

哺乳類染色体の安定性・不安定性を支配する遺伝子の研究

Genetic control of chromosomal stability in mammalian cells

- 代表研究者 国立遺伝学研究所分子遺伝研究系教授 瀬野 惇 二
Prof., Dept. of Molecular Genetics, National Inst. of Genetics
Takeshi SENO
- 協同研究所 東京大学応用微生物研究所助教授 鮎 沢 大
Assoc. Prof., of Appl. Microbiology, Univ. of Tokyo
Dai AYUSAWA
- 岡山大学薬学部助教授 綿 矢 有 佑
Assoc. Prof., Faculty of Pharmaceutical Sci, Okayama Univ.
Yusuke WATAYA
- 放射線医学総合研究所遺伝研究部主任研究官 辻 秀 雄
Chief., Div. of Genetics, National Inst. of Radiological Sci.
Hideo TSUJI
- 横浜市立大学木原生物学研究所助手 三 品 裕 司
Assist., Kihara Inst. of Biological Res., Yokohama City Univ.
Yuji MISHINA

Chromosome aberrations including gene amplification and translocation are a cytogenetic characteristics of tumor cells. Bloom's syndrome, Fanconi's anemia, ataxia telangiectasia, and xeroderma pigmentosum that are cancer prone autosomal recessive disease, are in fact called chromosome instability syndrome, indicating that chromosome stability is controlled genetically. In order to identify genes and their products that are associated with control of chromosome stability in mammalian cells, (i) we isolated temperature-sensitive mutants from Chinese hamster CHO cells which showed high frequencies of chromosome aberrations and/or sister chromatid exchanges when exposed to a non-permissive temperature of 39°C. By genetic complementation test 25 mutants were classified into 7 groups; Mutants of group 1, 2, and 3 were characterized as high frequency of chromosome aberrations, sister chromatid exchanges, and both, respectively. At non-permissive temperature, some mutants were arrested in S phase and some in other phases of cell cycle, indicating that chromosome stability is controlled by many genes associated with not only DNA replication but also chromatin condensation/decondensation, and chromosome disjunction. By introducing human DNA into some of these mutants attempts to clone the human genes responsible for chromosome stability is under way. (ii) We found that a physiological distortion of nucleotide metabolism leads to chromosome instability in mammalian cells. When cells were starved of thymidylate by treating with deoxynucleoside analogues such as FdUrd or mutant cells deficient in thymidylate synthase were cultured in the absence of thymidine, a rapid intracellular imbalance of 4 dNTPs was provoked that was followed by an accumulation of DNA fragments of 50-150 kilobases in length and cell death. We demonstrated in vitro that an unknown endonuclease responsible for such specific double strand DNA breakage is induced in the thymidylate starved cells. From these results we discuss about a possible mechanism of programmed death in somatic cells that is tightly associated with chromosome replication.

研究目的

体細胞は DNA に損傷を与える外的要因、たとえば放射線やマイトマイシン C、ブレオマイシンなどの薬剤によって死に至るが、他方、内的（生理的）要因によっても細胞が潜在的にもつ致死活性が誘発され細胞死に至る。後者の現象は programmed death または apoptosis とも呼ばれるが、その分子機構については未だ研究は未開拓のままである。

本研究においては、(1) 染色体が高温で安定性を失う温度感受性変異株をチャイニーズハムスター CHO 細胞から分離し、染色体異常 (CA, chromosome aberrations) や姉妹染色分体交換 (SCE, sister chromatid exchanges) を指標に関与遺伝子産物を同定しようとする。また、(2) 我々が既にマウス FM3A 細胞から分離したチミジル酸合成酵素 (TS) 欠損変異株（チミジン要求性）が、チミジン飢餓培養によって急激な細胞死を起こし、同時に特異的な DNA2 重鎖切断を伴う現象を programmed death の一種として捉え、同現象の誘発機構を分子レベルで解明する。ちなみに、精神遅滞やがん細胞の染色体転座に関係する染色体の遺伝性 fragile site は、チミジン飢餓によって誘発される。

