

regenerating liver of p27^{Kip1}-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

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

E. 知的所有権の所得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他
なし

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担報告書

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

分担研究者 本山 昇 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

研究要旨

末梢血管拡張性運動失調症（Ataxia Telangiectasia: A-T）患者由来細胞（A-T細胞）においてテロメア長の迅速な短縮が報告されており、早期細胞老化の原因と考えられている。そこで、A-T細胞におけるテロメア長と細胞寿命の関係を検証するために、A-T細胞にテロメラーゼの触媒サブユニット（hTERT）遺伝子を導入して、細胞増殖能を検討した。レトロウイルスを用いてAT患者由来線維芽細胞にhTERT遺伝子を導入し、Puromycin含有条件下で培養して耐性細胞株を得た。A-T細胞の親株では24 population doublings (PD)でreplicative senescenceに陥ったのに対して、hTERT導入細胞株では70PD以上細胞増殖を継続している。この親株とhTERT導入細胞株のテロメア長をTRF法により測定したところ、約6Kbpから約10Kbpへと著明なテロメア長の伸長を認めた。以上より、A-T細胞においてテロメア長が細胞寿命に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

キーワード： 早老症、毛細血管拡張性運動失調症、テロメア、テロメラーゼ、細胞分裂寿命

A. 研究目的

早老症の一つとして知られている末梢血管拡張性運動失調症 Ataxia Telangiectasia (AT)において、ゲノムの安定性維持機構と老化・老年病の

発症に関する研究を推進した。ATは進行性運動失調症、毛細血管拡張、毛髪・皮膚の早期老化、卵巣不全・インスリン抵抗性などの内分泌異常、免疫不全と易感染性、高発癌性など特徴と

し、30-40 歳代で死亡するヒト常染色体劣性遺伝病である。AT 患者由来細胞の特徴として、電離放射線に対する高感受性、放射線抵抗性 DNA 合成といった細胞周期 G1 期チェックポイントの異常、染色体末端を保護しているテロメア繰り返し配列の短縮や早期細胞老化 (Premature Replicative Senescence) が報告されている。

1995 年に AT の原因遺伝子として、PI-3 kinase ファミリーに属する *ATM* (*AT mutated*) が同定された。近年、この ATM が電離放射線照射後の DNA 修復における細胞周期のチェックポイント機構において重要な役割を担っており、ゲノム安定性維持に欠かすことができない分子であることが解明されつつある。しかしながら、*ATM* の遺伝子異常に起因するゲノム不安定化によって老化症状が誘導される詳細なメカニズムは明らかにされていない。

我々は、AT 細胞において ATM の機能異常により早期細胞老化が誘導されるメカニズムとして、図 1 のごとく、A) ゲノム全体の安定性維持機構の破綻、または、B) ゲノムのうち特に染色体末端のテロメア領域の維持機構の破綻を原因とする仮説を立てた。

A) DNA 障害時の細胞周期チェックポイントにおける ATM の異常はゲノム

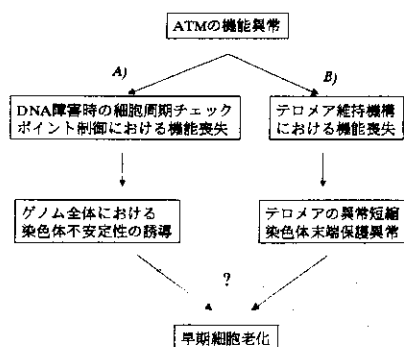
全体において染色体安定性維持を低下する。この染色体全体にわたる不安定性が細胞寿命を短縮する可能性がある。事実、*Atm* 遺伝子欠損マウス由来胎生期線維芽細胞においても染色体の不安定化と早期細胞老化が報告されており、ATM によるゲノム安定性維持機構が細胞寿命と密接に関与していると考えられる。

B) ヒト正常体細胞の分裂寿命はゲノムの末端のテロメア繰り返し配列によって規定されていると考えられており、テロメア DNA が短小化すると細胞老化に陥るモデルが提唱されている。ヒト正常細胞のみならず代表的な早老症である Werner 症候群由来細胞においてもテロメラーゼの遺伝子導入を行いテロメアを伸長すると、細胞老化が起こらず細胞寿命が延長することが報告されている。ATM がテロメア維持機構に関与しており、ATM の機能喪失によって染色体のうち特にテロメアにおける異常が細胞老化の原因となる可能性が考えられる。

