

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830065

研究課題名(和文)メダカの特ロメア・テロメレース動態 - テロメア伸縮変動の可能性 -

研究課題名(英文)Telomere and telomerase dynamics of the medaka, *Oryzias latipes*

## 研究代表者

畠山 仁 (Hatakeyama, Hitoshi)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・助教

研究者番号：30350177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：メダカは幼年期(0～7ヶ月)の急激な成長に伴いテロメア長は著しく短縮するが、成長が鈍化する青年期(7ヶ月～1年)にはテロメレース活性度を高めてテロメア長を回復し、老年期(1～4年)にはテロメレース活性が徐々に低下して緩やかにテロメア長が短縮することを確認した。したがって、魚類の生体内ではテロメレース活性を有していることが単純にテロメア長の伸長につながっているのではなく、テロメレース活性および成長の度合いによりテロメア長の制御が行われていることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：In the present study I measured telomere length, telomerase activity and body growth of *Oryzias latipes* from the embryo stage until senescence. During the rapid growth stage (age 0 - 7 months), telomeres shortened in parallel with decreasing telomerase activity. Then, during adolescence (age 7 months - 1 year), telomeres lengthened quickly as growth slowed and telomerase activity increased. In the adult stage (age 1 - 4 years) characterized by little growth, telomerase activity decreased gradually and telomeres shortened. My data indicate that telomere attrition and restoration are linked to growth and telomerase activity, and suggest that critical loss of telomere homeostasis is associated with mortality in this animal.

研究分野：生物学

キーワード：メダカ テロメア テロメレース 成長 老化

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) DNA・テロメアおよびテロメラーゼの構造

DNA は五炭糖 (デオキシリボース) とリン酸、塩基から構成される核酸である。塩基はアデニン(A)・グアニン(G)・シトシン(C)およびチミン(T)の4種類ある。DNA は2本の DNA の鎖からなる二重らせん構造をしている。2本の DNA 鎖を結合させている力は塩基間の水素結合である。塩基間の対合は特異的で、必ず A は T と、G は C とが結合する。二重らせん構造をとる DNA のそれぞれの鎖はポリヌクレオチドである。DNA ポリヌクレオチドはデオキシリボースの5'位の炭素と次のデオキシリボースの3'位の炭素がリン酸ジエステル結合によって結びつけられており、これが繰り返されて DNA 鎖の骨格となっている。

テロメアは真核生物の染色体の長・短腕の末端に存在し、ヒトを含めた脊椎動物のテロメアは 5'-TTAGGG-3' (反対鎖は 3'-AATCCC-5') の繰り返し DNA 配列を持ち、このパターンは脊椎動物以外の種では異なることもあるが、いずれも G に富んだ塩基配列をしている。その主な役割は結合する種々のタンパク質と共同して染色体の癒合や DNA の損傷、変性を防ぎ、染色体の安定に貢献している。テロメアはある一定の長さ、単鎖の突出部分の存在とテロメア結合タンパク質の3要素の連携により正常に機能する。テロメアの3'末端の単鎖の突出はテロメア3'オーバーハングと呼ばれ、テロメアの二重鎖部分に結合し、結合部分は単鎖と二本鎖からなる小さなDループとなる。末端から結合部までのテロメアは大型のTループになり、これらのループ構造は単鎖の突出を覆い隠す末端を保護する役割を果たしている(キャップ構造)。テロメアには結合タンパク質 (TRF1、TRF2 など) が知られている。TRF1 の過剰発現がテロメア短縮を導くことから、テロメア長を規定する結合タンパク質のカウント機構の存在が示唆されている。

テロメア長は、ヒトの正常体細胞では細胞分裂の度に 50-100 塩基対 (bp) ずつ短縮することが知られている。これは DNA 複製時に DNA ポリメラーゼが 5'から 3'の方向にしか DNA 合成できないことにより、娘鎖 DNA の5'最末端部分が複製されないことに起因する、いわゆる「末端複製問題」による。ただ、単鎖の3'オーバーハングは DNA の両末端に存在することがわかっており、娘鎖の3'最末端側では複製後に鋳型鎖の末端からの消化が起きて、3'オーバーハングを形成するものと考えられている。

近年、老化とがん化を直接結びつけるものとして、テロメアとテロメア合成酵素 - テロメラーゼが注目されている。テロメアは細胞分裂により短縮する。テロメアの伸長は通常テロメラーゼによって行われる。テロメラーゼは一種の逆転写酵素であり、テロメア構造

