

# 染色体不安定症候群の細胞老化機構

(研究課題番号 H12-長寿-009)

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

平成13年4月

主任研究者 小松賢志

(広島大学原爆放射能医学研究所 教授)

染色体不安定症候群の細胞老化機構に関する研究

主任研究者 小松 賢志 広島大学原爆放射能医学研究所 教授

研究要旨 DNA 修復蛋白 NBS1 がテロメア維持に関与する事が、NBS 細胞のテロメア長測定やテロメア蛋白 TRF2 との共局在により明らかになった。DNA 修復や DNA 複製のための NBS1 の活性化は ATM によるリン酸化に始まる事から、放射線照射後の ATM /NBS1/p53 の発現を解析した結果、NBS 細胞ではシグナル伝達に異常が示された。また今回の研究で作製されたニワトリ NBS 細胞やマウス NBS 細胞が NBS 形質の解析に供された。一方、ファンコニー貧血についてはその解析の準備段階として相補性群の同定を行った結果、日本人患者の新規の相補性群が示唆された。また E 群遺伝子のクローニングに成功した。

分担研究者 松浦伸也  
広島大学原爆放射能医学研究所  
助教授  
田内 広  
広島大学原爆放射能医学研究所  
助手  
田原栄俊  
広島大学医学部総合薬学科  
助手

ルを介してあるいは直接 DNA 末端のテロメア延長制御に関わっていると思われる。このようなヒトを対象としたゲノム不安定性と細胞老化の効果関係ならびにその機構解明は（1）ゲノム不安定性を誘発する環境因子（例えば喫煙）や制癌剤服用による老化促進のリスク推定や、（2）ゲノム不安定性起因の発癌や免疫低下などの抑制する生活習慣や創薬開発による老化予防、あるいは（3）早期老化患者に対する適正な老年病治療方針の決定を可能にすると思われる。一方、AT 患者はもとよりその家族でも高発癌性を示す事から、（4）日本人の FA や AT 変異遺伝子のヘテロ保因者のそれぞれの割合 1/180 および 1/300 から日本人総計約 100 万人と推定して、その老化研究は日本人における早期老化の遺伝的背景を解析する事になる。

現代社会では退職や年金受給などは一律にカレンダー年齢に拠っている。しかし、個人によって生物学的年齢が若く健康で就労可能な事は我々が経験的に知っている事であり、近い将来には年齢差別を排除したカレンダー年齢によらない社会構造が予測される。そのような時代の医療体制にあっては疾病としての早期老化の病態解明がますます重要になるであろう。ゲノム不安定化による老化は我々に課せられた社会的な重要研究項目でもある。

B. 研究方法

（イ）NBS1 の老化シグナル伝達経路：  
我々は DNA 二重鎖切断により開始される ATM 経由シグナルの p53 と関連蛋白が

A. 研究目的

老化に伴い細胞の染色体異常や突然変異の増加などゲノム不安定性が誘発される事は以前から知られていたが、最近、モデル動物の線虫の研究からゲノム不安定性が逆に老化を促進する事が明らかになってきた。実際、ゲノム不安定性を呈するヒト遺伝病ではがんや免疫不全と共に早期老化を示す。この事は早期老化を穏やかに進行する疾病としてがんなどと同列に議論できる事を意味している。本研究ではゲノム不安定性による老化機構を明らかにして、遺伝的および環境因子・生活習慣による早期老化の診断と予防に役立てる事を目的とする。

研究材料として染色体不安定症候群のファンコニー貧血 (FA) およびナイミーヘン症候群 (NBS) / 毛細血管拡張性運動失調症 (AT) のゲノム不安定性を呈するヒト遺伝病を用いる。これらの細胞では細胞老化の原因となる染色体テロメアが異常に早く短縮する事が指摘されている。恐らくゲノム安定化に関わるこれら遺伝病の蛋白が老化シグナ

NBS細胞において異常を示す事を報告した。老化に果たすこのシグナル経路の役割をNBS、AT、正常細胞のそれぞれの初期培養ならびに老化細胞において比較する。ウェスタンブロット法により p53 (ser15) などの定量化、老化細胞から ATM 抗体により精製した ATM を用いて GST-p53 の試験管内リン酸化能及び生体内での NBS1/ATM 複合体形成によるシグナル時系列を検証する。(ロ) NBS細胞のテロメア短縮促進：NBS および AT 初代培養細胞の分裂テロメア短縮を TTAGGG リピートをプローブとしたサザン法、AE プローブによる加水分解時の発光を比較する HPA 法の高精度計測により分裂毎のテロメア長減少を正常細胞と定量比較する。また S1 ヌクレアーゼによる 5'一本鎖 DNA (G-tail) 生成能や細胞内 ECTR 測定などによりテロメア異常短縮の原因を解明する。(ハ) Nbs1 遺伝子ノックアウトマウス作製：マウス Nbs1 遺伝子を D3-ES 細胞からスクリーニングする。ベクター PGK-neo-polyA と HSV-tk により FA 蛋白 C 末側 400-475 アミノ酸に変異を導入後、 $2 \times 10^7$  個の ES 細胞にエレクトロポリメーションする。PCR 法で相同組み換え体を確認した 5 日～7 日に出現する G418 耐性クローンの変異 ES 細胞を C57BL/6 の 3.5 日胚から回収したブラシスト内注入によりキメラマウスを作製する。同様にニワトリ Nbs1 遺伝子をクローニングして B 細胞由来の DT40 細胞のターゲッティングによりニワトリ Nbs1 細胞を作製する。

続いて、日本人ファンコニー貧血由来の線維芽細胞と標準相補性群細胞との細胞融合と MMC 感受性試験により日本人患者の相補性群を決定する。また、発現ベクターに組み込んだ cDNA ライブラリーをファンコニー細胞に導入して MMC 感受性の回復から原因遺伝子のクローニングを行う。

(倫理面の配慮)

大部分の使用した細胞は一般的に通用しているものであるが、現在迄実験用に供されたファンコニー細胞については所定の手続きを経てそれぞれの細胞バンクから入手、それらのガイドラインに従って使用した。

### C. 研究結果

ヒト NBS1 の酵母ホモログ Xrs2 欠損株では染色体テロメアが異常短縮する事から、DNA 修復に加えてテロメア維持機能もある事が知られている。我々は NBS 患者の皮膚線維芽細胞の細胞分裂によるテロメア長をサザン法により測定した結果、酵母同様にテロメア短縮が促進される事が明らかとなった。また、テロメラーゼ活性を有する NBS 株細胞は NBS1cDNA の導入により顕著なテロ

メアの延長がみられた。変異 NBS1cDNA あるいは NBS1 欠損ゲノム DNA の導入ではテロメア長は延長しないので不変である事から、NBS1 蛋白のテロメア維持機構によりテロメアが延長したと思われる。この事は、NBS1 蛋白の免疫染色によるフォーカスがテロメア結合蛋白 TRF2 と共局在する事からも支持される。

NBS1 蛋白の N 末側に存在する FHA (Forkhead associated) ドメイン及び BRCT (Brcal-C-terminus) ドメインは酵母からヒト迄非常に良く保存されている事が知られている。我々は新たにクローニングしたチキン NBS1 の DNA 配列をヒト、マウス及び酵母 Xrs2 と比較検討した結果、C 末側の 665-693 アミノ酸が高度に保存されており、特に NFKXFXXKXXXP(682-693) は真核生物で同一のアミノ酸配列をしていた。続いてこの C 末側及び N 末側の保存された領域の機能を調べる目的でそれぞれの欠失変異体を作製した。酵母 Two hybrid 実験の結果、C 末側の 682-693 アミノ酸は hMre11 との結合に必須である事が明らかとなった。さらに、これらの蛋白を NBS 細胞で発現させて放射線感受性及びフォーカス形成能について検討した。上記 hMre11 結合領域を欠失した蛋白は NBS 細胞と同程度の放射線感受性に留まって回復はみられなかったが、FHA/BRCT ドメインを欠失した蛋白では hMre11 が存在すれば放射線感受性の回復がみられた。つまり FHA/BRCT ドメインは放射線感受性には直接関与しないことが判明した。続いて、これらの NBS1 変異蛋白を発現した NBS 細胞を用いて放射線照射後の NBS1/hMre11/hRad50 複合体のフォーカス形成能をそれぞれの抗体による免疫染色で調べた。NBS 細胞ではこれらのフォーカスは形成されず、また hMre11/hRad50 複合体の核移行も認められなかった。この事は NBS1 の hMre11 結合領域を欠失した蛋白でも同じであったが、この領域の回復により NBS フォーカス形成も核移行能力も同時に回復した。一方、FHA/BRCT ドメインの欠失は、hMre11/hRad50 の放射線照射の核移行は認められるものの、NBS1 及び hMre11、hRad50 のいずれの抗体を用いてもフォーカス形成はみられなかった。この事は HeLa 細胞に FHA/BRCT ドメインを欠失した蛋白を過剰発現したドミナント・ネガティブクローンでも、NBS1 フォーカス形成がフォーカスに於ける FHA/BRCT ドメインの重要性が減少することから確認された。

放射線誘発アポトーシスあるいは DNA 修復の開始にあたってヒストンのリモデリングが先行しなければならない。実際、NBS1 フォーカスは放射線照射後 30 分に形成される

