

200/0227

厚生科学研究費補助金 長寿科学総合研究事業

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13年度 総括研究報告書

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)

平成14(2002)年3月

目 次

I. 総括研究報告

染色体不安定症候群の細胞老化機構に関する研究…………… 1

小 松 賢 志

II. 分担研究報告

1. ファンコニー貧血患者の加齢とノックアウトマウス…………… 9
作製に関する研究

松 浦 伸 也

2. テロメア長の測定に関する研究…………… 1 5

田 原 栄 俊

III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 1 7

IV. 研究成果の刊行物・別刷…………… 1 8

総括研究報告書

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 本研究ではナイミーヘン症候群(NBS)、毛細血管拡張性運動失調症(AT)及びファンコニー貧血(FA)の細胞老化機構を染色体末端のテロメア維持の視点から解析した。NBS患者皮膚線維芽細胞は細胞分裂によりテロメアが異常に短縮するが、原因遺伝子NBS1の発現により回復する。しかし、AT細胞では、原因遺伝子ATMの強制発現によってもテロメア長が延長しないことから両遺伝子の機能が別経路で作用していると思われる。この事はAT細胞でもNBS1蛋白がテロメア蛋白TRF1と結合することにより確認された。DNA修復ではATMがヒストンH2AXをリン酸化して損傷部位に修復蛋白をリクルートするが、細胞内での位置が特定されているテロメアではその必要性がないことに両者の違いが原因すると思われる。またこの他にNBS1の作用はChk2リン酸化などにより細胞周期チェックポイントでの機能も確認された。我々はAT同様にFAが放射線感受性であることを示して、NBS1と同経路でテロメア維持に関与しているのか作製したノックアウト細胞を用いて解析中である。

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
田原栄俊
広島大学医学部総合薬学科
助手

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 蛋白によるテロメア延長機構：約 5kb の短いテロメアを維持していた NBS 樹立細胞が NBS1cDNA 導入後にテロメアが延長することが前年度に示されたのでその延長機構を明らかにする。テロメア複製期の NBS1 と TRF2 の相互作用を CHIP 法で確認後、NBS1 リン酸化と hTERT など関連蛋白との相互作用、免疫染色による共局在そして G-tail やテロメア長を指標とした deletion mutant 実験によりテロメア蛋白の作用機序を解析する。一方、テロメア延長機構は DNA 修復経路の ATM/NBS1/hMre11/Ku70 と極めて類似している事が知られている。この DNA 修復経路ではヒストン H2AX リン酸化などヒストンとの相互作用を中心に進行することから、リン酸化 H2AX 抗体との免疫共沈法による新規スクリーニング蛋白の機能解

析により NBS1 のテロメア複製に於ける詳細な制御過程を明らかにする。(ロ) 前年度に FA ノックアウトマウス作製を計画していた遺伝子よりも、FA-D2 群遺伝子が機能的に本質的であることが他研究者により学会報告された。このため前年度は計画を変更して既に準備が出来ていた Nbs1 ノックアウトマウス作製を優先させた。この結果、Nbs1 ヘテロマウスのうち極端に Nbs1 蛋白量が低下した個体では、放射線照射により高度の体毛白化などの早期老化が示された。今後はこのマウス個体の組織病理学的所見などの検討、染色体異常などのゲノム不安定性とテロメア長を指標とした細胞老化の因果関係について解析する。また、前年度同様の方法で FA-D2 群遺伝子 FANCD2 の機能的ドメインである 561K のコビキチン化領域をターゲティングしたマウスを作製する。(ハ) FA-E 患者ならびに家族(ヘテロ保因者)のリンパ球に於ける年齢とテロメア長、そしてこれらの初代培養繊維芽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、テロメア FISH のシグナル強度の3種類の高精度計測により分裂毎のテロメア長の減少を正常細胞の 150pb/分裂と定量比較する。また S1 ヌクレアーゼによる G-tail 長の測定や hMre11 蛋白結合能の定量などによりテロメア異常短縮の原因を解明する。

(倫理面の配慮)

本研究は既採取の NBS 細胞と FA 細胞及び今後採取が予定されている FA 患者家族細胞などヒト由来細胞を扱う事から、厚生省研究班の「遺伝子解析による疾病対策・創薬等に関する研究における生命倫理に関する調査研究」の中間報告書(平成12年2月4日)に準拠して行う。ただし、当研究所でも倫理審査委員会の準備委員会が設置されたので、暫定的に研究所長による研究計画書の審査を受け、倫理審査委員会稼働後にあらためてその審査を受ける。また、具体的には研究責任者の小松と臨床遺伝学指導医でもある松浦の両名により患者家族のインフォームド・コンセント、身体的安全性、プライバシー保護など人権擁護の徹底を図る。

C. 研究結果

NBS1 蛋白機能を解析するために欠失蛋白を用いた Deletion mutation 実験、および前年度に続いて NBS1 のシグナル伝達における機能解析を計画した。その結果、放射線照射後に正常細胞でみられる Chk2 リン酸化に NBS 細胞は異常があることが示された。正常細胞で照射 0.5 時間後にみられるリン酸化によるバンドシフトが、NBS 細胞では AT 細胞と同様に変化がみられない。しかし、AT 細胞と異なって 3 時間後にはリン酸化によるバンドシフトが開始されることから Chk2 リン酸化の異常の程度は部分的である。NBS1 遺伝子の導入により NBS 細胞のリン酸化異常が正常レベルまで回復する事から NBS1 遺伝子が Chk2 リン酸化には必要であることは確実である。また、ATM/ATR によりリン酸化される NBS1 蛋白のセリン 343 をアラニンに変えた変異体ではリン酸化が低下する事から、Chk2 リン酸化には放射線照射後の ATM/ATR キナーゼ活性が関与している事が示唆された。Chk2 リン酸化の低下と一致して NBS 細胞は放射線照射後の G2/M チェックポイントにも異常を示す。すなわち、G2 期で照射された正常細胞は分裂指数が急速に低下するが、NBS 細胞では照射によっても少なくとも 1 時間は分裂を続ける最終的には正常細胞と同様に分裂停止に到る点は Chk2 リン酸化の異常が部分的であると同じである (Mol. Cell. Biol., 2001)。一方、NBS1 蛋白の N 末側には真核生物に共通する領域 FHA/BRCT ドメインが知られていたが、我々はチキンや酵母遺伝子との比較により C 末側に新規の保存された 10 アミノ酸から構成される領域があることを発見した。酵母 Two hybrid 実験によりこの領域は hMre11 結合に必要なドメインであることが示された。続いて、NBS1 蛋白の N 末側および C 末側の欠失した蛋白を NBS 細胞に発現させてその細胞性質の回復を比較した結果、C 末側がコロニー法で比較した細胞の放射線致死感受性の回復や Chk2 リン酸化の回復に必須であることが示された。しかし、N 末側の保存領域 (FHA/BRCT ドメイン) は必ずしも必要がないことが明らかになった。しかし、NBS1 蛋白の重要機能と思われる放射線照射後の