の鋳型となる RNA 成分 (TERC) と、触媒サブユニットである TERT からなる。体細胞ではテロメアが細胞の生存の限界まで短縮すると分裂限界に至り、細胞死を迎える。一方、無限ともいべき細胞分裂を必要とする生殖細胞や血液幹細胞では、主にテロメラーゼによりテロメアの伸長維持が図られている。

### (2) テロメア研究の経緯と現状

現状ヒトの臓器由来の培養系体細胞は分裂回数が通常 50 回前後に制限されており、「ヘイフリック限界」と呼ばれている。「細胞老化」はこのヘイフリック限界に達した細胞の状態を指す。細胞老化に至った細胞では、若い細胞に比べてテロメアの短縮が見られることから、細胞老化のプログラムにテロメアが関与していると考えられている。しかし、細胞老化に至った細胞では、約 6,000bp すなわち 6 キロ塩基対 (kbp) のテロメア長を持っており、テロメアの長さが限界に達したために増殖停止したと考えるよりは、それ以上短縮することによる染色体の不安定化と、その結果としての細胞死を制御する機構として、細胞老化のプログラムがあると思われる。この培養系の知見から、生体においても細胞分裂を行っている組織では時間の経過とともに分裂回数が増加するため、加齢に伴いテロメアが短縮すると考えられている。実際に、ヒトの新生児では各組織で 12-15kbp の長さであるが、加齢に伴って年 20-50bp 短縮することが知られている。またヒト以外では、齧歯目の野生種由来の近交系マウス *Mus spretus* とラット *Rattus norvegicus* およびロバ *Equus asinus* などの哺乳類、そしてキンカチョウ *Taeniopygia guttata*、ミドリツバメ *Tachycineta bicolor* およびアデリーペンギン *Pygoscelis adeliae* などの鳥類で加齢に伴うテロメア短縮が報告されている。

しかし、テロメア研究において、哺乳類・鳥類ではその寿命が比較的に長いため、成長、老化兆候および寿命を同一種で詳細に調査した報告はない。そこで、研究代表者らは脊椎動物のテロメア生物学の分野で、胚から老年までを通してテロメアとテロメラーゼの動態を調査すべく、脊椎動物の魚類のメダカ *Oryzias latipes* を老化モデル動物として、テロメアおよびテロメラーゼの動態を総合的に調査した。その結果、メダカは加齢によるテロメア長の短縮が心臓、脳以外でみられ、さらに同個体では臓器間のテロメアの相関が多く、多くの臓器で認められた。これはヒトと類似した結果である。またメダカは生涯テロメラーゼ活性を有し、ヒトの腫瘍系細胞 SiHa 細胞より 2~4 倍の活性が認められた。メダカのテロメア短縮は成熟後より成長期で激しく、体サイズ増加も同様であった。よってテロメアと体サイズは逆相関の関係であることが確認できた。メダカは生涯高いテロメラーゼ活性を持っているが、一方で加齢に伴

いテロメアを短縮させていた。この相反する結果から仮説的結論を導くと、メダカはテロメレース活性によって継続的な成長をするが、テロメア長の維持に関しては活性が不十分であることが考えられる。したがって、テロメア長が短縮し、老化することが示唆された。本研究では以下の目的に示す3つの課題を明らかにし、テロメア生物学を進展させることにした。

## 2. 研究の目的

(1) 研究代表者が既に報告しているメダカに加齢に伴うテロメア長およびテロメレース活性動態の解明を進展させ、試料を全身に統一して孵化から加齢死までテロメア・テロメレース動態を徹底的に検索して、強固な基礎データを作成する。

(2) 今まで研究代表者は、成熟前は全身の、成熟後は臓器別のテロメア長を測定していた。したがって個体全身のテロメア長に関しては胚から6ヶ月齢までしか測定していない。生涯のテロメア動態を解明するためにも、成熟後の全身のテロメア長を測定する必要がある、これらを遂行すると孵化から加齢死までの'Whole body'としてのテロメア・テロメレース動態を連続したデータとして示すことが可能となる。また幼年期に顕著なテロメア短縮した後テロメアが伸長する可能性があり、これを検証する。

