

平成 14 年度

厚生労働科学研究費補助金（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 15 年 3 月

主任研究者 松浦 彰

平成 14 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-----	14
1. 早期老化症関連遺伝子産物によるゲノム恒常性制御機構-----	15
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不死化早期老化症 Ataxia Telangiectasia 由来 繊維芽細胞におけるストレス誘導細胞老化に関する研究-----	24
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. リボソーム rRNA 反復遺伝子の安定性を維持する機構の解析----	30
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-----	35

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

単一の変異により老化の多面的形質が早期に発症する、遺伝的早老症の原因遺伝子の解析が進んでいる。末梢血管拡張性運動失調症(ataxia telangiectasia, AT)の原因遺伝子 *ATM*、Werner 症候群の原因遺伝子 *WRN* はそれぞれプロテインキナーゼ、DNA ヘリカーゼをコードし、ゲノム DNA の監視・修復機構に関与している。早老症関連因子複合体が 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、その結果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。本年度は、早老症関連タンパク質の核内動態の解析とその制御機構を明らかにする目的で、①哺乳類培養細胞における早老症原因遺伝子産物の翻訳後修飾と核内局在化の解析、②モデル生物におけるテロメア-*ATM/ATR* 相互作用の解析、を行った。その結果、*ATRIP* が早老症関連因子 *ATR* の核内動態を制御する因子であること、出芽酵母の *ATR* と *ATM* が染色体テロメアと相互作用し、*ATR* のテロメアへの結合が異常テロメアや、複製の完了をモニターしていることを明らかにした。

近年、テロメア長の短縮以外にも、酸化ストレス、放射線、UV 照射や *ras* などのがん遺伝子の発現によっても細胞老化が引き起こされることが知られている。そこで、放射線や酸化ストレスに応答し、細胞周期チェックポイントに関わる *ATM* がストレス誘導性細胞老化を誘導するシグナルに関与するかどうかを *AT/TERT* を用いて検討した。その結果、*ATM* を介した DNA 障害性ストレスシグナル経路は細胞老化誘導に必須でないことが明らかになった。*Ras* 誘導細胞老化と同様に *p38MAPK* の活性化が認められ、ストレス誘導性細胞老化にも *p38MAPK* 経路が重要な機能を果たしていることが示唆された。

ゲノムの安定性維持のメカニズムの解明を目的とし、出芽酵母反復配列 *rDNA*

内での組み換え制御配列の解析を行った。これまでにヒストン脱アセチル化酵素 Sir2p の欠損株で rDNA のコピー数が激しく変動し不安定になること、その変動は Fob1p による DNA 複製阻害活性に依存していること、を示している。本年度、この Sir2p による娘染色分体間の sister-chromatid cohesion の成立が rDNA の安定化に寄与していることを解明した。

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

telangiectasia、AT) は細胞周期チェックポイントタンパク質をコードする ATM 遺伝子上の変異により早発老化症状を呈するいわゆる早老症のひとつである。このことから、ゲノムへの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要であると考えられる。

本研究課題においては、早老症関連因子である ATM、ATR、NBS1 等に注目し、機能複合体の構成因子の単離、およびゲノム上の機能部位の解析を推進した。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シス・トランス因子を解析し、ゲノム維持機

A. 研究目的

ゲノム情報は内的、外的なストレスに常に曝されており、生体はゲノム上の損傷を監視し修復するための精巧な仕組みによりゲノム情報の変化を防止している。このメカニズムの一つが細胞周期の進行を調節するメカニズムである「細胞周期チェックポイント」である。ヒト遺伝性疾患毛細血管拡張性運動失調症 (ataxia