NBS1 フォーカス形成には C 末側と共に N 末側も必要であることが示された (J. Biol. Chem., 2001)。FHA/BRCT ドメインは DNA 修復やチェックポイント蛋白に普遍的に存在する事から、何らかの重要機能が予想される。そこで、NBS 細胞にこれらの欠失蛋白を発現させて放射線照射後の二動原体やリング、染色体末端結合などの染色体異常を比較した。その結果、予備的なデータではあるが N 末側は染色体異常の抑制に重要であることが示された。

DNA 修復の開始に先立って、クロマチンのリモデリングが必要であることが予想される。そこでヒストンの構成成分の 1 つである H2AX の照射によるリン酸化を我々が作製したリン酸化特異抗体を用いて検討した。その結果、ウエスタン法による解析で H2AX のリン酸化が照射が数分で起こり、照射細胞の核にフォーカスが形成されることが示された。このフォーカスの形成は照射後約 30 分にみられる NBS フォーカス形成よりも早い事、そして NBS 細胞でも H2AX のリン酸化ならびにフォーカス形成が観測されることから、NBS1 による DNA 修復が開始される初期に H2AX が放射線センサーによりシグナルを受けていると思われる。DNA 二重鎖切断のシグナル伝達に関与するキナーゼとして現在までに ATM、ATR そして DNA-PK が報告されている。そこで AT 細胞及び DNA-PK が欠損している scid 細胞を用いて、H2AX のリン酸化ならびにフォーカス形成を検討した。この結果、scid 細胞では H2AX のリン酸化ならびにフォーカス形成が正常であるが、AT ではリン酸化及びフォーカス形成が遅れる傾向にあることが示された。恐らく AT 機能をバックアップする蛋白が存在するが、放射線照射後のリモデリングに ATM が関与していると思われる。

続いて、NBS1 遺伝子のターゲッティングをマウスならびにチキン B 細胞由来の DT40 細胞を用いて行った。初めに、我々がクローニングに成功したチキン NBS1 遺伝子のエキソン 2 以降が欠失したターゲッティングを DT40 細胞で行った。その結果、ターゲッティングされたチキン NBS 細胞はヒト NBS 細胞と同程度の放射線感受性および染色体異常の誘発を示した。この細胞

の相同組み換え能をアッセイするために、neo 遺伝子がタンデムに接続した SCneo レポータープラスミドを導入した。チキン NBS 細胞が制限酵素 I-SceI により DNA 二重鎖切断が発生したときに正常に相同組み換えが起これば neo 遺伝子が発現して G418 抵抗性になる実験系である。アッセイの結果、チキン NBS 細胞相同組み換え能は正常細胞の約 1/100 程度にまで低下していることが明らかになった。これと一致して相同組み換えによると思われるマイトマイシン C による姉妹染色体交換も同時に低下した。NBS1 遺伝子を発現させたチキン NBS 細胞では放射線感受性も相同組み換えも回復することから、NBS 細胞の放射線感受性は相同組み換えの低下によることが明らかとなった。一方、組換えを起こした SCneo レポータープラスミドをサザン法により解析した結果、NBS 細胞でも相同染色体のクロスオーバーが起こっていることから、NBS1 の機能は相同組換えの初期と共に中間でも作用する可能性が示唆された。続いて、マウス Nbs1 遺伝子のエキソン 4 以降をターゲットングしたマウスを二種類作製した。一種類のノックアウトマウスでは体制 8.5 日で致死になるが細胞株が樹立可能であった。これに対して、Cre-Lox により選択マーカーの neo 遺伝子を除いたノックアウトマウスでは胎生 3.5 日で致死になり、細胞株化も不可能であった。正確な原因は現在解析中であるが、NBS1 の C 末側蛋白の発現が関係していると思われる。一方、正常細胞が極一部存在するキメラマウスが偶発的に発生した。このマウスは免疫グロブリンの低下や性腺低形成などヒト NBS 患者の臨床症状を呈すると共に、放射線照射後に体毛が早期に白色化して正常マウスと比較して老化傾向を示した。また、このマウスから樹立した NBS マウス細胞はヒトマウス細胞と同程度の放射線感受性を示した(日本癌学会総会シンポジウム,2001 年発表)。このため、テロメア結合蛋白 TRF2 と NBS1 との相互作用を解析した。免疫共沈法及び細胞のフォーカス形成による共局在は NBS1 と TRF2 は S 期初期の相互作用が正常細胞並びに AT 細胞で示された。NBS 細胞ではテロメア G-tail が短い事から、NBS1 と TRF2

が G-tail テロメア安定に機能していると思われる。

D. 考察

NBS1 のリン酸化及びフォーカス形成は放射線照射後 20-60 分に起こる生物現象である。その初期過程あるいは引き続いて起こる現象は不明であったが、今回の我々の実験結果はこれらの問題に対する解答を示唆するものであった。すなわち、ヒストン H2AX のリン酸化は照射数分後に起こり、また細胞核内の NBS1 と同位置にフォーカスを形成する事から NBS1 の初期に作用していると考えられる。また H2AX のリン酸化のキナーゼ候補としては ATM があげられる。そうすると現在の所、ATM が放射線の初期センサーである可能性が高いが、結論にはさらに解析が必要である。一方、Chk2 は ATM によりリン酸化を受けるが、同様に ATM の下流にある NBS1 が何故に Chk2 リン酸化に関与するかは不明である。このため D.Chen (Berkley) 等が示唆しているように ATM のキナーゼ活性が NBS1 などとの結合により活性化する機構は魅力的である。NBS1 の下流に相同組換えがある事を、我々は初めて高等真核生物で示した。この事は NBS 細胞で DNA 二重鎖切断の再結合が正常である事と一致しており、今後の NBS 病態発現を解析する上で有力な知見である。

E. 結論

高発がん性遺伝病のナイミーヘン症候群(NBS)の原因遺伝子 NBS1 は N 末側と C 末側に酵母から保存された塩基配列の領域を有する。これらの領域の機能を欠失蛋白質を用いて検討した結果、C 末側の hMre11-binding 領域は NBS 細胞の放射線感受性や染色体不安定性、細胞周期チェックポイントの回復に必須である。これに対して、N 末側の HHA/BRCT 領域は放射線感受性やチェックポイントには必ずしも必要でないが、その欠失蛋白質では染色体不安定性の回復ならびに損傷 DNA 部位での NBS1 フォーカス形成が見られなかった。DNA 修復蛋白に多く存在する FHA/BRCT ドメインの正確な機能は未だ不明であるが、我々の結果はこのドメインが DNA 修

