

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。

ATR と ATRIP は相互にタンパク量の調節を行っている可能性がこれまで示唆されている。細胞内のタンパク質複合体形成様式をゲルろ過を用いて解析した結果、ATRIP は常に自己二量体を形成し、その一部が ATR と複合体を形成していることが明らかになった。RNAi により ATRIP を減少させた場合、ATR はプロモーターが内在性、外来性であるかどうかに関わらず発現が低下した。その一方で、ATR を RNAi により減少させた場合は、内在性のプロモーターから発現している ATRIP は減少し、外来のプロモーター由来のものは現象が観察されなかった。このことは、ATR のタンパク質量は翻訳後のレベル、おそらく分解の段階で調節されていること、一方 ATRIP のそれは転写レベル、または翻訳レベルで行わ

れていることを示している。

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関与している。ヒトの ATM 欠損細胞 (ataxia telangiectasia (AT) 細胞)、出芽酵母の ATM に相当する *TEL1* 欠損株、あるいは分裂酵母の ATR (*rad3*) 欠損細胞では、正常株に比べて染色体末端に位置する反復配列 (テロメア配列) が短縮していることが観察され、これらの因子が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明らかである。また、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唆されている。つまり、出芽酵母あるいは分裂酵母において、両者の二重欠損は相乗効果を示し、テロメア配列が全く維持できないことにより細胞はやがて死に至る。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。

我々は、テロメアを染色体上の標的配列とし、ATM と ATR が標的配列に load されるか否か、されるとし

たらどのような分子機構で行われるか、を詳細に調べることにより、標的配列のゲノム情報の恒常性が保持されるメカニズムを解析出来ると考えた。そのため、それぞれの内在性のプロモーターより正常な機能をもったエピトープタグ (myc-tag あるいは HA-tag) を付加した ATM(Tell) および ATR(Mec1) を発現する出芽酵母株を作製し、細胞周期の各時期、または様々なテロメア異常変異株でのそれぞれのタンパク質の挙動をクロマチン免疫沈降法により解析した。

細胞周期が同調していない条件において、Mec1p 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、Mec1p 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 Mec1p 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 Mec1p のテロメアへの結合が増強されること、逆に Mec1p 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 Mec1p 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、Mec1p 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 Mec1p(ATR) を介して伝達されていることを示している。

細胞周期を同調した条件では、Mec1p のプロテインキナーゼ活性は S 期をピークにして変動する。一方 Tellp の活性は細胞周期でさほど変動しない。さらなる解析で Mec1p のキナーゼ活性はテロメア結合タンパク質の S 期における置換に必須であることが明らかになった。このことから、Mec1p は複製終結のモニタリング、あるいはテロメア複製のための複合体のインテグリティー制御、のためにテロメアに局在化していることが考えられる。

D. 討論

本研究において、我々は細胞周期チェックポイントに関与する新規因子 ATRIP の機能解析を行った。同因子はヒト ATM のパラログである ATR と結合し、チェックポイント情報伝達に関与する。本年度、我々は ATRIP が ATR の細胞内での局在化に重要な機能を果たすこと、また、ATR-ATRIP

が相互に細胞内のタンパク質量を制御していることを見いだした。この結果は、ATRIP が ATR の関与する情報伝達経路に critical な機能を発揮していることを浮き彫りにしている。

我々は、ATRIP の機能制御によりヒト正常繊維芽細胞に老化が誘導されることを昨年度までに見いだしている。本年度の結果と合わせて考えると、ATRIP の機能阻害型タンパク質の過剰生産が ATR 経路の量的、質的变化あるいは細胞内局在部位の変化を通して老化を誘導していることが考えられる。我々は繊維芽細胞の通常の老化過程において ATRIP が量的に低下していることを見いだしている。このことから、細胞老化において、ATR 活性を低下させるような何らかのシグナルが介在し、その結果として ATRIP 量の低下が誘導される可能性が考えられる。本研究の結果は、ATR が関与する細胞周期チェックポイント系が老化過程のマーカーとして利用できる可能性を示唆する。つまり、内在性の ATRIP 量、あるいは ATRIP 遺伝子のプロモーター活性を指標として細胞の老化状態を判定できるかもしれない。あるいは、ATR-ATRIP 経路を薬剤のターゲットとして、老化過程を制御する新規薬剤の開発が可能であるかもしれない。

