ高次構造が何らかの機能を担っている可能性が示唆される。

また、UV に対する抵抗性の獲得には、ヘリカーゼドメインに加え N 末端ドメインが関わっていることを示した。すなわち、N 末端ドメインの高発現により、UV に対する感受性が部分的に回復することが観察された。

このように、Rqh1 はいくつかの機能ドメインを持っていること、それぞれが特定の DNA 損傷における同タンパク質の多面的機能の発揮に関わっていること、が示唆された。出芽酵母における WRN ホモログである

Sgs1 タンパク質において、N 末端ドメインがトポイソメラーゼ III との結合に関わっていることが知られている。Rqh1 においても同様な相互作用が存在するかどうか、今後の解析が待たれる。

## 2. テロメラーゼによる末梢血管拡張性運動失調症(Ataxia telangiectasia)患者由来不死化細胞の樹立に関する研究

AT 患者由来繊維芽細胞では、テロメア長が正常繊維芽細胞に比べ速い速度で短縮すること、また細胞分裂寿命が短いことが観察されている。テロメラーゼ触媒サブユニットをコードする hTERT を導入し、AT 細胞のテロメア構造異常とテロメラーゼとの関係、細胞寿命との関係を調べた。

hTERT を導入する前の AT 細胞(親株)と hTERT を導入した AT 細胞において TRAP 法によりテロメラーゼ活性を測定した結果、hTERT 導入細胞のみにおいてテロメラーゼの活性を検出した。一方、テロメア長を測定した結果、テロメラーゼ陽性 AT 細胞では 12 kb 以上のテロメア長を有していた。これらの結果は、AT 細胞においても hTERT の導入によりテロメラーゼが活性化されること、それによりテロメア配列が染色体末端に付



加されたことを示している。

これら AT 親株とテロメラーゼ陽性 AT 細胞との細胞増殖を比較した結果、親株は 24 population doublings (PDs) で増殖を停止し、細胞老化に陥った一方、テロメラーゼを導入した株では親株で認められた細胞増殖の停止 (Replicative Senescence) を超え、70 PDs 以上の増殖を続けている。

テロメラーゼ陽性 AT 細胞では、親株と同様に細胞周期チェックポイント異常が観察され、また ATM の下流で機能する Cds1/Chk2 のリン酸化、p21<sup>Waf1/Cip1/Sdi1</sup> の発現誘導が認められなかった。従って、AT 細胞の放射性感受性機能欠損はテロメアの伸張によって回復しない。

これらのことから、ATM の細胞周期チェックポイント機構とは独立に、ゲノム末端のテロメアの絶対長、あるいはそれによる末端の高次構造維持が、細胞分裂寿命において決定的な役割を担っていることが考えられる。

### 3. 酵母における rDNA 反復配列の構造維持に関するシス配列の同定

ハイグロマイシン耐性変異を持つ rDNA を用い、出芽酵母の rDNA のコピー数を特異的に減少させる系を構築した。ハイグロマイシン培地上で生育してきた株の染色体上のコピ

一数をパルスフィールド電気泳動法で調べたところ、その中には目的とする 2 コピーの rDNA しか持たない株も含まれていた。この株の rDNA の構造を調べたところ、2 つの rDNA 間に DNA 複製阻害点を含む非転写領域が 1 つのみ存在した。

組み換えに関係していると予想される非転写領域に連続的に変異を導入し、組み換えに必要な領域の決定を試みた。その方法としては、非転写領域をそれぞれが約 130 bp の 7 つの部位に分け、そのそれぞれの部位をマーカー遺伝子で置き換え、最終的に計 7 種の置換変異株を作成した。これらの株に対して *FOB1* 遺伝子をプラスミドにのせて相補し、rDNA の増幅を誘導した。その結果、7 株中 4 株で rDNA の増幅能力が失われていた。このことから、この 4 つの領域は増幅に必要な配列を含むと結論でき、それを EXP (Expansion of rDNA) と名付けた。EXP は非転写領域の約 25% にあたる約 500 bp の連続した配列からなり、予想通り DNA 複製阻害点を含んでいた。これら増幅能力を失った 4 株について二次元アガロースゲル電気泳動法を用い DNA 複製阻害点における阻害活性の有無を調べたところ、DNA 複製阻害点そのものが置換された 1 株を除いて、他の 3 株では十分な阻害活性

