

《農芸化学奨励賞》

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



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 准教授 上野 勝

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 と呼ばれる繰返し DNA 配列 (ヒトでは [TTAGGG]_n) とそれに結合する蛋白質などで構成されている。ヒト癌細胞では、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発現しているため、テロメアの長さは一定に保たれるが、ヒト正常細胞ではテロメラーゼは発現していないため、テロメア DNA の長さは末端複製問題のために細胞分裂ごとに短くなる。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た。しかし最近、ヒト正常細胞でもテロメアを伸ばす活性はないが、テロメラーゼがごく少量発現していることがわかった。このテロメラーゼが正常に機能しなくなると、テロメア二本鎖部分の長さが短くなる前にテロメア一本鎖突出部分の長さが短くなり、細胞が老化することが報告された。このことから、最近テロメア一本鎖突出の長さや老化誘導との関係が注目されている。このようにテロメアの構造は細胞の老化や癌と密接に関係していることから、テロメア構造を人工的にコントロールできるようになれば、細胞の老化や癌を防止する新しい手法の開発につながることを期待できる。そのためには、テロメアでどのような蛋白質がどのように機能しているのかを理解する必要がある。これまでヒトのテロメアで機能することが示唆されている蛋白質は、2種類に分けることができる。一つ目はテロメア DNA に特異的に結合する蛋白質である。例えば、二本鎖テロメア DNA に結合する TRF1 や TRF2、一本鎖テロメア DNA に結合する POT1 などがある。二つ目は、DNA 修復や複製に関与する蛋白質である。例えば、DNA 二本鎖切断末端の修復に関係する MRE11 複合体や、一本鎖 DNA に非特異的に結合する RPA などがある。染色体中の DNA は生体内の活性酸素や太陽光の紫外線などが引き金となり切断されることがあるが、DNA 切断末端は DNA 修復蛋白質群によって、融合され、修復されている。テロメア末端が DNA 切断末端と誤認されると、テロメア末端どうしが融合し、それが染色体の不均等分配を引き起こし、染色体全体の不安定化を引き起こす。したがってテロメアでは DNA 修復に関与する因子の機能は厳密に制御される必要がある。しかし DNA 修復とテロメア維持の両方に関与する蛋白質の機能がテロメアでどのように制御され、機能しているのかは、ほとんどわかっていなかった。

単細胞真核生物である分裂酵母には、ヒトに存在する上記の蛋白質の相同蛋白質が存在し、それらの機能も保存されていることが期待される。例えばヒト二本鎖テロメア結合蛋白質 TRF1 の分裂酵母オルソログは Taz1 である (図 1)。またヒトの一本鎖テロメア DNA に結合する POT1 の相同蛋白質も分裂酵母に存在する (図 1)。分裂酵母は染色体を 3 本しかもたないため、テロメア DNA が維持できなくなっても、染色体内で

テロメア末端の融合が起こり、生き延びることができる。一方、ヒトや出芽酵母を含む他の生物はテロメア DNA が維持できなくなると、染色体数が多いため染色体間で末端融合が起こり、それが染色体の不均等分配を引き起こし、細胞死に至る。したがって分裂酵母はテロメア維持に必要な因子の解析に適している。そこで筆者らは、分裂酵母を用いて DNA 修復や複製に関与する蛋白質のテロメアにおける機能の解析を世界に先駆けて行った。以下にその結果を紹介する。

1. 分裂酵母 Mre11 複合体と Dna2 のテロメアにおける機能解析

Mre11 複合体は DNA 切断末端の相同組換えによる修復において、3'末端側の一本鎖突出の形成に必要であることが報告されている。テロメア末端も DNA 切断末端と同様に 3'末端側の一本鎖突出が存在する。そこで Mre11 がテロメア末端の一本鎖突出形成に必要かどうかを調べた (図 1)。分裂酵母のテロメア一本鎖突出は非常に短いため、その検出は困難であったが、筆者らは *taz1* 破壊株のテロメア一本鎖突出が非常に長いことを発見した。そこで *taz1 mre11* 二重変異株を作製したところ、*taz1* 単独破壊株より極端に一本鎖突出の長さが短くなることを発見した (図 2)。Mre11 はヌクレアーゼ活性をもっていることから、Mre11 のヌクレアーゼ活性が一本鎖突出の形成に必要かどうかを調べた結果、ヌクレアーゼ活性は必要ないことがわかった。これらのことから Mre11 が未知のヌクレアーゼをテロメアにリクルートすることがテロメア一本鎖突出の形成に必要であることが示唆された。そこでこの未知のヌクレアーゼを探索したところ、Dna2 というヌクレアーゼが *taz1* 破壊株のテロメア一本鎖突出の形成に必要であることがわかった (図 2)。さらに *dna2* 変異株は *taz1* が破壊されてな

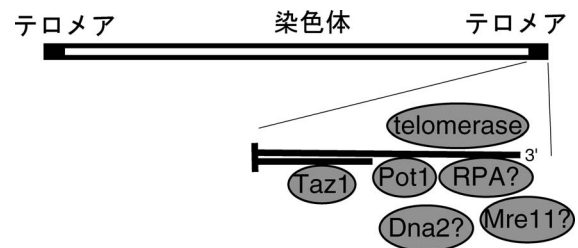


図 1 テロメアと分裂酵母テロメア結合蛋白質

分裂酵母では、染色体の末端に (GGTTACA)_n の繰返し配列 (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 は一本鎖非特異的 DNA 結合蛋白質、Mre11 は DNA 修復に関係するヌクレアーゼ、Dna2 は DNA 複製に関係するヘリケースで、これらの蛋白質がテロメアで機能するかどうかはわかっていなかった。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 蛋白質複合体。

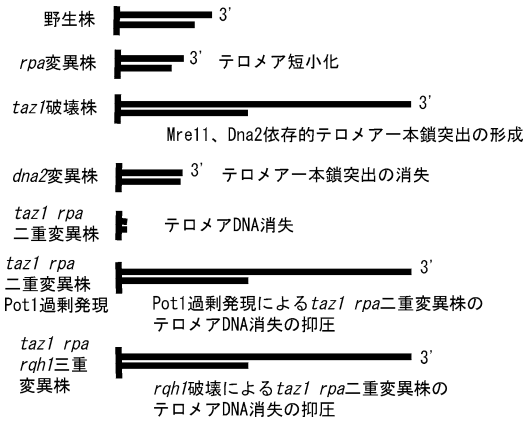


図2 筆者が明らかにした分裂酵母のDNA修復、複製因子のテロメアにおける表現型
染色体末端のテロメアDNA部分のみを直線で示した。

い株においてもテロメア末端の一本鎖突出形成に必要であることがわかった(図2)。Dna2はヒトにもホモログが存在するため、ヒトDNA2がテロメアで機能する可能性が考えられる。

2. 分裂酵母RPAのテロメアにおける機能解析

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。テロメア末端にも一本鎖DNAが存在することから、筆者らはRPAがテロメアで機能するかどうかを調べた。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変わった変異株(以降*rpa*変異株と呼ぶ)を作製したところ、*rpa*変異株のテロメアが野生株より短いことを発見した(図2)。さらに、RPA70がテロメアDNAに結合することをクロマチン免疫沈降法によって明らかにした。このことから分裂酵母RPAはテロメア維持に関係していることが示唆された。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。もしRPAがテロメア一本鎖突出の維持に関係しているのなら、*taz1*破壊株にさらに*rpa70*を変異させると、テロメア構造の維持に大きく影響するかもしれない。そこで*taz1 rpa*二重変異株を作製したところ、驚いたことに、この二重変異株はテロメアDNAを維持できずに、染色体が環状化して生き残ることを発見した(図2)。次に*taz1 rpa*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。一本鎖テロメア結合蛋白質Pot1を過剰発現させると

*taz1 rpa*二重変異株のテロメアDNAの消失は抑圧される(図2)。*taz1 rpa*二重変異株のテロメアDNAの消失は、ヒトWRNヘリケースのホモログである*rqh1*の破壊により抑圧される(図2)。

これらの結果を踏まえて以下のようなモデルを提唱した。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ヘリケース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2本鎖DNAを引きはがして、生じた一本鎖DNAが未知のDNA分解酵素(ヌクレアーゼ)によって分解されると予想される。このモデルは、*pot1*破壊株も*taz1 rpa*二重変異株と同様にテロメアDNAを急激に消失するというこれまで報告と矛盾しない。これらの蛋白質はヒトにも保存されているため、これらの蛋白質の機能もヒトで保存されている可能性がある。したがって今後はこれらの蛋白質の機能をさらに解析することで、テロメア構造を人工的に制御する新しい手法の開発につなげていきたい。

本研究は主に静岡大学理学部(前任校)および広島大学大学院先端物質科学研究科で行ったものです。本研究を行う機会を与えていただき、開始当時からご指導、ご支援を賜りました前静岡大学教授の吉永光一先生には心よりお礼申し上げます。また静岡大学教授の瓜谷真裕先生、准教授の丑丸敬史先生には、本研究の開始当時から多くのご助言、ご協力をいただきましたことを厚く感謝いたします。静岡大学教授の河岸洋和先生には多大なるご支援、励ましを賜りましたことを心よりお礼申し上げます。また本研究の継続にあたり、広島大学大学院先端物質科学研究科教授の加藤純一先生、教授の黒田章夫先生、助教の滝口昇先生には、的確なご助言、ご支援、ご協力を賜りましたことを深く感謝致します。また広島大学大学院先端物質科学研究科教授の土屋英子先生、助教の湯川格史先生には、有益なご助言、ご協力を賜りましたことを深く感謝いたします。共同研究者として本研究の推進に多大なご協力をいただきました千葉大学教授の松浦彰先生と横浜市立大学教授の岩崎博史教授に深く感謝いたします。本研究は卒業生、在校生の方がたとの共同研究であり、特に富田和範博士と木部達也博士は本研究の遂行に大きく貢献してくださいましたことを深く感謝申し上げます。最後に本奨励賞にご推薦いただきました広島大学大学院先端物質科学研究科教授の宮川都吉先生ならびにご支援賜りました諸先生方に厚くお礼申し上げます。