構と老化との関係について解析を行った。これらの解析により早老症関連因子複合体の機能の解明、その異常からゲノムインテグリティの破綻に至る道筋の解明、を目指した。

B. 研究方法

ATRIP のポリクローン抗体は、大腸菌にて生産し精製した glutathione S-transferase (GST)-hATRIP カルボキシ末端融合タンパク質、または合成ペプチドをウサギに免疫することにより得た。ATRIP のリン酸化特異的抗体は、リン酸化ペプチドをウサギに免役し、血清をアフィニティ精製することにより作製した。ATR、Chk1, p53 に対する抗体、およびこれらのリン酸化特異抗体は、Oncogene 社、Cell Signaling Technology 社、Santa Cruz 社より購入した。出芽酵母 Mec1p、Tel1p のクロマチン免疫沈降実験では、それぞれ 18xmyc タグ、5xHA タグを付加したタンパク質を内在性のプロモーターにより発現する株を作製し、それぞれのタグに対するモノクローン抗体、protein G-beads (Dyna) を用いてタンパク質-DNA 複合体を免疫沈降した。DNA とタンパク質のクロスリンクをはずした後、PCR によって特定の領域が増幅されるかどうかについて検討した。

SIPS 誘導と細胞老化の解析には、細胞に 55 Gy の X 線照射、あるいは 500 μ M H₂O₂ 処理を 2 時間行い、SIPS を誘導した。5 から 10 日間培養後、細胞を固定し SA- β -gal 染色・PI 染色を行い SA- β -gal 陽性細胞を数えた。また、細胞を 10 μ M BrdU でラベルし、70% エタノールで固定し、FITC 標識抗 BrdU 抗体及び PI で染色し、FACS にて細胞周期を解析した。

sister-chromatid cohesion (SCC) の成立の有無を調べるためにクロマチン免疫沈降法 (ChIP 法) を用いた。cohesin に対する抗体、を用いて免疫沈降を行ない、cohesin と一緒に落ちて来る DNA の量を PCR 法で調べた。さらに SCC の rDNA の安定性に対する直接的な影響を調べるため、Marker loss 法により rDNA の組み換え頻度を調べた。つまり rDNA の反復配列内に選択可能なマーカー遺伝子 (URA3) を挿入し、その欠失頻度を FOA を含む培地で調べた。

C. 研究成果と考察

1. ATR-ATRIP の複合体形成機構と核内動態

ATR は哺乳類 ATM と分裂酵母 Rad3 に構造的に類似したタンパク質として同定された。ATR は紫外線、

メチルメタンスルホン酸、過酸化水素などによる DNA 傷害、ヒドロキシ尿素やアフィディコリンによる複製阻害に際して活性化され、下流の因子をリン酸化することにより細胞周期チェックポイント情報の伝達に参与している。我々は、ATR の機能制御複合体の一端を明らかにする目的で、ATR と結合する新規因子、ATRIP (hMus304) の単離し、その機能解析を行った。

昨年度までの研究で、我々は本タンパク質が DNA 損傷時に ATR 依存的にリン酸化されることを見いだしている。我々は、ヒトとマウスで保存されている SQ/TQ 配列の Ser, Thr を Ala に改変した変異 ATRIP を網羅的に作製し、変異タンパク質の DNA 損傷時の挙動を解析することにより ATR 依存的にリン酸化される ATRIP の残基を決定した。次に、この部位のリン酸化特異的なポリクローナル抗体を作製し、ATR 依存的なリン酸化が ATRIP の細胞内動態にどのような影響を与えるかについて解析した。

ATRIP のリン酸化部位を Ala に改変したタンパク質（以降 SA 変異 ATRIP と呼ぶ）を導入した細胞において、ATR-ATRIP は野生型タンパク質と同様に focus を形成することができた。このことから ATR による ATRIP のリン酸化は DNA 損傷後の

ATR の focus 形成には必須でないことが明らかである。

このことは、さらに ATR タンパク質の発現を RNAi により阻害した細胞を用いた解析により確認できた。ATR に対する RNAi により ATR のタンパク質量は減少し、それとともに ATRIP の DNA 損傷後のリン酸化は検出されなくなる。しかしながらその場合でも ATRIP の focus 状の分布は影響されなかった。このことは、ATR の活性化が ATR-ATRIP の細胞内局在化を変化させるのではなく、ATRIP 自身が DNA 損傷部位に集合する能力をもち、その能力は ATR の活性とは関係ないことを示唆している。

2. ATM と ATR の相反的かつ時期特異的テロメア局在化とその分子機構

ATM および ATR は真核生物において広く保存され、染色体の恒常性維持に参与している。これらの因子は進化上保存された線状染色体末端維持機能を担っていることが知られ、さらにテロメア維持において ATM と ATR は重複した機能を果たしていることが示されている。我々はゲノム維持における両者の機能分担と、その欠損によるゲノム恒常性の破綻との関係を明らかにし、その破綻の結果生じる早老表現型の発症メカニズ