が観察された。このことから、EXP は DNA 複製阻害活性とそれとは独立な活性の最低 2 つの活性を有する領域と考えられる。また EXP の配列的な特徴としては AT のクラスターが幾つか存在すること以外には特筆すべき点はなかった。

#### D. 討論

酵母および哺乳類培養細胞の系において、早老症原因遺伝子産物 ATM、WRN とその関連因子に関する分子レベルの解析を行った。ATM、WRN は分子量が 150 kDa を超える巨大タンパク質であり、触媒ドメインとして明らかになっている領域の他に機能未解明の領域が存在する。本研究から明らかになったことは、ATM 関連因子には複数の下流因子（あるいは経路）を特異的に制御するための機能ドメインが存在する可能性があること、また WRN 関連タンパク質は複数の修復過程において異なるドメインが機能を発揮している可能性があること、である。これらの結果は、両遺伝子の欠損がもたらすさまざまな病態の分子メカニズムを考える上の手がかりになるものと考えられる。

両遺伝子の欠損がもたらすゲノム構造の変化については、酵母、哺乳類細胞の両方で、染色体末端に位置するテロメアがその変異部位であり、

少なくとも ATM、WRN 欠損細胞において分裂寿命の短縮表現型が生ずる最大の要因がテロメア維持機構の破綻（変化）によることが示された。しかしながら、テロメアを持たない染色体を有する分裂酵母株で観察された表現型は、テロメア以外の染色体領域のインテグリティーにこれらの因子が関与している可能性を示唆している。そのターゲットの候補としては rDNA 領域などの反復配列などが考えられ、事実出芽酵母の WRN ホモログ Sgs1 の欠損株においては rDNA 領域の組み換えが昂進しているという報告がある。

反復配列の構造維持に関与するシス配列として、新規の機能エレメント EXP を同定することに成功した。今後、早老症関連因子をはじめ、DNA 代謝に関わる様々な因子がこのシス配列の機能にどのように関与しているかを解析し、トランス因子・シス因子からなるゲノムインテグリティー維持の複雑なネットワークを明らかにしていきたい。

老化におけるゲノムの一次・高次構造レベルの変化は、その重要性が示唆されているものの、今なお未解明な点が多い。早老症関連因子の機能およびゲノム構造変化の機構という二つの観点から本研究課題を推進し、老化におけるゲノム変化の寄与、

分子メカニズムの解明に繋がりたいと  
考えている。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hayashi, E., Yasui, A., Mimura, Y., Nakanishi, M., Motoyama, N., Ikeda, K., and Matsuura, A. Disorganized hyperproliferation and reduced cell growth in the regenerating liver of p27<sup>Kip1</sup>-deficient mice. In preparation
2. Matsuura, A., and Ikeda, K. Conferring DNA damage supersensitivity by circularization of chromosomes in the fission yeast. In preparation
3. Matsuura, A., Zhang, Q. W., Ikeda, K., and Ishikawa, F. The fission yeast ATM homologue Rad3 regulates telomere integrity through checkpoint-dependent and -independent mechanisms. In preparation
4. 松浦 彰 (2000) テロメアを維持する仕組み：ATM ファミリータンパク質によるゲノム統合性維持機構 *細胞工学* 19, 1077-1084
5. Naka, K., Tachibana, A., Ishikawa, F.,

Ikeda, K., and Motoyama, N. Introduction of telomerase to ataxia telangiectasia cells can extend shortened telomeres and bypass replicative senescence. In preparation.

6. Kobayashi, T., Nomura, M., and Horiuchi, T. (2001). Identification of DNA cis-elements essential for expansion of ribosomal DNA repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol* 21, 136-147.

##### 2. 学会発表

1. Matsuura, A. Fission yeast ATM homologues regulate the telomere integrity through cell cycle checkpoint-dependent and -independent mechanisms. Cancer and Molecular Genetics in the Twenty-first Century Meeting. Grand Rapids (USA), September 2000
2. Matsuura, A. Roles of ATM homologues in regulation of telomere integrity in fission yeast. The International Workshop on Dynamics and Algorithms of Chromosome Function. Hiroshima, November 2000