最近、ATR-ATRIP の必須機能として、染色体上の特定部位の複製の正常な進行への関与が指摘されている。ATR の活性低下と老化との相関は、老化と DNA 複製の異常との関連を想起させる。これまで明らかになった早期老化症原因遺伝子はみな DNA の修復過程に関与している。DNA 修復異常が結果的に染色体の複製、分配異常をもたらすことを考えると、染色体上に異常の蓄積しやすい部位が存在し、加齢に伴いその特定部位における異常が増加している、というモデルが想起される。

そのような部位として考えられる領域として、染色体テロメアがある。我々はモデル細胞を用いた解析により、ATM と ATR が相反的にテロメアに結合していることを見いだした。また、短小化したテロメアの感知に ATR が関与していること、ATR がテロメア複製の調節に関与していること、を示すデータを得た。これらの結果は、本研究におけるヒト繊維芽細胞を用いた解析結果を補強するものである。モデル細胞を用いた解析をさらに続けることで、早期老化症原因遺伝子の欠損がもたらす病態が解明でき、創薬分野において多大な貢献をもたらすことが期待される。

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

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
- F. 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

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

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

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 室長

研究要旨

早期老化症の一つである末梢血管拡張性運動失調症（**Ataxia Telangiectasia** : **AT**）患者由来細胞においては、テロメア長の迅速な短縮により早期細胞老化を起こす。これまでに、テロメラーゼの触媒サブユニット（**hTERT**）遺伝子導入により不死化 **AT** (**AT/TERT**) 細胞を樹立し、テロメア長の伸長により細胞老化を起こさず不死化することを明らかにしてきた。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。

キーワード：早期老化症、細胞老化、酸化ストレス、**DNA** 障害

A. 目的

ヒトの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おり、細胞分裂ごとにテロメア **DNA** が短小化すると細胞老化に陥ることが知られている。一方、マウスの繊維芽細胞は、テロメア長とは無関係に培養条件化でのストレス (**culture shock**) によって細胞老化に陥る。また、**ras** がん遺伝子

の強制発現によっても細胞老化が誘導されることが知られている。さらに、**UV** や放射線などによる **DNA** 障害及び酸化ストレスによっても細胞老化が誘導されることが知られており、ストレス誘導性細胞老化 (**stress-induced premature senescence: SIPS**) といわれている。

早期老化症の一つとして知られている抹消血管拡張性運動失調症

(Ataxia Telangiectasia : AT) 患者由来の細胞においては、テロメア長の迅速な短縮により早期細胞老化を起こす。これまでに、テロメラーゼの触媒サブユニット (hTERT) 遺伝子導入により不死化 AT (AT/TERT) 細胞を樹立し、テロメア長の伸長により細胞老化を起こさず不死化することを明らかにしてきた。AT の原因遺伝子 ATM は、放射線や酸化ストレスなどの DNA 障害性ストレス応答に重要な機能を果たしており、細胞周期の停止 (細胞周期チェックポイント)・DNA 修復・アポトーシスを制御している。そこで、ATM を介した DNA 障害チェックポイント機構が、SIPS の誘導にも関与しているかどうかを AT/TERT を用いて検討した。

B. 研究方法

1. 細胞の培養

hTERT 発現 AT 細胞 (AT1KY/TERT、AT2KY/TERT、AT4KY/TERT、AT5KY/TERT、AT6KY/TERT) 及び正常細胞 (Normal/TERT) は、10%ウシ胎児血清、0.5 μ g/ml puromycin を含む DMEM 培地で培養した。

2. SIPS 誘導と細胞老化の解析

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。

3. 細胞周期の解析

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 にて解析した。

4. ウェスタンブロット解析

細胞を 50 mM Tris-HCl (pH. 7.4), 125 mM NaCl, 0.1 %(v/v) Nonidet P-40 (Sigma), 5 mM EDTA, 0.1 M NaF、プロテアーゼ阻害剤を含む溶液で溶解し、タンパク濃度を測定した。5 μ g の細胞溶解液を SDS-PAGE にて分離し、Hybond-P にブロットし、ATM、CHEK2、p21、 α -tubulin、p53、p38MAPK 及びリン酸化 p38MAPK に対する抗体、POD 標識 2 次抗体で標識し ECLplus にて検出した。

C. 研究結果

1. AT/TERT 細胞における SIPS 誘導

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するために、AT/TERT と Normal/TERT における SIPS の誘導を比較検討した。SIPS を誘導するために、55 Gy の X 線照射もしくは H₂O₂ による酸化ストレスを与え、5 日から 10 日間培養を行った。Normal/TERT 細胞は SIPS 誘導処理によって、扁平化した細胞になり、SA-β-gal 陽性になった (図 1)。

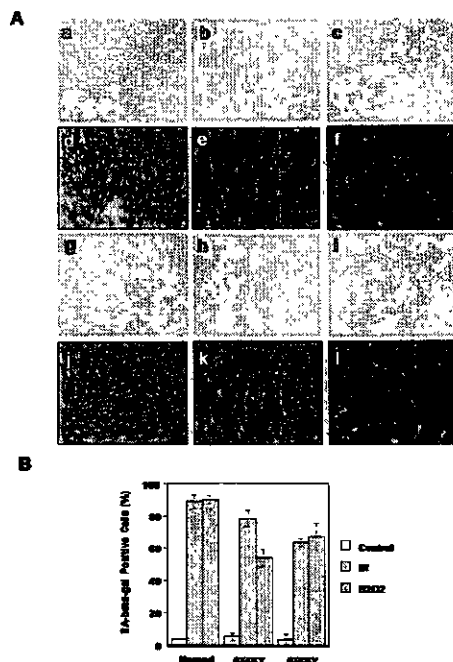


図 1. AT/TERT 細胞における SIPS 誘導
Normal/TERT 及び AT/TERT 細胞を無処理(a, d, g, j)、55Gy X 線照射(b, e, h, k)あるいは 500μM H₂O₂ 処理(c, f, i, l)を行い 10 日後に SA-β-gal 染色を行った。(A)Normal/TERT (a-f) 及び AT6KY/TERT 細胞の形態、SA-β-gal 染色(a-c, g-h)と PI 染色(d-f, j-k)。(B) SA-β-gal 陽性細胞の割合を示している。

同様に AT/TERT 細胞においても扁平化した細胞になり、SA-β-gal

陽性になり、細胞老化の形態を呈した (図 1)。また、細胞分裂能を維持しているかどうかを検討するために、SIPS 誘導後 5 日目の細胞の BrdU の取り込み (すなわち S 期の細胞) を FACS にて解析した結果、Normal/TERT 細胞と同様に AT/TERT 細胞においても BrdU 陽性細胞は 5%以下に減少していた (図 2)。即ち、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 が誘導されることを明らかにした。

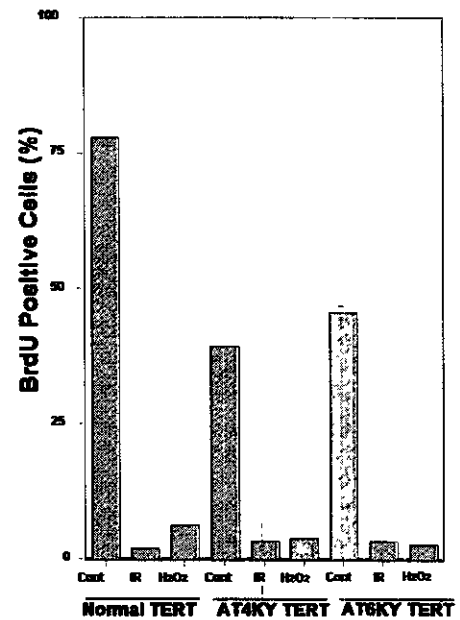


図 2.SIPS 誘導後の AT/TERT 細胞における DNA 合成
無処理、X 線照射及び H₂O₂ 処理後 3 日目の DNA 合成を BrdU でラベルし FACS にて解析した。