もし、AT 細胞にテロメラーゼ導入してテロメア長を伸長しても細胞寿命が延長しなかった場合、ATM の細胞周期チェックポイントなどの異常によるゲノム全体の維持が重要であると考えられる (A)。一方、細胞寿命が延長した場合、早期細胞老化の誘導にはテロメア維持機構が重要で

あると考えられる (B)。そこで、A)、B)の仮説のいずれが細胞老化の誘導に決定的な役割を担っているかを解明するため、AT 患者由来線維芽細胞に対してテロメラーゼの触媒サブユニットタンパクである hTERT の遺伝子導入を行った。

図1 Ataxia Telangiectasia (AT)由来細胞における早期細胞老化誘導の分子機構



B. 研究方法

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 hTERT レトロウイルスを AT 患者由来皮膚線維芽細胞 (AT 細胞) および健常人由来皮膚線維芽細胞 (正常細胞) の 15%FBS DMEM 培養上清に加えて、hTERT の導入を行った。これら細胞を 0.5 μ g/ml の puromycin 含有培養液で培養して puromycin 耐性細胞を選択した。hTERT 導入細胞の hTERT RNA の産生を RT-PCR 法により確認した。さらにテロメラーゼ

の活性を Telomeric Repeats Amplification Protocol (TRAP)法により確認した。テロメラーゼ陽性 AT 細胞において Terminal Restriction Fragment (TRF) 法によりテロメア長を測定した。

さらに、これらテロメラーゼ陽性 AT 細胞における細胞周期チェックポイント機構の特性を解析するため、4 Gy の X 線照射を行ったあと BrdU 含有条件下培養を行い、エタノール固定後、抗 BrdU 抗体と Propidium Iodid の二重染色を施して、フローサイトメーターによる解析を行った。また、X 線照射後のテロメラーゼ陽性 AT 細胞のタンパクを抽出して、western blotting を行い、ATM によってリン酸化されることが報告されている Cds1/Chk2 やその下流分子である p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} の解析を行った。さらに、 γ 線照射を照射後、14 日におけるコロニー数を測定して、放射線感受性を検討した。

C. 研究成果と考察

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の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 (図2)。一方、テロメア長を測定した結果、親株では細

胞の生存限界に近い約 6 kb のテロメア長を示したのに対して、hTERT 導入後のテロメラーゼ陽性 AT 細胞では 12 kb 以上のテロメア長を有していた (図 3)。これらの結果は AT 細胞においても hTERT 導入によってテロメラーゼが活性化され、テロメラーゼによってテロメアが付加伸長したことを示している。

つぎにこれら AT 親株とテロメラーゼ陽性 AT 細胞の細胞増殖を検討した。AT 親株の細胞増殖は約 24 population doublings (PDs) で停止し、細胞老化に陥った (図 4)。これに対して、テロメラーゼ陽性 AT 細胞は親株で認められた細胞増殖の停止 (Replicative Senescence) を超えて、70 PDs 以上増殖を続けている (図 5)。

これらテロメア長を伸長した AT 細胞において 4 Gy の X 線照射時の細胞周期チェックポイント機構をフローサイトメーターにより解析した結果、テロメラーゼ陽性正常細胞では G1 期、G2 期の細胞周期の停止が認められた (図 6)。これに対して、テロメラーゼ陽性 AT 細胞では G1 期のチェックポイントが機能しておらず、X 線照射後に DNA 複製期にある細胞数が非照射細胞と比較して減少しなかった。また、Western blotting において X 線を照射した正常細胞で

は、ATM によって Cds1/Chk2 がリン酸化されたことを示すバンドシフト、および p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} の発現上昇を認めた。これに対して、AT 細胞では X 線照射による Cds1/Chk2 バンドシフトおよび p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} の発現誘導が認められなかった (図 7)。さらに、放射線照射後 14 日におけるコロニー数を測定した結果、テロメラーゼ陽性 AT 細胞では正常細胞と比較して放射線感受性であることが明らかになった。この結果は、すでに報告されているごとく AT 線維芽細胞と同様の形質であり、hTERT 導入によりテロメア長を伸長しても放射線感受性における AT 細胞の機能異常は回復しないと考えられる (図 8)。