3. 松浦 彰  
環状染色体の mitotic instability  
第 14 回ワークショップ「遺伝的  
組換えとその制御」神戸、2000  
年 12 月
4. Matsuura, A. and Ikeda, K.  
Biological significance of the  
telomere in damage tolerance:  
chromosome circularization confers  
hypersensitivity to endogenous and  
exogenous DNA. damages in fission  
yeast. Cold Spring Harbor Meeting  
on Telomeres and Telomerase. Cold  
Spring Harbor (USA), March 2001
5. Naka, K., Matsuura, A., Tachibana,  
A., Ishikawa, F., Ikeda, K., and  
Motoyama, N. Establishment of  
immortalized ataxia telangiectasia  
cells by telomerase. The  
International Workshop on Dynamics  
and Algorithms of Chromosome  
Function. Hiroshima, November  
2000
6. 仲 一仁、立花 章、石川冬木、  
池田恭治、本山 昇 テロメラー  
ゼによる末梢血管拡張性運動失調  
症 (Ataxia telangiectasia) 患者  
由来不死化細胞の樹立 第 23 回  
日本分子生物学会年会 神戸、  
2000 年 12 月
7. Naka, K., Matsuura, A., Tachibana,  
A., Ishikawa, F., Ikeda, K., and  
Motoyama, N. Introduction of  
telomerase to ataxia telangiectasia cells  
can extend shortened telomeres and  
bypass replicative senescence.  
Miami Winter Symposia, Cell Death  
and Aging. Miami Beach (USA),  
February 2001
8. Naka, K., Tachibana, A., Ishikawa, F.,  
Ikeda, K., and Motoyama, N.  
Introduction of telomerase to ataxia  
telangiectasia cells can extend  
shortened telomeres and bypass  
replicative senescence. Cold  
Spring Harbor Meeting on Telomeres  
and Telomerase. Cold Spring  
Harbor (USA), March 2001
9. 竹内 靖、小林 武彦、堀内 嵩  
DNA 複製阻害と細胞の老化 第  
15 回 DNA 複製ワークショップ  
京都、2000 年 7 月
10. 竹内 靖、小林 武彦、堀内 嵩  
DNA 複製阻害と細胞の老化 酵  
母遺伝学フォーラム 東京、2000  
年 8 月

- |   |  |
|---|--|
| <p>11. <u>Kobayashi, T.</u>, Nomura, M., and Horiuchi, T. Identification of cis-essential sequences for amplification of the ribosomal RNA gene repeats. Eukaryotic DNA Replication meeting. Salk Institute (USA), September 2000</p>                                 | <p>2. 実用新案登録<br/>なし</p> <p>3. その他<br/>なし</p> |
| <p>12. <u>Kobayashi, T.</u> Identification of DNA <i>cis</i>-elements essential for expansion of ribosomal DNA repeats in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. The International Workshop on Dynamics and Algorithms of Chromosome Function. Hiroshima, November 2000</p> |  |
| <p>13. <u>小林 武彦</u>、野村 眞康、堀内 嵩<br/>酵母リボソーム RNA 遺伝子の増幅に必須な DNA 配列の決定 第14 回ワークショップ「遺伝的組換えとその制御」神戸、2000 年 12 月</p>   |  |
| <p>14. <u>小林 武彦</u>、野村 眞康、堀内 嵩<br/>酵母リボソーム RNA 遺伝子の増幅に必須な DNA 配列の決定 第23 回日本分子生物学会年会 神戸、2000 年 12 月</p>  |  |

F. 知的所有権の所得状況

1. 特許取得  
なし

## 2. 分 担 研 究 報 告 書

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

早老症関連遺伝子産物によるゲノム構造維持機構に関する研究

分担研究者 松浦 彰 国立長寿医療研究センター老年病研究部  
外科系総合診療研究室 室長

研究要旨

近年、早老症の原因遺伝子の解析が進み、その産物の多くが複製、組み換え、修復などの DNA 代謝のさまざまな局面において機能していることが示されている。早老症 ataxia telangiectasia の原因遺伝子 *ATM*、Werner syndrome の原因遺伝子 *WRN* はそれぞれ PI-3 キナーゼと構造的に類似したプロテインキナーゼ、RecQ 型 DNA ヘリカーゼをコードしており、真核生物において進化的によく保存されている。本年度、早老症原因遺伝子産物の詳細な機能解析を行うことを目的に、モデル細胞である分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) におけるそれぞれのホモログである Rad3、Rqh1 の機能ドメインの同定と制御機構の解析を行った。

