



テロメア維持における DNA 複製・組換え因子の役割

1. はじめに

テロメアは真核生物の染色体末端部にある構造体で、テロメア DNA と呼ばれる繰り返し DNA 配列（ヒトでは [TTAGGG]_n）とそれに結合するタンパク質などで構成されている（図 1）。テロメア DNA に配列特異的に結合するタンパク質以外に、DNA 複製、組換え、修復などに関与する因子がテロメアの維持に関係している。我々は、それらの因子のテロメアにおける役割を解析したところ、それらの因子とテロメア特異的因子との協力や競合関係が見えてきた。本稿では我々の得た知見をもとにそれらの因子、特に replication protein A (RPA) のテロメア維持における役割について考察する。

2. テロメア構造と老化との関連について

テロメア DNA は、二本鎖部分と末端の一本鎖部分から

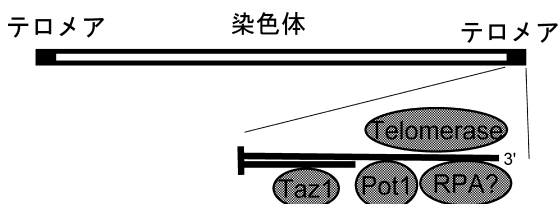


図 1 テロメアと分裂酵母テロメア結合タンパク質

分裂酵母では、染色体の末端に (GGTTACA)_n の繰り返し配列（テロメア DNA）がほぼ規則的に約 300 塩基存在する。Taz1 は二本鎖テロメア DNA に、Pot1 は一本鎖テロメア DNA に特異的に結合する。RPA はテロメアに局在するが、一本鎖テロメアで機能するかどうかはわかっていない。上記のタンパク質以外にも幾つかのタンパク質がテロメアに結合することがわかっている。Telomerase（テロメラーゼ）はテロメア DNA を伸長する酵素を含んだ RNA タンパク質複合体。

なり、一本鎖部分は DNA の 3' 末端側が突出している（図 1）。分裂酵母 Taz1 は Cooper らによってイーストワンハイブリット法を用いて二本鎖テロメア結合タンパク質として同定された。Taz1 の DNA 結合ドメインである Myb ドメインは、de Lange らによって同定されていたヒト二本鎖テロメア結合タンパク質 TRF1 の Myb ドメインと相同性があることがわかった¹⁾。Taz1 を破壊するとテロメアが約 10 倍伸長することから、Taz1 はテロメラーゼを負に制御していると考えられている。分裂酵母とヒト Pot1 は、オキシトリカ (*Oxytricha*) や他の繊毛虫の一本鎖テロメア DNA 結合タンパク質の相同タンパク質として、データベース検索によって同定された。分裂酵母とヒトの Pot1 は、インビトロでそれぞれ、分裂酵母とヒトの一本鎖テロメア配列に特異的に結合することが報告された²⁾。分裂酵母 *pot1* 遺伝子を破壊するとテロメア DNA が急激に消失するが、その機構はわかっていない。これら以外に塩基配列非特異的一本鎖 DNA 結合タンパク質 RPA 複合体がテロメアに局在することが、分裂酵母やヒトで明らかにされている^{3,4)}。RPA 複合体（以降 RPA と呼ぶ）は、分子量約 70kDa, 32kDa, 14kDa の三つのサブユニット（それぞれ RPA70, RPA32, RPA14）からなるヘテロ三量体で真核生物とアーキアで広く保存されている。RPA は DNA 複製時や、DNA 相同組換え修復時に生じる一本鎖 DNA に結合して、それぞれのイベントが適切に行われるように機能している。我々は、分裂酵母 RPA70 をコードする遺伝子 *rpa70* の 223 番目のアスパラギン酸がチロシンにかわった変異株（以降 *rpa70-D223Y* 変異株と呼ぶ）のテロメアが野生株より短いこと、RPA70 がテロメア DNA に結合することなどを報告している³⁾。そこで、RPA のテロメアにおける機能をさらに詳しく調べることにした。RPA と Pot1 はともに一本鎖 DNA に結合することから、テロメア末端一本鎖突出で、これらのタンパク質が競合することが予想されるが、それについては全くわかっていない。