以上のように、AT 細胞に hTERT を導入にすることによって、テロメア長を伸長し Replicative Senescence を回避して細胞寿命が延長することが明らかになった。このテロメア長を伸長した AT 細胞は、依然として細胞周期チェックポイント機能を喪失していた。これらの結果より、ATM の細胞周期チェックポイント機構の破綻とは独立に、ゲノム末端のテロメア DNA の絶対的な長さの伸長、あるいはそれによる染色体末端の高次構造の維持が細胞寿命において決定的な役割を担っていると考えられる。

D. 結論

AT 細胞においてテロメラーゼを発現させることでテロメア長が伸長し、細胞老化が回避され細胞寿命が延長した。AT 細胞においてもテロメア長の維持あるいはそれに基づく染色体末端の高次構造の安定性が細胞寿命の決定には重要な役割を果たすことが明らかになった。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.

2. 学会発表

1. 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

2. 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

3. 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
4. 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

E. 知的所有権の所得状況

0. 特許取得

なし

0. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図2 hTERT導入および親株のAT線維芽細胞におけるテロメラーゼ活性

| | AT1KY | | AT4KY | | AT5KY | | AT6KY | | AT10S | |
|-----------------|-------|---|-------|---|-------|---|-------|---|-------|---|
| hTERT infection | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + |
| ΔH | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + |

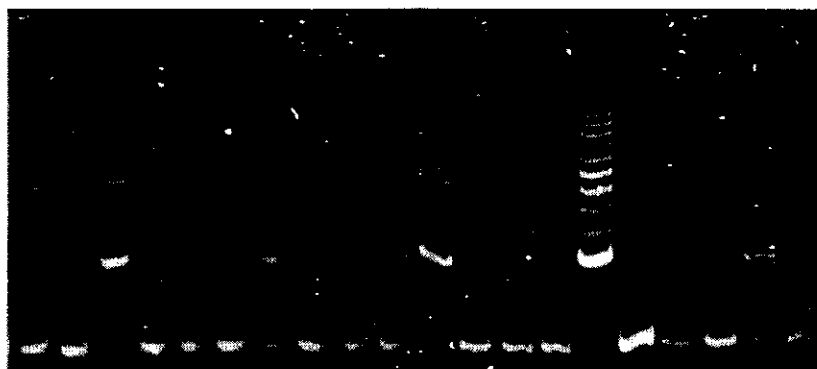


図3 hTERT導入および親株のAT線維芽細胞におけるテロメア長

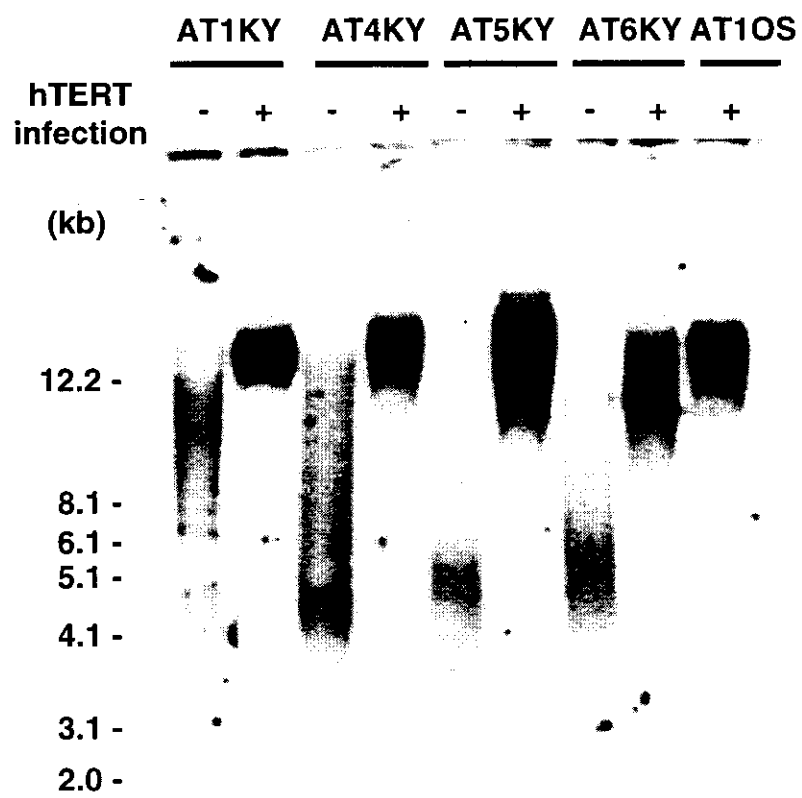


図4 AT線維芽細胞親株の細胞増殖