のに対して、H2AX リン酸化は数分以内にフォーカスが検出される。ゲノム DNA はヒストン 8 量体(H2A, H2B, H3, H4 各 2 分子)に巻き付くことで高次の染色体構造を形成しているが、H2A ファミリーの 10-25%をしめる H2AX のリン酸化が染色体リモデリングを開始していると思われる。我々はリン酸化 H2AX の抗体を作製して H2AX リン酸化と DNA 修復の関係について検討した。電離放射線照射やアドリマイシン、エトポシドなど抗癌剤による DNA 損傷時のフォーカス形成の比較では、DNA 二重鎖切断において効率良く H2AX のリン酸化ならびにフォーカスが形成されることが判明した。また、このリン酸化 H2AX フォーカスは NBS1 フォーカスと共局在しており、放射線誘発の DNA 二重鎖切断部位でヒストンのリモデリングが起こった後に NBS1 蛋白が hMre11/hRad50 を細胞質から同部位にリクルートして来ると思われる。また、リン酸化 H2AX の抗体による免疫沈降物(IP)に NBS1 蛋白が存在しており、NBS1 は直接ヒストンに結合して DNA 修復を開始させている可能性がある。また、この IP には非相同 DNA 末端再結合の蛋白 Ku も存在することが明らかとなった。Ku 蛋白は NBS1 複合体の構成成分 hMre11 と結合するとの報告もあり、両者が直接リン酸化型 H2AX に結合しているかは不明である。相同組換えならびに非相同 DNA 末端再結合の蛋白 NBS1 及び Ku が H2AX に局在することからヒストン上でこれらの DNA 修復の重要な初期反応が進行していると思われる。H2AX のリン酸化はアポトーシス誘導、そして恐らくは放射線照射後の p53 誘導にも関係すると思われている。我々の実験では正常細胞では照射 1 時間後にみられる p53 の細胞内蓄積が NBS 細胞では有意に低下していた。キナーゼによる p53(ser15)のリン酸化が起こらない AT 細胞よりは誘導 p53 量が多いことから、AT とは異なるヒストンのリモデリングなどに原因する間接的効果と思われる。

NBS1 の酵母ホモログ Xrs2 は非相同 DNA 末端再結合の蛋白であり、相同組換え機構への関与は少ないと思われている。しかし、高等真核生物の減数分裂では NBS1 が強く発現していることから、相同組換えへの関与も示唆される。このため、チキン B リンパ球由来 DT40 細胞を用いて Nbs1 ノックアウト細胞を作成した。まず NBS1 の N 末側保存領域 FHA/BRCT ドメインに設計した変成プライマーを用いて、RT-PCR によりチキン胚由来の cDNA ライブラリーをスクリーニングした。得られたチキン Nbs1 は 753 アミノ酸からなり、その N 末側及び C 末側の領域はヒト NBS1 と約 60%の相同性を有していた

が、Atm によるリン酸化を受ける中央部のアミノ酸はほとんど相同性を示さなかった。続いて、ノックアウトコンストラクトを作製するためにエクソン 2 からエクソン 6 に相当する約 5.5kb のゲノム DNA を単離後に構造決定した DT40 細胞の Nbs1 遺伝子をターゲットングした。Nbs1 ノックアウト細胞はヒト NBS 細胞と同じく生存可能であるが、野性型 DT40 細胞と比較して顕著に増殖速度が低下していた。また、ヒト NBS 細胞と同様に自然及び放射線誘発染色体の高頻度の発生と放射線致死高感受性を示した。一方、ターゲットインテグレーションを指標に相同組換え能を野性型 DT40 細胞と比較した結果、Nbs1 ノックアウト細胞では顕著に相同組換え能が低下している事が判明した。一方、Nbs1 ノックアウトマウスは胎生 7~8 日で致死であることが判明した。しかしながら、Nbs1 ノックアウトマウス細胞株の樹立は可能でヒト NBS 細胞と同程度の放射線感受性を示した。一方、日本人のファンコニー貧血患者 10 人の皮膚線維芽細胞の相補性試験を行った結果、6 人が A 群にそして 2 人が G 群に分類された。しかし、残りの 2 人は A 群及び G 群でもなく日本人で報告されていない新規の相補性群に属すると思われる。また欧米人の E 群細胞を用いた相補性に基づいた遺伝子クローニング法により FANCE を同定した。FANCE は 1611bp で 536 アミノ酸からなる蛋白をコーティングした。これらの座位は我々が既に報告した染色体 6q のマッピング結果と一致していた。既知蛋白とのホモロジー検索では 2ヶ所の核移行シグナルの存在がみられるものの、既知蛋白との類似性は認められなかった。

#### D. 考察

本研究から NBS1 も他の DNA 修復蛋白同様に、テロメア長維持そして恐らくは細胞老化の蛋白である事が示された。すなわち、NBS1 はテロメアに局在して TRF2 と結合する事、その機能の失活は NBS 細胞にみられるようにテロメア長の短縮促進、あるいは NBS1 蛋白導入によるテロメア長の延長から確認された。DNA 修復あるいは細胞周期制御同様に、NBS1 のテロメアにおける機能には ATM が関与している事が示唆されるが現在迄にその機構は不明である。NBS1 が Ku と共に ATM によりリン酸化されたヒストン H2AX に結合する事は、DNA 二重鎖切断の再結合の初期に機能している事を示すものであり、その詳細な機能の解明はテロメア延長の初期過程も明らかにすると期待される。AT も NBS もいずれも早期老化を示すヒト遺伝病である。同じく染色体不安定症候群に属す

るファンコニー貧血でもテロメア長の短縮促進が示唆されており、ATM/NBS1/FANCによるテロメア維持機構の総合的解明が待たれる。我々のFANCE遺伝子クローニングはこの解明に重要な貢献をすると期待される。

#### E. 結論

NBS1 蛋白はテロメア複製期を通じて TRF2 と相互作用する事、また NBS 患者由来の初期培養細胞では細胞分裂によるテロメア短縮が AT 細胞同様に促進される事、また NBS1 遺伝子の導入によりテロメア長が延長される事が示された。一方、ATM からのシグナルにより hMre11 に結合する NBS1 の機能ドメインは酵母でも保存されたアミノ酸配列を有すること、ATM による NBS1 リン酸化に先駆けて、アポトーシス誘導や p53 シグナル伝達に関与すると思われるヒストン H2AX がリン酸化されるなど当初予定していなかった ATM/NBS1 シグナル伝達の初期過程の全容が明らかになりつつある。

一方、FA は少なくとも 7 相補性群に分類されるが、MMC 感受性と放射線感受性そして恐らく細胞老化もこれら相補性群に依存的である。細胞融合による相補性試験や抗体を用いた日本人患者の相補性群の解析結果では、A 群が 60%、G 群が 20% であることが明らかになった。A 群 G 群のいずれにも属さない残りの 10% の患者の分類研究が現在進行中である。我々は今回 FA-E 群の遺伝子クローニングに成功しているため、今後日本人独自の相補性群遺伝子のクローニングや two hybrid によるテロメア関連遺伝子の機能とその維持機構解明には NBS1 と同様の方法が応用可能である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) J.P.Winter, F.Leville, C.G.M.Berkel, M.A.Rooimans, L.Weel, J.Steltenpool, I.Demuth, N.V.Morgan, N.Alon, L.B.Collins, J.Lightfoot, P.A.Leegwater, Q.Waisfisz, Komatsu, K., F.Arwert, J.C.Pronk, C.G.Mathew, M.Digweed, M.Buchwald, H.Joenje: Isolation of a cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene. (Am.J.Hum.Genet.,67,1306-1308,2000)

2) Matsuura, S., Ito, E., Tauchi, H., Komatsu, K., Ikeuchi, T., Kajii, T.: Chromosomal instability syndrome of total premature chromatid separation with mosaic variegated aneuploidy is defective in mitotic-spindle checkpoint. (Am.J.Hum.Genet.,67,483-486,2000)

3) Tauchi, H., K.Komatsu, Ishizaki, K., Yatagai, F., Kato, T.: Mutation spectrum of MSH3-deficient cells HHUA/chr.2 reflects in vivo activity of the MSH3 gene product in mismatch repair. (Mutat.Res.,447,155-164,2000)

4) Ohnishi, T., Komatsu, K., Tauchi, H., Wang, X., Takahashi, A., Ohnishi, K., Shiba, A., Matsumoto, H.: Heat-induced accumulation of p53 and hsp72 is suppressed in lung fibroblasts from SCID mouse. (Int.J.Radiat.Biol.,76,711-715, 2000)

5) Hama, S., Matsuura, S., Tauchi, H., Sawada, J., Kato, C., Yamasaki, F., Yoshioka, H., Sugiyama, K., Arita, K., Kurisu, K., Kamada, N., Heike, Y., Komatsu, K.: Absence of mutation in the NBS1 gene in B-cell malignant lymphoma patients. (Anticancer Research,20,1897-1900, 2000)

6) Hiel, J.A., Weemaes, C., Komatsu, K., et.al. Nijmegen breakage syndrome. The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group. (Arch.Dis.Child.,82,400-406,2000)

7) Ishikawa, S., Ishikawa, M., Tokuda, T., Yoshida, K., Wakui, K., Matura, S., Ohara, S., Sekijima, Y., Hidaka, E., Fukushima, Y., Shigeta, H., Komatsu, K., Ikeda, S.: Japanese family with an autosomal dominant chromosome instability syndrome: a new neurodegenerative disease? (Am J Med Genet.,94,265-270,2000)

8) H.Tauchi, J.Kobayashi, K.Morishima, S.Matsuura, A.Nakamura, T.Shiraishi, E.Ito, D.Masnada, D.Delia, K.Komatsu: The FHA domain of NBS1 is essential for nuclear foci formation after irradiation, but not essential for hRAD50/hMRE11/NBS1 complex DNA Repair activity. (J.Biol. Chem.,276:12-15,2001)