復過程でのゲノム不安定性に関連することを示した。一方、NBS1 遺伝子のターゲッティング実験を行った結果、チキン DT40 細胞では NBS1 が相同組み換えに重要であることや、遺伝子改変マウスでは NBS1 が個体レベルの老化への関与を示す実験結果が得られた。このことは NBS1 がテロメアーで TRF2 と共局在することと一致する。また AT 細胞でも NBS1 と TRF2 の相互作用がみられることから NBS1 と ATM のテロメアー維持機構が異なると思われる。一方、我々が作製したチキンファンコニー細胞は放射線損傷の修復に関与することが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) G.Buscemi, C.Savio, L.Zannini, F.Micciche, D.Masnada, M.Nakanishi, H.Tauchi, K.Komatsu, S.Mizutani, K.Khanna, P.Chen, P.Concannon, L.Chessa, D.Delia: Chk2 activation dependence on Nbs1 after DNA damage. (*Mol.Cell.Biol.*, 21:5214-5222, 2001)
- 2) T.Ubagai, S.Matsuura, H.Tauchi, K.Itou, K.Komatsu: Comparative genomic hybridization analysis suggests a gain of chromosome 7p associated with lymph node metastasis in non-small cell lung cancer. (*Oncology Reports*, 8:83-88, 2001)
- 3) H.Tauchi, J.Kobayashi, K.Morishima, S.Matsuura, A.Nakamura, T.Shiraishi, E.Ito, D.Masnada, D.Delia, K.Komatsu: 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. (*J.Biol.Chem.*, 276:12-15, 2001)
- 4) K.Sakata, Y.Matsumoto, H.Tauchi, M.Satoh, A.Oouchi, H.Nagakura, K.Koito, N.Suzuki, K.Komatsu, M.Hareyama: Expression of Genes involved in Repair of DNA Double-strand Breaks in Tumors. (*Int.J.Radiat.Oncology*, 49:161-167, 2001)

5) K.Kato, S.Antoku, K.Kodama, S.Kawamura, Y.Fujita, K.Komatsu, A.A.Awa: Organ doses from radiation therapy in atomic bomb survivors., *Radiat.Res.*, 155:785-795, 2001

6) H.Tauchi, J.Kobayashi, K.Morishima, D.C.van Gent, T.Shiraishi, N.S.Verkaik, D.van Heemst, E.Ito, A.Nakamura, E.Sonoda, M.Takeda, S.Takeda, S.Matsuura, K.Komatsu: Nbs1 is essential for DNA repair via homologous recombination in higher vertebrate cells. (投稿中)

7) S.Matsuura, K.Ichikawa, E.Ito, J.Kobayashi, A.Nakamura, H.Tauchi, H.Watanabe, A.Kimura, T.Noda, K.Komatsu: C-terminus Nbs1 protein confers cellular viability in mouse Nbs1-null mutant. (投稿中)

8) J.Kobayashi, H.Tauchi, T.Kobayashi, K.Morishima, T.Shiraishi, E.Ito, A.Nakamura, S.Matsuura, K.Tanimoto, K.Komatsu: Histone H2AX regulates the focus formation of NBS1/hMRE11/hRAD50 complex after DNA damage. (投稿中)

9) 中村麻子, 小松賢志: ナイミーヘン症候群における二本鎖 DNA 切断修復の異常. (蛋白質 核酸 酵素, 46:1038-1045, 2001)

10) 白石貴博, 小松賢志: ファンコニー貧血 (遺伝子医学, 印刷中)

2. 学会発表

- 1) A.Nakamura, H.Tauchi, S.Matsuura, J.Kobayashi, T.Ide, K.Komatsu: Association of NBS1 with Telomere replication. The 2001 meeting on Telomeres & Telomerase, Cold Spring Harbor, New York, USA, 2001, March 28-April 1.
- 2) 森島賢一, 岡本文, 中村麻子, 篠原美紀, 松浦伸也, 小松賢志: ファンコニー貧血の放射線感受性への関与. 第 42 回原子爆弾後障害研究会, 広島, 2001, 6 月 10 日.

- 3) 伊藤詠美, 松浦伸也, 小松賢志, 田内 広, 池内達郎, 梶井 正: M 期チェックポイント異常を特徴とする高発癌性遺伝病 2 症例の、機能的相補性試験. 第 42 回原子爆弾後障害研究会, 広島, 2001, 6 月 10 日.
- 4) 小林純也, 田内 広, 松浦伸也, 谷本啓二, 小松賢志: 放射線誘発 DNA 損傷におけるヒストン H2AX フォーカスの形成. 第 42 回原子爆弾後障害研究会, 広島, 2001, 6 月 10 日.
- 5) 白石貴博, 田内 広, 篠原美紀, 松浦伸也, 小松賢志: 突然変異高感度検出系を用いた逆線量率効果の解析. 第 42 回原子爆弾後障害研究会, 広島, 2001, 6 月 10 日.
- 6) 荘司俊益, 小松賢志, 渡辺敦光: Scid マウス胎仔の放射線による内臓奇形発生感受性. 第 42 回原子爆弾後障害研究会, 広島, 2001, 6 月 10 日.
- 7) 白石貴博, 田内 広, 篠原美紀, 松浦伸也, 小松賢志: (ハムスター×ヒト X 染色体) 突然変異高感度検出系を用いた逆線量率効果及びバイスタンダー効果の解析. 第 26 回中国地区放射線影響研究会, 広島, 2001, 7 月 27 日.
- 8) 森島賢一, 岡本 文, 白石貴博, 中村麻子, 篠原美紀, 松浦伸也, 小松賢志: ファンコニー貧血細胞の放射線感受性. 第 26 回中国地区放射線影響研究会, 広島, 2001, 7 月 27 日.
- 9) 中村麻子, 岡本 文, 森島賢一, 篠原美紀, 松浦伸也, 小松賢志: DNA 修復欠損遺伝病ファンコニー貧血日本人患者の遺伝的相補性群. 第 26 回中国地区放射線影響研究会, 広島, 2001, 7 月 27 日.
- 10) 伊藤詠美, 松浦伸也, 市川幸司, 中村麻子, 小林純也, 篠原美紀, 田内 広, 木村昭郎, 渡辺敦光, 野田哲生, 小松賢志: 遺伝子標的法を用いたナイミーヘン症候群遺伝子欠損マウス細胞の樹立. 第 26 回中国地区放射線影響研究会, 広島, 2001, 7 月 27 日.
- 11) 中村麻子, 田内 広, 小林純也, 篠原美紀, 松浦伸也, 井出利憲, 小松賢志: 高発ガン性症候群遺伝子 NBS1 のテロメア維持機構. 第 60 回日本癌学会総会, 横浜, 2001, 9 月 26-28 日.
- 12) 松浦伸也, 市川幸司, 伊藤詠美, 中村麻子, 小林純也, 田内 広, 木村昭郎, 渡辺敦光, 野田哲生, 小松賢志: ジーンターゲットングによるナイミーヘン症候群遺伝子 Nbs1 の機能解析. 第 60 回日本癌学会総会, 横浜, 2001, 9 月 26-28 日.
- 13) 伊藤詠美, 松浦伸也, 小松賢志, 田内 広, 池内達郎, 梶井 正: Total PCS を示す染色体不安定症候群における G1 期アポトーシスの異常. 第 60 回日本癌学会総会, 横浜, 2001, 9 月 26-28 日.
- 14) 田内 広, 小林純也, 松浦伸也, 武田俊一, 小松賢志: 高発がん性遺伝病原因遺伝子 NBS1 は相同組換え修復に必須である. 第 60 回日本癌学会総会, 横浜, 2001, 9 月 26-28 日.
- 15) 池内達郎, 楊 増全, 山本興太郎, 松浦伸也, 小松賢志, 梶井 正: 高発がん性の total PCS 遺伝形質に伴って出現する異数性細胞の解析. 第 60 回日本癌学会総会, 横浜, 2001, 9 月 26-28 日.
- 16) 山崎文之, 濱 聖司, 吉岡宏幸, 梶原佳則, 岡村達憲, 杉山一彦, 有田和徳, 栗栖 薫, 佐伯康之, 木平健治, 松浦伸也, 小松賢志: アデノウイルスベクターを用いた p16 遺伝子発現の、抗がん剤感受性に及ぼす影響についての検討. 第 60 回日本癌学会総会, 横浜, 2001, 9 月 26-28 日.
- 17) 小松賢志, 田内 広, 小林純也, 中村麻子, 篠原美紀, 野田哲生, 松浦伸也: 高発がん性遺伝病ナイミーヘン症候群. 第 60 回日本癌学会総会, 横浜, 2001, 9 月 26-28 日.