ムの解明を目指した。

細胞周期が同調していない条件において、Meclp および Tellp はテロメア DNA を同程度免疫沈降した。つぎに、細胞周期を α ファクターにより G1 期で同調させ、リリース後の細胞を経時的に集めることで、両タンパク質のテロメア結合様式を解析した。その結果、Meclp は細胞周期の S 期の時期にのみテロメアと結合し、他の時期は Meclp の代わりに Tellp がテロメアと結合していることが明らかとなった。さらに、種々の酵母変異株を用いた解析により、Tellp の活性が低下した際には Meclp のテロメアへの結合が増強されること、逆に Meclp の活性が失われると Tellp が細胞周期を通じてテロメアに結合していることが見いだされた。このことは Tellp と Meclp が相反的にテロメアに結合していることを示す。

また、酵母のテロメア短縮変異株 *est2*, *yku70* において、Meclp が通常結合していない細胞周期上の時間帯にテロメアに結合していることがわかった。このことはテロメア短縮シグナルが Meclp(ATR)を介して伝達されていることを示している。

3. AT/TERT 細胞における SIPS 誘導と細胞老化関連タンパク質の誘導

およびリン酸化

昨年度までに AT 細胞にテロメラーゼ (hTERT) を発現させることでテロメア長が伸長し、replicative cellular senescence (細胞老化) が回避され不死化することを示してきた。しかしながら、放射線などに対する DNA 障害チェックポイント機構の異常 (細胞周期チェックポイント、放射線感受性など) は hTERT の発現によっては回避できなかった。そこで、SIPS 誘導において ATM を介した DNA 障害チェックポイント機構が重要な機能を果たしているかどうかを検討した。その結果、AT/TERT 細胞においても X 線照射や酸化ストレスによって SIPS が誘導されることが明らかになった。

さらに、AT/TERT における SIPS 誘導の分子メカニズムを明らかにするために、細胞老化に伴って発現が上昇するタンパク質やリン酸化の変化を解析した。X 線照射及び H₂O₂ 処理後 6 日目に、Normal/TERT と同様に AT/TERT 細胞においても細胞老化において重要な機能を果たすことが知られている p53, p21, p16 の蓄積が認められた。また p38MAPK の活性化状態を Thr180 と Tyr182 のリン酸化状態を検討した結果、Normal/TERT と同様に AT/TERT 細胞においても p38MAPK のリン酸

化が認められ活性化していることが明らかになった。このことから SIPS 誘導においても p38MAPK が関与している可能性が示唆された。

4. リボゾーム rRNA 反復遺伝子の安定性を維持する機構の解析

ChIP 法により米国グループの報告通り、5S rDNA 近傍に SCC が存在することを確かめた。次にその SCC が *SIR2* の変異によりどのように変化するか調べた。その結果、*SIR2* 欠損株では SCC が野生株のそれに比べて約 3 分の 1 に減少していることが判明した。また、SCC の存在が知られているセントロメア領域も同様に調べたところ、この領域の SCC は *SIR2* 変異により影響を受けていなかった。そのため *SIR2* 変異による SCC の不成立は rDNA 領域特異的な現象であると考えられる。

SCC の一つのコンポーネントである Smc1 タンパク質の温度感受性変異株を用いて、その rDNA の安定性を Marker loss 法により検定した。その結果、予想通り半許容温度下において、マーカー遺伝子の欠失頻度、つまり rDNA の不安定性が許容温度下に比べて約 3 倍上昇していた。さらにその上昇は DNA 複製阻害活性に依存していた。以上のことから、*SIR2* 変異がクロマチン構造の変化を通し

