

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18390500

研究課題名（和文）

FEN1 はアンチエイジングに関与しているか？

研究課題名（英文）

Is FEN1 involved in the anti-ageing machinery?

研究代表者

中村 卓 (NAKAMURA TAKASHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30172406

研究成果の概要：①ヌクレアーゼ活性を失わせた FEN1 (nuclease-defective FEN1, ND FEN1) をユラーゲンプロモータにより発現させたトランスジェニックマウスを長期間観察した結果、一部のトランスジェニックマウスに脱毛や体重減少、脾臓の肥大化、腎臓ののう胞形成など早期の老化によるものと思われる形態学的変化を認めた。しかしながら脊椎の側弯や寿命の短縮は認められなかった。②このマウスに長期間(5 か月)にわたって紫外線 (UV-B) の皮膚照射を続けた後、紫外線照射からの回復過程を観察すると NDFEN1 トランスジェニックマウスでは 22 匹中 13 匹に悪性腫瘍の発生をみた。一方、野生型マウスでは 24 匹中 7 匹に悪性腫瘍の発生が認められた。③ND FEN1 をテトラサイクリンの存在下で発現するように遺伝子組み替えをした細胞では、低酸素分在環境下において、DNA 修復の制御に重要な役割を果たしている H2AX のリン酸化を抑制できない状態であることがわかった。これらの結果から FEN1 の活性が失われると DNA の修復が円滑に行われず、そのために更に H2AX の活性が亢進し、老化や紫外線に対する発癌作用を助長していると考えた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2007 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	15,500,000	4,650,000	20,150,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：FEN-1, 老化, トランスジェニックマウス, 脱毛, 骨粗鬆症

1. 研究開始当初の背景

Flap endonuclease 1 (FEN-1) は DNA の複製や修復の際に生じた DNA からみ出した余分な “flap” 部分の除去に働く酵素である。従って、FEN-1 は DNA 複製に伴って生じた Okazaki 断片や DNA 2 重鎖切断修復の際の組み換え修復

(recombination repair) や、紫外線やアルキル化剤により、変異した塩基を取り除く際の塩基修復除去において、endonuclease として働き、5-flap の基点を切断する。また、FEN-1 は 5' → 3' exonuclease としても働き DNA 複製の際に生じた RNA プライマーの 5' 末端のり

ポヌクレオチド除去に関与するとされている。以上の結果はその殆どが *in vitro* で確認されてきた。しかしながら、実際に細胞内で FEN-1 がどのように働いているかについては不明な点が多かった。

老化と DNA 代謝とは接に関連しているといわれている。また、FEN1 は早老 のモデルである Werner 症候群の原因遺伝子との相互関係が示唆されている。したがって老化の FEN1 は何らかの重要な役割を果たしていると考えられた。

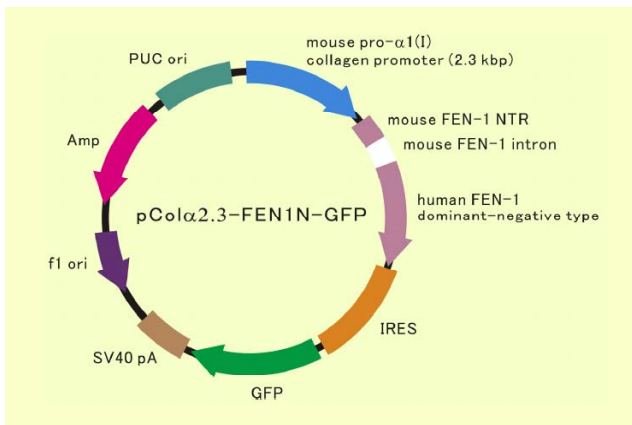
2. 研究の目的

(1) I 型コラーゲンプロモータの制御下でヌクレアーゼ活性を失った FEN1 を発現させたトランスジェニックマウスを使って老化における FEN1 の役割を調べる。

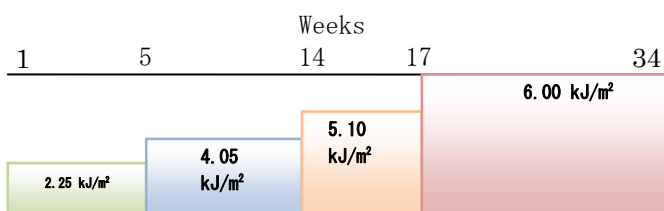
(2) 紫外線による皮膚の修復過程における FEN1 の役割、特に紫外線誘発による癌化プロセスでの FEN1 の役割を調べる。