9) Ubagai, T., Matsuura, S., Tauchi, H., Itou, K., K.Komatsu: Comparative genomic hybridization analysis suggests a gain of chromosome 7p associated with lymph node metastasis is non small cell lung cancer. (Oncology Reports,8:83-88,2001)

10) Sakata, K., Matsumoto, Y., Tauchi, H., Satoh, M., Oouchi, A., Nagakura, H., Koito, K., Suzuki, N., Komatsu, K., Hareyama, M.: Expression of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in tumors. (Int.J.Radiat.Oncology, in press,2001)

## 2. 学会発表

- 1) K.Komatsu : The role of NBS1 in genomic integrity. The 17th Radiation Biology Center International Symposium, Bioregulation of Radiation Response: Molecular Mechanism of Radiation Carcinogenesis, Kyoto, 2000, November 16-17
- 2) 田内 広, 白石貴博, 松浦伸也, 澤田純子, 加藤千景, 小松賢志, 笠井(江口)清美, 古澤佳也, 安藤興一: 機能相補性試験による DNA 二重鎖切断修復遺伝子 NBS1 の重要ドメイン解析. 第 41 回原子爆弾後障害研究会, 長崎, 2000, 6 月 4 日
- 3) 森島賢一, 中村麻子, 岡本 文, 松浦伸也, 田内 広, 小松賢志, 小林純也: DNA 修復欠損ファンコニー貧血細胞のアポトーシス誘発. 第 41 回原子爆弾後障害研究会, 長崎, 2000, 6 月 4 日
- 4) 松浦伸也, 小松賢志, 伊藤詠美, 田内 広, 池内達郎, 梶井 正: M 期チェックポイント異常を起因とする新しいヒト高発癌性遺伝病. 第 41 回原子爆弾後障害研究会, 長崎, 2000, 6 月 4 日
- 5) 中村麻子, 田内 広, 松浦伸也, 小林純也, 岡本 文, 小松賢志, 井出利憲: 放射線損傷修復蛋白 NBS1 の発現異常による加齢促進. 第 41 回原子爆弾後障害研究会, 長崎, 2000, 6 月 4 日
- 6) 小林純也, 谷本啓二, 田内 広, 松浦伸也, 小松賢志: 放射線感受性 NBS 細胞における ATM キナーゼの活性について. 第 41 回原子爆弾後障害研究会, 長崎, 2000, 6 月 4 日
- 7) 田内 広, 森島賢一, 小林純也, 山下由紀子, 園田英一朗, 高田 穰, 武田俊一, 松浦伸也, 小松賢志: DNA 修復遺伝子 NBS1 ノックアウト DT40 細胞の作成と表現型解析. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000, 12 月 13-16 日
- 8) 中村麻子, 田内 広, 松浦伸也, 小林純也, 角尾進吾, 袁 勳梅, 石川冬木, 井出利憲, 小松賢志: ナイミーヘン症候群(NBS)細胞におけるテロメア維持機構. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000, 12 月 13-16 日
- 9) 森島賢一, 松浦伸也, 中村麻子, 白石貴博, 伊藤詠美, 小林純也, 田内 広, 小松賢志: Yeast two-hybrid system を用いた FANCG 結合タンパクのスクリーニング. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000, 12 月 13-16 日
- 10) 小林純也, 田内 広, 小川 晃, 小林稔子, 松浦伸也, 谷本啓二, 小松賢志: DNA 損傷によるヒストン H2AX フォーカス形成. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000, 12 月 13-16 日
- 11) 白石貴博, 田内 広, 松浦伸也, 武田俊一, 小松賢志: ニワトリ DT40 hprt-細胞作成とヒト X 染色体ターゲティング. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000, 12 月 13-16 日
- 12) 伊藤詠美, 松浦伸也, 田内 広, 小松賢志, 池内達郎, 梶井 正: Total premature chromatid separation (total PCS) ホモ接合体 2 症例の Mitotic index を指標にした機能的相補性試験. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000, 12 月 13-16 日
- 13) 長谷川和正, 田内 広, 小松賢志, 石川冬木: テロメラーゼ非依存性テロメア維持機構 (ALT) における DNA 組み換え関連因子の役割. 第 59 回日本癌学会総会, 横浜, 2000, 10 月 4 日-6 日
- 14) 田内 広, 小林純也, 中村麻子, 松浦伸也, 小松賢志: 高発癌性遺伝病ナイミーヘン症候群原因タンパク NBS1 による hRAD50/hMRE11 複合体の細胞内局在制御. 第 59 回日本癌学会総会, 横浜, 2000, 10 月 4 日-6 日
- 15) 中村麻子, 田内 広, 小林純也, 松浦伸也, 井出利憲, 小松賢志: 高発癌性遺伝病ナイミーヘン症候群(NBS)細胞におけるテロメア維持機構の解析. 第 59 回日本癌学会総会, 横浜, 2000, 10 月 4 日-6 日
- 16) 松浦伸也, 田内 広, 池内達郎, 梶井 正, 小松賢志: 紡錘体チェックポイント異常を原因とする新しい高発癌性遺伝病. 第 59 回日本癌学会総会, 横浜, 2000, 10 月 4 日-6 日
- 17) 小松賢志: DNA 修復関連遺伝子. 日本放射線影響学会第 43 回大会, 東京都, 2000, 8 月 30-9 月 1 日
- 18) 小林純也, 田内 広, 小川 晃, 小林稔子, 松浦伸也, 谷本啓二, 小松賢志: NBS1 と ATM の相互作用による放射線誘導細胞応答の制御. 日本放射線影響学会第 43 回大会, 東京都, 2000, 8 月 30-9 月 1 日

- 19) 田内 広, 森島賢一, 小林純也, 山下由紀子, 園田英一朗, 高田 穰, 武田俊一, 松浦伸也, 小松賢志: DT40 を用いた放射線 DNA 損傷修復遺伝子 NBS1 ノックアウト細胞の作成とその表現型解析. 日本放射線影響学会第 43 回大会, 東京都, 2000, 8 月 30-9 月 1 日
- 20) 中村麻子, 田内 広, 松浦伸也, 小林純也, 森島賢一, 白石貴博, 伊藤詠美, 井出利憲, 小松賢志: NBS1 によるテロメア維持機構の解析. 日本放射線影響学会第 43 回大会, 東京都, 2000, 8 月 30-9 月 1 日
- 21) 白石貴博, 田内 広, 小林純也, 森島賢一, 中村麻子, 松浦伸也, 小松賢志: ナイミーヘン染色体不安定症候群原因タンパク NBS1 による hRAD50/hMRE11 複合体の細胞内局在制御. 日本放射線影響学会第 43 回大会, 東京都, 2000, 8 月 30-9 月 1 日
- 22) 松浦伸也, 伊藤詠美, 田内 広, 池内達郎, 梶井 正, 小松賢志: M 期チェックポイント異常を原因とする新しいヒト高発癌性染色体不安定症候群. 日本放射線影響学会第 43 回大会, 東京都, 2000, 8 月 30-9 月 1 日
- 23) 森島賢一, 松浦伸也, 中村麻子, 白石貴博, 伊藤詠美, 小林純也, 田内 広, 小松賢志: Yeast two-hybrid system を用いた FANCG への結合タンパクのスクリーニング. 日本放射線影響学会第 43 回大会, 東京都, 2000, 8 月 30-9 月 1 日
- 24) 白石貴博, 田内 広, 小林純也, 森島賢一, 中村麻子, 松浦伸也, 小松賢志: MRE11 複合体の細胞内局在を制御する NBS1 機能ドメイン. Workshop on DNA Repair and Mutagenesis 2000, 仙台, 2000, 9 月 12-14 日
- 25) 中村麻子, 田内 広, 松浦伸也, 小林純也, 角尾進吾, 袁 勳梅, 石川冬木, 井出利憲, 小松賢志: ナイミーヘン症候群におけるテロメア維持機構. Workshop on DNA Repair and Mutagenesis 2000, 仙台, 2000, 9 月 12-14 日
- 26) 伊藤詠美, 松浦伸也, 田内 広, 小松賢志, 池内達郎, 梶井 正: 染色分体早期分離および異数化モザイクを特徴とする新規高発癌性遺伝病の不死化細胞株の樹立. Workshop on DNA Repair and Mutagenesis 2000, 仙台, 2000, 9 月 12-14 日
- 27) 森島賢一, 松浦伸也, 中村麻子, 白石貴博, 伊藤詠美, 小林純也, 田内 広, 小松賢志: Yeast two-hybrid system を用いた FANCG への結合タンパクのスクリーニング. Workshop on DNA Repair and Mutagenesis 2000, 仙台, 2000, 9 月 12-14 日
- 28) K.Komatsu: Functions of NBS1 for genetic stability after irradiation. Second U.S.-Japan Cooperative Cancer Research Program Symposium, 東京都, 2001, 3 月 8-9 日
- 29) K.Komatsu, H.Tauchi, J.Kobayashi, S.Matsuura: Functions of NBS1 in initial step of DNA repair after irradiation. International Workshop on Radiation Damage 2001: Repair, Mutagenesis and Visualization, 東京都, 2001, 3 月 14-16 日
- 30) K.Komatsu: Functions of NBS1 for genetic stability after irradiation. The 17th Kumamoto Medical Bioscience Symposium, 熊本, 2001, 3 月 22 日
- 31) 小松賢志: ナイミーヘン症候群遺伝子とゲノム安定化. がん特定公開・合同シンポジウム, 東京都, 2000, 2 月 4 日
- 32) K.Komatsu: Cancer-related multiple functions of the protein responsible for Nijmegen breakage syndrome, NBS1. Symposium on stress science in Nagasaki「Aging and Carcinogenesis」, 長崎, 2000, 11 月 14-15 日
- 33) A.Nakamura, H.Tauchi, S.Matsuura, J.Kobayashi, S.Kakuo, X.Yuan, F.Ishikawa, T.Ide, K.Komatsu: Abnormal telomere shortening by disruption of repair protein NBS1. 第 1 回文部省特定領域研究「がん」6 領域若手研究者ワークショップ, 静岡, 2000, 8 月 31 日-9 月 3 日
- 34) 中村麻子, 田内 広, 松浦伸也, 小林純也, 角尾進吾, 袁 勳梅, 石川冬木, 井出利憲, 小松賢志: ナイミーヘン染色体不安定症候群 (NBS) 細胞におけるテロメア維持機構. 日本人類遺伝学会第 45 回大会, 福岡, 10 月 25-27 日, 2000
- 35) 松浦伸也, 伊藤詠美, 田内 広, 小松賢志, 池内達郎, 梶井 正: Total premature chromatid separation (total PCS) ホモ接合個体の不死化線維芽細胞株の樹立. 日本人類遺伝学会第 45 回大会, 福岡, 10 月 25-27 日, 2000
- G. 知的所有権の取得状況  
該当なし