て SCC の成立をさまたげ、それにより sister-chromatid がずれ易くなり rDNA が不安定になっていると考えられる。

D. 討論

早老症関連タンパク質である ATR 及び NBS1 の細胞内動態の解析を行った。両者は細胞周期チェックポイントに関わるタンパク質として、ゲノムインテグリティの制御を行い、癌化及び老化においてその機能が関わっていることが示唆されてきている。本研究で明らかになったことは、ATR が巨大タンパク質複合体のメンバーであり、ATRIP タンパク質とともにこの複合体に含まれ、ATR の動態が ATRIP により制御されていることである。また ATR と ATM は相互に影響を与えながら細胞内の動態を変化させ、またその機能は一部重複していることが明らかになった。また、ATM を介さない老化誘導メカニズムが明らかにされ、その経路における MAP キナーゼ p38 の重要性が明らかにできつつある。ATM、ATR といった早老症関連因子が含まれる核内機能複合体の動態及び活性の変化を手がかりに、老化、癌化といった高次生命現象におけるこれらの早老症関連タンパク質の関与を解析す

ることが可能となった。

また、老化とゲノム安定性という観点から、テロメアおよび rDNA 領域の安定化因子の解析を進め、ATM と ATR という類似したキナーゼの局在化による制御、ヒストンのアセチル化状態を介した姉妹染色分体間の cohesion による制御、という未知の制御機構を明らかにすることができた。これらの欠損がなぜ老化と関連するのか、についてはまだ未解明な点が多い。これらの因子によるゲノム安定化という側面から老化現象を詳細に解剖し、老化の普遍的メカニズムを明らかにすることが可能となるであろう。これら早老症関連因子と特定のゲノム上の配列の維持（変化）からその結果としての細胞活性の変化が解明されれば、老化を制御し、老年病の発症を防止する方策への道筋が見えてくるであろう。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Hayashi, E., Yasui, A., Oda, K., Nagino, M., Nimura, Y., Nakanishi, M., Motoyama, N., Ikeda, K. and **Matsuura, A.** (2003) Loss of p27Kip1 accelerates DNA replication after partial hepatectomy in mice. *J. Surg. Res.* in press
2. Gunge, N., Takata, H., **Matsuura, A.** and Fukuda, K. (2003) Progressive rearrangement of telomeric sequences added to both the ITR ends of the yeast linear pGKL plasmid. *Biol. Proced. Online* 5: 29-42
3. Tomita, K., **Matsuura, A.**, Caspari, T., Carr, A. M., Akamatsu, Y., Iwasaki, H., Mizuno, K., Ohta, K., Uritani, M., Ushimaru, T., Yoshinaga, K. and Ueno, M. Competition between Rad50 complex, Ku heterodimer and second nuclease at telomere ends and possibly DSB ends. *Mol. Cell. Biol.* in press
4. Sekoguchi, E., Sato, N., Yasui, A., Fukada, S., Nimura, Y., Aburatani, H., Ikeda, K. and **Matsuura, A.** A novel mitochondrial carnitine-acylcarnitine translocase induced by partial hepatectomy and fasting. *J. Biol. Chem.* in revision.
5. Takata, H., Kanoh, Y., Gunge, N., Shirahige, K. and **Matsuura, A.** Reciprocal association of the budding yeast orthologues of ATM and ATR with telomeres *in vivo*. Submitted
6. Itakura, E., Sekoguchi, E., Umeda, K., Kajihara-Takai, K., Kimura, M., Tachibana, A., Ohsumi, M., Tamai, K.,