3. 研究の方法

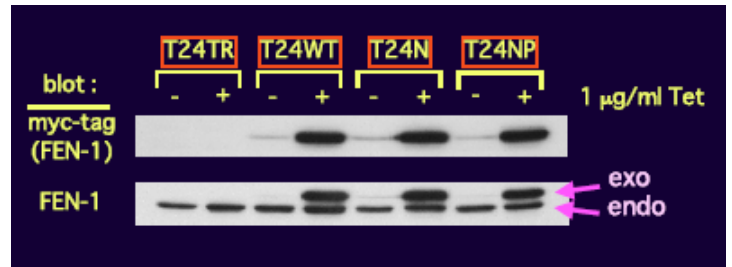
(1) トランスジェニックマウス作製については、改良した Gordon らの方法 (Proc Natl Acad Sci, USA77, 7380, 1980) で行った。使用したプラスミドを下図に示す。このプラスミドには I 型コラーゲンプロモータの下流にヌクレアーゼ活性を FEN1 を結合させている。



(2) 紫外線照射は UVB(波長 nm) は隔週毎に 34 週行った。プロトコールを下図に示す。



(3) 細胞レベルでの解析には ND FEN-1 の発現がテトラサイクリンの存在下のみ誘導されるようにしたヒト膀胱癌細胞株 T24 (T24N) を用いた。比較の為に野生型 FEN1 (T24WT) PCNA 結合能を失活させた FEN1 をテトラサイクリン存在下で発現するよう遺伝子操作を行った。T24WT ならびに T24NP も使用した。テトラサイクリン存在下での野生型ならびに変異型 FEN1 の発現の程度を下図のウェスタンブロットに示す。



4. 研究成果

(1) FEN1 トランスジェニックマウスにおける老化の促進

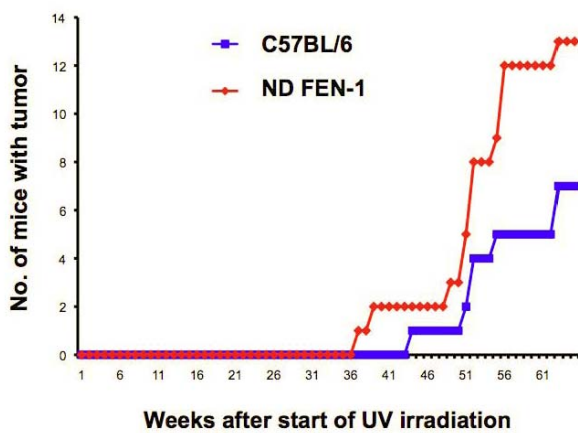
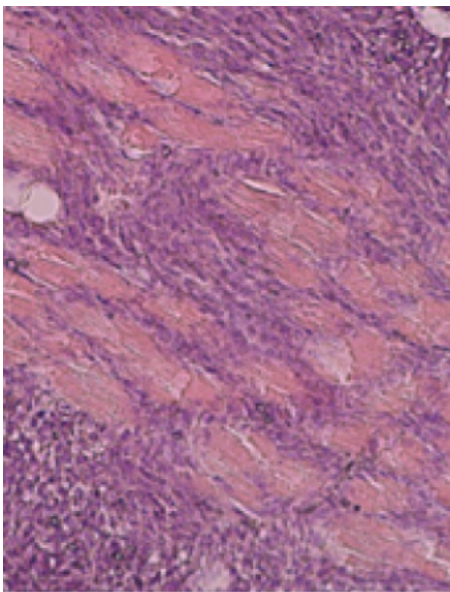
ヌクレアーゼ活性を失った FEN1 を発現したトランスジェニックマウスは老化が進んでいることを示すいくつかの形態学的特徴をもっていた。これらは a) 体重の減少、b) 脱毛、c) 脾臓肥大などであった。寿命の短縮、骨粗鬆症、発癌は認めなかった。発生した個体の代表的な例を下図に示す。