- 18) 中村麻子, 田内 広, 小林純也, 篠原美紀, 松浦伸也, 井出利憲, 小松賢志: ナイミーヘン症候群遺伝子 NBS 1 のテロメア維持機構. 日本人類遺伝学会 第 46 回大会, 埼玉, 2001, 10 月 3-5 日.
- 19) 松浦伸也, 伊藤詠美, 市川幸司, 中村麻子, 小林純也, 篠原美紀, 田内 広, 木村昭郎, 渡辺敦光, 野田哲生, 小松賢志: 遺伝子標的法を用いた Nbs1 遺伝子機能解析. 日本人類遺伝学会 第 46 回大会, 埼玉, 2001, 10 月 3-5 日.
- 20) 池内達郎, 菅原聡子, 楊 増全, 松浦伸也, 小松賢志, 山本興太郎, 梶井 正: Total PCS (premature chromatid separation) 遺伝形質に伴って産生される異数性細胞の解析. 日本人類遺伝学会 第 46 回大会, 埼玉, 2001, 10 月 3-5 日.
- 21) 白石貴博, 田内 広, 篠原美紀, 松浦伸也, 小松賢志: (ハムスター×ヒト X 染色体) 高感度突然変異検出系による bystander effect の予備的解析. 第 44 回日本放射線影響学会, 大阪, 2001, 10 月 29-31 日.
- 22) 田内 広, 白石貴博, 森島賢一, 松浦伸也, 一政満子, 一政祐輔, 小松賢志: 突然変異高感度検出系によるトリチウムβ線の低線量率効果の解析. 第 44 回日本放射線影響学会, 大阪, 2001, 10 月 29-31 日.
- 23) 小林純也, 田内 広, 篠原美紀, 松浦伸也, 谷本啓二, 小松賢志: DNA 二重鎖切断修復の初期過程における NBS1 とヒストン H2AX の機能. 第 44 回日本放射線影響学会, 大阪, 2001, 10 月 29-31 日.
- 24) 田内 広, 白石貴博, 笠井(江口)清美, 古澤佳也, 安藤興一, 松浦伸也, 小松賢志, 一政祐輔: 突然変異および細胞癌化における高 LET 放射線の逆線量率効果. 第 44 回日本放射線影響学会, 大阪, 2001, 10 月 29-31 日.
- 25) 中村麻子, 田内 広, 小林純也, 篠原美紀, 松浦伸也, 井出利憲, 小松賢志: 放射線感受性蛋白 NBS1 のテロメア維持機能. 第 44 回日本放射線影響学会, 大阪, 2001, 10 月 29-31 日.
- 26) 荘司俊益, 小松賢志, 渡辺敦光: Scid マウス胎仔の ^{60}Co γ 線による内臓奇形発生感受性. 第 44 回日本放射線影響学会, 大阪, 2001, 10 月 29-31 日.
- 27) 森島賢一, 岡本 文, 白石貴博, 中村麻子, 篠原美紀, 松浦伸也, 小松賢志: ファンユニー貧血細胞の放射線感受性. 第 44 回日本放射線影響学会, 大阪, 2001, 10 月 29-31 日.
- 28) 松浦伸也, 伊藤詠美, 市川幸司, 中村麻子, 小林純也, 田内 広, 木村昭郎, 渡辺敦光, 小松賢志: ジーンターゲティング法によるマウス Nbs1 遺伝子ノックアウト細胞株の樹立. 第 44 回日本放射線影響学会, 大阪, 2001, 10 月 29-31 日.
- 29) 伊藤詠美, 松浦伸也, 篠原美紀, 小松賢志, 田内 広, 池内達郎, 梶井 正: Total PCS を示す染色体不安定症候群 2 症例の機能的相補性試験. 第 44 回日本放射線影響学会, 大阪, 2001, 10 月 29-31 日.
- 30) E.Ito, S.Matsuura, M.Shinohara, K.Komatsu, H.Tauchi, T.Ikeuchi, T.Kajii: Complementation studies of immortalized cell lines from infants with total PCS. 3R Symposium, Hyogo, 2001, November 6-9.
- 31) A.Nakamura, H.Tauchi, S.Matsuura, J.Kobayashi, T.Ide, K.Komatsu: Association of NBS1 with telomere replication. 3R Symposium, Hyogo, 2001, November 6-9.
- 32) 中村麻子, 田内 広, 小林純也, 篠原美紀, 松浦伸也, 井出利憲, 小松賢志: DNA 損傷修復蛋白 NBS1 のテロメア維持機能. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001, 12 月 9-12 日.

33) 伊藤詠美, 松浦伸也, 篠原美紀, 田内 広, 池内達郎, 梶井 正, 小松賢志: Total PCS を示す染色体不安定症候群における M 期チェックポイント関連遺伝子の解析. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001, 12 月 9-12 日.

34) 白石貴博, 森島賢一, 篠原美紀, 松浦伸也, 小松賢志: 染色体不安定症候群ファンコニー貧血細胞の放射線感受性. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001, 12 月 9-12 日.

35) 森島賢一, 田内 広, 白石貴博, 篠原美紀, 松浦伸也, 小松賢志: ファンコニー貧血遺伝子 FANCD2 のチキンホモログとターゲットイング DT40 細胞の特性. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001, 12 月 9-12 日.

36) 小林純也, 田内 広, 篠原美紀, 松浦伸也, 谷本啓二, 小松賢志: DNA 二重鎖切断修復過程におけるヒストン H2AX の機能. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001, 12 月 9-12 日.