- Ikeda, K. and Matsuura, A. ATRIP escorts ATR to nuclear foci after DNA damages. Manuscript in preparation
7. Umeda J, Sano S, Kogawa K, Motoyama N, Yoshikawa K, Itami S, Kondoh G, Watanabe T, Takeda J. (2003) In vivo cooperation between Bcl-xL and the phosphoinositide 3-kinase-Akt signaling pathway for the protection of epidermal keratinocytes from apoptosis. *FASEB J.*, in press.
 8. Fernandez-Capetillo O, Chen H-T, Celeste A, Ward I, Romanienko PJ, Morales JC, Naka K, Xia Z, Camerini-Otero RD, Motoyama N, Carpenter PB, Bonner W, Chen J, Nussenzweig A. (2002) DNA damage-induced G₂-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat. Cell Biol.* **4**: 993-997.
 9. Naka K, Ikeda K, Motoyama N. (2002) Recruitment of NBS1 into PML oncogenic domains (PODs) via interaction with SP100 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **299**: 863-871.
 10. Takai H, Naka K, Okada Y, Watanabe M, Harada N, Saito S, Anderson CW, Appella E, Nakanishi M, Suzuki H, Nagashima K, Sawa H, Ikeda K, Motoyama N. (2002) Chk2-deficient mice exhibit increased radioresistance and defective p53-mediated transcription. *EMBO J.* **21**: 5195-5205.
 11. Furukawa-Hibi Y, Yoshida-Araki K, Ohta T, Ikeda K, Motoyama N. (2002) FOXO Forkhead Transcription factors Induce G₂-M Checkpoint in Response to Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* **277**: 26729-26732.
 12. Yoshida H, Okada Y, Kinoshita N, Hara H, Sasaki M, Sawa H, Nagashima K, Mak TW, Ikeda K, Motoyama N. (2002) Differential requirement for Apaf1 and Bcl-xL in the regulation of programmed cell death during development. *Cell Death & Differ.* **9**: 1273-1276.
 13. Kobayashi Y, Watanabe M, Okada Y, Sawa H, Takai H, Nakanishi M, Kawase Y, Suzuki H, Nagashima K, Ikeda K, Motoyama N. (2002) Hydrocephalus, Situs Inversus, Chronic Sinusitis, and Male Infertility in DNA Polymerase I-Deficient Mice: Possible Implication for the Pathogenesis of Immotile Cilia

- Syndrome. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 2769-2776.
14. Kodama, K.-i., Kobayashi, T., Niki, H., Hiraga, S., Oshima, T., Mori, H., and Horiuchi, T. (2002) Amplification of Hot DNA segments in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **45**: 1575-1588.
2. 学会発表
1. Hideki Takata, Norio Gunge, Kyoji Ikeda and Akira Matsuura. Analysis of telomere *de novo* addition using the nuclear migration system of a yeast cytoplasmic linear plasmid. 2002 Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting, Madison, USA, July 2002
 2. 高田英基、郡家徳郎、池田恭治、松浦 彰「Reciprocal association of yeast ATM family proteins with telomeres.」第 20 回 Yeast Workshop, 2002 年 11 月、熊本
 3. 板倉英祐、梅田和之、大隅萬里子、池田恭治、松浦 彰「ATR-ATRIP の複合体形成機構」第 25 回日本分子生物学会年会、2002 年 12 月、横浜
 4. 富田和範、渡辺喜久雄、松浦 彰、赤松由布子、岩崎博史、丑丸敬史、瓜谷真裕、上野 勝「分裂酵母 Nbs1 複合体と Ku の DNA 切断末端とテロメア末端における機能」第 25 回日本分子生物学会年会、2002 年 12 月、横浜
 5. 高田英基、郡家徳郎、池田恭治、松浦 彰「テロメア定常長維持における出芽酵母 ATM 関連因子 *MEC1*, *TEL1* の役割」第 25 回日本分子生物学会年会、2002 年 12 月、横浜
 6. 小野祐生、松浦 彰、瓜谷真裕、丑丸敬史、上野 勝「分裂酵母 RPA の機能解析」第 25 回日本分子生物学会年会、2002 年 12 月、横浜
 7. 世古口英、林 英司、佐藤典裕、池田恭治、松浦 彰「ミトコンドリアに局在する新規カルニチンキャリアースーパーファミリータンパク質の機能解析」第 25 回日本分子生物学会年会、2002 年 12 月、横浜
 8. 梅田和之、世古口英、板倉英祐、木村 真、高井（梶原）薫、池田恭治、松浦 彰「ATRIP の DNA 損傷依存的リン酸化の役割」第 25