分担研究報告書

ファンコニー貧血患者の加齢とノックアウトマウス作製に関する研究

分担研究者 松浦伸也 広島大学原爆放射能医学研究所 助教授

研究要旨 ファンコニー貧血(FA)には少なくとも7種類の異なる原因遺伝子が存在するとされているので、今年度は日本人の患者の分類、ならびにE群の遺伝子クローニングに成功した。一方、NBS1 ノックアウトマウスの開発を行って、現在マウス Nbs1 細胞はヒト同様に放射線高感受性及び染色体不安定性高感受性であることを明らかにした。

A. 研究目的

老化に伴い細胞の染色体異常や突然変異の増加などゲノム不安定性が誘発される事は以前から知られていたが、最近、モデル動物の線虫の研究からゲノム不安定性が逆に老化を促進する事が明らかになってきた。実際、ゲノム不安定性を呈するヒト遺伝病では発がんや免疫不全と共に早期老化を示す。この事は早期老化を穏やかに進行する疾病として発がんなどと同様に議論できる事を意味している。本研究では染色体不安定症候群のファンコニー貧血を材料とした遺伝的因子による老化機構、ならびにナイミーヘン症候群(NBS)のノックアウトマウス細胞作製によるテロメア短縮機構を明らかにして早期老化の診断と予防に役立てる事を目的とする。

B. 研究方法

日本人患者由来のリンパ芽球細胞を SV40 ウィルスで株化後に、ファンコニー貧血 A ~ G 群の標準細胞と PEG (50 %) で細胞融合する。両親細胞を neo 及び Hygromycin で標識する事によって、融合ハイブリット細胞は G418 ならびに Hygromycin 耐性クローンとに選別可能である。これらのハイブリットクローンの MMC 感受性が親細胞程度に留まる場合には、両細胞は同一相補性群に属すると判定する。また、MMC 感受性が正常細胞レベルに回復する、いわゆる相補性がある場合には異なる相補性群に属すると判断する。一方、相補性試験と併行して、既に報告されている相補性群の中で原因遺伝子が未同定の E 群遺伝子のクローニングを行う。EB ウィルスに基づいた発現ベクターにヒト cDNA ライブラリーを組み込んで E 群細胞に導入後に、100  $\mu$ g/ml の MMC 処理により生存可能なクローン中に取り込まれた cDNA を解析する。

一方、患者 NBS 細胞は放射線作用の分子機構解明に重要な知見をもたらした。ここでは NBS 動物モデルの作製により genotype/phenotype の解析を行う。Nbs1 のエクソン2部位に PGK-neo-poly A/HSD-tk ターゲティングベクター導入によりヌル突然変異 ES 細胞を得る。この変異 ES 細胞の放射線感受性を染色体異常頻度などを指標として確認後、C57BL/6 の 3.5 日胚から回収したプラストシスト内に移入する。続いて偽妊娠 ICR マウスの子宮内に戻して得られるキメラマウス交配により F1 の尾 DNA の PCR 法により変異マウスを確認する。また、ニワトリ DT40 細胞は容易に相同組換えを行うことから、短時間に NBS ノックアウト細胞の解析が可能である。このためにニワトリ Nbs1 をクローニング後に、その Exon 2-6 のゲノム DNA を変異 Nbs1 でターゲティングしてノックアウト細胞を作製した。ターゲットコンストラクトには neo, hyg, bsr の3種類の選択マーカーを用いた。  
(倫理面への配慮)

日本人患者の細胞は京大放射線の細胞バンクから所定の手続きを経て使用した。また、その他の細胞もヨーロッパ FA 細胞バンクから手続きを経て使用した。

C. 研究結果

日本人のファンコニー貧血患者10人の皮膚線維芽細胞の相補性試験を行った結果、6人がA群にそして2人がG群に分類された。しかし、残りの2人はA群及びG群でもなく日本人で報告されていない新規の相補性群に属すると思われる。また欧米人のE群細胞を用いた相補性に基づいた遺伝子クローニング法により FANCE を同定した。FANCE は 1611bp で 536 アミノ酸からなる蛋白をコーディングした。これらの座位は我々が既に



報告した染色体 6q のマッピング結果と一致していた。既知蛋白とのホモロジー検索では 2ヶ所の核移行シグナルの存在がみられるものの、既知蛋白との類似性は認められなかった。

続いて、Nbs1 ノックアウト細胞の性質を調べるために NBS1 の N 末側保存領域 FHA/BRCT ドメインに設計した変成プライマーを用いて、RT-PCR によりチキン胚由来の cDNA ライブラリーをスクリーニングした。得られたチキン Nbs1 は 753 アミノ酸からなり、その N 末側及び C 末側の領域はヒト NBS1 と約 60% の相同性を有していたが、Atm によるリン酸化を受ける中央部のアミノ酸はほとんど相同性を示さなかった。続いて、ノックアウトコンストラクトを作製するためにエクソン 2 からエクソン 6 に相当する約 5.5kb のゲノム DNA を単離後に構造決定した DT40 細胞の Nbs1 遺伝子をターゲットングした。Nbs1 ノックアウト細胞はヒト NBS 細胞と同じく生存可能であるが、野性型 DT40 細胞と比較して顕著に増殖速度が低下していた。また、ヒト NBS 細胞と同様に自然及び放射線誘発染色体の高頻度の発生と放射線致死高感受性を示した。一方、ターゲットインテグレーションを指標に相同組換え能を野性型 DT40 細胞と比較した結果、Nbs1 ノックアウト細胞では顕著に相同組換え能が低下している事が判明した。この結果は SC-neo を導入した細胞で、I-SceI 制限酵素を細胞内に一時的に発現させて DNA 二重鎖切断を発生させて相同組換えをアッセイする実験系とも良く一致して、Nbs1 ノックアウト細胞では相同組換えが極端に低下していた。一方、Nbs1 ノックアウトマウスは胎生 7~8 日で致死のあることが判明した。しかしながら Nbs1 ノックアウトマウス細胞株の樹立は可能でヒト NBS 細胞と同程度の放射線感受性を示した。

#### D. 考察

遺伝的相補性の違いによって老化の程度など細胞の性質は大きく変わるものと予想される。日本人ファンコニー患者では既に A 群と G 群が報告されていたが、我々の実験は更に別の相補性群の存在を示すものである。この事は日本人患者細胞を用いた研究でも相補性群の同定の必要性を示唆するものである。また、FANCE 蛋白は既知蛋白との相同性はなく、他の FA 原因遺伝子同様に下等真核生物からの情報が得られない事を示した。ヒト及びマウス、ニワトリのファンコニー細胞の確立とその解析の必要性を示すものである。

チキン Nbs1 細胞の開発は、高等真核生物

では Nbs1 蛋白が相同組換えに必須であることを示した。この結果は酵母の研究からは予想されなかった事である。この相同組換えの低下は姉妹染色体交換 (SCE) の低下とも一致しており、ブルーム症候群における SCE の増加機構との関係で興味深い。今後の Nbs1 マウス細胞との解析により、SCE の発生機序や相同組換えの制御機構が明らかになるものと期待される。

#### E. 結論

- 1) 日本人ファンコニー貧血には相補性 A 群及び G 群以外の患者の存在が示唆された。
- 2) FANCE の遺伝子クローニングに成功した。
- 3) チキン及びマウス Nbs1 ノックアウト細胞を開発した。
- 4) チキン Nbs1 細胞の解析結果は、Nbs1 蛋白が相同組換えに重要な機能を有する事を示した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Matsuura, S., Ito, E., Tauchi, H., Komatsu, K., Ikeuchi, T., Kajii, T.: Chromosomal instability syndrome of total premature chromatid separation with mosaic variegated aneuploidy is defective in mitotic-spindle checkpoint. (Am.J.Hum.Genet., 67, 483-486, 2000)

2) Hama, S., Matsuura, S., Tauchi, H., Sawada, J., Kato, C., Yamasaki, F., Yoshioka, H., Sugiyama, K., Arita, K., Kurisu, K., Kamada, N., Heike, Y., Komatsu, K.: Absence of mutation in the NBS1 gene in B-cell malignant lymphoma patients. (Anticancer Research, 20, 1897-1900, 2000)

