

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目:基盤研究(C)

研究期間:2006~2008

課題番号:18570005

研究課題名(和文) テロメア一本鎖突出維持に関与する新しい蛋白質の探索とその機能解析

研究課題名(英文) Analysis of novel proteins involved in single-strand telomere maintenance

研究代表者

上野 勝(UENO MASARU)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・准教授

研究者番号:90293597

研究成果の概要:

RPA は、DNA ダメージ時の修復、複製、相同組換えなど様々なプロセスに関与しているが、ヒト RPA のテロメアにおける機能は現在のところわかっていない。そこで本研究ではヒト RPA がヒト培養細胞においてテロメアでどのように機能するかを明らかにすることを目的とし、分裂酵母 rad11-D223Y に相当する変異をもつヒト発現用ベクター-hRPA70(D227Y)をヒト細胞に導入し、この変異 hRPA70 をヒト培養細胞に過剰発現したところ、テロメアが短小化することを発見した。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,400,000	0	1,400,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	660,000	4,260,000

研究分野:生物学

科研費の分科・細目:基礎生化学・遺伝・ゲノム動態

キーワード:テロメア、分裂酵母、ヒト細胞、RPA、Taz1、

1. 研究開始当初の背景

急速に進展する高齢化社会を豊かで活力に満ちたものとするためには、老化・老年病に関する研究を推進し、その成果に基づき、老化の制御と老年病の克服をはかることが重要な課題である。これまで二本鎖テロメア DNA の長さは細胞の老化と関係していると考えられていた。しかし正常細胞のテロメア一ゼの機能を阻害するとテロメア短小化が起る前に細胞が老化し、その時のテロメア一本鎖突出の長さは短くなることが報告された(Cell.2003,114,241-253)。このことから、二本鎖テロメア DNA の長さではなく、テロ

メア一本鎖突出の長さが細胞の老化と密接に関係していることが明らかになった。しかしテロメア一本鎖突出の維持機構はほとんど明らかにされていない。テロメア一本鎖突出の維持機構が解明されれば、基礎生物学の進歩に大きく貢献するだけでなく、細胞の老化を防止する新しい技術の開発に繋がることを期待できる。

2. 研究の目的

分裂酵母とヒトのテロメア関連蛋白質は構造と機能が比較的類似していると考えられている。従って分裂酵母のテロメア一本鎖

突出の制御に関連する新規蛋白質のヒトホモログもテロメア一本鎖突出の制御に関係する可能性がある。そこで本研究では、以下の2つの目標を立てて実験を行う。

目標1 これまでに申請者が発見した分裂酵母テロメア一本鎖構造維持関連蛋白質 RPA のヒトホモログがテロメア一本鎖あるいは二本鎖構造維持に関係するかどうかを明らかにする。

目標2 分裂酵母テロメア一本鎖あるいは二本鎖構造の維持に関係する新規蛋白質を発見する。

3. 研究の方法

(1) ヒト細胞を用いた研究

まず、分裂酵母テロメア一本鎖結合蛋白質 RPA のヒトホモログがテロメア一本鎖および二本鎖構造の制御に関係しているかどうかを明らかにする。ヒト細胞の蛋白質の機能を解析する方法として最近 siRNA 法がよく使われるが、siRNA では細胞分裂を数回行うと siRNA が効かなくなる。しかしテロメア構造の変化を観測するためには細胞分裂を多数繰り返す必要があると考えられる。そこで、本研究では変異を持った RPA を発現させ、数カ月培養したあとのテロメア構造を解析する。

(2) 分裂酵母を用いた研究

分裂酵母 *taz1 rad11-D223Y* 二重破壊株はテロメア DNA が消失することを発見している。*Rap1* は *Taz1* と同様破壊するとテロメアが伸長するが、*taz1* 破壊株と違って、テロメア近傍での DNA 複製が停止するというのではないことが報告されている。そこで、*rap1 rad11-D223Y* 二重変異株を作成し、テロメア DNA が消失するかどうかを調べた。また、最近分裂酵母 RPA の小サブユニットである *ssb3* 破壊株が生育可能であることがわかった。そこで、*ssb3* 破壊株のテロメアの長さが異常かどうかや、*taz1 ssb3* 二重破壊株はテロメア DNA が消失するかどうかを調べる。DNA ダメージチェックポイントにおいて RPA は *rad3* と同経路で機能することがわかっている。また *rad32 rad3* 二重破壊株、*tel1 rad3* 二重破壊株はテロメアが消失することが報告されている。そこでテロメアでも *ssb3* と *rad3* が同経路で機能するかどうかを調べるために、*rad32 ssb3* 二重破壊株、*tel1 ssb3* 二重破壊株を作製し、テロメアが消失するか確認した。

4. 研究成果

(1) ヒト細胞を用いた研究

①分裂酵母 *rad11-D223Y* に相当する変異 *hRPA70(D227Y)* を過剰発現するヒト培養細胞を作製した

ヒト培養細胞において RPA 複合体の機能を変化させたときのテロメア構造への影響を調べるため、分裂酵母 *rad11-D223Y* に相当する変異をもつヒト細胞発現用ベクター *hRPA70(D227Y)* を作成し、HT1080 細胞にウイルス感染を行い遺伝子導入し、TAB182N(テロメアの機能に影響しないタンパク質。コントロール)、*hRPA70*、*hRPA70(D227Y)* を過剰発現させた。導入遺伝子を長期安定的に発現させるため、遺伝子導入を行ったレトロウイルスベクターに薬剤耐性遺伝子を挿入し、ベクターとして利用した。パッケージング細胞にレトロウイルスベクターを導入すると、組み換え型レトロウイルスを産生する。これを感染させるとホストの染色体に組み込まれ、安定した発現が期待できる。ウイルス感染による遺伝子発現をウエスタンブロッティングにより確認後 (Fig.13B)、約 PD=50 まで長期培養を行った。

②ヒト培養細胞において *hRPA70(D227Y)* を過剰発現するとテロメアが短小化する

約 PD=8、30、50 でのそれぞれの細胞のゲノム回収を行い、サザンハイブリダイゼーションによってテロメア長に変化が起きているか調べると、*hRPA70(D227Y)* 過剰発現細胞でテロメア長が短くなっているように見えた。そこで、FUJIFILM Multi Gauge V3.0 を使って各細胞のバンドのピーク値を調べてみると、*hRPA70(D227Y)* 過剰発現細胞では初期の細胞 (PD=8) は他の細胞と同じくらいのテロメアの長さだが、細胞を継代していくとテロメア長が PD=8、約 5900bp から PD=50、約 3900bp へと約 2000bp 短くなっていることがわかった。さらに、シグナル全体のシフトを観察するために各細胞のシグナルをグラフ化してみると、*hRPA70(D227Y)* 過剰発現細胞だけ明らかにシグナル全体がシフトしていた。

③ヒト培養細胞において *hRPA70(D227Y)* を過剰発現すると内在の *hRPA70* の発現量が落ちる

Myc 抗体での発現確認をみると、PD=50 では *hRPA70(D227Y)* の発現が極端に少なかった。また、RPA70 抗体での発現確認とあわせてみると、PD=8 での *hRPA70(D227Y)* の発現は、Myc 抗体でのシグナルに比べると、RPA70 抗体でのシグナルがごくわずであった。これは RPA70 抗体が *hRPA70(D227Y)* に結合できていない可能性がある。しかし、

このことを考慮しても、hRPA70(D227Y)過剰発現細胞での RPA70 抗体を用いたシグナルは、内在性 hRPA70 の発現量が変化しないと思われる TAB182N 過剰発現細胞での RPA70 抗体を用いたシグナルよりも極端に弱い。細胞を継代している途中で生育速度など、目立った表現型はなかった。そこで FUJIFILM Multi Gauge V3.0 を使って Myc、RPA70 抗体での発現量(シグナル強度)を数値化した。Myc、RPA70 抗体での発現量を Fig.16C の CBB 染色の矢印の位置のバンドの発現量で割り、さらに Myc/CBB では PD=8 の hRPA70 の値を、RPA70/CBB では PD=30 の TAB182N の値を基準(=1)に相対化した。その結果、hRPA70(D227Y)の発現は、遺伝子導入後からしだいに落ちていることがわかった。また、hRPA70(D227Y)過剰発現細胞は TAB182N 過剰発現細胞(hRPA70 の発現量は HT1080 細胞と同じと考えられる)よりも初期の段階から内在性の hRPA70 の発現が落ちている。

④hRPA70(D227Y)過剰発現細胞のテロメア一本鎖 DNA に変化はなかった

細胞より抽出したゲノム DNA を制限酵素 Hinf I、Rsa I で処理し、電気泳動後ゲルを gel dryer で dry up し、バックグラウンドとして G プローブでテロメアを検出した。次に G-tail に相補的な C プローブでテロメアを検出した。サザン解析におけるハイブリダイズを二本鎖 DNA 状態のゲル上で行うため、テロメアプローブは一本鎖 DNA 部分である 3'突出のみハイブリダイズする。よってシグナルの濃淡が一本鎖突出を示すことになる。結果としては hRPA70 過剰発現細胞と hRPA70(D227Y)過剰発現細胞との間には顕著なシグナル差が見られなかった。このことにより、hRPA70(D227Y)過剰発現細胞ではテロメア一本鎖突出に変化がないと考えられる。

(2) 分裂酵母を用いた研究

①rap1 Δ rad11-D223Y 株のテロメアは消失しない

taz1 破壊株のテロメア DNA 近傍での DNA 複製が異常になるという報告により、Taz1 と複合体を形成する Rap1 についての研究を行った。rap1 破壊株もテロメア DNA が野生型に比べ数倍に伸び一本鎖突出が生じるが、テロメア DNA 近傍での DNA 複製は正常という表現型を示す。このため rad11-D223Y と二重変異株にすることでテロメア DNA が消失するかどうかを調べた。rad11-D223Y 変異株にヒートショック法を用いて rap1::kan インサートを形質転換して rap1 rad11-D223Y 二重変異株を取得した。

この株のゲノムを回収し Southern Hybridization を行った結果、rap1 rad11-D223Y 二重変異株ではテロメア DNA は消失しなかった。

これにより taz1 rad11-D223Y 二重変異株の急激なテロメア DNA 消失には複製進行異常が関係しているかもしれないことが示唆された。また、rap1 破壊株に比べて rap1 rad11-D223Y 二重変異株のテロメア長が短くなっていることから、rad11-D223Y 変異によってテロメアーゼ活性が阻害されている可能性も示唆された。

②ssb3 Δ taz1 Δ 二重破壊株のテロメアは消失しない

また、分裂酵母において RPA 複合体の小サブユニットをコードする ssb3 を破壊した株が他の研究室によって取得された。そこで ssb3 と taz1 または rap1 を破壊した時に rad11-D223Y 変異株と同じようにテロメアが消失するかどうか調べた。ssb3 破壊株と taz1 破壊株、rap1 破壊株を接合し培地選択をおこなって ssb3 taz1 二重破壊株、ssb3 rap1 二重破壊株を取得した。それぞれの破壊株をゲノム回収し、サザンハイブリダイゼーションを行ってテロメア長を確認してみたところ、WT と比べて ssb3 破壊株は短く、taz1 破壊株に比べて ssb3 taz1 二重破壊株も短くなっており、rad11-D223Y 変異と同じように ssb3 破壊によってテロメアーゼ活性が阻害されている可能性が示唆されたものの、ssb3 taz1 二重破壊株のテロメアが消失することはなかった。このことから、ssb3 破壊によっては rad11-D223Y 変異と同じような表現型は示さないことがわかった。

③ssb3 破壊株は rad3 破壊のような表現型は示さない

DNA ダメージチェックポイントで RPA と共同で働くたんぱく質として Rad3 (出芽酵母では mec1) がある。rad3 Δ 株ではテロメアが短くなり、また、Rad32-Rad50-Nbs1 DNA 修復タンパク質複合体をコードする rad32 との二重破壊株、rad32 rad3 二重破壊株ではテロメアが消失する。tel1 rad3 二重破壊株でもテロメアが消失する。そこで接合により、rad32 ssb3 二重破壊株、tel1 ssb3 二重破壊株を作製し、テロメアが消失するか確認した。tel1 ssb3 二重破壊株ではテロメアが消失せず、また、rad32 ssb3 二重破壊株でもテロメアが 200bp ぐらいに短くなっているものの、テロメアが消失することはなかった。また、rad3 ssb3 二重破壊株のテロメア長は rad3 破壊株と同じ短小化を示しているので、Ssb3 と Rad3 は同じエピスタティックなテロメア維持機構のグループであるといえる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

(1) Yukawa M, Yo K, Hasegawa H, Ueno M, and *Tsuchiya E. Rpd3/HDAC complex is present at the URS1 cis-element with hyperacetylated histone H3. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73. 378-384. (2009). 査読あり

(2) Daicho K, Maruyama H, Suzuki A, Ueno M, Uritani M, Ushimaru T. The ergosterol biosynthesis inhibitor zaragozic acid promotes vacuolar degradation of the tryptophan permease Tat2p in yeast. *Biochim Biophys Acta.* 1768. 1681-1690. (2007). 査読あり

(3) Tatsuya Kibe, Yuuki Ono, Koichiro Sato and Masaru Ueno*. Fission yeast Taz1 and RPA are synergistically required to prevent rapid telomere loss. *Mol. Biol. Cell.*, 18, 2378-2387. (2007). 査読あり

(4) Uritani M*, Hidaka H, Hotta Y, Ueno M, Ushimaru T, Toda T. Fission yeast Tor2 links nitrogen signals to cell proliferation and acts downstream of the Rheb GTPase., *Genes Cells.*, 11, 1367-1379. (2006). 査読あり

[学会発表] (計12件)

国際学会

(1) 2009年5月14日から5月16日、Switzerland-Japan Meeting on the Molecular Mechanisms Regulating Chromosome Dynamics and Genome Stability、スイス、ビラルス、招待講演、上野 勝、ROLES OF POT1 AND RECQ HELICASE IN GENOME STABILITY

(2) 2009年4月28日から5月2日、Cold Spring Harbor Laboratory Meeting Telomere and Telomerase、米国、ニューヨーク、口頭発表、上野 勝、ROLE OF RECQ HELICASE AT DYSFUNCTIONAL TELOMERE

(3) 2008年9月15日から19日、EMBO Conference "Telomeres and the DNA damage response 2008"、スイス、ビラルス、ポスター発表、上野 勝、Roles of Pot1 and RecQ helicase in telomere maintenance

(4) 2008年6月22日から6月27日、FASEB Summer Research Conference on Yeast

Chromosome Structure, Replication and Segregation、米国、アリゾナ、招待講演、上野 勝、Roles of fission yeast Pot1 and Rqh1 in telomere maintenance

(5) 2007年11月30日から12月1日、Tolmach symposium on Chromosome Structure and DNA Repair at Washington University St. Louis、米国、セントルイス、口頭発表、上野 勝、Telomere loss in pot1 disruptant is suppressed by deletion of RecQ helicase.

(6) 2007年6月11日から6月16日、The 4th International Fission Yeast Meeting、デンマーク、コペンハーゲン、口頭発表、上野 勝、Telomere loss in pot1 disruptant is suppressed by deletion of RecQ helicase rqh1

(7) 2007年5月2日から5月6日、Cold Spring Harbor Laboratory Meeting Telomere and Telomerase、米国、ニューヨーク、口頭発表、上野 勝、Telomere loss of pot1 disruptant is suppressed by deletion of RecQ helicase, but pot1 srs2 double mutant is synthetically lethal

(8) 2006年8月30日から9月3日、Telomeres and Genomic Stability 2006、スイス、ビラルス、招待講演、上野 勝、Roles of fission yeast RPA in telomere maintenance

国内学会

(1) 2009年1月24日、日本農芸化学会中四国支部第23回講演会(例会)、高知、招待講演、上野 勝、DNA修復や複製に関する蛋白質のテロメアにおける機能の解明

(2) 2008年3月26日から28日、日本農芸化学会2008年度大会、名古屋、2008年度農芸化学奨励賞受賞講演、上野 勝、DNA修復や複製に関する蛋白質のテロメアにおける機能の解明

(3) 2007年12月11日から12月15日、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会、横浜、ワークショップ(テロメア研究の最前線)オーガナイザーおよび口頭発表、上野 勝、分裂酵母 pot1 破壊株のテロメア消失は RecQ ヘリケースの破壊によって抑圧される

(4) 2007年9月19日から21日、日本遺伝学会第79回大会、岡山、口頭発表、上野 勝、分裂酵母 pot1 破壊株のテロメア

消失は RecQ ヘリケースの破壊によって抑圧される。

[その他]

ホームページアドレス

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/scmueno/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 勝 (UENO MASARU)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・准教授

研究者番号:90293597

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者