2. 細胞老化関連タンパク質の発現誘導とリン酸化

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。

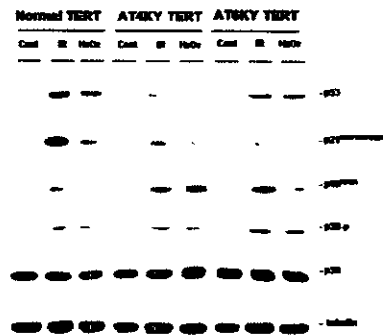


図 3.SIPS 誘導における細胞老化マーカータンパク質の発現とリン酸化
無処理、X線照射及びH₂O₂処理後6日目のp53、p21、p16の発現量とp38MAPKのリン酸化をウェスタンブロット解析した。

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(図3)。Rasがん遺伝子誘導性細胞老化においては、p38MAPKが重要な機能を果たすことが最近報告された。そこで、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(図3)。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。

D. 考察

細胞老化は、ある種の個体老化の

原因ともなると考えられる。一方、DNA障害性ストレスによって蓄積したDNAの変異による細胞のがん化を回避する手段の一つとも考えられている。X線やUV照射、酸化ストレスなどのDNA障害性ストレスによって細胞老化(SIPS)が誘導されるが、その分子メカニズムは明らかにされていなかった。私たちは、DNA障害チェックポイントに重要な機能を果たすATMがSIPSの誘導においても何らかの機能を果たしていると考えて、AT/TERT細胞におけるSIPS誘導を解析した結果、AT/TERT細胞においてもSIPSが誘導されることを見出した。これらのことからDNA障害性ストレスによって誘導されるSIPSには、DNA障害チェックポイントシグナルカスケードを介していないことが明らかになった。また、p38MAPKの活性化が、SIPSを含む細胞老化において一般的に重要な機能を果たしていることが示唆された。今後は、どのようなメカニズムによってp38MAPKが活性化されるかを明らかにすることが課題であると思われる。

E. 結論

DNA障害性ストレスによって誘導される細胞老化(SIPS)には、DNA障害チェックポイントシグナルカスケードは必須でなく、他の要因によって引き起こされる

p38MAPK の活性化が重要な役割を果たしている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Umeda J, Sano S, Kogawa K, **Motoyama N**, Yoshikawa K, Itami S, Kondoh G, Watanabe T, Takeda J. 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.

2. 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. DNA damage-induced G₂-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat. Cell Biol.* **4**: 993-997, 2002. (Published Online: 25 November 2002, DOI: 10.108/ncb884.)

3. Naka K, Ikeda K, **Motoyama N**. Recruitment of NBS1 into PML oncogenic domains (PODs) via interaction with SP100 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **299**: 863-871, 2002.

4. 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. Chk2-deficient mice exhibit increased radioresistance and defective p53-mediated transcription. *EMBO J.* **21**: 5195-5205, 2002.

5. Furukawa-Hibi Y, Yoshida-Araki K, Ohta T, Ikeda K, **Motoyama N**. FOXO Forkhead Transcription factors Induce G₂-M Checkpoint in Response to Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* **277**: 26729-26732, 2002.

6. Yoshida H, Okada Y, Kinoshita N, Hara H, Sasaki M, Sawa H, Nagashima K, Mak TW, Ikeda K, **Motoyama N**. Differential requirement for Apaf1 and Bcl-xL in the regulation of programmed cell death during development. *Cell Death & Differ.* **9**: 1273-1276, 2002.

7. Kobayashi Y, Watanabe M, Okada Y, Sawa H, Takai H, Nakanishi M, Kawase Y, Suzuki H, Nagashima K, Ikeda K, **Motoyama N**. 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, 2002.

2. 学会発表

1. 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 2-6, 2002.

2. 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 2-6, 2002.

3. 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（つくば）、2002（5 月 17、18 日）.

4. 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（東京）、2002（10 月 1 日～3 日）.

5. 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（東京）、2002（10 月 1 日～3 日）.

6. 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（横浜）、2002（12 月 11 日～14 日）.

7. 日比（古川）陽子、荒木（吉田）聖美、太田 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（横浜）、2002（12 月 11 日～14 日）.

B. 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）

分担研究報告書

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

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

ヒト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。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。出芽酵母では1) ゲノム、特にリボゾーム rRNA 反復遺伝子（以下 rDNA とする）の安定性の低下が寿命の短縮を引き起こしていること、2) 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こと、さらに最近、3) 早老症細胞においても rDNA の異常反復が上昇していること等から、rDNA の安定化機構が真核細胞の老化の過程に重要であると考えられる。

出芽酵母の rDNA は第 1 2 番染色体上に約 1 5 0 回繰り返して存在する。このような反復遺伝子では通常リピート間での相同組み換えにより、コピー数が徐々に減少していくが、rDNA ではコピー数安定化機構により、1 5 0 コピー前後で保持されている。その機構の一つが DNA 複製阻害活性に依存した遺伝子増幅作用で、これにより減ったコピー数を元に回復させている。もう一つの安定化の機構は、Sir2p に依存したリピート間での組み換え抑制（サイレンシング）で、Sir2p はヒストン脱アセチル化活性を持っていることから、クロマチン構造の変化が組み換えを抑えていると考えられる。本年度は、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ので報告する。

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、sister-chromatid cohesion。

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、ゲノムの安定性の低下に対し、より敏感であると考えられる。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、その安定性の維持に働く Sir2p を欠損させると確かに細胞の寿命は短縮し、逆に過剰発現させると長寿になる。また、rDNA の組み換えに必須である Fob1p を欠損させても同様に rDNA は安定化し長寿になる。これらのことから、出芽酵母では rDNA の安定性の低下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。さらに最近、ヒト早老症の細胞では、異常な rDNA の反復が正常細胞のそれに比べて 2 倍に上昇していることが判明された。

報告者の最終的な目標はゲノムの安定性と細胞老化の関係を解明することで、本研究課題においては、ゲノムの安定性維持のための分子メカニズムの解明を、特に酵母 rDNA を材料として用い目指す。

rDNA の安定化の為に、細胞は 2

つの戦略をとっている。一つは偶発的に起こる組み換えにより欠失したコピーを遺伝子増幅により回復させる方法で、この反応の中心的な役割を果たすのは前出の Fob1p である。Fob1p による DNA 複製阻害活性が組み換えのホットスポットとして機能し、unequal な sister-chromatid recombination を引き起こしてコピー数を上昇させている。もう一つの安定化戦略は、Sir2p による組み換えの抑制である。Sir2p はヒストン脱アセチル化作用を有することからクロマチン構造の変化を介して、組み換えや転写のサイレンシングに関わっていると予想される。しかし今のところ、その作用機序については何も判っていない。

本年度の研究目的としては、Sir2p に依存したクロマチン構造の組み換え抑制メカニズムの解明を目指し、特に unequal な sister-chromatid recombination を制御していると予想される sister-chromatid cohesion (SCC) を中心に解析を行なった。

B. 研究方法

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。ChIP 法とは、目的とするタンパク質と DNA との結合活性を検

出す方法である。まず細胞をホルマリンで処理しタンパク質と DNA の結合を固定化した。次に細胞を破壊し、さらに超音波破碎装置で DNA を約 500 bp の長さになるまで断片化した。この DNA と結合した状態のタンパク質を抗体、この実験では 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。SCC が 5S rDNA の近傍に存在することが米国のグループの研究により判明していたため、そこを中心に 1 kb おきに 4 つの PCR primer set を作成し、それぞれの領域の PCR 産物量を、免疫沈降前の DNA を鋳型行なった PCR 産物と比較することにより、どの領域がどれだけ沈降してきたか、つまり cohesin と結合していたかを決定した。同様の実験を *SIR2* が欠損した株でも行ない、*SIR2* 変異の SCC に対する影響を調べた。

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

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。

5S rDNA 近傍の SCC 領域は、Sir2p によりクロマチン構造が変化することが知られているので、その変化が SCC の成立に寄与していると考えられる。次に、SCC が rDNA の安定性維持に直接機能しているのなら、SCC 自身の変異でも *SIR2* 変異同様、rDNA が不安定になるはずである。このことを確かめるために 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。

また SCC は、細胞周期の S/G2 期での DNA 2 本鎖切断修復に必須であることが米国のグループの研究により明らかになっている。そのため SCC は sister-chromatid のずれを防ぐばかりではなく複製阻害点で生じる 2 本鎖切断修復にも機能していると考えられる。そこで同様に Smc1 タンパク質の温度感受性変異株を用いて、その染色体をパルスフィールド電気泳動で観察した。その結果、半許容温度下で rDNA を持つ 1 2 番染色体のみが、他の染色体に比べて著しく減少していることが判明した。さらにこの変化は複製阻害活性をなくすことで、見られなくなることから、複製阻害点で生じた DNA 2 本鎖切断の修復が出来ないためにこのような染色体消失が発生していると考えられる。

D. 討論

Sir2p はヒストン脱アセチル化作用を持つこと、そして *SIR2* 欠損株では rDNA の増幅速度を含む、組み換え頻度の上昇が見られることから、Sir2p は rDNA のクロマチン構造の変化を通して、組み換えを抑制して

いると予想されていた。本年度の研究成果で、Sir2p によるクロマチン構造の変化、特に 5S rDNA 周辺の変化が、SCC の成立に重要であり、その成立により rDNA の安定性が維持されていることが判明した。SCC 欠損による組み換えの活性化は *SIR2* 欠損同様、DNA 複製阻害活性に依存することから、そこで生じた DNA の 2 本鎖切断の修復の過程で、SCC は切断末端が隣のコピーにずれて相同組み換えを起こすのを防いでいると考えられる。さらに SCC の欠損下では 12 番染色体のみが消失していることから、SCC は DNA 複製阻害点での修復反応そのものにも関与していると考えられる。

SCC は、他の生物種からの知見より、ヘテロクロマチン領域に成立する傾向が指摘されていた。特に、セントロメア領域ではヘテロクロマチンの状態が SCC の成立に必須と考えられている。本研究で得られた結果からも、Sir2p による 5S rDNA 近傍のヘテロクロマチン化が SCC の成立に必要であると考えられる。その詳しい分子メカニズムの解明が今後の課題である。

E. 研究発表

1. 論文発表

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. 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（招待講演）

2. 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（口頭発表）

3. 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（口頭発表）

4. 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（招待講演）

5. 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）

6. 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（口頭発表）

7. 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（口頭発表）

F. 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

20020250

以降は雑誌/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。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

Progressive Rearrangement of Telomeric Sequences Added to Both the ITR Ends of the Yeast Linear pGKL Plasmid.

Gunge N, Takata H, Matsuura A, Fukuda K.

Biol Proced Online. 2003;5:29-42. Epub 2003 Feb 17.

DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1.

Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Celeste A, Ward I, Romanienko PJ, Morales JC, Naka K, Xia Z, Camerini-Otero RD, Motoyama N, Carpenter PB, Bonner WM, Chen J, Nussenzweig A.

Nat Cell Biol. 2002 Dec;4(12):993-7.

Recruitment of NBS1 into PML oncogenic domains via interaction with SP100 protein.

Naka K, Ikeda K, Motoyama N.

Biochem Biophys Res Commun. 2002 Dec 20;299(5):863-71.

Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription.

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.

EMBO J. 2002 Oct 1;21(19):5195-205.

FOXO forkhead transcription factors induce G(2)-M checkpoint in response to oxidative stress.

Furukawa-Hibi Y, Yoshida-Araki K, Ohta T, Ikeda K, Motoyama N.
J Biol Chem. 2002 Jul 26;277(30):26729-32. Epub 2002 Jun 04.

Differential requirement for Apaf1 and Bcl-X(L) in the regulation of programmed cell death during development.

Yoshida H, Okada Y, Kinoshita N, Hara H, Sasaki M, Sawa H, Nagashima K, Mak TW, Ikeda K, Motoyama N.
Cell Death Differ. 2002 Nov;9(11):1273-6.

Hydrocephalus, situs inversus, chronic sinusitis, and male infertility in DNA polymerase lambda-deficient mice: possible implication for the pathogenesis of immotile cilia syndrome.

Kobayashi Y, Watanabe M, Okada Y, Sawa H, Takai H, Nakanishi M, Kawase Y, Suzuki H, Nagashima K, Ikeda K, Motoyama N.
Mol Cell Biol. 2002 Apr;22(8):2769-76.