3) H. Tauchi, J. Kobayashi, K. Morishima, S. Matsuura, A. Nakamura, T. Shiraishi, E. Ito, D. Masnada, D. Delia, K. Komatsu: The FHA domain of NBS1 is essential for nuclear foci formation after irradiation, but not essential for hRAD50/hMRE11/NBS1 complex DNA Repair activity. (J. Biol. Chem., 276: 12-15, 2001)

4) Ubagai, T., Matsuura, S., Tauchi, H., Itou, K., K. Komatsu: Comparative genomic hybridization analysis suggests a gain of chromosome 7p associated with lymph node metastasis is non small cell lung cancer. (Oncology Reports, 8: 83-88, 2001)

## 2. 学会発表

- 1) 田内 広, 白石貴博, 松浦伸也, 澤田純子, 加藤千景, 小松賢志, 笠井(江口)清美, 古澤佳也, 安藤興一: 機能相補性試験による DNA 二重鎖切断修復遺伝子 NBS1 の重要ドメイン解析. 第 41 回原子爆弾後障害研究会, 長崎, 2000, 6 月 4 日
- 2) 森島賢一, 中村麻子, 岡本 文, 松浦伸也, 田内 広, 小松賢志, 小林純也: DNA 修復欠損ファンコニー貧血細胞のアポトーシス誘発. 第 41 回原子爆弾後障害研究会, 長崎, 2000, 6 月 4 日
- 3) 松浦伸也, 小松賢志, 伊藤詠美, 田内 広, 池内達郎, 梶井 正: M 期チェックポイント異常を起因とする新しいヒト高発癌性遺伝病. 第 41 回原子爆弾後障害研究会, 長崎, 2000, 6 月 4 日
- 4) 中村麻子, 田内 広, 松浦伸也, 小林純也, 岡本 文, 小松賢志, 井出利憲: 放射線損傷修復蛋白 NBS1 の発現異常による加齢促進. 第 41 回原子爆弾後障害研究会, 長崎, 2000, 6 月 4 日
- 5) 小林純也, 谷本啓二, 田内 広, 松浦伸也, 小松賢志: 放射線感受性 NBS 細胞における ATM キナーゼの活性について. 第 41 回原子爆弾後障害研究会, 長崎, 2000, 6 月 4 日
- 6) 田内 広, 森島賢一, 小林純也, 山下由紀子, 園田英一朗, 高田 穰, 武田俊一, 松浦伸也, 小松賢志: DNA 修復遺伝子 NBS1 ノックアウト DT40 細胞の作成と表現型解析. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000, 12 月 13-16 日
- 7) 中村麻子, 田内 広, 松浦伸也, 小林純也, 角尾進吾, 袁 勳梅, 石川冬木, 井出利憲, 小松賢志: ナイミーヘン症候群(NBS)細胞におけるテロメア維持機構. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000, 12 月 13-16 日
- 8) 森島賢一, 松浦伸也, 中村麻子, 白石貴博, 伊藤詠美, 小林純也, 田内 広, 小松賢志: Yeast two-hybrid system を用いた FANCG 結合タンパクのスクリーニング. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000, 12 月 13-16 日
- 9) 小林純也, 田内 広, 小川 晃, 小林稔子, 松浦伸也, 谷本啓二, 小松賢志: DNA 損傷によるヒストン H2AX フォーカス形成. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000, 12 月 13-16 日
- 10) 白石貴博, 田内 広, 松浦伸也, 武田俊一, 小松賢志: ニワトリ DT40 hprt-細胞作成とヒト X 染色体ターゲティング. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000, 12 月 13-16 日
- 11) 伊藤詠美, 松浦伸也, 田内 広, 小松賢志, 池内達郎, 梶井 正: Total premature chromatid separation (total PCS) ホモ接合体 2 症例の Mitotic index を指標にした機能的相補性試験. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000, 12 月 13-16 日
- 12) 田内 広, 小林純也, 中村麻子, 松浦伸也, 小松賢志: 高発癌性遺伝病ナイミーヘン症候群原因タンパク NBS1 による hRAD50/hMRE11 複合体の細胞内局在制御. 第 59 回日本癌学会総会, 横浜, 2000, 10 月 4 日-6 日
- 13) 中村麻子, 田内 広, 小林純也, 松浦伸也, 井出利憲, 小松賢志: 高発癌性遺伝病ナイミーヘン症候群(NBS)細胞におけるテロメア維持機構の解析. 第 59 回日本癌学会総会, 横浜, 2000, 10 月 4 日-6 日
- 14) 松浦伸也, 田内 広, 池内達郎, 梶井 正, 小松賢志: 紡錘体チェックポイント異常を原因とする新しい高発癌性遺伝病. 第 59 回日本癌学会総会, 横浜, 2000, 10 月 4 日-6 日
- 15) 小林純也, 田内 広, 小川 晃, 小林稔子, 松浦伸也, 谷本啓二, 小松賢志: NBS1 と ATM の相互作用による放射線誘導細胞応答の制御. 日本放射線影響学会第 43 回大会, 東京都, 2000, 8 月 30-9 月 1 日
- 16) 田内 広, 森島賢一, 小林純也, 山下由紀子, 園田英一朗, 高田 穰, 武田俊一, 松浦伸也, 小松賢志: DT40 を用いた放射線 DNA 損傷修復遺伝子 NBS1 ノックアウト細胞の作成とその表現型解析. 日本放射線影響学会第 43 回大会, 東京都, 2000, 8 月 30-9 月 1 日
- 17) 中村麻子, 田内 広, 松浦伸也, 小林純也, 森島賢一, 白石貴博, 伊藤詠美, 井出利憲, 小松賢志: NBS1 によるテロメア維持機構の解析. 日本放射線影響学会第 43 回大会, 東京都, 2000, 8 月 30-9 月 1 日
- 18) 白石貴博, 田内 広, 小林純也, 森島賢一, 中村麻子, 松浦伸也, 小松賢志: ナイミーヘン染色体不安定症候群原因タンパク NBS1 による hRAD50/hMRE11 複合体の細胞内局在制御. 日本放射線影響学会第 43 回大会, 東京都, 2000, 8 月 30-9 月 1 日

19) 松浦伸也, 伊藤詠美, 田内 広, 池内達郎, 梶井 正, 小松賢志: M期チェックポイント異常を原因とする新しいヒト高発癌性染色体不安定症候群. 日本放射線影響学会第43回大会, 東京都, 2000, 8月30-9月1日

20) 森島賢一, 松浦伸也, 中村麻子, 白石貴博, 伊藤詠美, 小林純也, 田内 広, 小松賢志: Yeast two-hybrid systemを用いたFANCGへの結合タンパクのスクリーニング. 日本放射線影響学会第43回大会, 東京都, 2000, 8月30-9月1日

21) 白石貴博, 田内 広, 小林純也, 森島賢一, 中村麻子, 松浦伸也, 小松賢志: MRE11複合体の細胞内局在を制御するNBS1機能ドメイン. Workshop on DNA Repair and Mutagenesis 2000, 仙台, 2000, 9月12-14日

22) 中村麻子, 田内 広, 松浦伸也, 小林純也, 角尾進吾, 袁 勳梅, 石川冬木, 井出利憲, 小松賢志: ナイミーヘン症候群におけるテロメア維持機構. Workshop on DNA Repair and Mutagenesis 2000, 仙台, 2000, 9月12-14日

23) 伊藤詠美, 松浦伸也, 田内 広, 小松賢志, 池内達郎, 梶井 正: 染色分体早期分離および異数化モザイクを特徴とする新規高発癌性遺伝病の不死化細胞株の樹立. Workshop on DNA Repair and Mutagenesis 2000, 仙台, 2000, 9月12-14日

24) 森島賢一, 松浦伸也, 中村麻子, 白石貴博, 伊藤詠美, 小林純也, 田内 広, 小松賢志: Yeast two-hybrid systemを用いたFANCGへの結合タンパクのスクリーニング. Workshop on DNA Repair and Mutagenesis 2000, 仙台, 2000, 9月12-14日

25) K.Komatsu, H.Tauchi, J.Kobayashi, S.Matsuura: Functions of NBS1 in initial step of DNA repair after irradiation. International Workshop on Radiation Damage 2001: Repair, Mutagenesis and Visualization, 東京都, 2001, 3月14-16日

26) A.Nakamura, H.Tauchi, S.Matsuura, J.Kobayashi, S.Kakuo, X.Yuan, F.Ishikawa, T.Ide, K.Komatsu: Abnormal telomere shortening by disruption of repair protein NBS1. 第1回文部省特定領域研究「がん」6領域若手研究者ワークショップ, 静岡, 2000, 8月31日-9月3日

27) 中村麻子, 田内 広, 松浦伸也, 小林純也, 角尾進吾, 袁 勳梅, 石川冬木, 井出利憲, 小松賢志: ナイミーヘン染色体不安定症候群(NBS)細胞におけるテロメア維持機構. 日本人類遺伝学会第45回大会, 福岡, 10月25-27日, 2000

28) 松浦伸也, 伊藤詠美, 田内 広, 小松賢志, 池内達郎, 梶井 正: Total premature chromatid separation (total PCS) ホモ接合個体の不死化線維芽細胞株の樹立. 日本人類遺伝学会第45回大会, 福岡, 10月25-27日, 2000