Rad3 は分裂酵母内では細胞周期チェックポイントおよびテロメア長維持という二つの独立した機能を担っていることを既に報告しているが (Nature Genetics 1998、Genetics 1999)、我々は *rad3<sup>+</sup>* 遺伝子上の高温感受性変異をスクリーニングし、テロメア長維持にのみ欠損をもつ突然変異を単離することに成功した。また、Rad3 の両方の機能が同時に欠損することにより、テロメア維持により重篤な機能喪失が生ずることを明らかにした。このことより、ATM 関連因子が複数の経路を統合的に制御することで、ゲノムインテグリティの維持に関わっていると結論した。

一方、分裂酵母 Rqh1 の機能ドメインの解析から、Rqh1 の DNA ヘリカーゼドメインがタンパク質としての機能に重要であること、しかしヘリカーゼ活性自体が必須とされない Rqh1 の未知の機能が存在することを見いだした。

キーワード： 早老症、ATM、WRN、テロメア、ゲノムインテグリティ

## A. 研究目的

ゲノム情報は、紫外線、放射線などの外的な障害、およびDNA複製時に生ずる内的な障害に常にさらされている。生体はそれらの損傷を監視・修復する機構をもつことにより、ゲノムのインテグリティを維持している。近年、ヒトの早発老化を呈する遺伝性の早老症の原因遺伝子の分子レベルでの解析が進められ、ゲノムに対する種々のストレスに対する監視および修復機構の機能低下がヒトの老化過程の抑制において重要な役割を果たしていることが明らかになった。老化、老年病に対する予防・治療薬の開発のためには、ゲノムストレスに対する生体応答機構、その破綻をもたらすゲノムレベルのグローバルな変化を詳細に解析することが必要であり、このため老化過程におけるゲノムレベルの変化を解析するためのモデルシステムの構築が重要であると考えられる。

早老症 ataxia telangiectasia の原因遺伝子 *ATM*、Werner syndrome の原因遺伝子 *WRN* はそれぞれ PI-3 キナーゼファミリーに属するプロテインキナーゼ、RecQ 型 DNA ヘリカーゼをコードしていることが明らかにされている。注目すべき点は、これらのタンパク質が真核生物において進化的に保存されていることである。このこ

とは、両タンパク質の機能が真核生物において普遍的な基本的 DNA 代謝のいずれかのステップに関与していることを示唆している。

我々は、早老症遺伝子産物の細胞内機能の解明、およびその欠損により誘導されるゲノムレベルの構造変化の分子機構を解明することを目的に、モデル細胞である分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) における両タンパク質のホモログ、Rad3 および Rqh1 の機能ドメインの同定とその制御機構の解析を行った。Rad3 は分裂酵母内では細胞周期チェックポイントおよびテロメア長維持という二つの独立した機能を担っているが、*rad3<sup>+</sup>* 遺伝子上の高温感受性変異を解析することにより、Rad3 の両機能がテロメア構造維持を介したゲノムインテグリティ制御に協調的に関与していることを示した。また、分裂酵母 Rqh1 の機能ドメインの解析から、Rqh1 が関わるゲノム監視・修復機構において DNA ヘリカーゼ活性を必要としない経路が存在する可能性を示した。

## B. 研究方法

分裂酵母の *rad3<sup>+</sup>* 遺伝子をプラスミド上にクローン化し、error-prone PCR によりランダムな突然変異をもつ変異 *rad3<sup>+</sup>* 遺伝子ライブラリーを構築し



た。ライブラリーを *rad3* を欠失した分裂酵母株に導入して得られた形質転換体の表現型を検索し、目的の変異をもつ遺伝子を同定した。さらに、変異遺伝子をゲノムの *rad3*<sup>+</sup> 遺伝子座のみに 1 コピー持つ株を相同組み換えにより構築し、以後の解析に用いた。テロメア長の測定は合成オリゴ DNA をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションにより、Cds1 および Chk1 の活性化に関しては N 末にタグをつけたタンパク質を発現する細胞を構築し、*in vitro* キナーゼアッセイまたはウエスタンブロットによって行った。

分裂酵母 *rqh1*<sup>+</sup> 遺伝子に関しては、プラスミド中にクローン化したのち、さまざまな欠失型遺伝子、DNA ヘリカーゼ活性を失わせる変異を導入した遺伝子を構築した。さらに、それらをチアミンにより発現が制御できる *nmt1* プロモーター下に連結したプラスミドを作成し、それらを野生型株および *rqh1* 欠損株に導入した。形質転換体において、紫外線や DNA 変異原による DNA 損傷、ヒドロキシウレア(HU)による DNA 複製阻害を誘発したときの細胞の生存率の変化、また変異タンパク質を過剰生産した際の増殖表現型を解析した。