37) 田内 広, 森島賢一, 小林純也, 松浦伸也, 園田英一朗, 高田 穰, 武田俊一, 小松賢志: NBS1 遺伝子の相同組換え修復における機能解析. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001, 12 月 9-12 日.

38) 松浦伸也, 市川幸司, 伊藤詠美, 中村麻子, 小林純也, 篠原美紀, 田内 広, 木村昭郎, 渡辺敦光, 野田哲生, 小松賢志: Targeted disruption of the Nbs1 gene for Nijmegen breakage syndrome. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001, 12 月 9-12 日.

39) A.Nakamura, H.Tauchi, S.Matsuura, J.Kobayashi, T.Ide, K.Komatsu: Association of ATM/NBS1 with telomere replication. Keystone Symposia, Snowbird, Utah, USA, 2002, January 7-13.

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 Nbs1 のノックアウトマウスを2種類のターゲッティングベクターを用いて作製した。この結果、Nbs1 のC末側が胎児の発生に重要であることが明らかとなった。また、生存した Nbs1 マウスは免疫不全や性腺低形成、そしてマウス由来細胞は放射線高感受性及び染色体不安定性などヒト疾患と同様の症状を呈して病態解析に有用であることを示した。一方、チキン B 細胞由来の DT40 細胞を用いて、Nbs1 及び FANCD2 のターゲッティングを行った結果、前者は相同組換えに必須であること、後者は DNA 架橋剤損傷からの修復に欠陥があることが示された。

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列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つ事を目的とする。

B. 研究方法

チキン B 細胞由来の DT40 細胞は高頻度で相同組換えを起こすために遺伝子ターゲッティングに有用な研究材料である。本研究では DT40 細胞を用いてチキン Nbs1 ならびに FANCD2 細胞を作製した。チキン Nbs1 はエキソン 2 をターゲッティングすることにより、それ以降のエキソンの発現がみられないヌル変異体を作製した。この細

胞の表の現形解析には放射線致死感受性や染色体異常、MMC 誘発姉妹染色分体交換、そして ScNeo レポーター遺伝子を用いた相同組換え能を比較した。一方、ファンコニー貧血の実質的な機能タンパクである FANCD2 の 516 番目のアルギニンのユビチキン化部位をターゲッティングしたファンコニー細胞の作製を行った。また NBS1 の個体レベルでの発現解析のためノックアウトマウスを作製した。Nbs1 のエキソン 2 部位に PGK-neo-poly A/HSD-tk ターゲッ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チスト内に移入する。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。このマウス肺線維芽細胞を樹立後、放射線致死感受性や遺伝子突然変異頻度を scid 細胞 (DNA-PKcs^{-/-}) や Ku70^{-/-}細胞と比較する。続いて、既に海外の研究室から譲渡を受けている Ku^{-/-}マウスや Atm^{-/-}との交配により得られるダブルターゲッティング細胞を用いて、Atm 機能が DNA 二重鎖切断の再結合以外にも機能するのか、あるいは Nbs1

が NHEJ と HR のいずれの再結合経路に関与しているかを検討する。

(倫理面への配慮)

日本人患者の細胞は京大放生研の細胞バンクから所定の手続きを経て使用する。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する。

C. 研究結果

作製したチキンファンコニー貧血細胞では MMC に高感受性を示した。このことにより 516K のユビチキン化が FANCD2 蛋白の機能に重要であることが示された。一方、同時に作製した FANCD2 抗体は MMC と同様に放射線照射に対しても損傷 DNA 部位にフォーカスを形成することが示された。放射線損傷に反応するタンパクの上流には毛細血管拡張性運動失調症の遺伝子 ATM が存在することから、現在 ATM と FANCD2 との相互作用について解析中である。またファンコニー貧血患者細胞ではテロメアが異常短縮することから、FANCD2 と NBS1 との共局在についても我々の作製した抗体を用いて解析中である。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 遺伝子をターゲティングした。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。また姉妹染色分体交換 (SCE) は相同組換えによることが知られているが、MMC 誘発の SCE 頻度はチキン Nbs1 細胞で極端に低下していることが示された。これらの結果は 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。もう

一方の DNA 二重鎖切断の再結合過程であるエンドジョイニングは Nbs1 では正常であることが確認された。

さらに、個体レベルでの発現を比較するためにマウス Nbs1 遺伝子のエキソン 4 以降をターゲティングしたマウスを二種類作製した。一種類のノックアウトマウスでは胎生 8.5 日で致死になるが細胞株を樹立可能であった。これに対して、Cre-Lox により選択マーカーの neo 遺伝子除いたノックアウトマウスでは胎生 3.5 日で致死になり、細胞株化も不可能であった。正確な原因は現在解析中であるが、NBS1 の C 末側蛋白の発現が関係していると思われる。一方、正常細胞が極一部存在するキメラマウスが偶発的に発生した。このマウスは免疫グロブリンの低下や性腺低形成などヒト NBS 患者の臨床症状を呈すると共に、放射線照射後に体毛が早期に白色化して正常マウスと比較して老化傾向を示した。また、このマウスから樹立した NBS マウス細胞はヒトマウス細胞と同程度の放射線感受性を示した。このため、テロメア結合蛋白 TRF2 と NBS1 との相互作用を解析した。免疫共沈法及び細胞のフォーカス形成による共局在は NBS1 と TRF2 は S 期初期に相互作用することを示した。NBS 細胞ではテロメア G-tail が短いことから、NBS1 と TRF2 が G-tail テロメア安定に機能していると思われる。また、Nbs1 マウスと ATM 及び Ku マウスとの交配では、これらの遺伝子のダブルノックアウトマウスは作製出来なかった。恐らく胚発生の極く初期に致死になると思われる。

D. 考察

我々が作製した二種類のノックアウトマウスのうち、Cre-Lox^p で Neo 遺伝子を除いたコンストラクトでは胚発生の極く初期 (E3.5 日以前) に致死になった。これに対して Neo 遺伝子が存在するマウスでは少なくとも E7.0 ~ 8 日迄生存可能であった。後者では Nbs1 の C 末が発現していることが確認されており、C 末側の存在が発生に大きな影響を及ぼすことが確認出来た。チキン Nbs1 ターゲティング細胞を用いた解析では Nbs1 はエンドジョイニングよりも相同組換えのタンパクであることが示され

た。この点は高等真核生物と酵母での機能の大きな違いである。既に我々は Nbs1 C 末側がヌクレアーゼ活性を有する Mre11/Rad50 との結合に必須であることを示したので、相同組換えの初期に必要な突出型 1 本鎖 DNA が出来ないことが Nbs1 の相同組換え能や胚発生初期での死に繋がると思われる。従ってテロメア維持に重要な G-tail も同様の一本鎖 DNA から構成されるので Nbs1 もテロメアの異常短縮、そして今回示された個体レベルでの老化の原因であると考えられる。ATM や DNA-PK (Ku70/80) はヒストンのリン酸化に相補的に作用していることが知られているのでそのダブルノックアウトマウスはクロマチン・リモデリングの失敗から致死になると予想される。Nbs1 とのダブルノックアウトマウスについても他の原因が予想されるので今後さらに解析が必要である。