G. 知的所有権の取得状況  
該当なし

分担研究報告書

老化細胞のシグナル伝達機構に関する研究

分担研究者 田内 広 広島大学原爆放射能医学研究所 助手

**研究要旨** NBS細胞ではDNA障害発生時のp53誘導が異常である事が示された。この結果、NBS細胞では一時的なDNA合成停止やアポトーシス誘導の低下が起こるものと思われる。また、DNA修復に先駆けてクロマチン・リモデリングが起こると予想されるがヒストンH2AXのリン酸化はNBS細胞においても正常であった。

A. 研究目的

テロメアの短縮に伴ったp53が誘導、さらにそれが細胞セネセンスやアポトーシスに導かれる事が知られている。この機構はDNA修復におけるATMキナーゼ活性化によるp53誘導と細胞周期チェックポイント制御ならびにアポトーシス誘発と同じと予想される。そこで本研究では放射線照射によるヒストンH2AXリン酸化に始まる、ATMキナーゼ活性化などの(老化)シグナルについて解析した。

B. 研究方法

実験に使用したGM7166VA7細胞はNBS患者皮膚線維芽細胞からSV40ウィルスにより株化樹立した。NBSリンパ芽球94p307及び17078細胞はそれぞれK.Sperling博士(ベルリン)及びD.Smeets(オランダ)からそれぞれ供与いただいた。また正常リンパ芽球GM2184はNIGMS(Camden)及び毛細血管拡張性運動失調症の(AT)リンパ芽球CSAはKapp博士(UCSA)からそれぞれ提供された。

ウェスタンブロットは細胞抽出液を8% SDSポリアクリルアミドゲルで分離後、p53抗体、p21抗体、MDM2抗体(サンタクルーズ社)及びp53ホスホセリン15抗体(ニューイングランドバイオラボ社)、NBS1抗体(我々が作製したNBS1アミノ酸353~754に対する抗体)を使って行った。ヒストンH2AXのリン酸化抗体も我々が開発して実験に使用した細胞周期解析はエタノールで細胞を固定後、プロピディウムヨードPIにより染色後フローサイトメトリーにより解析した。

(倫理面の配慮)

使用した細胞は全て国際的に実験用として一般的に流通しているものである。

C. 研究結果

正常細胞では放射線照射後に細胞内p53蓄積量が顕著に増加する。しかしNBS細胞では照射後のp53誘導量がAT細胞同様に低下している事を既に報告した。今回p53誘導に関連するp21及びMDM2の誘導もNBS細胞で減少している事を確認した。正常細胞では放射線照射によりp53Ser15のリン酸化によりp53の分解が阻害される結果として細胞内p53が増加するとされている。しかしAT細胞ではp53Ser15のリン酸化が起こらないために、放射線照射後に細胞内p53量が増加しないと思われる。そこで我々はNBS細胞の放射線照射後のp53Ser15の抗体を用いてリン酸化能を測定した。正常細胞では放射線照射後1時間からリン酸化が進行するが、AT細胞及びNBS細胞では1時間後のこのリン酸化がみられない。しかし4時間後にはリン酸化が起こるが、これは後期p53誘導に関係するとされるATR(ATM遺伝子ファミリー)の作用によるものと思われる。これらのp53リン酸化と細胞内p53量の増加とは良く一致している。ATの原因遺伝子ATMはキナーゼ活性を有することが知られている。そこでp53のリン酸化がATMによるものであることを確認するためにGST-p53を用いた試験管内リン酸化実験を行った。GST-p53は放射線照射した正常細胞からの抽出液で30分後及び1時間に顕著にリン酸化されるが、ATMが欠損したAT細胞ではこのリン酸化がみられない。一方、NBS細胞では照射前のp53リン酸化のレベルが高いが、放射線照射によってもp53リン酸化のレベルは一定である。この結果はNBS細胞でp53リン酸化のATMキナーゼが正常に作用していないことを示している。

放射線照射によるp53の細胞内誘導はアポトーシスの原因となることが知られている。そこでNBS細胞の放射線照射後の早期アポ

トーススを正常細胞及び AT 細胞に比較した。この結果、NBS 細胞は AT 細胞と同様に照射後のアポトーシスが低下していることが明らかになった。

DNA 修復の開始にあたってヒストンのリモデリングが先行しなければならない。実際、NBS1 フォーカスは放射線照射後 30 分に形成されるのに対して、H2AX リン酸化は数分以内にフォーカスが検出される。ゲノム DNA はヒストン 8 量体 (H2A, H2B, H3, H4 各 2 分子) に巻き付くことで高次の染色体構造を形成しているが、H2A ファミリーの 10-25% をしめる H2AX のリン酸化が染色体リモデリングを開始していると思われる。我々はリン酸化 H2AX の抗体を作製して H2AX リン酸化と DNA 修復の関係について検討した。電離放射線照射やアドリアマイシン、エトポシドなど抗癌剤による DNA 損傷時のフォーカス形成の比較では、DNA 二重鎖切断において効率良く H2AX のリン酸化ならびにフォーカスが形成されることが判明した。また、このリン酸化 H2AX フォーカスは NBS1 フォーカスと共局在しており、放射線誘発の DNA 二重鎖切断部位でヒストンのリモデリングが起こった後に NBS1 蛋白が hMre11/hRad50 を細胞質から同部位にリクルートして来ると思われる。また、リン酸化 H2AX の抗体による免疫沈降物 (IP) に NBS1 蛋白が存在しており、NBS1 は直接ヒストンに結合して DNA 修復を開始させている可能性がある。

#### D. 考察

現在では、DNA 二重鎖切断の再結合に関与する蛋白のほとんどが、テロメア維持にも関わっている事が知られている。このためテロメアからの細胞周期やアポトーシス制御のシグナルも DNA 修復と同一であると思われる。我々の結果は NBS1 はヒストン H2AX リン酸化に Ku と協同して NHEJ あるいは HR のいずれかの DNA 修復系を始働させる重要な機能を示唆している。テロメア延長においてもその開始に機能すると同時に、細胞周期制御やアポトーシスにも関与すると思われる。現在迄の知識から得られる仮説は、NBS1 が 3' 突出型 (G-tail) を作ることによってテロメア末端の T-loop の開閉を行う、あるいはテロメアでの相同組換えを行うことにより末端を安定化するなどがあるが、今後の更なる解明が必要である。

#### E. 結論

1) NBS 細胞では放射線誘発 p53 誘導に異常を示す。これは p53 (ser-15) のリン酸化の低下によるものである。

2) NBS 細胞ではアポトーシス誘導に異常がみられる。

3) リン酸化ヒストン H2AX と NBS1 蛋白フォーカスは共局在する。

4) リン酸化ヒストン H2AX に NBS1 蛋白及び Ku 蛋白が結合する。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Matsuura, S., Ito, E., Tauchi, H., Komatsu, K., Ikeuchi, T., Kajii, T.: Chromosomal instability syndrome of total premature chromatid separation with mosaic variegated aneuploidy is defective in mitotic-spindle checkpoint. (Am. J. Hum. Genet., 67, 483-486, 2000)

2) Tauchi, H., Komatsu, K., Ishizaki, K., Yatagai, F., Kato, T.: Mutation spectrum of MSH3-deficient cells HHUA/chr.2 reflects in vivo activity of the MSH3 gene product in mismatch repair. (Mutat. Res., 447, 155-164, 2000)

3) Ohnishi, T., Komatsu, K., Tauchi, H., Wang, X., Takahashi, A., Ohnishi, K., Shiba, A., Matsumoto, H.: Heat-induced accumulation of p53 and hsp72 is suppressed in lung fibroblasts from SCID mouse. (Int. J. Radiat. Biol., 76, 711-715, 2000)

4) Hama, S., Matsuura, S., Tauchi, H., Sawada, J., Kato, C., Yamasaki, F., Yoshioka, H., Sugiyama, K., Arita, K., Kurisu, K., Kamada, N., Heike, Y., Komatsu, K.: Absence of mutation in the NBS1 gene in B-cell malignant lymphoma patients. (Anticancer Research, 20, 1897-1900, 2000)

5) H. Tauchi, J. Kobayashi, K. Morishima, S. Matsuura, A. Nakamura, T. Shiraishi, E. Ito, D. Masnada, D. Delia, K. Komatsu: The FHA domain of NBS1 is essential for nuclear foci formation after irradiation, but not essential for hRAD50/hMRE11/NBS1 complex DNA Repair activity. (J. Biol. Chem., 276: 12-15, 2001)

6) Ubagai, T., Matsuura, S., Tauchi, H., Itou, K., K. Komatsu: Comparative genomic hybridization analysis suggests a gain of chromosome 7p associated with lymph node metastasis is non small cell lung cancer. (Oncology Reports, 8: 83-88, 2001)

7) Sakata, K., Matsumoto, Y., Tauchi, H., Satoh, M., Oouchi, A., Nagakura, H., Koito, K., Suzuki, N., Komatsu, K., Hareyama, M.: Expression

of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in tumors. (Int.J.Radiat.Oncology,in press,2001)

## 2. 学会発表

1) 田内 広, 白石貴博, 松浦伸也, 澤田純子, 加藤千景, 小松賢志, 笠井(江口)清美, 古澤佳也, 安藤興一: 機能相補性試験による DNA 二重鎖切断修復遺伝子 NBS1 の重要ドメイン解析. 第 41 回原子爆弾後障害研究会, 長崎, 2000, 6 月 4 日