## C. 研究成果と考察

### 1. ATM 関連遺伝子 *rad3*<sup>+</sup> によるゲノムインテグリティー制御機構

我々はこれまでに、分裂酵母の二つの ATM 関連遺伝子 *rad3*<sup>+</sup>、*tell*<sup>+</sup> を同時に欠損した株において、テロメアが極端に短縮し、その結果細胞の生存率が低下することを見いだしている (Nature Genetics 1988)。*rad3* の単独変異ではテロメア長の短小化が観察されるものの、*tell* 変異のみでは異常が観察されないことから、Rad3 がテロメア維持に関して主要な機能を果たし、Tel1 は Rad3 欠損時において相補的な機能を果たしていると考えられる。

Rad3 はチェックポイント Rad の一つとして Carr らにより同定されており、Chk1、Cds1 の二つのキナーゼをリン酸化することにより DNA 損傷にตอบสนองして細胞周期停止を誘導するために必須であることが既に報告されている。我々はテロメア維持機能が、細胞周期チェックポイント機能とは独立であることを遺伝学的に示しているが (Genetics 1999)、さらに Rad3 によるテロメア制御機能を解析するために *rad3* の温度感受性変異を単離し、その表現型を解析した。

単離した変異の一つである *rad3-h4* は、DNA 損傷に対して正常に細胞応答を行うことができることから、チェックポイント機能は正常であるこ

とが示された。一方、この株はテロメア長に関しては *rad3* の欠損株と同程度に短縮したことから、テロメア機能のみに欠損をもつことがわかった。このことから、Rad3 がチェックポイント制御とは異なる機能を有していることが改めて確認された。

Rad3、Tel1 の両タンパク質の欠損により見いだされるゲノムインテグリティの異常および生存率の低下は、*rad3-h4 tel1* の二重変異株では観察されない。このことは Rad3-h4 変異タンパク質がもつチェックポイント機能がゲノム構造変化を抑制している可能性を示している。そこで、*rad3-h4 tel1* 変異株にさらにチェックポイント変異 *cds1 chk1* を導入したところ、*rad3 tel1* 完全二重欠損株と同様なテロメアの消失、生存率の低下が観察された。

以上の結果は、Rad3 にはチェックポイントを制御する機能、それとは独立の、テロメア長を正常に維持する機能、の二つの機能があること、さらに両機能がテロメア構造維持を介したゲノムインテグリティ制御に協調的に関与していることを示している。哺乳類においても ATM タンパク質が、チェックポイント機能および DNA 修復を制御する機能を有していることが明らかとされている。本研究の結果は、ATM ファミリータ

ンパク質のゲノムインテグリティの維持における重要性が、複数の経路の統合的制御に関わっていることに由来していることを示唆している。支配下にある複数の経路は、それぞれが独立な機能を果たしているというよりは、むしろ相補的に作用することでゲノムインテグリティの破綻をもたらすような DNA の構造異常を未然に防いでいると考えられる。

分裂酵母 Rad3 タンパク質の哺乳類オーソログは、ATM ファミリーの一員の ATR タンパク質である。欠失マウスが胎生致死の表現型を示すため、ATR タンパク質の機能解析は未だ十分になされていない。Rad3 の部分欠損と類似した変異を導入することで、ATR の持つ生理機能の一端を明らかにすることができると考え、マウス *Atr* 遺伝子座のゲノム DNA を単離し、その構造解析を進めている。

近年、ATR のオーソログである出芽酵母 Mec1、分裂酵母 Rad3 に直接結合するタンパク質 Ddc2、Rad26 が報告されている。それらのタンパク質は複合体を形成し、細胞周期制御機能に関与していると考えられている。現在、ヒト ATR に結合し、類似した機能をもつタンパク質をスクリーニングしており、今後それらのタンパク質が ATR の生理機能およびその制御にどのように関与しているか

についての解析を進めていきたいと考えている。

## 2. recQ 型ヘリカーゼ Rqh1 の機能ドメインの同定

早老症 Werner syndrome の原因タンパク質 WRN は、DNA ヘリカーゼドメインを持ち、核内で機能していることが示されている。WRN と構造的に類似したタンパク質は真核生物において広く保存されていることから、WRN が DNA 上でおきる何らかの普遍的な反応に直接あるいは間接的に関与していることが考えられるが、その詳細は未だ明らかとされていない。