E. 結論

- 1) Nbs1 マウスの発生には Nbs1 C 末側の機能が重要である。
- 2) Nbs1 は相同組換えに重要であるが、エンドジョイニングには必ずしも必要でない。この点は酵母の Xrs2 がエンドジョイニングにも重要であるのとは異なる。
- 3) Nbs1 ノックアウトは早老性を示した。
- 4) ファンコニー貧血遺伝子は放射線及び MMC による DNA 損傷の修復機構に重要である。特に FANCD2 の 516K のユビチン化が活性化に必須である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) T.Ubagai, S.Matsuura, H.Tauchi, K.Itou, K.Komatsu: Comparative genomic hybridization analysis suggests a gain of chromosome 7p associated with lymph node metastasis in non-small cell lung cancer. (Oncology Reports, 8:83-88, 2001)
- 2) H.Tauchi, J.Kobayashi, K.Morishima, S.Matsuura, A.Nakamura, T.Shiraishi, E.Ito, D.Masnada, D.Delia, K.Komatsu: 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. (J.Biol.Chem., 276:12-15, 2001)

- 3) H.Tauchi, J.Kobayashi, K.Morishima, D.C.van Gent, T.Shiraishi, N.S.Verkaik, D.van Heemst, E.Ito, A.Nakamura, E.Sonoda, M.Takeda, S.Takeda, S.Matsuura, K.Komatsu: Nbs1 is essential for DNA repair via homologous recombination in higher vertebrate cells. (投稿中)

- 4) S.Matsuura, K.Ichikawa, E.Ito, J.Kobayashi, A.Nakamura, H.Tauchi, H.Watanabe, A.Kimura, T.Noda, K.Komatsu: C-terminus Nbs1 protein confers cellular viability in mouse Nbs1-null mutant. (投稿中)

- 5) J.Kobayashi, H.Tauchi, T.Kobayashi, K.Morishima, T.Shiraishi, E.Ito, A.Nakamura, S.Matsuura, K.Tanimoto, K.Komatsu: Histone H2AX regulates the focus formation of NBS1/hMRE11/hRAD50 complex after DNA damage. (投稿中)

2. 学会発表

- 1) A.Nakamura, H.Tauchi, S.Matsuura, J.Kobayashi, T.Ide, K.Komatsu: Association of NBS1 with Telomere replication. The 2001 meeting on Telomeres & Telomerase, Cold Spring Harbor, New York, USA, 2001, March 28-April 1.

- 2) 森島賢一, 岡本 文, 中村麻子, 篠原美紀, 松浦伸也, 小松賢志: ファンコニー貧血の放射線感受性への関与. 第 42 回原子爆弾後障害研究会, 広島, 2001, 6 月 10 日.

- 3) 伊藤詠美, 松浦伸也, 小松賢志, 田内 広, 池内達郎, 梶井 正: M 期チェックポイント異常を特徴とする高発癌性遺伝病 2 症例の、機能的相補性試験. 第 42 回原子爆弾後障害研究会, 広島, 2001, 6 月 10 日.

- 4) 小林純也, 田内 広, 松浦伸也, 谷本啓二, 小松賢志: 放射線誘発 DNA 損傷におけるヒストン H2AX フォーカスの形成. 第 42 回原子爆弾後障害研究会, 広島, 2001, 6 月 10 日.

- 5) 白石貴博, 田内 広, 篠原美紀, 松浦伸也, 小松賢志: 突然変異高感度検出系を用いた逆線量率効果の解析. 第 42 回原子爆弾後障害研究会, 広島, 2001, 6 月 10 日.
- 6) 白石貴博, 田内 広, 篠原美紀, 松浦伸也, 小松賢志: (ハムスター×ヒト X 染色体) 突然変異高感度検出系を用いた逆線量率効果及びバイスタンダー効果の解析. 第 26 回中国地区放射線影響研究会, 広島, 2001, 7 月 27 日.
- 7) 森島賢一, 岡本 文, 白石貴博, 中村麻子, 篠原美紀, 松浦伸也, 小松賢志: ファンコニー貧血細胞の放射線感受性. 第 26 回中国地区放射線影響研究会, 広島, 2001, 7 月 27 日.
- 8) 中村麻子, 岡本 文, 森島賢一, 篠原美紀, 松浦伸也, 小松賢志: DNA 修復欠損遺伝病ファンコニー貧血日本人患者の遺伝的相補性群. 第 26 回中国地区放射線影響研究会, 広島, 2001, 7 月 27 日.
- 9) 伊藤詠美, 松浦伸也, 市川幸司, 中村麻子, 小林純也, 篠原美紀, 田内 広, 木村昭郎, 渡辺敦光, 野田哲生, 小松賢志: 遺伝子標的法を用いたナイミーヘン症候群遺伝子欠損マウス細胞の樹立. 第 26 回中国地区放射線影響研究会, 広島, 2001, 7 月 27 日.
- 10) 中村麻子, 田内 広, 小林純也, 篠原美紀, 松浦伸也, 井出利憲, 小松賢志: 高発ガン性症候群遺伝子 NBS1 のテロメア維持機構. 第 60 回日本癌学会総会, 横浜, 2001, 9 月 26-28 日.
- 11) 松浦伸也, 市川幸司, 伊藤詠美, 中村麻子, 小林純也, 田内 広, 木村昭郎, 渡辺敦光, 野田哲生, 小松賢志: ジーンターゲットイングによるナイミーヘン症候群遺伝子 Nbs1 の機能解析. 第 60 回日本癌学会総会, 横浜, 2001, 9 月 26-28 日.
- 12) 伊藤詠美, 松浦伸也, 小松賢志, 田内 広, 池内達郎, 梶井 正: Total PCS を示す染色体不安定症候群における G1 期アポトーシスの異常. 第 60 回日本癌学会総会, 横浜, 2001, 9 月 26-28 日.
- 13) 田内 広, 小林純也, 松浦伸也, 武田俊一, 小松賢志: 高発がん性遺伝病原因遺伝子 NBS1 は相同組換え修復に必須である. 第 60 回日本癌学会総会, 横浜, 2001, 9 月 26-28 日.
- 14) 池内達郎, 楊 増全, 山本興太郎, 松浦伸也, 小松賢志, 梶井 正: 高発がん性の total PCS 遺伝形質に伴って出現する異数性細胞の解析. 第 60 回日本癌学会総会, 横浜, 2001, 9 月 26-28 日.
- 15) 山崎文之, 濱 聖司, 吉岡宏幸, 梶原佳則, 岡村達憲, 杉山一彦, 有田和徳, 栗栖薫, 佐伯康之, 木平健治, 松浦伸也, 小松賢志: アデノウイルスベクターを用いた p16 遺伝子発現の、抗がん剤感受性に及ぼす影響についての検討. 第 60 回日本癌学会総会, 横浜, 2001, 9 月 26-28 日.
- 16) 小松賢志, 田内 広, 小林純也, 中村麻子, 篠原美紀, 野田哲生, 松浦伸也: 高発がん性遺伝病ナイミーヘン症候群. 第 60 回日本癌学会総会, 横浜, 2001, 9 月 26-28 日.
- 17) 中村麻子, 田内 広, 小林純也, 篠原美紀, 松浦伸也, 井出利憲, 小松賢志: ナイミーヘン症候群遺伝子 NBS 1 のテロメア維持機構. 日本人類遺伝学会 第 46 回大会, 埼玉, 2001, 10 月 3-5 日.
- 18) 松浦伸也, 伊藤詠美, 市川幸司, 中村麻子, 小林純也, 篠原美紀, 田内 広, 木村昭郎, 渡辺敦光, 野田哲生, 小松賢志: 遺伝子標的法を用いた Nbs1 遺伝子機能解析. 日本人類遺伝学会 第 46 回大会, 埼玉, 2001, 10 月 3-5 日.
- 19) 池内達郎, 菅原聡子, 楊 増全, 松浦伸也, 小松賢志, 山本興太郎, 梶井 正: Total PCS (premature chromatid separation) 遺伝形質に伴って産生される異数性細胞の解析. 日本人類遺伝学会 第 46 回大会, 埼玉, 2001, 10 月 3-5 日.