本研究は生命現象の基幹にふれるものであると同時に発がん要因や制がん物質に対する反応性の個人差、およびその疾患との関連の理解に予防的、臨床的見地から貢献するものである。

研究経過

染色体の安定保持機構が遺伝的支配のもとにあることは、高発がん性ヒト遺伝性疾患であるブルーム症候群、ファンconi貧血症などの患者の培養細胞が染色体不安定性を示すことからうなずける。本研究では、同機構に関与遺伝子にまでさかのぼって解析するために、染色体の安定保持に欠陥を示す温度感受性変異株を CHO 細胞から積極的に分離することを試みた。既にいくつかの変異株について細胞遺伝学的解析を開始している。

また、我々はマウス培養細胞から分離したチミジル酸合成酵素 (TS) 欠損変異株を用いることによって抗がん剤メソトレキセート (MTX) や 5-フ

ロロデオキシウリジン (FdUrd) の強い殺細胞効果と同一、かつより完全な効果を得られる実験系を開発してきた。すなわち、同 TS 欠損株細胞をチミジン無添加培養すると強いチミン飢餓が起こり、急激な細胞死が起こる。その際、単に DNA 合成の停止が起こるだけではなく、dTMP の de novo 供給停止（これをチミジル酸ストレスという）が引金となって特異的な DNA2 重鎖切断が誘発されることを示した。その特徴は (i) 切断が染色体の特定領域でのみ起こる（蓄積 DNA 断片は約 100 キロ塩基対 (kbp) と均一）、(ii) その結果、染色体異常 (CA) や姉妹染色分体交換 (SCE) が誘発される、そして (iii) 切断には誘導性の未知エンドヌクレアーゼ（その誘導はシクロヘキシミド処理で抑えられる）の関与が示唆されることの3点である。本研究においては、上記実績をふまえて、体細胞のもつ programmed death の潜在的活性を明らかにする目的でさらに研究をすすめるものである。

研究成果

1. 染色体の安定保持に関する変異株分離

ハムスター CHO/K1 細胞を変異原 MNNG で処理し、CA あるいは SCE を非許容温度 (39°C) で誘発する温度感受性株を分離した。得られた 25 の温度感受性変異株は、変異株同志の細胞融合テストによって 13 の相補性群に分類された。そのうち CA および SCE の誘発される 5 相補性群について 39°C における染色体不安定化の内容を検討したところ、I 群 (tsTM3, 8, 24) は CA を、II 群 (tsTM4, 11, 13, 19, 26) は SCE を、III 群 (tsTM18, 20) は CA, SCE 両方を好発した。なお、他の 2 群に属する変異株は顕著ではないが CA あるいは SCE を 39°C で特異的に示した。この結果は、複数の遺伝子が CA や SCE に関与することを示し、また CA と SCE 両者に関与する遺伝子と、主としていずれか片方に関与する遺伝子のあることを示唆する。tsTM3, tsTM4, tsTM8 および tsTM18 は、非許容温度で培養すると S 期で細胞周期が停止し、かつ染色体不安定化が誘発されることから、S 期の機能異常が染色体の不安定化に関与していることが推測された。しかし、

S 期以外に停止する変異株の中にも CA あるいは SCE を好発するもの (tsTM13, 18, 19, 24) もあり、これらの結果だけでは染色体不安定性と DNA 複製との関係は不明である。ちなみに、tsTM4 と 8 は 39°C において DNA 合成活性は正常であったが、tsTM3 は低下した。また、tsTM18 は S 期および G2 期の両方に停止し、tsTM13 は M 期における染色体の分配に異常を示した。

高発がん性で SCE を好発するヒト遺伝性疾患ブルーム症候群患者の変異遺伝子を明らかにするため、上記 CHO 温度感受性変異株のうち tsTM1, tsTM3 および tsTM4 の各々と融合させ、SCE について変異の相補が見られるかどうかを検討した。その結果、tsTM1, tsTM3 共にブルーム細胞の融合で SCE 頻度は正常レベルを示したので、両変異共ブルーム症候群の変異とは異なることが体細胞遺伝学的に示された。しかし、tsTM4 については、なぜかブルーム細胞と雑種細胞を形成せず、さらに検討を要する。