テロメア DNA は、いわゆる末端複製問題のために DNA 複製ごとに減少する。このことから、二本鎖テロメア DNA の長さは細胞の寿命と密接に関係すると考えられている。分裂酵母やヒトがん細胞では、テロメア DNA を伸長する酵素複合体であるテロメラーゼが働いているため、テロメアの長さは一定に保たれる（図 1）が、ヒト正常細胞ではテロメラーゼの活性がほとんどないため、テロメア DNA の長さは細胞分裂ごとに短くなる。しかし最近、ヒト正常細胞でもテロメラーゼがごく少量発現していることがわかった。このテロメラーゼはテロメアを伸ばす

活性はないが、このテロメラーゼが正常に機能しなくなると、テロメア二本鎖部分の長さは短くならず、テロメア一本鎖突出部分の長さのみが短くなり、細胞が老化することが報告された⁵⁾。このことから、テロメア一本鎖突出の長さが老化の誘導と関係していることが示唆されており、テロメア一本鎖突出の維持機構の解明が望まれている。

3. POT1 と WRN のテロメアにおける役割

上記にも述べたが分裂酵母 *pot1* 遺伝子を破壊するとテロメア DNA を急激に失うことから Pot1 タンパク質はテロメア維持において非常に重要であることがわかっている²⁾。また、ヒトがん細胞の POT1 を siRNA でノックダウンするとテロメア末端の一本鎖突出が短くなることから、ヒト POT1 はテロメア末端の一本鎖突出の維持に必要であることが示唆されている⁶⁾。しかし POT1 をノックダウンしても残存 POT1 がテロメアで機能している可能性も考えられることから、ヒト POT1 の機能解明には更なる研究が必要である。

最近マウスの *Pot1* に関する論文が二つのグループから報告され、驚いたことにマウスには二つの *Pot1* 遺伝子 (*Pot1a* と *Pot1b*) が存在することがわかった^{7,8)}。Hockemeyer らの論文では、*Pot1a* を破壊すると初期胚致死となり、*Pot1b* を破壊すると生育可能であるが、テロメア一本鎖突出が非常に長くなることが報告された。Wu らの論文でも *Pot1a* を破壊すると初期胚致死となることが報告された。しかし Hockemeyer らの論文では *Pot1a* を条件的 (conditional) に破壊しても生育に影響を与えないのに対して、Wu らの論文では *Pot1a* を条件的 (conditional) に破壊すると、細胞分裂が停止し、p53 依存的に老化が誘導された。この違いが実験方法の違いによるものなのかあるいは株の違いによるものかを明らかにするためにはさらなる研究が必要とされる。

WRN は二本鎖 DNA を引き剥がす酵素活性 (ヘリカーゼ活性) を持つタンパク質で、このタンパク質の機能欠失によって、早老、テロメア短縮速度の亢進、ゲノムの不安定性などが特徴として認められるウェルナー症候群を発症する。ヒト WRN タンパク質は S 期にテロメアに結合する。また *Wrm* 遺伝子に変異した細胞ではラギング鎖の合成で複製されるテロメアだけがある頻度で欠失することから、WRN が G (グアニン) の多いテロメア DNA の効率的な複製に必要であることが示唆されている⁹⁾。

精製した POT1 タンパク質はテロメア配列依存的に WRN のヘリカーゼ活性を高めるのに対して、RPA はテロ

メア配列のあるなしに関係なく WRN のヘリカーゼ活性を高める¹⁰⁾。また、POT1 と RPA はどちらも WRN と結合する。これらのことから、三つのタンパク質がテロメアで協力あるいは競合して機能していることが予想されるが、その基礎的な分子機序は明らかになっていない。

4. 分裂酵母 *taz1 rpa 70-D 223 Y* 二重変異株はテロメア DNA を急激に失う

我々は *taz1* 破壊株のテロメア末端一本鎖突出は野生株よりも非常に長いことを報告している。しかもこの一本鎖突出の形成には DNA 切断末端の 5'鎖の削り込みに必要な Mre11-Rad50-Nbs1 複合体の活性が必要であるが、Mre11 のヌクレアーゼ活性は必要でないことを報告している¹¹⁾。また *taz1* 破壊株のテロメア末端一本鎖突出の形成にはヌクレアーゼドメインとヘリカーゼドメインを持つ Dna2 の活性も必要であることを発見している¹²⁾。もし RPA がテロメア一本鎖突出の維持に関係しているなら、野生株よりも非常に長いテロメア一本鎖突出を持つ *taz1* 破壊株で、さらに *rpa 70* の 223 番目のアスパラギン酸をチロシンに変異させると、テロメア構造に大きく影響するかもしれない。そこで *taz1 rpa 70-D 223 Y* 二重変異株を作成したところ、驚いたことにこの二重変異株はテロメア DNA を急激に失うことを発見した¹³⁾。*taz1* 遺伝子を破壊すると、テロメア DNA が伸びることから、Taz1 はテロメラーゼを負に制御していると考えられている。しかし我々の発見では、Taz1 と RPA は、テロメアの維持に必要不可欠であることを示している。我々は *taz1 rpa 70-D 223 Y* 二重変異株のテロメア消失機構を解明するために、いくつかの実験を行い、以下のことを発見した。

5. 分裂酵母 *taz1 rpa 70-D 223 Y* 二重変異株のテロメア DNA 消失は *rqh 1* の破壊によって抑圧される

まず変異 RPA70-D 223 Y タンパク質のテロメア結合が正常な RPA70 タンパク質と比べて違うかどうかを ChIP アッセイによって調べたところ、変異 RPA70-D 223 Y タンパク質は野生型 RPA70 よりも多くテロメアに結合することがわかった。しかも野生型 RPA70 のテロメアへの結合は *taz1* を破壊することでも多くなることがわかった。これらのことから *taz1 rpa 70-D 223 Y* 二重変異株では、変異 RPA70-D 223 Y がテロメアに過剰に集まることが予想される。RPA がテロメアに過剰に集まると本来テロメアで機能すべきタンパク質のテロメア結合を阻害することが考えられ、それが *taz1 rpa 70-D 223 Y* 二重変異株のテ

ロメア DNA 消失の原因かもしれないと考えた。そこで、変異 RPA70-D 223 Y タンパク質の過剰なテロメア結合を抑圧する変異株の探索を行った。出芽酵母 Sgs1 タンパク質（分裂酵母では Rqh1, ヒトでは WRN に相当する）と Mec1（分裂酵母では Rad3, ヒトでは ATR に相当する）が同時に変異していると、RPA の複製停止によって生じた一本鎖 DNA への結合能は低下する¹⁴⁾。そこで、我々は分裂酵母 *rqh1* の破壊が⁸⁾, 変異 RPA70-D 223 Y タンパク質の過剰なテロメア結合や *taz1 rpa70-D 223 Y* 二重変異株のテロメア DNA の消失を抑圧するかどうかを調べた。その結果、変異 RPA70-D 223 Y タンパク質の過剰なテロメア結合と *taz1 rpa70-D 223 Y* 二重変異株のテロメア DNA の消失の両方ともが、*rqh1* の破壊によって抑圧された。

6. 分裂酵母 *taz1 rpa70-D 223 Y* 二重変異株のテロメア DNA 消失は、Pot1 の過剰発現によって抑圧される

taz1 rpa70-D 223 Y 二重変異株では RPA が過剰にテロメアに集まることで本来テロメアで機能すべきタンパク質が機能できない可能性がある。Pot1 は一本鎖テロメア DNA に結合することから *taz1 rpa70-D 223 Y* 二重変異株では Pot1 の機能が阻害されている可能性を考えた。そこで *taz1 rpa70-D 223 Y* 二重変異株に Pot1 を過剰発現させたところ、*taz1 rpa70-D 223 Y* 二重変異株のテロメア DNA の消失は抑圧された。このことから、*taz1 rpa70-D 223 Y* 二重変異株では、Pot1 がテロメアに結合できないか、あるいは結合できても正常に機能できないことが示唆された。これらの結果を踏まえて以下のようなモデルを提唱する（図 2）。Taz1 と RPA がテロメアで正常に機能しなくなると、Pot1 がテロメアに結合できなくなるか、あるいは

結合しても正常に機能できなくなる。その結果、Rqh1 がテロメアで異常に機能してしまう。Taz1 と RPA がテロメアで正常に機能しなくなると、Rqh1 はおそらくテロメア二本鎖 DNA を引き剥がして、生じた一本鎖 DNA が未知の DNA 分解酵素によって分解されると予想される。*pot1* 破壊株においても *taz1 rpa70-D 223 Y* 二重変異株と同様にテロメアが急激に消失することもこのモデルを支持する。

7. おわりに

我々の実験結果から変異 RPA のテロメアへの過剰な蓄積は Pot1 の機能を阻害することが示唆され、Pot1 と RPA はテロメア一本鎖で競合することが考えられる。また *taz1 rpa70-D 223 Y* 二重変異株で *rqh1* を破壊するとテロメア消失を抑圧することから Rqh1 のヘリカーゼ活性を制御することがテロメアの維持に重要であることが示唆された。ヒトでは WRN タンパク質はテロメアの維持に必要であるが、我々の実験では分裂酵母の *rqh1* 破壊株のテロメアの長さは正常であるため、Rqh1 がテロメアの維持に必要などうかはわかっていない。WRN ノックアウトマウスは単独ではヒト早老症を示さないのに対して、テロメラーゼと WRN のダブルノックアウトマウスでは早老症を示すことから、テロメラーゼ活性のない状態でないと、分裂酵母 Rqh1 のテロメアにおける表現型は現れないのかもしれない。今後は、分裂酵母の Rqh1, Pot1, RPA のテロメアにおける役割を更に詳細に解析することで、ヒトテロメア維持機構の解明に貢献したいと考えている。

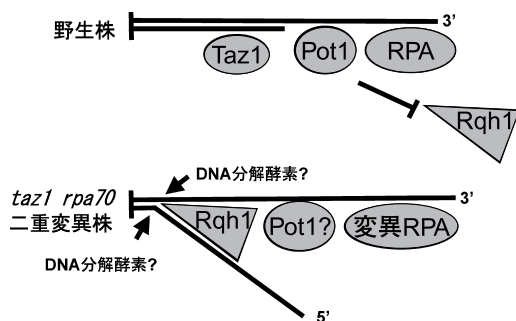


図 2 RPA, Taz1, Pot1 のテロメアにおける役割のモデル図
Taz1 と RPA がテロメアで正常に機能しなくなると、Pot1 がテロメアに結合できなくなるか、あるいは結合しても正常に機能できなくなる。その結果、Rqh1 がおそらくテロメア二本鎖 DNA を引き剥がして、生じた一本鎖 DNA が未知の DNA 分解酵素によって分解されると予想される。

- 1) Cooper, J.P., Nimmo, E.R., Allshire, R.C., & Cech, T.R. (1997) *Nature*, 385, 744-747.
- 2) Baumann, P. & Cech, T.R. (2001) *Science*, 292, 1171-1175.
- 3) Ono, Y., Tomita, K., Matsuura, A., Nakagawa, T., Masukata, H., Uritani, M., Ushimaru, T., & Ueno, M. (2003) *Nucleic Acids Res.*, 31, 7141-7149.
- 4) Verdun, R.E. & Karlseder, J. (2006) *Cell*, 127, 709-720.
- 5) Masutomi, K., Yu, E.Y., Khurts, S., Ben-Porath, I., Currier, J. L., Metz, G.B., Brooks, M.W., Kaneko, S., Murakami, S., Decaprio, J.A., Weinberg, R.A., Stewart, S.A., & Hahn, W.C. (2003) *Cell*, 114, 241-253.
- 6) Hockemeyer, D., Sfeir, A.J., Shay, J.W., Wright, W.E., & de Lange, T. (2005) *EMBO J.*, 24, 2667-2678.
- 7) Hockemeyer, D., Daniels, J.P., Takai, H., & de Lange, T. (2006) *Cell*, 126, 63-77.
- 8) Wu, L., Multani, A.S., He, H., Cosme-Blanco, W., Deng, Y., Deng, J.M., Bachilo, O., Pathak, S., Tahara, H., Bailey, S.M., Deng, Y., Behringer, R.R., & Chang, S. (2006) *Cell*, 126, 49-62.
- 9) Crabbe, L., Verdun, R.E., Hagblom, C.I., & Karlseder, J. (2004) *Science*, 306, 1951-1953.

- 10) Opresko, P.L., Mason, P.A., Podell, E.R., Lei, M., Hickson, I. D., Cech, T.R., & Bohr, V.A. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 32069–32080.
- 11) Tomita, K., Matsuura, A., Caspari, T., Carr, A.M., Akamatsu, Y., Iwasaki, H., Mizuno, K., Ohta, K., Uritani, M., Ushimaru, T., Yoshinaga, K., & Ueno, M. (2003) *Mol. Cell. Biol.*, 23, 5186–5197.
- 12) Tomita, K., Kibe, T., Kang, H.Y., Seo, Y.S., Uritani, M., Ushimaru, T., & Ueno, M. (2004) *Mol. Cell. Biol.*, 24, 9557–9567.
- 13) Kibe, T., Ono, Y., Sato, K., & Ueno, M. (2007) *Mol. Biol. Cell.*, 18, 2378–2387.
- 14) Cobb, J.A., Schleker, T., Rojas, V., Bjergbaek, L., Tercero, J. A., & Gasser, S.M. (2005). *Genes Dev.*, 19, 3055–3069.

上野 勝

(広島大学大学院先端物質科学研究科
分子生命機能科学専攻)

The roles of DNA replication and recombination factors in telomere maintenance

Masaru Ueno (Department of Molecular Biotechnology, Graduate School of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University, 1-3-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima 739-8530, Japan)

S100A8 と S100A9 によるがんの肺転移 制御

1. 転移におけるがん細胞

がんの血行性転移は少なくとも四つの段階からなる (図 1-A)。1, 原発巣で増殖したがん細胞同士の接着が失われそれを取り囲む正常な組織構築に matrix metalloprotease (MMP) などを活性化して浸潤する, 2, がんに囚らずも酸素と栄養を供給している血管の中に侵入し体循環によって転移を予定している臓器にたどりつく, 3, 転移予定臓器の血管から外に出る, 4, 転移予定臓器内で増殖する。この複雑な事象の根本要因はこれまでがん細胞そのもののの中に想定された『転移遺伝子』に求められてきた。歴史的には高転移性か否かによって発現に差のある遺伝子として同定された NDP kinase Nm23 などである¹⁾。その低発現や遺伝子変異ががんを転移性に導くとされてきた。しかし Nm23 の結合で Prune の cAMP phosphodiesterase (PDE) 活性およびがん細胞の転移能は促進され, PDE 阻害薬である dipyrindamole がこれを抑制する場合もある²⁾。現在までに RhoC や特定のケモカイン受容体をはじめ多くの遺伝子

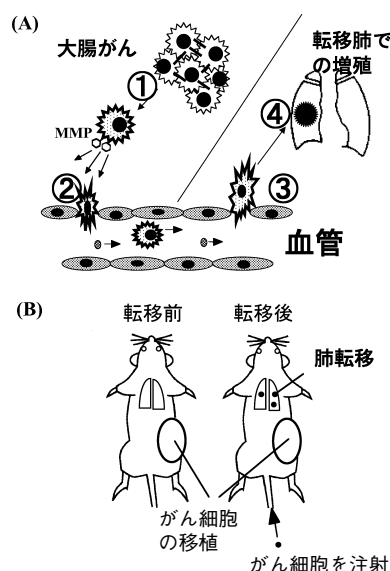


図 1 転移の各段階と実験系
A 転移の 4 段階 (本文参照)
B 転移のモデル実験 (本文参照)

が転移と関係があるものとしてがん細胞から同定されている^{3,4)}。転移には多段階かつ多彩な生物学的活性が必要であるが, 複数の分子の動態を制御する典型的な存在は転写因子である。例えば, Weinberg 博士の研究室では転移能力の異なるマウスの乳がん細胞における網羅的な遺伝子発現解析を上で述べた転移段階の達成度と比較検討し, 転写因子 Twist を同定した⁵⁾。転移の第一段階であるがん細胞同士の接着は E-cadherin に依存するが Twist は本接着分子の発現を低下させるだけでなく, 形態変化や細胞運動など多くの生物学的事象をひき起こすことが知られている。

2. 転移における生体側因子

一方, 生体側の転移に関わる現象の研究も進んできた。その最も理解しやすい例が腫瘍血管新生である。もちろんがんそのものがなければ腫瘍血管新生も起こらないのであるからあくまでがん細胞が議論の出発点であることに変わりはない。がん細胞はその制御を逸脱した過剰増殖ゆえに少なくとも局所的に低酸素状態となり転写因子 HIF-1 α や NF- κ B を介して JunB が誘導される⁶⁾。これらは血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の転写を起こし, がんに向かって血管が新生される。この血管は単に酸素と栄養をがんに供給するだけではなく, これを介して細胞や分泌性タンパク質が生体とがんとの間を往来する。例えば, リンパ球やマクロファージなど腫瘍免疫担当細胞はがん細胞の殺傷など