2) 森島賢一, 中村麻子, 岡本 文, 松浦伸也, 田内 広, 小松賢志, 小林純也: DNA 修復欠損ファンコニー貧血細胞のアポトーシス誘発. 第 41 回原子爆弾後障害研究会, 長崎, 2000, 6 月 4 日

3) 松浦伸也, 小松賢志, 伊藤詠美, 田内 広, 池内達郎, 梶井 正: M 期チェックポイント異常を起因とする新しいヒト高発癌性遺伝病. 第 41 回原子爆弾後障害研究会, 長崎, 2000, 6 月 4 日

4) 中村麻子, 田内 広, 松浦伸也, 小林純也, 岡本 文, 小松賢志, 井出利憲: 放射線損傷修復蛋白 NBS1 の発現異常による加齢促進. 第 41 回原子爆弾後障害研究会, 長崎, 2000, 6 月 4 日

5) 小林純也, 谷本啓二, 田内 広, 松浦伸也, 小松賢志: 放射線感受性 NBS 細胞における ATM キナーゼの活性について. 第 41 回原子爆弾後障害研究会, 長崎, 2000, 6 月 4 日

6) 田内 広, 森島賢一, 小林純也, 山下由紀子, 園田英一朗, 高田 穰, 武田俊一, 松浦伸也, 小松賢志: DNA 修復遺伝子 NBS1 ノックアウト DT40 細胞の作成と表現型解析. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000, 12 月 13-16 日

7) 中村麻子, 田内 広, 松浦伸也, 小林純也, 角尾進吾, 袁 勲梅, 石川冬木, 井出利憲, 小松賢志: ナイミーヘン症候群(NBS)細胞におけるテロメア維持機構. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000, 12 月 13-16 日

8) 森島賢一, 松浦伸也, 中村麻子, 白石貴博, 伊藤詠美, 小林純也, 田内 広, 小松賢志: Yeast two-hybrid system を用いた FANCG 結合タンパクのスクリーニング. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000, 12 月 13-16 日

9) 小林純也, 田内 広, 小川 晃, 小林稔子, 松浦伸也, 谷本啓二, 小松賢志: DNA 損傷によるヒストン H2AX フォーカス形成. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000, 12 月 13-16 日

10) 白石貴博, 田内 広, 松浦伸也, 武田俊一, 小松賢志: ニワトリ DT40 hprt-細胞作成とヒト X 染色体ターゲティング. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000, 12 月 13-16 日

11) 伊藤詠美, 松浦伸也, 田内 広, 小松賢志, 池内達郎, 梶井 正: Total premature chromatid separation (total PCS) ホモ接合体 2 症例の Mitotic index を指標にした機能的相補性試験. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000, 12 月 13-16 日

12) 長谷川和正, 田内 広, 小松賢志, 石川冬木: テロメラーゼ非依存性テロメア維持機構 (ALT) における DNA 組み換え関連因子の役割. 第 59 回日本癌学会総会, 横浜, 2000, 10 月 4 日-6 日

13) 田内 広, 小林純也, 中村麻子, 松浦伸也, 小松賢志: 高発癌性遺伝病ナイミーヘン症候群原因タンパク NBS1 による hRAD50/hMRE11 複合体の細胞内局在制御. 第 59 回日本癌学会総会, 横浜, 2000, 10 月 4 日-6 日

14) 中村麻子, 田内 広, 小林純也, 松浦伸也, 井出利憲, 小松賢志: 高発癌性遺伝病ナイミーヘン症候群(NBS)細胞におけるテロメア維持機構の解析. 第 59 回日本癌学会総会, 横浜, 2000, 10 月 4 日-6 日

15) 松浦伸也, 田内 広, 池内達郎, 梶井 正, 小松賢志: 紡錘体チェックポイント異常を原因とする新しい高発癌性遺伝病. 第 59 回日本癌学会総会, 横浜, 2000, 10 月 4 日-6 日

16) 小松賢志: DNA 修復関連遺伝子. 日本放射線影響学会第 43 回大会, 東京都, 2000, 8 月 30-9 月 1 日

17) 小林純也, 田内 広, 小川 晃, 小林稔子, 松浦伸也, 谷本啓二, 小松賢志: NBS1 と ATM の相互作用による放射線誘導細胞応答の制御. 日本放射線影響学会第 43 回大会, 東京都, 2000, 8 月 30-9 月 1 日

18) 田内 広, 森島賢一, 小林純也, 山下由紀子, 園田英一朗, 高田 穰, 武田俊一, 松浦伸也, 小松賢志: DT40 を用いた放射線 DNA 損

傷修復遺伝子 NBS1 ノックアウト細胞の作成とその表現型解析. 日本放射線影響学会第 43 回大会, 東京都, 2000, 8 月 30-9 月 1 日

19) 中村麻子, 田内 広, 松浦伸也, 小林純也, 森島賢一, 白石貴博, 伊藤詠美, 井出利憲, 小松賢志: NBS1 によるテロメア維持機構の解析. 日本放射線影響学会第 43 回大会, 東京都, 2000, 8 月 30-9 月 1 日

20) 白石貴博, 田内 広, 小林純也, 森島賢一, 中村麻子, 松浦伸也, 小松賢志: ナイミーヘン染色体不安定症候群原因タンパク NBS1 による hRAD50/hMRE11 複合体の細胞内局在制御. 日本放射線影響学会第 43 回大会, 東京都, 2000, 8 月 30-9 月 1 日

21) 松浦伸也, 伊藤詠美, 田内 広, 池内達郎, 梶井 正, 小松賢志: M 期チェックポイント異常を原因とする新しいヒト高発癌性染色体不安定症候群. 日本放射線影響学会第 43 回大会, 東京都, 2000, 8 月 30-9 月 1 日

22) 森島賢一, 松浦伸也, 中村麻子, 白石貴博, 伊藤詠美, 小林純也, 田内 広, 小松賢志: Yeast two-hybrid system を用いた FANCG への結合タンパクのスクリーニング. 日本放射線影響学会第 43 回大会, 東京都, 2000, 8 月 30-9 月 1 日

23) 白石貴博, 田内 広, 小林純也, 森島賢一, 中村麻子, 松浦伸也, 小松賢志: MRE11 複合体の細胞内局在を制御する NBS1 機能ドメイン. Workshop on DNA Repair and Mutagenesis 2000, 仙台, 2000, 9 月 12-14 日

24) 中村麻子, 田内 広, 松浦伸也, 小林純也, 角尾進吾, 袁 勳梅, 石川冬木, 井出利憲, 小松賢志: ナイミーヘン症候群におけるテロメア維持機構. Workshop on DNA Repair and Mutagenesis 2000, 仙台, 2000, 9 月 12-14 日

25) 伊藤詠美, 松浦伸也, 田内 広, 小松賢志, 池内達郎, 梶井 正: 染色体分体早期分離および異数化モザイクを特徴とする新規高発癌性遺伝病の不死化細胞株の樹立. Workshop on DNA Repair and Mutagenesis 2000, 仙台, 2000, 9 月 12-14 日

26) 森島賢一, 松浦伸也, 中村麻子, 白石貴博, 伊藤詠美, 小林純也, 田内 広, 小松賢志: Yeast two-hybrid system を用いた FANCG への結合タンパクのスクリーニング. Workshop on DNA Repair and Mutagenesis 2000, 仙台, 2000, 9 月 12-14 日

27) K.Komatsu, H.Tauchi, J.Kobayashi, S.Matsuura: Functions of NBS1 in initial step of DNA repair after irradiation. International Workshop on Radiation Damage 2001: Repair, Mutagenesis and Visualization, 東京都, 2001, 3 月 14-16 日

28) A.Nakamura, H.Tauchi, S.Matsuura, J.Kobayashi, S.Kakuo, X.Yuan, F.Ishikawa, T.Ide, K.Komatsu: Abnormal telomere shortening by disruption of repair protein NBS1. 第 1 回文部省特定領域研究「がん」6 領域若手研究者ワークショップ, 静岡, 2000, 8 月 31 日-9 月 3 日

29) 中村麻子, 田内 広, 松浦伸也, 小林純也, 角尾進吾, 袁 勳梅, 石川冬木, 井出利憲, 小松賢志: ナイミーヘン染色体不安定症候群 (NBS) 細胞におけるテロメア維持機構. 日本人類遺伝学会第 45 回大会, 福岡, 10 月 25-27 日, 2000

30) 松浦伸也, 伊藤詠美, 田内 広, 小松賢志, 池内達郎, 梶井 正: Total premature chromatid separation (total PCS) ホモ接合体の不死化線維芽細胞株の樹立. 日本人類遺伝学会第 45 回大会, 福岡, 10 月 25-27 日, 2000

G. 知的所有権の取得状況  
該当なし

分担研究報告書

テロメア長の測定に関する研究

分担研究者 田原栄俊 広島大学医学部総合薬学科 助手

**研究要旨** テロメア長を定量的に測定するために HPA (Hybridization Protection Assay) 法を開発した。従来のサザン法に比較して高感度、定量的、迅速、簡便な操作でテロメア長を測定できることが明らかとなった。HPA 法を用いて早老性疾患ウエルナー患者細胞を解析した結果、正常細胞と比較してウエルナー細胞のテロメア長に特異な変化は検出されなかった。

A. 研究目的

染色体不安定症候群の細胞老化機構を明らかにするために様々な早老症患者におけるテロメア長の測定を行い染色体不安定症候群におけるテロメアの役割を明らかにすることを本研究の分担研究目的とする。

B. 研究方法

1. DNA の精製

Mag Genome extractor kit を用いて DNA を精製した。単離した DNA は電気泳動によって高分子の DNA が精製されていることを確認した。