- 回日本分子生物学会年会、2002年12月、横浜
9. 高田英基、松浦 彰「出芽酵母 ATM 関連因子 Tellp, Mec1p の reciprocal なテロメア局在化の分子機構」第 20 回染色体ワークショップ、2003 年 1 月、京都
 10. Yoko Furukawa-Hibi, Kiyomi Yoshida-Araki, Tsutomu Ohta, Kyoji Ikeda, Noboru Motoyama. Forkhead transcription factors activate the stress-inducible gene GADD45 in response to oxidative stress. *Molecular Genetics of Aging*, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting (Cold Spring Harbor, NY, USA), October 2002.
 11. Hiroyuki Takai, Kazuhito Naka, Yuki Okada, Miho Watanabe, Naoki Harada, Shin'ichi Saito, Carl W. Anderson, Ettore Appella, Makoto Nakanishi, Hiroshi Suzuki, Kazuo Nagashima, Hirofumi Sawa, Kyoji Ikeda, Noboru Motoyama. Chk2-deficient mice exhibit increased radioresistance and defective p53-mediated transcription. *Molecular Genetics of Aging*, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting (Cold Spring Harbor, NY, USA), October 2002.
 12. 日比 (古川) 陽子、荒木 (吉田) 聖美、太田力、池田恭治、本山 昇. 「フォークヘッド型転写因子 FOXO ファミリーによるストレス応答遺伝子 GADD45 の転写制御」第 25 回日本基礎老化学会大会、2002 年 5 月、つくば
 13. 日比 (古川) 陽子、荒木 (吉田) 聖美、太田力、池田恭治、本山 昇. 「FOXO ファミリー転写因子はストレス応答性遺伝子 GADD45 の転写促進により G2/M 期細胞周期停止を誘導する」第 61 回日本癌学会総会、2002 年 10 月、東京
 14. 岡田由紀、澤 洋文、高井裕之、原田直樹、門内有美、渡部美穂、長嶋和郎、池田恭二、本山 昇. 「Chk2 ノックアウトマウスにおける自然発癌の解析」第 61 回日本癌学会総会、2002 年 10 月、東京
 15. 岩淵邦芳、栗原孝行、柴田昌夫、曹 永恒、濱田富美男、小林純也、田内 広、青木秀年、Piku Base、Aidan Doherty、本山 昇、小松賢志、今村幸治、伊達孝保. 「二重鎖切断に対する p53 結合蛋白質 1

- (53BP1) の機能解析」第 25 回
日本分子生物学会、2002 年 12 月、
横浜
- 研究会：ユビキチン系と DNA ト
ランスアクション、2002 年 9 月、
三島
7. 日比 (古川) 陽子、荒木 (吉田)
聖美、大田 力、池田恭治、本
山 昇. 「酸化ストレス時に FOXO フ
ァミリー転写因子は GADD45 を
転写し細胞周期を停止させる」第
25 回日本分子生物学会、2002 年 12
月、横浜
21. 小林 武彦 “Strategies to keep the
stability of ribosomal RNA gene
repeats in yeast.” 理研国際コンフ
ァレンス -DNA repair and
recombination: from molecular
structures at the angstrom resolution
to human diseases-, 2002 年 11 月、
那須 (招待講演)
17. 小林 武彦、野村眞康、堀内 嵩
「ゲノム構築におけるクロマチン
構造の役割」日本細胞生物学会年
会、2002 年 5 月、横浜
22. 小林 武彦、野村 眞康、堀内 嵩
「酵母リボソーム RNA 反復遺伝
子の安定化戦略」第 25 回日本分
子生物学会年会、2002 年 12 月、
横浜
18. 小林 武彦、野村眞康、堀内 嵩
「ゲノムの安定化におけるクロマ
チン構造の役割」酵母遺伝学フォ
ーラム、2002 年 7 月、広島
23. 小林 武彦、野村 眞康、堀内 嵩
「Sister-chromatid cohesion はリボソ
ーム RNA 反復遺伝子の維持に必須
である」ワークショップ”DNA
Repair, Recombination and
Mutagenesis 2003”、2003 年 2 月、
淡路島
19. 小林 武彦、野村 眞康、堀内
嵩 ”Sir2 is required for the
establishment of sister-chromatid
cohesion in the yeast rDNA.” DNA
Replication and Genome Integrity
meeting. 2002 年 8 月、米国ソー
ク研究所
20. 小林 武彦 「ゲノムの安定性とク
ロマチン構造」国立遺伝学研究所
- 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

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

早期老化症関連遺伝子産物によるゲノム恒常性制御機構

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

早期老化症 ataxia telangiectasia の原因遺伝子 ATM とその orthologue ATR は細胞内でタンパク質キナーゼとして機能する。これらのタンパク質は酵母から哺乳類まで広く真核生物種に保存されており、それらの欠損が老化・癌化の過程でゲノム不安定性を誘発することが明らかにされている。本年度は、早老症関連タンパク質の核内動態の解析とその制御機構を明らかにする目的で、①哺乳類培養細胞における早老症原因遺伝子産物の翻訳後修飾と核内局在化の解析、②モデル生物におけるテロメア-ATM/ATR 相互作用の解析、を行った。

昨年度までに我々はショウジョウバエチェックポイントタンパク質 mus-304 の哺乳類ホモログ (ATRIP) を単離している。これまで、ATRIP タンパク質が種々の DNA 傷害によりリン酸化を受けることを見いだしている。我々は DNA 傷害時に ATR 依存的にリン酸化される ATRIP のアミノ酸残基を同定した。興味深いことに、ATR によるリン酸化、あるいは ATR の非存在化においても ATRIP は核内で DNA 損傷時に特徴的な構造 (focus) を形成することが出来た。これらの結果は、ATRIP が ATR の核内動態を制御する因子であることを示す。

さらに我々は、出芽酵母において ATR と ATM が染色体テロメアと相互作用することを見いだした。両者のテロメアへの結合は相反的であり、細胞周期特異的な制御を受けていることを明らかにした。ATR のテロメアへの結合が異常テロメアや、複製の完了をモニターしていることを示唆するデータを得ている。これらの結果は、早老症関連因子が複製時の異常の蓄積を防止する機能を果たしていることを示している。

キーワード： 早老症、ATM、ATR、ゲノムインテグリティー、テロメア

A. 研究目的

細胞周期チェックポイント機構は、ゲノム上に生ずる内的、外的な傷害を監視し、修復するための機構であり、この機能により生体はゲノムのインテグリティを維持している。細胞周期チェックポイント機構は進化的に高度に保存されており、その欠損は様々な生物種においてゲノムの不安定化を誘起する。DNA損傷やDNA複製異常を監視するチェックポイント機構において中心的な役割を果たすタンパク質として、近年ATMファミリータンパク質が注目されている。これら一群のタンパク質は分子量200,000以上の巨大タンパク質であり、そのカルボキシ末端にリン脂質フォスファチルイノシトールをリン酸化する酵素が持つキナーゼドメインと相同なドメインを有し、DNA傷害に应答して活性化されるタンパク質キナーゼである。

ヒトに存在する二種の同ファミリータンパク質のうち、ATMはヒト染色体不安定化症候群 ataxia telangiectasia(AT)の原因遺伝子である。ATは個体レベルでは早発老化症状を呈し、また細胞レベルでは分裂寿命の短縮（細胞老化の促進）の表現型を示す。このことは、細胞周期チェックポイントの欠損がゲノム上の何

らかの傷の蓄積をもたらす結果として、個体・細胞レベルでの老化が引き起こされることを示唆している。しかし、これまでのところその詳細なメカニズムの解明には至っていない。

老化、老年病に対する予防・治療薬の開発への基礎的なアプローチとして、本研究は以下の2点を目的としている。1, 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。2, 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を構築する。

我々は、昨年度までにショウジョウバエチェックポイントタンパク質 mus-304 との相同性をもとに ATM と構造的に類似した ATR と協調的に機能する新規タンパク質 ATRIP を単離、同定した。本年度、このタンパク質の ATR 機能発現に対する影響を解析し、本因子が ATR の細胞内局在性を決定する因子であることを示唆する結果を得た。また、酵母を用いた解析により、ATM と ATR が相互に影響を与えつつ細胞内の DNA 恒常性を保っていることを明らかにした。これらの結果をもとに、ゲノム維持に関与するタンパク質複合体間の相

相互作用、その破綻によるゲノム恒常性の異常、その結果としての老化表現型の発現、という道筋が明らかになりつつある。本研究の研究成果は、今後ゲノム維持に関与するタンパク質複合体間の相互作用に着目した新規薬剤の開発により、老化過程を制御できる可能性を示唆している。

B. 研究方法

ATRIP のポリクローン抗体は、大腸菌にて生産し精製した glutathione S-transferase (GST)-hATRIP カルボキシ末端融合タンパク質、または合成ペプチドをウサギに免疫することにより得た。ATRIP のリン酸化特異的抗体は、リン酸化ペプチドをウサギに免疫し、血清をアフィニティー精製することにより作製した。ATR、Chk1,p53 に対する抗体、およびそれらのリン酸化特異抗体は、Oncogene 社、Cell Signaling Technology 社、Santa Cruz 社より購入した。