分裂酵母における WRN ホモログは Rqh1 タンパク質である。Rqh1 の欠損株は紫外線(UV)などによる DNA 損傷、HU による複製阻害に対して超感受性を示すことが知られている。Rqh1 が関与する DNA 修復経路を明らかにする目的で、Rqh1 タンパク質の持つ機能ドメインの検索を行った。

まず我々は、Rqh1 の全長を *nmt1* プロモーターにより過剰発現した場合に細胞増殖が阻害されることを見いだした。Rqh1 の DNA ヘリカーゼ活性を消失させる変異タンパク質 (Rqh1-HD) によっても同様な表現型が観察されることから、この現象は DNA ヘリカーゼ活性自体は必要ではない

ことが考えられる。また、Rqh1 タンパク質の N 末、C 末を欠失したタンパク質によっては増殖の阻害が起こらず、Rqh1 タンパク質の全長がこの表現型の発現に必須であることが示された。

HU に対する抵抗性に関しては、Rqh1、Rqh1-HD のいずれの発現により *rqh1* 欠損による表現型は回復がみられた。この結果は、DNA 複製の阻害に対する抵抗性に関しても、Rqh1 の DNA ヘリカーゼ活性が必要でないことを示している。しかしながら、ヘリカーゼドメインを欠失した変異タンパク質によっては表現型の回復は観察されない。ヘリカーゼドメインの持つ高次構造が何らかの機能を担っている可能性が示唆される。

また、UV に対する抵抗性の獲得には、ヘリカーゼドメインに加え N 末端ドメインが関わっていることを示した。すなわち、N 末端ドメインの高発現により、UV に対する感受性が部分的に回復することが観察された。

このように、Rqh1 はいくつかの機能ドメインを持っていること、それぞれが特定の DNA 損傷における同タンパク質の多面的機能の発揮に関わっていること、が示唆された。出芽酵母における WRN ホモログである Sgs1 タンパク質において、N 末端ドメインがトポイソメラーゼ III との結

合に関わっていることが知られている。Rqh1 においても同様な相互作用が存在するかどうか、今後の解析が待たれる。

WRN が欠損した哺乳類細胞において、染色体テロメアの短縮が昂進しているという報告がある。また、WRN および Sgs1 は、テロメアにおけるテロメラーゼ非依存的増幅過程において重要な機能を果たしていることが示唆されている。我々は分裂酵母において、テロメアの機能異常をバイパスする経路として染色体の環状化経路が存在することを報告している (Nature Genetics 1998) が、環状染色体が *rqh1* 変異のバックグラウンドにおいて極端に不安定化することを新たに見いだした。テロメアを持たない染色体における *rqh1* 変異の効果は、染色体上にはテロメア以外の Rqh1 の機能部位が存在することを意味している。今後、recQ 型ヘリカーゼが染色体上のどこに作用点を持つのか、その欠損によりどのようなゲノム構造変化が誘発されるかについて、さらに解析を進める予定である。

#### D. 討論

ATM、WRN タンパク質は触媒ドメインとして明らかになっている領域の他に機能未解明の領域があり、その解明が両タンパク質の生体内での

役割を理解するうえで重要であると考えられる。本研究から明らかになったことは、ATM 関連因子には複数の下流因子 (あるいは経路) を特異的に制御するための機能ドメインが存在する可能性があること、また WRN 関連タンパク質は複数の修復過程において異なるドメインが機能を発揮している可能性があること、である。これらの結果は、両遺伝子の欠損がもたらすさまざまな病態の分子メカニズムを考える上の手がかりになるものと考えられる。

両遺伝子の欠損がもたらすゲノム構造の変化については、少なくとも WRN 関連因子がテロメアに加え染色体上の他の領域において機能を発揮していることが示唆された。そういったターゲットの候補としては rDNA 領域などの反復配列などが考えられる。今後、WRN 関連因子の欠損がもたらすゲノムの一次・高次構造レベルの変化を明らかにすることで、ゲノムインテグリティという観点からこの疾患の分子病態を明らかにしたいと考えている。

#### 1. 論文発表

1. Hayashi, E., Yasui, A., Mimura, Y., Nakanishi, M., Motoyama, N., Ikeda, K., and Matsuura, A. Disorganized hyperproliferation and reduced cell growth in the