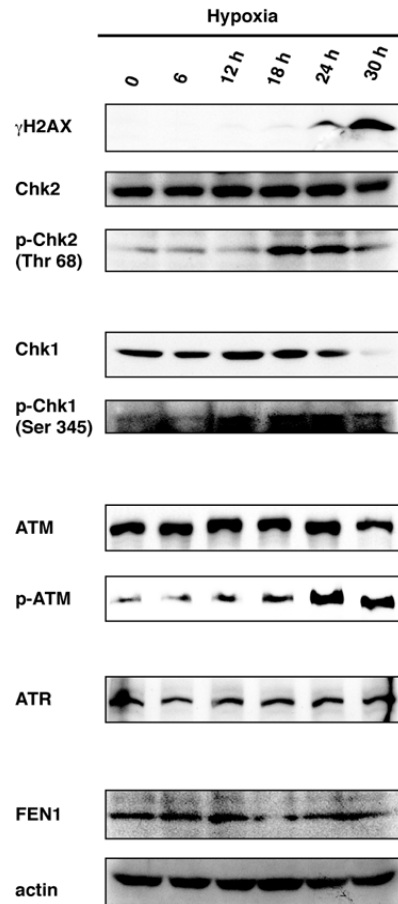
(2) トランスジェニックマウスにおける紫外線発癌誘導

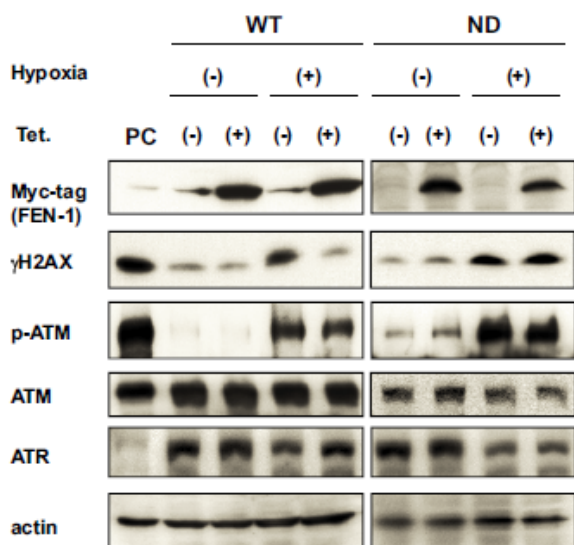
紫外線照射後の回復過程においてヌクレアーゼ活性を失った FEN1 を発現させたトランスジェニックマウスでは、22 匹中 13 匹 (59%) において、一方野生型マウスでは 24 匹中 7 匹 (29%) において悪性腫瘍の発生を観察した。典型的な発症例と全観察経過のデータをも

とにした Kaplan-Meier 解析の結果を下図に示す。



(3) FEN1 活性と H2AX リン酸化との関連
次に、個体レベルでこのような異常がどうして起こるのか、その原因を解析する目的でヌクレアーゼ活性を失った FEN1 を発現させたヒト膀胱癌細胞を使って、低酸素分圧環境下において、DNA 障害修復機構がどのように働いているのかを調べた。H2AX は DNA の修復過程の初期の段階に関与する蛋白質である。DNA の障害は上流の ATM あるいは ATR で感知し、ヒストン蛋白の一種である H2AX のリン酸を介してより下流の DNA 修復酵素の働きを調節している。野生型 FEN1 を強制発現させた T24 細胞 (T24WT) では低酸素分圧環境下におかれると、24 時間後に H2AX のリン酸化が促進される。その後リン酸化はもとの状態にもどることがわかった (下図左パネル)。しかしながらヌクレアーゼ活性を失った T24 を強制発現させた T24 細胞 (T24ND) では、H2AX のリン酸化がもとの状態にまでなかなかもどらない (下図右パネル)。したがって FEN1 が働かないことで H2AX のリン酸化の制御がこわれてしまっていると考えた。したがってこれらの結果より FEN1 ヌクレアーゼ活性の失活に伴う個体レベルにおける老化や発癌の促進は FEN1 による H2AX のリン酸化制御がうまく働かないために生じたものであることが示唆された。





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 1 件)

①片山郁夫、佛坂由可、松山俊文、角忠輝、中村卓、Ionizing radiation induces macrophage foam cell formation and aggregation through JNK-dependent activation of CD36 scavenger receptors、Int J Radiat Oncol Biol Phys、70(3) 835-846、2008、査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 卓 (NAKAMURA TAKASHI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：30172406

(2) 研究分担者

角 美佐 (SUMI MISA)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：90284702

佛坂 由可 (HOTOKEZAKA YUKA)
長崎大学・医学部・歯学部附属病院・講師
研究者番号：10244089

田代 茂樹 (TASHIRO SHIGEKI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：20300882

角 忠輝 (SUMI TADATERU)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：80284701

市川 陽子 (ICHIKAWA YOUKO)
長崎大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号：90380857