ATRIP のリン酸化部位変異は Stratagene 社の Quikchange キットを用いて導入した。正常型、変異型遺伝子は pCMV-tag3、pEF4-Mychis、pMXpuro、pMXneo のベクターに導入して遺伝子導入に用いた。レトロウイルスのパッケージングには VSV-G を使い、パントロピ

ックウイルスとして正常繊維芽細胞、ガン由来細胞株に導入した。

出芽酵母 Mec1p、Tel1p のクロマチン免疫沈降実験では、それぞれ 18xmyc タグ、5xHA タグを付加したタンパク質を内在性のプロモーターにより発現する株を作製し、それぞれのタグに対するモノクローン抗体、protein G-beads (Dyna)を用いてタンパク質-DNA 複合体を免疫沈降した。DNA とタンパク質のクロスリンクをはずした後、PCR によって特定の領域が増幅されるかどうかについて検討した。

C. 研究成果と考察

1. ATR-ATRIP の複合体形成機構と核内動態

ATR は哺乳類 ATM と分裂酵母 Rad3 に構造的に類似したタンパク質として同定された。ATR は紫外線、メチルメタンスルホン酸、過酸化水素などによる DNA 傷害、ヒドロキシ尿素やアフィディコリンによる複製阻害に際して活性化され、下流の因子をリン酸化することにより細胞周期チェックポイント情報の伝達に関与している。その欠損が遺伝性疾患をもたらす ATM とは異なり、ATR が原因となる疾患は今のところ見いだされていない。マウスオーソログのノックアウトは胚性致死となるこ

とから、ヒトでの欠損も同様に致死となると考えられる。

ATR の機能に関しては、前述のようにその欠損細胞が単離できないことから、その解析は今なお十分には進んでいない。我々は、ATR の機能制御複合体の一端を明らかにする目的で、ATR と結合する新規因子の単離を試み、昨年度までにショウジョウバエチェックポイントタンパク質 mus-304 の哺乳類ホモログ、Mus304(ATRIP)を同定した。

ヒトのホモログである hATRIP は、791 アミノ酸からなり、その構造的な特徴として、中央のアミノ末端側領域に coiled-coil 領域を持つこと、ATM や ATR によりリン酸化されるターゲットとなりうる SQ/TQ モチーフが散在すること、が挙げられる。昨年度までの研究で、我々は本タンパク質が DNA 損傷時に ATR 依存的にリン酸化されることを見いだしている。

まず我々は、ヒトとマウスで保存されている SQ/TQ 配列の Ser, Thr を Ala に改変した変異 ATRIP を網羅的に作製し、変異タンパク質の DNA 損傷時の挙動を解析することにより ATR 依存的にリン酸化される ATRIP の残基を決定した。次に、この部位のリン酸化特異的なポリクローナル抗体を作製し、ATR 依存的なリン酸

化が ATRIP の細胞内動態にどのような影響を与えるかについて解析した。

DNA 損傷時、特に電離放射線照射により損傷を導入した場合、ATR-ATRIP 複合体は細胞内に focus 上に存在するようになる。このとき、ATRIP をリン酸化特異的抗体で免疫染色すると、同様な focus 状の分布を示した。このことは、ATR-ATRIP の focus 形成に伴って ATRIP がリン酸化されることを示唆する。

このことをさらに詳細に解析するため、ATRIP のリン酸化部位を Ala に改変したタンパク質（以降 SA 変異 ATRIP と呼ぶ）を導入した細胞において、ATR-ATRIP が同様な focus を形成しうるかどうか、について検討した。SA 変異型 ATRIP は内在性の野生型 ATRIP のリン酸化を阻害することから、ATR 依存のリン酸化に対し dominant-negative な効果を持つことが明らかになった。しかしながら、内在性のタンパク質、SA 変異タンパク質はともに DNA 損傷後に focus を形成することができた。このことから ATR による ATRIP のリン酸化は DNA 損傷後の ATR の focus 形成には必須でないことが明らかである。

このことは、さらに ATR タンパク質の発現を RNAi により阻害した細胞を用いた解析により確認できた。