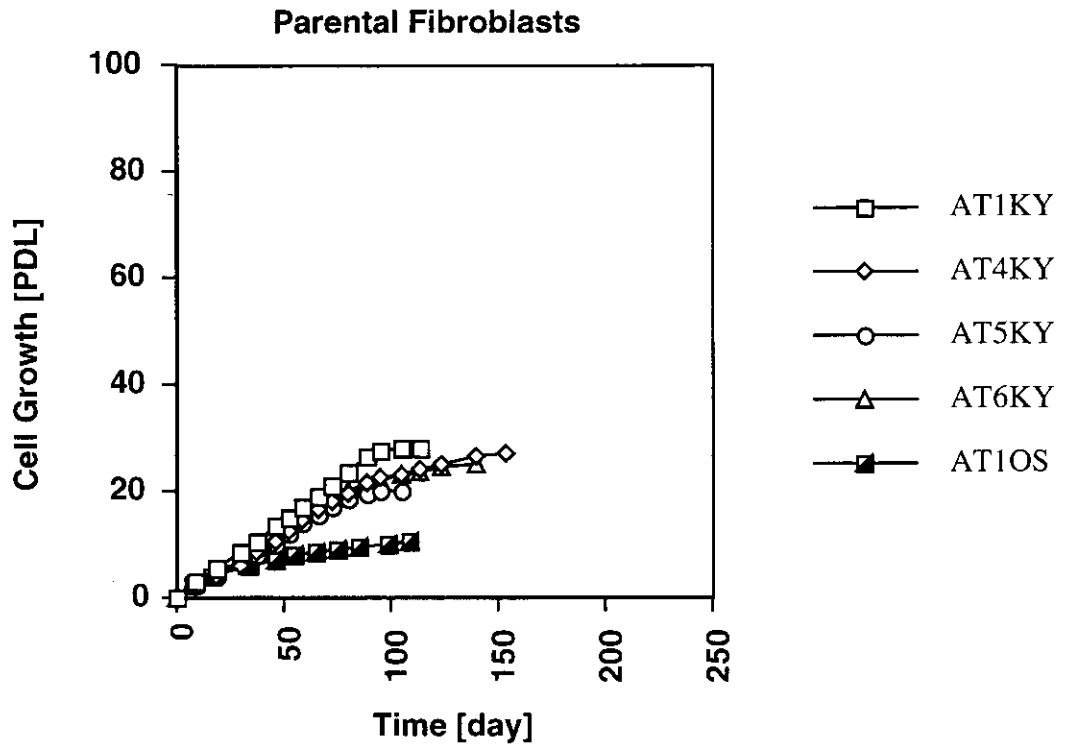


図5 hTERT 導入AT線維芽細胞の細胞増殖

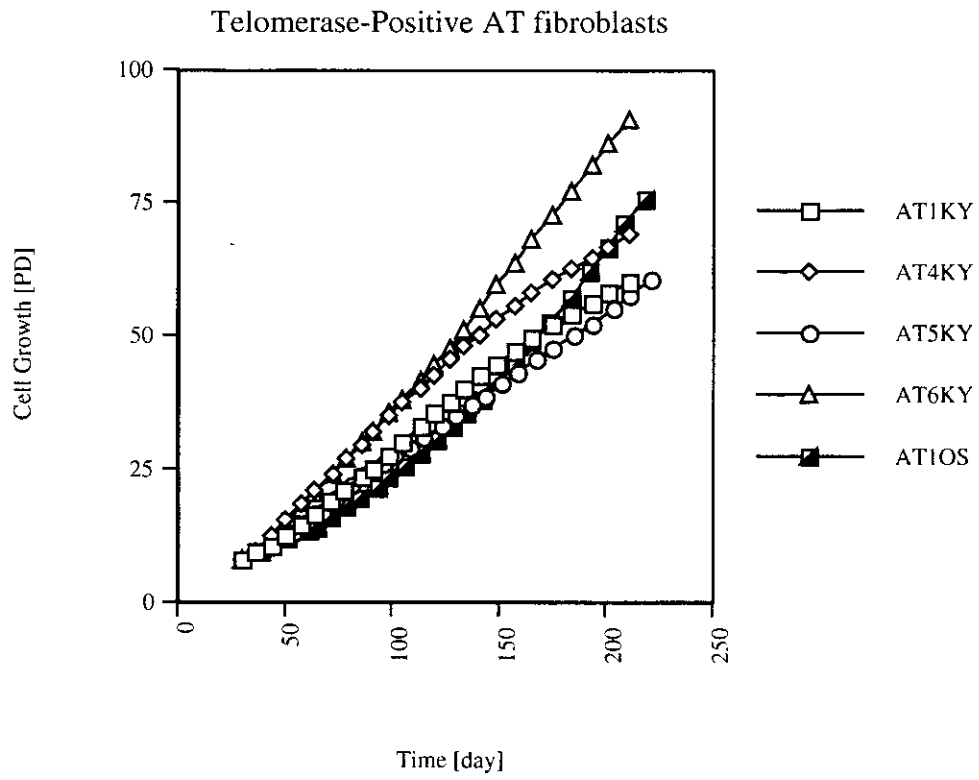


図6 放射線照射後の細胞周期チェック機構の異常