2. テロメア長の測定

ヒト組織のテロメア長を測定するため、高感度、定量的、迅速、簡便な HPA 法を開発し用いた。さらに、テロメア長をサザン解析を用いて測定する場合、従来のアイソトープを用いる方法を改良し非アイソトープの方法の一つ DIG ラベルしたプローブを用いて検出した。

3. テロメラーゼ活性の測定

TRAP 法を用いて検出した。検出は、サイバーゴールド好感度核酸検出試薬で染色して検出した。

C. 研究結果

C-1: 定量的テロメア長測定法の開発

1) ヒト組織のテロメア長を測定するため、高感度、定量的、迅速、簡便な HPA 法を開発を行った。

2) 癌においてはテロメア長が短い場合が多いが、長い場合もあり、むしろ癌によって非常に大きな変動を示すことが分かった。

3) 癌のテロメア長は TRAP 法によってテロメラーゼを増幅し TRAP-HPA 法によってそれらを定量した結果テロメラーゼ活性の強さ

とは相関せず、テロメア長をきめる別の因子の関与が考えられた。

C-2: 遺伝的早老症患者におけるテロメア長の測定と hTERT 遺伝子導入の効果 ヒト体細胞における有限分裂寿命の原因であるテロメア短縮が、増殖能力低下と遺伝子発現変化をどのように起こすのか、それがヒトの老化とどう関わるかについて解析した。また、テロメア維持・細胞不死化に関わるウエルナー遺伝子の役割に関し、健常人の B リンパ球は EBV ウイルスを感染させると、一部の細胞は強いテロメラーゼ活性を発現して不死化するが、ウエルナー患者の B リンパ球はまったく不死化しないことが明らかになった。健常人の線維芽細胞は、hTERT 遺伝子、SV40T 抗原遺伝子の両遺伝子を導入すれば不死化することがわかっているが、ウエルナー患者の線維芽細胞からも両遺伝子の導入によって不死化した。不死化に伴う染色体の不安定性の回避は、現在調べている限り起こっていなかった。

D. 考察

テロメア長の測定は、一般的にサザン解析によって行い、その結果をデンストメーターなどによって定量するのが一般的であるが、癌度がブロードになるうえ誤差も大きい。しかし、本研究で開発した方法を用いると、比較的誤差が少なく簡便にテロメア長を測定できることがわかった。本法は、本研究のみならずたのテロメアの研究にも非常に有用であると考えられる。

ウエルナー患者におけるテロメアの長さや染色体の不安定性については優位な相関性が見いだせなかった。hTERT 遺伝子導入による不死化の試みにおいても他の細胞よりも不死



化しやすく染色体も不安定であるというという結果は見いだせなかった。つまり、早老症患者においては、テロメアの不安定による物ではなく別の因子によって起こっていることが示唆された。

#### E. 結論

早老症患者における染色体の不安定性は、テロメアの短縮とは independent に起こっていることが示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Fujimoto, J., Yasui, W., Tahara, H., Tahara, E., Kudo, Y., and Yokozaki, H. DNA hypermethylation at the pS2 promoter region is associated with early stage of stomach carcinogenesis, *Cancer Lett.* 149: 125-34, 2000.
- 2) Harada, K., Arita, K., Kurisu, K., and Tahara, H. Telomerase activity and the expression of telomerase components in pituitary adenoma with malignant transformation, *Surg. Neurol.* 53: 267-74, 2000.
- 3) Harada, K., Kurisu, K., Sadatomo, T., Tahara, H., Tahara, E., and Ide, T. Growth inhibition of human glioma cells by transfection-induced P21 and its effects on telomerase activity, *J. Neurooncol.* 47: 39-46, 2000.
- 4) Harada, K., Kurisu, K., Tahara, H., Tahara, E., and Ide, T. Telomerase activity in primary and secondary glioblastomas multiforme as a novel molecular tumor marker, *J. Neurosurg.* 93: 618-25, 2000.
- 5) Kawakami, Y., Kitamoto, M., Nakanishi, T., Yasui, W., Tahara, E., Nakayama, J., Ishikawa, F., Tahara, H., Ide, T., and Kajiyama, G. Immuno-histochemical detection of human telomerase reverse transcriptase in human liver tissues, *Oncogene* 19: 3888-93, 2000.
- 6) Takahashi, S., Kitamoto, M., Takaishi, H., Aikata, H., Kawakami, Y., Nakanishi, T., Shimamoto, F., Tahara, E., Tahara, H., Ide, T., and Kajiyama, G. Expression of telomerase component genes in hepatocellular carcinomas, *Eur. J. Cancer* 36: 496-502, 2000.
- 7) Yokozaki, H., Tahara, H., Oue, N., and Tahara, E. Cloning of a human hepatocyte growth factor/scatter factor transcription variant from a gastric cancer cell line HSC-39, *Int. J. Oncol.* 16: 105-8, 2000.

##### 2. 学会発表

- 1) 第 59 回日本癌学会、横浜、10 月 3-6 日、2000 年

2) Symposium on Stress Sciences in Nagasaki, Aging and Carcinogenesis Nov. 14-15, 2000

3) 第 23 回日本分子生物学会、神戸、12 月 13-16, 2000 年

#### G. 知的所有権の取得状況

該当なし

200000229A

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、下記の「研究成果の刊行に関する一覧」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧」

**Isolation of a cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene.**

de Winter JP, Léveillé F, van Berkel CG, Rooimans MA, van Der Weel L, Steltenpool J, Demuth I, Morgan NV, Alon N, Bosnoyan-Collins L, Lightfoot J, Leegwater PA, Waisfisz Q, Komatsu K, Arwert F, Pronk JC, Mathew CG, Digweed M, Buchwald M, Joenje H.

American journal of human genetics. 2000 Nov;67(5):1306-8.

**Chromosomal instability syndrome of total premature chromatid separation with mosaic variegated aneuploidy is defective in mitotic-spindle checkpoint.**

Matsuura S, Ito E, Tauchi H, Komatsu K, Ikeuchi T, Kajii T.

American journal of human genetics. 2000 Aug;67(2):483-6.

**Mutation spectrum of MSH3-deficient HHUA/chr.2 cells reflects in vivo activity of the MSH3 gene product in mismatch repair.**

Tauchi H, Komatsu K, Ishizaki K, Yatagai F, Kato T.

Mutation research. 2000 Feb 14;447(2):155-64.

**Brief communication: heat-induced accumulation of p53 and hsp72 is suppressed in lung fibroblasts from the SCID mouse.**

Ohnishi T, Komatsu K, Tauchi H, Wang X, Takahashi A, Ohnishi K, Shiba A, Matsumoto H.

International journal of radiation biology. 2000 May;76(5):711-5.

200000229A

**Absence of mutations in the NBS1 gene in B-cell malignant lymphoma patients.**

Hama S, Matsuura S, Tauchi H, Sawada J, Kato C, Yamasaki F, Yoshioka H, Sugiyama K, Arita K, Kurisu K, Kamada N, Heike Y, Komatsu K.  
Anticancer research. 2000 May-Jun;20(3B):1897-900.

**Nijmegen breakage syndrome. The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group.**

[No authors listed]

Archives of disease in childhood. 2000 May;82(5):400-6.

**Japanese family with an autosomal dominant chromosome instability syndrome: a new neurodegenerative disease?**

Ishikawa S, Ishikawa M, Tokuda T, Yoshida K, Wakui K, Matsuura S, Ohara S, Sekijima Y, Hidaka E, Fukushima Y, Shigeta H, Komatsu K, Ikeda S.

American journal of medical genetics. 2000 Oct 2;94(4):265-70.

**The forkhead-associated domain of NBS1 is essential for nuclear foci formation after irradiation but not essential for hRAD50[hMRE11]NBS1 complex DNA repair activity.**

Tauchi H, Kobayashi J, Morishima K, Matsuura S, Nakamura A, Shiraishi T, Ito E, Masnada D, Delia D, Komatsu K.

The Journal of biological chemistry. 2001 Jan 5;276(1):12-5.

**Comparative genomic hybridization analysis suggests a gain of chromosome 7p associated with lymph node metastasis in non-small cell lung cancer.**

Ubagai T, Matsuura S, Tauchi H, Ito K, Komatsu K.

Oncology reports. 2001 Jan-Feb;8(1):83-8.

200000229A

**DNA hypermethylation at the pS2 promoter region is associated with early stage of stomach carcinogenesis.**

Fujimoto J, Yasui W, Tahara H, Tahara E, Kudo Y, Yokozaki H, Tahara E.  
Cancer letters. 2000 Feb 28;149(1-2):125-34.

**Immuno-histochemical detection of human telomerase reverse transcriptase in human liver tissues.**

Kawakami Y, Kitamoto M, Nakanishi T, Yasui W, Tahara E, Nakayama J, Ishikawa F, Tahara H, Ide T, Kajiyama G.  
Oncogene. 2000 Aug 10;19(34):3888-93.

**Expression of telomerase component genes in hepatocellular carcinomas.**

Takahashi S, Kitamoto M, Takaishi H, Aikata H, Kawakami Y, Nakanishi T, Shimamoto F, Tahara E, Tahara H, Ide T, Kajiyama G.  
European journal of cancer. 2000 Mar;36(4):496-502.

**Cloning of a human hepatocyte growth factor/scatter factor transcription variant from a gastric cancer cell line HSC-39.**

Yokozaki H, Tahara H, Oue N, Tahara E.  
International journal of oncology. 2000 Jan;16(1):105-8.