(3) テロメア生物学分野において、統計分析は一般に頻度主義に基づいた仮説検定が用いられてきていた。しかし、今回はテロメア長・テロメレース活性および体サイズの動態を適切に把握するため、モデル選択を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) メダカの成長

本研究では、非近交系のメダカを動物供給会社から購入し、10年間実験室で繁殖および飼育を継続した。飼育法については、実験動物としてのメダカの長期飼育法が報告されているので採用した。すなわち、市販のガラス製(30×45×30 cm)の水槽に、飼育水(1日汲み置きした井水)を35リットル入れ、週2回換水した。飼育は雌雄混在で、1水槽に最大50個体とした。底面には1 cmの厚さに砂利を敷き、水温はヒーターとサーモスタットで25±1に調節し、エアレーションによる酸素供給を行った。照明は白色蛍光灯により1日12時間(8:00~20:00)行った。給餌は朝夕2回、食べ残しがない程度に市販の熱帯魚用飼料 Tetra Min を与えた。観察時に雌の腹部に付着している卵を発見したときは、成熟個体による捕食を避けるため、卵を雌の腹部から分離して別の水槽に移し飼育した。本研究で使用した魚はすべて上記の条件下で飼育したものである。胚体10日齢から4年齢の成魚まで、体長(全

長)(N=285)および体重(N=279)を測定した。計測の際、2-Phenoxyethanolを1,500倍に希釈した液でメダカを麻酔し、体長(全長)はノギスを用いて0.1 mm単位、体重は分析天秤を用いて1 mg単位で測定した。さらに、飼育中に見られたメダカに加齢に関連した外部形態の変化については、カメラで撮影し記録した。

### (2) テロメア長アッセイ

試料(N=239)は使用時まで-80で保存した。サザンブロット法を採用し、制限酵素 *Hinf*I 消化の TRF 長を測定した。すなわち、検体を粉碎し、400 μl の Lysis Buffer (10mM Tris-HCl (pH7.4), 50mM NaCl, 50mM EDTA (pH8.5), 27% Sucrose)、100 μl の Proteinase K、20 μl の 20% SDS を加えて細胞融解処理を行い、フェノール・クロロホルムにより高分子 DNA を抽出した。DNA 5 μg を制限酵素 *Hinf*I で切断、0.8% アガロースゲルにて電気泳動し、ナイロンメンブレンにアルカリトランスファーした。ハイブリダイゼーション液(6×SSPE [1×; 0.15 M NaCl, 10 mM sodium phosphate, 1.0 mM EDTA, pH 7.4], 1% SDS)を用い、(TTAGGG)<sub>4</sub> プロブには、[γ-<sup>32</sup>P]ATP を T4 Polynucleotide Kinase (東洋紡、日本)にて5'末端標識したのを用い、50で12時間ハイブリダイゼーションを行った。2×SSC(17.55 g/l NaCl, 8.82 g/l クエン酸ナトリウム)でメンブレンを洗浄し、6×SSC および 0.1% SDS を加え、50で15分間浸漬しながら洗浄した。乾燥後バイオ・イメージングアナライザー BAS-2500 Mac を用いて PC に泳動像を取込み、TRF 長補正ソフト(オープンソース) Telometric version 1.2 にて TRF 長を求めた。なお、Telometric では平均、中央値、最頻値が求められるが、TRF 長は正規分布に従わないため、中央値を TRF 長とした。

### (3) テロメレースアッセイ

試料(N=64)は、使用時まで-80で保存した。

TRAP法を用いた。凍結保存していた試料を粉碎し、冷却した Lysis Buffer (10mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EGTA, 0.1mM PMSF, 5mM 2ME, 0.5% CHAPS, 10% Glycerol) を 200 μl 加えてホモジナイズし、氷上で30分間静置した。静置後、遠心分離(4℃, 9,100×g, 20分間)して、上清をタンパク質抽出液として採取した。抽出液のタンパク質濃度は、Bradford assay で測定した。タンパク質抽出液採取後、0.1 μg の CX primer

(5'-CCCTTACCCTTACCCTTACCTAA-3')を PCR チューブの底に入れて上部を wax で封入し、その上に 6 μg 相当量のタンパク質抽出液、PCR 反応液 50 μl (20mM Tris-HCl (pH8.3), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 63mM KCl, 0.005% Tween20, 1mM EGTA, 50μM dNTP)