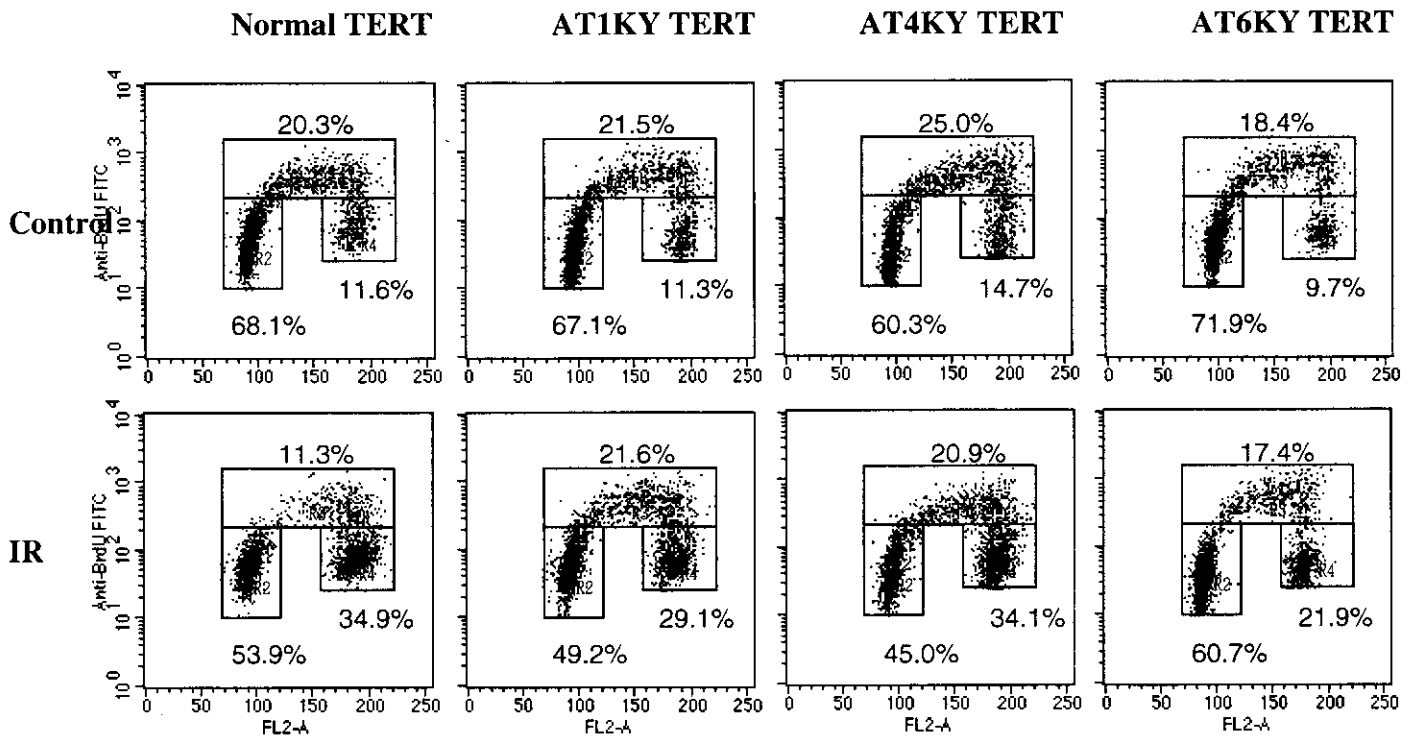


図7 放射線照射後Cds1/Chk2-p53-p21活性化機構の異常

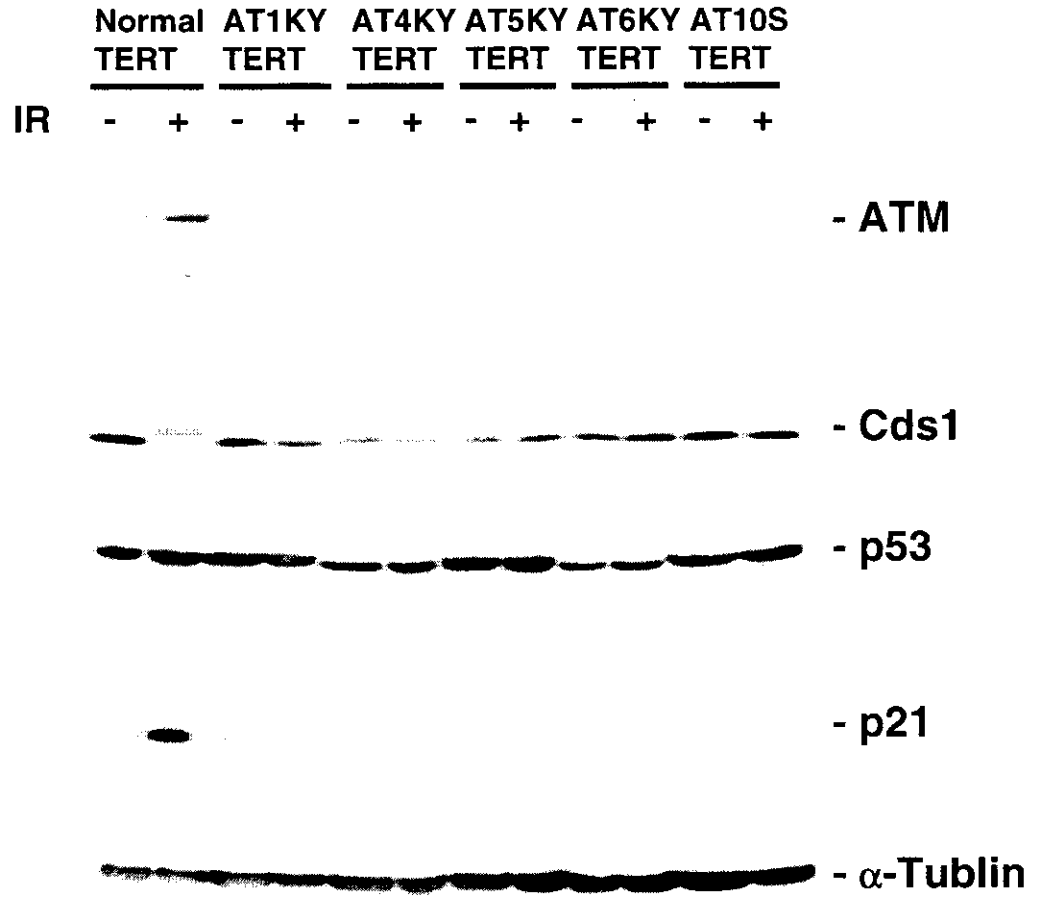
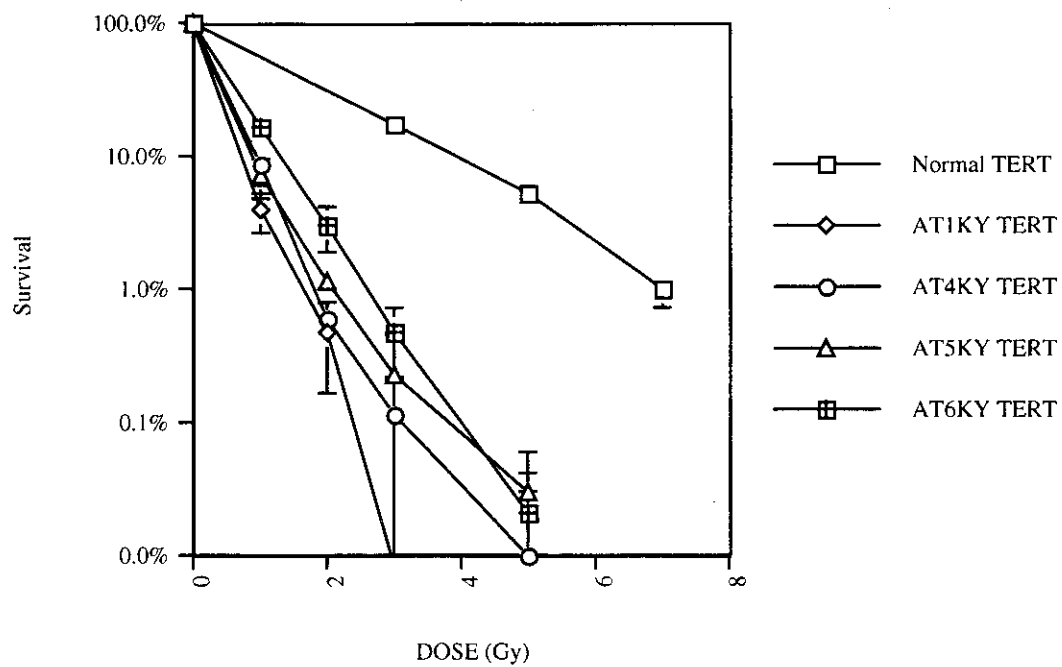


図8 hTERT導入正常およびAT線維芽細胞における放射線感受性



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

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

分担研究者 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

研究要旨

早老症の分子レベルでの解析によりゲノムの安定性の低下がヒトの老化の過程において重要な役割を果たしていると予想される。報告者は実験系が単純な出芽酵母を用いてゲノムの安定性維持のメカニズムの解明を最終的な目的とし研究を行なっている。近年出芽酵母でゲノム、特にリボゾーム rRNA 反復遺伝子（以下 rDNA）の安定性の低下が寿命の短縮を引き起こしていること、加えて早老症の原因遺伝子 WRN の酵母ホモログである SGS1 遺伝子の変異が、rDNA を不安定化し老化を促進する事が見い出され、酵母の老化モデル生物としての地位は上昇している。報告者は5年前、rDNA の組み換えに必須な遺伝子 FOB1 を単離し、その変異株では rDNA の組み換えがほとんど起こらず酵母の寿命が50%以上延長することを見出した。Fob1 タンパク質は rDNA の転写終結点近傍にある DNA 複製フォークの進行阻害活性に関与しており、このフォークの阻害が DNA に2本鎖切断等の損傷を引き起こし、組み換えを活性化していると考えられる。またこの複製阻害活性はヒトの細胞に至るまで保存して存在することから、rDNA 内での組み換えはおそらく高等真核生物においても類似したメカニズムで行なわれている可能性が高い。

今年度はこの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。現在この70%の配列の機能を解析中である。

キーワード: 早老症、出芽酵母、リボゾーム rRNA 遺伝子、相同組み換え、ゲノムの安定性、DNA 複製阻害活性。

A. 研究目的

早老症の分子レベルでの解析により、ゲノムの安定性の低下がヒトの老化の過程において重要な役割を果たしていることが予想される。ゲノムの中でも反復遺伝子はその遺伝子間での相同組み換えが他の領域に比べて起こり易く、さらに不安定であると考えられている。事実、最もよく研究されている反復遺伝子である出芽酵母のリボソーム rRNA 遺伝子 (rDNA) を例にとると、出芽 (細胞分裂) を重ねるごとに rDNA より環状の分子 (ERC: Extrachromosomal rDNA circle) が飛び出して核内に蓄積していく。出芽酵母ではこの ERC の蓄積が老化の一因になっている事がすでに証明されている。さらに興味深いことに、早老症の出芽酵母のホモログ遺伝子である *SGS1* を欠損した株では、ERC の飛び出しが増加し、それに伴い寿命も短縮することが4年前米国 MIT の Garente らにより報告された。以上のことから、出芽酵母では rDNA の不安定性 (組み換え) の上昇が老化の促進に重要な役割を果たしていると考えられる。

しかし、rDNA 内での組み換えは細胞にとって有害なことばかりかというとはそうではなく、一方で生存に不可欠な役割も果たしている。rDNA のように100コピー以上がクラス

ターを作って染色体上に並んで存在する反復遺伝子では、その遺伝子間で大規模な相同組み換えが起こり多量のコピーが失われる恐れが常にある。それをそのまま放置しておくとかやがて生存に必要なコピー数を割り込むことが予想される。このような一方的なコピー数の減少を避けるために、細胞は rDNA 内での組み換えを利用し、減ったコピー数を元のレベルまで増幅させる機構を持っている。実際報告者らは5年前に rDNA の増幅に必須な遺伝子 *FOB1* を単離し、1) その変異株では rDNA 内での組み換えはほとんど起こらないこと、2) ERC の放出が極端に少ない事、3) その寿命が野生株に比べて50%以上延長すること、を見出した。また、その組み換え活性化のメカニズムとしては、Fob1 は rDNA の転写終結点近傍にある DNA 複製フォークの進行阻害活性に必須であることから、おそらくこのフォークの阻害が DNA に2本鎖切断等の損傷を引き起こし、組み換え活性化の引き金となっていると考えている。

そこで本研究の目的は老化および rDNA のコピー数の維持に係る rDNA の組み換え機構を解明する事である。その一貫として本年度はその組み換えに必須な DNA 配列の決定を行なった。

B. 研究方法

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、報告者らは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

rDNA のコピー数を減らすためにハイグロマイシン耐性変異を持つ rDNA を用いた。ハイグロマイシンはリボゾームを標的とする抗生物質で、rRNA の変異によりハイグロマイシン耐性のリボゾームを作り出すことができる。この耐性変異 rDNA を持つ多コピープラスミドを野生株に導入し、ハイグロマイシンを含む培地に移すと、プラスミド上のハイグロマイシン耐性変異は染色体上の野生型 rDNA (ハイグロマイシン感受性) に対し遺伝的に劣性であるため、染色体上の感受性のコピー数がプラスミド上の耐性のコピー数より減少した株のみがハイグロマイシン

耐性となり選択されてくる。実際に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ー数をパルスフィールド電気泳動法で調べたところ、すべて 20 コピー以下に減少していた。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、期待通り、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。また、この株をハイグロマイシンを含まない培地に再び戻すと、コピー数が増加し元のレベルまで回復することから、2 コピーでも十分組み換えによる増幅能力があることが判明した。そのためこの 2 コピー株に対し、実験操作中のコピー数の増加を避ける目的で、あらかじめ *FOBI* 遺伝子を破壊しておいた。次にこの株に対し、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 *FOBI* 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須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

EXP が組み換えのホットスポットとして機能していることを裏付ける結果が他にも存在する。rDNA は Sir 2 タンパク質に依存したサイレンシング効果により組み換えがある程度抑えられていることが知られているが、その Sir 2 タンパク質が直接作用してクロマチン構造を変化させている領域がほぼ EXP と一致した。このことから Sir 2 タンパク質が EXP の持つ組

み換えのホットスポットとしての機能を低下させることで、rDNA の組み換えを抑制していると考えられる。

EXP が組み換えを促進する分子メカニズムに関しては今後の解析を待たねばならないが、今回の研究結果で一つはっきりしたことは、今まで考えられていたような DNA の複製阻害のみでの組み換えの活性化は、rDNA に関しては当てはまらないということである。この点は大腸菌等で得られた結果とは全く異なる。おそらく EXP の一部が欠けている場合、複製阻害点で DNA が2本鎖切断を起こしても、ほとんどの場合すぐ下の娘染色分体と組み換えを起こし修復され、コピー数の変動等の改変には繋がらないと考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. 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. 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

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

2. 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

F. 知的所有権の所得状況

1. 特許取得
なし

3. Kobayashi, T., 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

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

4. Kobayashi, T. Identification of DNA
cis-elements essential for expansion
of ribosomal DNA repeats in
Saccharomyces cerevisiae. The
International Workshop on Dynamics
and Algorithms of Chromosome
Function. Hiroshima, November
2000

5. 小林 武彦、野村 眞康、堀内 嵩
酵母リボゾーム 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

6. 小林 武彦、野村 眞康、堀内 嵩
酵母リボゾーム RNA 遺伝子の増