上記変異株細胞の染色体不安定化と CA や SCE の際に起こる DNA 組換え (再配列) 活性との間に関連があるかどうかをみるために、非許容温度下にネオマイシン耐性遺伝子の導入による形質転換実験を行った。その結果、tsTM2, 3, 4, 8 は親株細胞に比べ 2.5~5 倍高い形質転換頻度を示した。このことは、DNA 組換え活性と染色不安定化の間に、密接な関連があることを示唆する。

2. チミジル酸ストレスの分子機構

マウス乳がん由来細胞 FM3A から分離したチミジル酸合成酵素 (TS) 欠損株細胞を用いて、以下の研究成果を上げていることは既に述べた。すなわち TS を欠く細胞はチミジン無添加培地におくと TS を標的とする 5-フロロデオキシウリジン (FdUrd) で親株細胞を処理したときと同様に、急激な細胞死を引き起こす。その際、細胞内 DNA 基質 dNTP プールの不均衡が起こり、DNA2 重鎖切断を引き起こす。今回は、この 4 種の dNTP 間の不均衡が細胞死の誘因であるかどうかを検討した。すなわち、dNTP プール不均衡を起こすことが予想される FdUrd 以外の化合物について、細胞死を起こすかを検討した。TS 阻害剤である

5-トリフロロメチルデオキシウリジン、リボヌクレオチド還元酵素阻害剤であるデオキシアデノシン、2-クロデオキシアデノシンなどはいずれも dNTP プール不均衡を起こし、DNA2 重鎖切断とそれに続く細胞死をもたらした。しかも、各化合物によって dNTP プールの不均衡パターンは異なっていた。すなわち、誘因は別であっても dNTP プール不均衡は共通の機構によって細胞死を引き起こすと判断した。これらの結果から、“dNTP プール不均衡細胞死”の機構が存在するという作業仮説をもつに至った。

上記 DNA2 重鎖切断によって比較的均一な長さの DNA 断片が蓄積することをアルカリ性および中性のフィルター溶出法によってすでに明らかにしているが、今回パルフィールド電気泳動法によってより正確な結果を得た。すなわち、マウス FM3A 細胞の場合は DNA 断片の長さは 100~200 kbp、ヒト CCRF-HSB2 細胞では 50~100 kbp であった。この結果は、DNA 切断がランダムではなく、なんらかの染色体の複製機能単位と関連することを示唆する。

3. dNTP プール不均衡によって誘導されるエンドヌクレアーゼ

蛋白質合成阻害剤シクロヘキシミドがチミジル酸ストレスによる DNA 切断および細胞死を抑えることは既に明らかにしたが、このことは誘導性エンドヌクレアーゼの関与を示唆する。このエンドヌクレアーゼの存在を検証するため、FdUrd 処理細胞からその分離精製をこころみ、以下の結果を得た。同細胞抽出液を DEAE-アガロースカラムクロマトグラフィーで画分したところ、5 mM NaCl で溶出する画分に未処理細胞クロマチン DNA を切断する活性を検出した。反応後のクロマチン DNA をパルスフィールド電気泳動で解析したところ、*in vivo* の場合と同様の長さの DNA 断片を特異的に生じた。すなわち、同活性はクロマチン DNA 上の特異的な箇所を認識して 2 重鎖切断すると考えられる。なお、上記クロマトグラフィーにおいて 0 mM NaCl で溶出される画分に 5 mM NaCl 画分の DNA 切断活性を阻止する因子が存在した。

4. *In vitro* におけるチミジル酸ストレス処理細胞の DNA 組換え活性の解析

ネオマイシン耐性 (neo) 遺伝子上の互いに異なった箇所に部分欠失をもつ 2 種の不完全遺伝子を基質として用い、細胞抽出液を含む *in vitro* の反応系で組換え反応によって活性型 neo 遺伝子の生ずる頻度を検討した。その結果、チミジル酸ストレス処理をしたマウス FM3A 細胞には未処理細胞に比べ有意に高い (2 倍) 組換え活性が存在することが示された。しかし本活性が相同的組換えを促進する活性かどうかはまだ明らかではない。