0.1 $\mu$ g の TS primer (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3')(United States Biochemicals, Cleveland, OH), 1  $\mu$ g の T4 gene 32 protein, 2 単位の Taq DNA ポリメラーゼを加えた。テロメラーゼによる TS primer の伸長反応のため、室温で 30 分間静置した後、90 秒間、90 に加温後、PCR を 31 サイクル (94 で 30 秒、50 で 30 秒、72 で 45 秒) 行った。生成物を 10% ポリアクリドアミドゲルで電気泳動し、その後ゲルを SYBR Green I で 30 分間染色した。泳動像を PC に取込み、画像解析ソフト (オープンソース) ImageJ version 1.39 で各バンドの強度を定量し、強度の平均値および標準偏差を求めた。なお、陰性対照は Lysis Buffer、陽性対照はヒトの子宮頸癌由来細胞株の SiHa 細胞を用いた。メダカ試料のテロメラーゼ活性の相対値は、陽性対照 SiHa 細胞を基準にした。

#### (4) 統計解析

体サイズ (体長および体重) は統計ソフト R (バージョン 3.1.2) で解析した。線型モデル・累乗モデル・漸近指数モデルおよびゴンペルツ成長モデルの 4 種のモデルを赤池情報規準 (AIC) により選択した。テロメア長およびテロメラーゼ活性は統計ソフト SAS (バージョン 9.3) で解析した。線形モデルおよび非線形モデルである局所重み付き 1 次式回帰 (LOWESS) モデルの 2 つのモデルを改良赤池情報規準 (AIC<sub>C1</sub>) により選択した。なお、LOWESS モデルは AIC<sub>C1</sub> が最小の平滑化パラメーターを選定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 主な研究成果

##### 体サイズ動態

体長および体重の体サイズデータに線型モデル・累乗モデル・漸近指数モデルおよびゴンペルツ成長モデルの 4 種のモデルを適用し、AIC が最小になるモデルを相応しいモデルとして採用した。その結果、体長も体重もゴンペルツ成長モデルであった (体長 AIC: 線型モデル=2,004, 累乗モデル=1,764, 漸近指数モデル=1,377, ゴンペルツ成長モデル=1,369; 体長 AIC: 線型モデル=3,588, 累乗モデル=3,471, 漸近指数モデル=3,338, ゴンペルツ成長モデル=3,322) (図 1・2)。

##### テロメア長およびテロメラーゼ活性動態

テロメア長およびテロメラーゼ活性は線形モデルおよび非線形モデルである LOWESS モデルの 2 つのモデルを適用し、AIC<sub>C1</sub> が最小になるモデルを相応しいモデルとして採用した。その結果、テロメア長もテロメラーゼ活性も LOWESS モデルであった (テロメア長 AIC<sub>C1</sub>: 線型モデル=465.9, LOWESS モデル (平滑化パラメーター=0.165) =403.2; テロメラーゼ活性 AIC<sub>C1</sub>:

線型モデル=-126.0, LOWESS モデル (平滑化パラメーター=0.352)=-144.3) (図 3・4)。

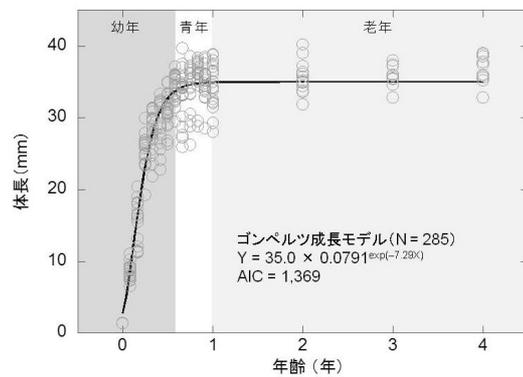


図1 体長動態

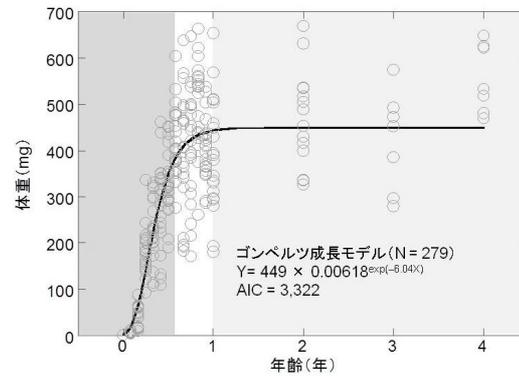


図2 体重動態

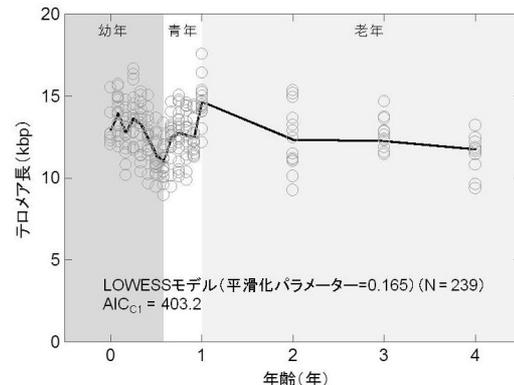


図3 テロメア長動態

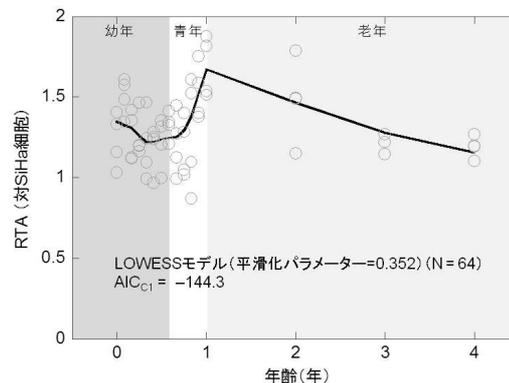


図4 テロメラーゼ活性動態

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト  
得られた成果

メダカの特ロメア長は幼年期(0~7ヶ月)では急激に短縮していたが、青年期(7ヶ月~1年)では急激に伸長して元の長さに回復し、その後老年期(1~4年)では緩やかに短縮していた。テロメラーゼ活性もテロメア長動態と同様の動態であった。一方成長(体長および体重)は、幼年期では急激に増加するが、青年期に入ると成長の鈍化が認められ、さらに老年期にはほとんど成長しなかった。以上の結果から、メダカの特ロメア長は経時的に単純に短縮していないことが明らかになった。詳細には、メダカは幼年期の急激な成長に伴いテロメア長は著しく短縮するが、成長が鈍化する青年期にはテロメラーゼ活性度を高めてテロメア長を回復し、老年期にはテロメラーゼ活性が徐々に低下して緩やかにテロメア長が短縮することを確認した。したがって、魚類の生体内ではテロメラーゼ活性を有していることが単純にテロメア長の伸長につながっているのではなく、テロメラーゼ活性および成長の度合いによりテロメア長の制御が行われていることが示唆される。これにより、幼年期に顕著なテロメア短縮した後テロメアが伸長することを明らかにできた。

#### 国内外における位置づけとインパクト

国外においてテロメア生物学は医学だけでなく、動物学でもさかんに行われている。近年、正常な生物でのテロメア動態に関する関心が高まっている。今までのテロメア研究では、経時的な試料採取の間隔が大体1年単位で広く、成長期のテロメア動態が捉えられていない。本研究では、成長期の試料採取を1ヶ月単位にして、幼年期の急激なテロメア短縮および、青年期のテロメア回復を明らかにすることができたので、インパクトがある。また、国内でのテロメア研究はヒトを対象として医学中心であるが、本研究により動物学にも波及する可能性がある。さらに統計解析ではテロメア研究において初めてモデル選択を行ったことから、今後主流である頻度主義に基づいた仮説検定だけでなく、新たな解析方法としてモデル選択が普及する可能性がある。

#### 今後の展望

孵化から加齢死までの'Whole body'としてのテロメア・テロメラーゼ動態を明らかにできたので、今後は温度など環境要因によるテロメア・テロメラーゼ動態の変化をメダカを使用して明らかにしていきたい。

#### <引用文献>

赤坂甲治、裳華房、ゲノムサイエンスのための遺伝子科学入門、2002、262

田久保海誉 他、テロメア、日本臨牀、2009、1293-1296

Hatakeyama, H. et al., The teleost *Oryzias latipes* shows telomere shortening with age despite telomerase activity throughout life. Mech. Ageing Dev. 2008, 129, 550-557.

Monaghan, P. Telomeres and life histories: the long and the short of it. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2010, 1206, 130-142.

#### 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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

畠山 仁 (HATAKEYAMA, Hitoshi)

日本獣医生命科学大学・獣医学科・助教

研究者番号: 30350177

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号: