

早老性疾患遺伝子による皮膚線維芽細胞の老化とテロメア制御

京都大学 放射線生物研究センター

小松 賢 志

Nijmegen Breakage Syndrome (NBS) is an autosomal recessive disorder characterized by chromosome instability, defect in repair of double strand break and high incidence of lymphoid cancers. Here, we show that NBS1 is recruited to telomere ends by alternative mechanism, in which NBS1 interacts with TRF2, possibly through telomeric DNA, and forms discrete foci in ATM-independent manner. This is demonstrated by the evidences that NBS1 foci are formed in ATM-defective cells, and that both NBS cells lacking FHA/BRCT domains and S278/343A clone, mutated in ATM-phosphorylated sites, can interact with TRF2. Moreover, C-terminus of NBS1, MRE11 nuclease-binding region, was essential for the interaction with TRF2. It is consistent that NBS1 lacking the C-terminus was failed to elongate the short telomere length in NBS cells, although transfection both with full length of the NBS1 cDNA and of the S278/343A cDNA restored the telomere length. Furthermore, the short G-tail length of NBS cell line has not changed significantly following transfection with NBS1 cDNA lacking of the C-terminus region, while the full length of cDNA complements the G-tail length. These findings suggest that NBS1 is recruited to telomere by MRE11/RAD50/NBS1 complex formation in ATR- and ATM-independent manner and is implicated in telomere length maintenance, possibly through G-tail regulation.

1. 緒 言

老化に伴い細胞の染色体異常や突然変異の増加などゲノム不安定性が誘発される事は以前から知られていたが、最近、モデル動物の線虫の研究からゲノム不安定性が逆に老化を促進する事が明らかになってきた。実際ゲノム不安定性を呈するヒト遺伝病では、がんや免疫不全と共に早期老化を示す。本研究ではゲノム不安定性による老化機構を明らかにするために、研究材料として染色体不安定症候群のナイミーヘン症候群 (NBS) 及び毛細血管拡張性運動失調症 (AT) のゲノム不安定性を呈するヒト遺伝病を用いる。これらの細胞では細胞老化の原因となる染色体テロメアが異常に早く短縮する可能性が指摘されている。恐らくゲノム安定化に関わるこれら遺伝病の蛋白が直接 DNA 末端のテロメア延長制御に関わっていると思われる。このために染色体不安定症候群におけるテロメア長の測定を行う。さらに、テロメア長の延長機構を解明するために、テロメア G テールの測定やテロメア蛋白 TRF2 相互作用について解析する。また、ナイミーヘン症候群 (NBS) のノックアウトマウス細胞作製によるテロメア短縮機構を明らかにする事を目的とする。

2. 実 験

NBS1 蛋白によるテロメア延長機構：NBS 及び AT 初代培養細胞の分裂テロメア短縮を TTAGGG リピートをプローブとしたサザン法、AE プローブによる加水分解時の発光を比較する HPA 法、テロメア FISH のシグナル強度の高精度計測により分裂毎のテロメア長減少を正常細胞の 150bp/分裂と定量比較する。また S1 ヌクレアーゼによる 5' 一本鎖 DNA 生成能や細胞内 ECR などによりテロメア異常短縮の原因を解明する。続いて、NBS 細胞が NBS1cDNA 導入後にテロメアが延長することを確認した後に、その延長機構を明らかにする。すなわち、ChIP 法でテロメア複製期の NBS1 と TRF2 の相互作用、NBS1 リン酸化と hTERT など関連蛋白との相互作用、免疫染色による共局在そして G-tail やテロメア長を指標とした deletion mutant 実験によりテロメア蛋白の作用機序を解析する。NBS 患者の皮膚由来の線維芽細胞を SV40 で不死化した GM07166V A7 細胞、及び正常細胞として子宮内腫由来の HeLa 細胞、ヒト肺由来細胞を不死化した MRC-55V 細胞と GM07166VA7 に全身 NBS1 cDNA を発現ベクター pIRES-hyg で導入した放射線感受性が回復したクローンを用いる。

細胞同調は aphidicolin 2µg/mL で 16～20 時間培養後に、通常培地に戻して行う。除去後 0～3 時間が G1/S 期、3～5 時間後が S 期初期、5～8 時間後が S 期後期、8 時間以降が G2/M 期に対応することをフローサイトメトリで確認する。

NBS1 と TRF2 の二重免疫染色は細胞を Triton X-100 で処理後に NBS1 (rabbit) 抗体と TRF2 (goat) 抗



Cellular aging and abnormal regulation of telomeres in skin fibroblasts from a patient with an accelerated aging disorder.

Kenshi Komatsu

Radiation Biology Center, Kyoto University

体でインキュベートし、それぞれ anti-goat IgG-TRITC と anti-rabbit IgG-Alexa 488 で染色する。また、細胞を lysisbuffer で抽出した lysate を NBS1 抗体で沈殿した免疫複合体を NBS1 抗体及び TRF2 抗体を用いたウエスタンブロット法で解析する。

G-tail 長の測定は細胞から抽出した DNA を二本鎖のままゲル上でハイブリダイズする in gel hybridization を行う。プローブには 5' (CCCTAA) 43' オリゴヌクレオチドを、そして 3'-エキソヌクレアーゼとして Mung Bean Nuclease (MBN) を用いる。

チキン B 細胞由来の DT40 細胞は遺伝子ノックアウトの効率が通常の高等真核細胞の数百倍高頻度であるのでノックアウト細胞の作製に良く使用される。我々は初めに NBS1 の N 末側保存領域 FHA/BRCT ドメインに設計した変成プライマーを用いて、RT-PCR によりチキン胚由来の cDNA ライブラリーをスクリーニングする。続いて、ノックアウトコンストラクトを作製するためにエクソン 2 からエクソン 6 に相当する約 5.5kb のゲノム DNA を用いて DT40 細胞の Nbs1 遺伝子をターゲティングする。Nbs1 の個体レベルでの発現解析のためノックアウトマウスを作製する。Nbs1 のエクソン 2 部位に PGK-neo-poly A/HSD-tk ターゲティングベクター導入によりヌル突然変異 ES 細胞を得る。この変異 ES 細胞のターゲティングベクターを Cre-Loxp で除去した細胞あるいは除去しない ES 細胞を、C57BL/6 の 3.5 日胚から回収したプラストシスト内に移入する。続いて偽妊娠 ICR マウスの子宮内に戻して得られるキメラマウス交配により F1 の尾 DNA の PCR 法により変異マウスを確認する。このマウス肺線維芽細胞を樹立後、放射線致死感受性や染色体異常頻度ならびに遺伝子突然変異頻度を比較し、個体レベルの発現をリンパ球サブセット解析、Nbs1 蛋白発現の組織特異性を測定する。

3. 結果

NBS1 がテロメア維持に関わっていることは NBS 患者の皮膚線維芽細胞の細胞分裂によるテロメア長をサザン法により測定した結果、テロメア短縮が促進される事から明らかとなった。そこで二重免疫染色法によりテロメアに於ける NBS1 フォーカス形成を観察した結果、フォーカスは細胞周期の S 期において見られた。また、この時期に一致してテロメア蛋白 TRF2 と NBS1 が結合していることが IP-ウエスタン法により確認できた。DNA 修復では NBS1 蛋白の損傷部位へのリクルートに ATM が関与しているので、ATM が欠損している毛細血管拡張性運動失調症細胞を用いて S 期でのテロメアへの NBS1 蛋白のリクルートを検討した。しかしながら、毛細血管拡張性運動失調症細胞でも正常細胞と同様に NBS1 は TRF2 と結合が出来、またフォーカスが形成されることが判明した。この事から

NBS1 蛋白のリクルート機構は DNA 修復とテロメア維持では異なることが確認された。

NBS1 抗体及び TRF2 抗体を用いて MRC-5SV 細胞の免疫染色を行った結果、NBS1 及び TRF2 とともに細胞周期依存性にフォーカスを形成することが示された。特に NBS1 フォーカスは S 期初期にドット状のフォーカスを形成して、NBS1 と TRF2 の二重染色は両フォーカスが一致することが確認された。また、テロメア FISH 法により細胞内局在を検討した結果、両フォーカスはテロメア上に存在することが判明した。一方、NBS1 と TRF2 の生体内での結合が免疫複合体での解析により明らかになった。つまり、NBS1 抗体での複合体を TRF2 抗体を用いてウエスタンブロット解析したところ、TRF2 の存在が確認された。この両者の結合は、NBS1 と TRF2 フォーカスの共局在の結果と一致して、S 期初期においてのみ検出された。

続いて、テロメア端に存在する一本鎖 DNA (G-tail) を in gel hybridization により測定した結果、NBS 細胞の G-tail は正常 HeLa 細胞及び NBS1 タンパクを強制再現させた NBS 細胞よりも約 80% 短いことが明らかになった。テロメアプローブが G-tail のみに Hybridize していることは、MBN 処理によりサザン法のシグナルが消失したことにより確認できた。

個体レベルでの発現を比較するためにマウス Nbs1 遺伝子のエクソン 4 以降をターゲティングしたマウス二種類の性質を比較した。ターゲティングベクターがそのままのノックアウトマウスでは胎生 8.5 日で致死になるが、細胞株は樹立可能であった。これに対して、Cre-Lox によりターゲティングベクターを除いたノックアウトマウスでは胎生 3.5 日で致死になり、細胞株化も不可能であった。両者のノックアウトマウスの違いは Nbs1 の C 末側蛋白の発現にあるので、ヒト NBS 細胞同様に生存には C 末側蛋白が必要であることが示された。一方、正常細胞が極一部存在するキメラマウスが偶発的に発生した。このマウスは免疫グロブリンの低下や性腺低形成などヒト NBS 患者の臨床症状を呈すると共に、放射線照射後に体毛が早期に白色化して正常マウスに比較して老化傾向を示した。また、このマウスから樹立した Nbs マウス細胞は、ヒトマウス細胞と同程度の放射線感受性を示した。このため、テロメア結合蛋白 TRF2 と NBS1 との相互作用を解析した。免疫共沈法及び細胞のフォーカス形成による共局在は NBS1 と TRF2 は S 期初期に相互作用することを示した。NBS 細胞ではテロメア G-tail が短いことから、NBS1 と TRF2 が G-tail の延長とテロメア安定に機能していると思われる。また、Nbs1 マウスと ATM 及び Ku マウスとの交配では、これらの遺伝子のダブルノックアウトマウスは作製出来なかった。恐らく胚発生の極く初期に致死になると思われる。

しかしながら、同時に作成したチキン Nbs1 エクソン 2

からエクソン6に相当する約5.5kbのゲノムDNAをターゲットしたDT40細胞は生存しており実験に使用可能であった。Nbs1ノックアウト細胞はヒトNBS細胞と同じく生存可能であるが、野性型DT40細胞と比較して顕著に増殖速度が低下していた。また、ヒトNBS細胞と同様に自然及び放射線誘発染色体の高頻度の発生と放射線致死高感受性を示した。一方、ターゲットインテグレーションを指標に相同組換え能を野性型DT40細胞と比較した結果、Nbs1ノックアウト細胞では顕著に相同組換え能が低下している事が判明した。また姉妹染色分体交換(SCE)は相同組換えによることが知られているが、MMC誘発のSCE頻度はチキンNbs1細胞で極端に低下していることが示された。これらの結果はSC-neoを導入した細胞で、I-SceI制限酵素を細胞内に一時的に発現させてDNA二重鎖切断を発生させて相同組換えをアッセイする実験系とも良く一致して、Nbs1ノックアウト細胞では相同組換えが野性型に比較して1/100以下に低下していた。もう一方のDNA二重鎖切断の再結合過程である非相同DNA末端再結合をpDVH14レポーター遺伝子を用いてアッセイした結果、direct joiningとmicro-homology associated joiningのいずれもNbs細胞では正常であることが確認された。これはATM欠損のAT細胞で異常な相同組換え能を呈するが、非相同DNA末端再結合が正常であることと一致する。

4. 考 察

NBSは歴史的にATのバリエーションに分類されてきた。実際、本研究で示したように放射線損傷の修復に対してATと同じ修復経路の欠損を示した。しかしながら、テロメア維持に関してはAT細胞でもNBS1フォーカス形成の異常が見られない。また、NBS1のTRF2やhMre11への結合も正常細胞と同様にS期前期で観察された。このことから上述のDNA損傷と異なって、ATMがNBS1と同一のテロメア維持経路で機能しているとは言い難い。テロメア複製の場合には染色体上の定まった位置テロメアで起こる現象であり、しかもそこにはhMre11/Rad50が細胞周期を通じて結合していることからヒストンH2AXリン酸化による蛋白のリクルートが必要でないと思われる。テロメア維持に於ける魅力的なATMの機能は、何らかの原因でテロメアが短縮した細胞をアポトーシスに誘導する事である。アポトーシス誘導はDNA損傷応答におけるATMの重要な機能であり、本研究のAT細胞を使用した実験結果とも矛盾しない。しかし、ATMの酵母ホモログTEL1がテロメア維持で重要な機能をしていると思われる酵母ではアポトーシスが確認されていないことから、さらに重要なテロメア維持機能がATMに存在すると思われる。

テロメラーゼ活性のないヒト組織の初代培養細胞は細胞分裂毎にテロメアが短縮するが、テロメラーゼ活性を有す

る不死化細胞では、S期初期にG-tailをプライマーにテロメアが延長することが知られている。これと一致して、我々の結果はNBS1がG-tail形成に重要であること、そしてNBS1がTRF2とS期初期に複合体を形成することを示した。NBS1のテロメア維持機構はS期初期にG-tailを延長することが示唆されるが、その詳細は不明である。我々は既にNBS1が放射線誘発DNA二重鎖切断の再結合過程である相同組換えに必要な5'-突出型単鎖DNA形成と同様の機構による可能性が指摘される。G-tailは染色体末端のT-loopの開環やGカルテットの解消にも関与しているため、NBS細胞におけるこれらの解析が哺乳動物細胞でのテロメア維持機構の解明につながると期待される。

我々が作製した二種類のノックアウトマウスのうち、Cre-LoxpでNeo遺伝子を除いたコンストラクトでは胚発生の極く初期(E3.5日以前)に致死になった。これに対してNeo遺伝子が存在するマウスでは少なくともE7.0~8日迄生存可能であった。後者ではNbs1のC末が発現していることが確認されており、C末側の存在が発生に大きな影響を及ぼすことが確認出来た。チキンNbs1ターゲット細胞を用いた解析ではNbs1はエンドジョイニングよりも相同組換えの蛋白であることが示された。この点は高等真核生物と酵母での機能の大きな違いである。既に我々はNbs1 C末側がヌクレアーゼ活性を有するMre11/Rad50との結合に必須であることを示したので、相同組換えの初期に必要な突出型1本鎖DNAが出来ないことがNbs1の相同組換え能や胚発生初期での死に繋がると考えられる。従ってテロメア維持に重要なG-tailも同様の一本鎖DNAから構成されるのでNbs1もテロメアの異常短縮、そして今回示された個体レベルでの老化の原因であると考えられる。ATMやDNA-PK(Ku70/80)はヒストンのリン酸化に相補的に作用していることが知られているのでそのダブルノックアウトマウスはクロマチン・リモデリングの失敗から致死になると予想される。Nbs1とのダブルノックアウトマウスについても他の原因が予想されるので今後さらに解析が必要である。

5. 総 括

NBS1のテロメア維持における役割を解析した結果、NBS1蛋白はテロメア結合タンパクTRF2とテロメア部位で共局在することが免疫染色法により示された。また、NBS1抗体を用いた免疫共沈物のウエスタンブロット解析は、TRF2とNBS1が物理的に結合していることが確認された。この結合は細胞周期依存性でS期初期のテロメアが延長する時期と一致した。NBS1はヌクレアーゼ活性を有するMre11/Rad50と複合体を形成することから、テロメラーゼによるテロメア延長に必要な一本鎖DNAのG-

tail を測定したところ、NBS 細胞では正常細胞に比較して短いことが判明した。一方、Nbs1 のノックアウトマウスを 2 種類のターゲティングベクターを用いて作製した結果、Nbs1 の C 末側が発現した ES 細胞では胎生 7.5 日まで生存したが、ヌル変異体のマウスでは 3.0 日以前に胚が消失した。Nbs1 の C 末側発現の変異体からは細胞株樹立が可能で、患者細胞と同様の放射線感受性を示した。また、Nbs1 の野性型と変異体から構成されるキメラマウスでは免疫不全や性腺低形成、そしてマウス由来細胞は放射線高感受性及び染色体不安定性など、ヒト疾患と同様の症状を呈して病態解析に有用であることを示した。一方、チキン B 細胞由来の DT40 細胞を用いて Nbs1 のターゲティングを行った結果、相同組換え能が野性型の 1/100 以下に低下していることから、ATM 同様に Nbs1 は相同組換え修復の蛋白であることが判明した。しかしながら、テロメア維持に関しては A T 細胞でも NBS1 フォーカス形成の異常が

見られない。また、NBS1 の TRF2 や hMre11 への結合も正常細胞と同様に S 期前期で観察された。このことから上述の DNA 損傷と異なって、NBS1 が ATM とは別経路のテロメア維持機能を有していることが示唆された。

(関連論文)

- 1) H. Tauchi, J. Kobayashi, K. Morishima, et al.: Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells. *Nature*, 420:93-98, 2002
- 2) J. Kobayashi, H. Tauchi, S. Sakamoto, et al.: NBS1 localizes to g-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain. *Curr. Biol.*, 12:1846-1851, 2002
- 3) H. Tauchi, S. Matsuura, J. Kobayashi, et al.: Nijmegen breakage syndrome gene, NBS1, and molecular links to factors for genome stability. *Oncogene*, 21: 8967-8980, 2002