- 20) 白石貴博, 田内 広, 篠原美紀, 松浦伸也, 小松賢志: (ハムスター×ヒト X 染色体) 高感度突然変異検出系による bystander effect の予備的解析. 第 44 回日本放射線影響学会, 大阪, 2001, 10 月 29-31 日.
- 21) 田内 広, 白石貴博, 森島賢一, 松浦伸也, 一政満子, 一政祐輔, 小松賢志: 突然変異高感度検出系によるトリチウム β 線の低線量率効果の解析. 第 44 回日本放射線影響学会, 大阪, 2001, 10 月 29-31 日.
- 22) 小林純也, 田内 広, 篠原美紀, 松浦伸也, 谷本啓二, 小松賢志: DNA 二重鎖切断修復の初期過程における NBS1 とヒストン H2AX の機能. 第 44 回日本放射線影響学会, 大阪, 2001, 10 月 29-31 日.
- 23) 田内 広, 白石貴博, 笠井(江口)清美, 古澤佳也, 安藤興一, 松浦伸也, 小松賢志, 一政祐輔: 突然変異および細胞癌化における高 LET 放射線の逆線量率効果. 第 44 回日本放射線影響学会, 大阪, 2001, 10 月 29-31 日.
- 24) 中村麻子, 田内 広, 小林純也, 篠原美紀, 松浦伸也, 井出利憲, 小松賢志: 放射線感受性蛋白 NBS1 のテロメア維持機能. 第 44 回日本放射線影響学会, 大阪, 2001, 10 月 29-31 日.
- 25) 森島賢一, 岡本 文, 白石貴博, 中村麻子, 篠原美紀, 松浦伸也, 小松賢志: ファンコニー貧血細胞の放射線感受性. 第 44 回日本放射線影響学会, 大阪, 2001, 10 月 29-31 日.
- 26) 松浦伸也, 伊藤詠美, 市川幸司, 中村麻子, 小林純也, 田内 広, 木村昭郎, 渡辺敦光, 小松賢志: ジーンターゲット法によるマウス Nbs1 遺伝子ノックアウト細胞株の樹立. 第 44 回日本放射線影響学会, 大阪, 2001, 10 月 29-31 日.
- 27) 伊藤詠美, 松浦伸也, 篠原美紀, 小松賢志, 田内 広, 池内達郎, 梶井 正: Total PCS を示す染色体不安定症候群 2 症例の機能的相補性試験. 第 44 回日本放射線影響学会, 大阪, 2001, 10 月 29-31 日.
- 28) E.Ito, S.Matsuura, M.Shinohara, K.Komatsu, H.Tauchi, T.Ikeuchi, T.Kajii: Complementation studies of immortalized cell lines from infants with total PCS. 3R Symposium, Hyogo, 2001, November 6-9.
- 29) A.Nakamura, H.Tauchi, S.Matsuura, J.Kobayashi, T.Ide, K.Komatsu: Association of NBS1 with telomere replication. 3R Symposium, Hyogo, 2001, November 6-9.
- 30) 中村麻子, 田内 広, 小林純也, 篠原美紀, 松浦伸也, 井出利憲, 小松賢志: DNA 損傷修復蛋白 NBS1 のテロメア維持機能. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001, 12 月 9-12 日.
- 31) 伊藤詠美, 松浦伸也, 篠原美紀, 田内 広, 池内達郎, 梶井 正, 小松賢志: Total PCS を示す染色体不安定症候群における M 期チェックポイント関連遺伝子の解析. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001, 12 月 9-12 日.
- 32) 白石貴博, 森島賢一, 篠原美紀, 松浦伸也, 小松賢志: 染色体不安定症候群ファンコニー貧血細胞の放射線感受性. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001, 12 月 9-12 日.
- 33) 森島賢一, 田内 広, 白石貴博, 篠原美紀, 松浦伸也, 小松賢志: ファンコニー貧血遺伝子 FANCD2 のチキンホモログとターゲットティング DT40 細胞の特性. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001, 12 月 9-12 日.
- 34) 小林純也, 田内 広, 篠原美紀, 松浦伸也, 谷本啓二, 小松賢志: DNA 二重鎖切断修復過程におけるヒストン H2AX の機能. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001, 12 月 9-12 日.

35) 田内 広, 森島賢一, 小林純也, 松浦伸也, 園田英一朗, 高田 穰, 武田俊一, 小松賢志 : NBS1 遺伝子の相同組換え修復における機能解析. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001, 12 月 9-12 日.

36) 松浦伸也, 市川幸司, 伊藤詠美, 中村麻子, 小林純也, 篠原美紀, 田内 広, 木村昭郎, 渡辺敦光, 野田哲生, 小松賢志 : Targeted disruption of the Nbs1 gene for Nijmegen breakage syndrome. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001, 12 月 9-12 日.

37) A.Nakamura, H.Tauchi, S.Matsuura, J.Kobayashi, T.Ide, K.Komatsu : Association of ATM/NBS1 with telomere replication. Keystone Symposia, Snowbird, Utah, USA, 2002, January 7-13.

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 助教授

研究要旨 Nbs1 のテロメア維持における役割を解析した結果、Nbs1 蛋白はテロメア結合タンパク TRF2 とテロメア部位で共局在することが免疫染色法により示された。また、Nbs1 抗体を用いた免疫共沈物のウエスタンブロット解析は TRF2 と Nbs1 が物理的に結合していることが確認された。この結合は細胞周期依存性で S 期初期のテロメアが延長する時期と一致した。Nbs1 はヌクレアーゼ活性を有する Mre11/Rad50 と複合体を形成することから、テロメラーゼによるテロメア延長に必要な一本鎖 DNA の G-tail を測定したところ、NBS 細胞では正常細胞に比較して短いことが判明した。

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

NBS 患者の皮膚由来の線維芽細胞を SV40 で不死化した GM07166VA7 細胞、及び正常細胞として子宮内腫由来の HeLa 細胞、ヒト肺由来細胞を不死化した MRC-5SV 細胞と GM07166VA7 に全身 NBS1 cDNA を発現ベクター pIRES-hyg で導入した放射線感受性が回復したクローンを用いる。

細胞同調は aphidicolin 2 μ g/ml で 16-20 時間培養後に、通常培地に戻して行う。除去後 0-3 時間が G1/S 期、3-5 時間後が S 期初期、5-8 時間後が S 期後期、8 時間以降が G2/M 期に対応することをフローサイトメトリーで確認する。

NBS1 と TRF2 の二重免疫染色は細胞を Triton X-100 で処理後に NBS1 (rabbit) 抗体と TRF2 (goat) 抗体でインキュベートしてから、それぞれ anti-goat IgG-TRITC と anti-rabbit IgG-Alexa 488 で染色する。また、

細胞を lysisbuffer で抽出した lysate を NBS1 抗体で沈殿した免疫複合体を NBS1 抗体及び TRF2 抗体を用いたウエスタンブロット法で解析する。

G-tail 長の測定は細胞から抽出した DNA を二本鎖のままゲル上でハイブリダイズする in gel hybridization を行う。プローブには 5'(CCCTAA)43'オリゴヌクレオチドを、そして 3'-エキソヌクレアーゼとして Mung Bean Nuclease を用いる。

(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

NBS1 抗体及び TRF2 抗体を用いて MRC-5SV 細胞の免疫染色を行った結果、NBS1 及び TRF2 とともに細胞周期依存性にフォーカスを形成することが示された。特に NBS1 フォーカスは S 期初期にドット状のフォーカスを形成して、NBS1 と TRF2 の二重染色は両フォーカスが一致することが確認された。また、テロメア FISH 法により細胞内局在を検討した結果、両フォーカスはテロメア上に存在することが判明した。一方、NBS1 と TRF2 の生体内での結

合が免疫複合体での解析により明らかになった。つまり、NBS1 抗体での複合体を TRF2 抗体を用いてウエスタンブロット解析した所、TRF2 の存在が確認された。この両者の結合は、NBS1 と TRF2 フォーカスの共局在の結果と一致して、S 期初期においてのみ検出された。

続いて、テロメア端に存在する一本鎖 DNA (G-tail) を in gel hybridization により測定した結果、NBS 細胞の G-tail は正常 HeLa 細胞及び NBS1 タンパクを強制再現させた NBS 細胞よりも約 80% 短いことが明らかになった。テロメアプローブが G-tail のみに Hybrize していることは、MBN 処理によりサザン法のシグナルが消失したことにより確認できた。

D. 考察

テロメラーゼ活性のないヒト組織の初代培養細胞は細胞分裂毎にテロメアが短縮するが、テロメラーゼ活性を有する不死化細胞では S 期初期に G-tail をプライマーにテロメアが延長することが知られている。これと一致して、我々の結果は NBS1 が G-tail 形成に重要であること、そして NBS1 が TRF2 と S 期初期に複合体を形成することを示した。NBS1 のテロメア維持機構は S 期初期に G-tail を延長することが示唆されるが、その詳細は不明である。我々は既に NBS1 が放射線誘発 DNA 二重鎖切断の再結合過程である相同組換えに必要であることを示しているので、相同組換えに必要な 5'-突出型単鎖 DNA 形成と同様の機構による可能性が指摘される。G-tail は染色体末端の T-loop の開環や G カルテットの解消にも関与しているため、NBS 細胞におけるこれらの解析が哺乳動物細胞でのテロメア維持機構の解明につながると期待される。

E. 結論

- 1) 免疫染色により NBS1 と TRF2 は染色体末端テロメアで共局在することが確認された。
- 2) NBS1 と TRF2 は S 期初期に生体内で結合することが IP-複合体-ウエスタン法により示された。
- 3) NBS1 では G-tail 長が正常細胞の約 20%

にまで短縮していることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Tahara, H., Ide, T., Afshari, C., Barrett, J.: Involvement of telomere shortening and telomerase in cell aging and immortalization. (In Goto, M., Miller, R., W. (eds), Gann, Monograph on Cancer Research. Tokyo, KARGER, 2001, 147-163)

2) Minamoto, T., Buschmann, T., Habelhah, H., Matusевич, E., Tahara, H., Boerresen-Dale, A.L., Harris, C., Sidransky, D., Ronai, Z.: Distinct pattern of p53 phosphorylation in human tumors. (Oncogene, 20:3341-3347, 2001)

3) Matsutani, N., Yokozaki, H., Tahara, E., Tahara, H., Kuniyasu, H., Haruma, K., Chayama, K., Yasui, W.: Expression of telomeric repeat binding factor 1 and 2 and TRF1-interacting nuclear protein 2 in human gastric carcinomas. (Int. J. Oncol., 19:507-512, 2001)

2. 学会発表

1) 田原栄俊, 井出利憲: テロメア長によって制御されている遺伝子の同定. 第 60 回日本癌学会, 横浜, 2001, 9 月 26-28 日.

2) 田原栄俊, 真鍋 紫, 齊藤 誠, 羽迫真一, 井出利憲: テロメア長によって変化する遺伝子の検索. 第 24 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2001, 12 月 9-12 日.

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表
雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
G.Buscemi, et.al.	Chk2 activation dependence on Nbs1 after DNA damage.	Mol.Cell.Biol.	21	5214-5222	2001
T.Ubagai, et.al.	Comparative genomic hybridization analysis suggests a gain of chromosome 7p associated with lymph node metastasis in non-small cell lung cancer.	Oncology Reports	8	83-88	2001
H.Tauchi, et.al.	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.	J.Biol.Chem	276	12-15	2001
K.Sakata, et.al.	Expression of Genes involved in Repair of DNA Double-strand Breaks in Tumors.	Int.J.Radiat. Oncology	49	161-167	2001
Kato,K., et.al.	Organ doses from radiation therapy in Atomic bomb survivors.	Radiat.Res.	155	785-795	2001
中村麻子, 小松賢志	ナイミーヘン症候群における二本鎖DNA切断修復の異常.	蛋白質 核酸 酵素	46	1038-1045	2001
Tahara,H., et.al.	Involvement of telomere shortening and telomerase in cell aging and immortalization.	Gann Monograph on Cancer Res. In Goto,M., Miller,R., W. (eds), Tokyo, KARGER	49	147-163	2001
Minamoto, T., et.al.	Distinct pattern of p53 phosphorylation in human tumors.	Oncogene	20	3341-3347	2001
Matsutani, N., et.al.	Expression of telomeric repeat binding factor 1 and 2 and TRF1-interacting nuclear protein 2 in human gastric carcinomas.	Int.J.Oncol.	19	507-512	2001

20010227

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