今後の課題と発展

染色体異常 (CA) および SCE を非許容温度で起こす多種類の温度感受性変異株が増殖を指標にした第一次スクリーニングによって高頻度で得られたことは、染色体の安定保持機構が DNA 複製あるいは染色体の分配機構と密接に関連することを浮び上がらせた。ちなみに細胞周期 G2/M 期における染色体凝縮に際して起こるヒストン H1 のリン酸に関与するユビキチン活性化酵素 E2 の変異株 ts85 がマウス FM3A 細胞からすでに安田らによって分離・解析されているが、本研究における tsTM3 と 27 は ts85 と同一相補群であった。このことは、染色体の安定保持に DNA 複製以外の機構が関与する証拠として興味深い。

また、DNA 複製には限られたプール量の 4 種の dNTP を効率良く供給する装置が核マトリックス上に存在することが明らかにされつつあるが、同プールの不均衡が敏感に染色体異常や SCE につながる DNA2 重鎖切断を誘発することは、体細胞が潜在的にもつ自爆死の機構を具体的に示し、興味深い。特にこの現象が DNA 組換え活性とも関連することを示したことは、最近の国の内外における動物をモデルに用いた遺伝子治療の基礎研究の進展との関連で注目し得る。我々の今後の研究の一層のスピードアップと関連分野への貢献が望まれる。

今回の成果に基づき、次の課題としては染色体の安定保持機構に関わる因子あるいは積極的に不安定化をもたらす因子を遺伝子およびその産物と

して生化学的に同定することである。現在、tsTM4 および 8 の変異株細胞にヒト細胞 DNA を導入して形質転換細胞クローンを分離し、遺伝子のクローン化に向けて研究をすすめている。また、染色体上の不安定性に関わる DNA あるいはクロマチン構造の特異性を塩基配列レベルで明らかにする研究を進めている。その成果は、DNA の安定保持機構の研究の進展ばかりでなく、染色体レベルの DNA 複製レベルの研究に新しい局面を開くものと期待される。

発表論文

- 1) Ayusawa, D., Arai, H., Wataya, Y. and Seno, T.: A specialized form of chromosomal DNA degradation induced by thymidylate stress in mouse FM3A cells. *Mutat. Res.*, **200**, 221-230 (1988)
- 2) Tsuji, H., Heartlein, M. W. and Latt, S. A.: Disparate effects of 5-bromodeoxyuridine on sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in Bloom syndrome fibroblasts. *Mutat. Res.*, **198**, 241-253 (1988)
- 3) Hori, T., Takahashi, E., Tsuji, H., Tsuji, S. and Murata, M.: Fragile X expression in thymidine-prototrophic and auxotrophic human-mouse somatic cell hybrids under low and high thymidylate stress conditions. *Cytogenet. Cell Genet.*, **47**, 177-180 (1988)
- 4) Wataya, Y., Yamane, K., Hiramoto, K., Otsuka, Y., Okubata, Y., Negishi, K. and Hayatsu, H.: Generation of intracellular active oxygens in mouse FM3A cells by 3-hydroxyamino-1-methyl-5H-pyrido(4,3-b) indole. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* **79**, 576-579, (1989).
- 5) Hirota, Y., Yoshika, A., Tanaka, S., Watanabe, K., Otani, T., Minowada, J., Matsuda, A., Ueda, T. and Wataya, Y.: Imbalance of deoxyribonucleoside triphosphates, DNA double-strand breaks, and cell death caused by 2-chlorodeoxyadenosine in mouse FM3A cells. *Cancer Res.* **49**, 915-919 (1989).
- 6) Yamato, M., Hirota, Y., Sasaki, J., Hashigaki, K., Hayatsu, H. and Wataya, Y.: Lethal DNA double strand breaks in mouse mammary tumor FM3A cells treated *in vitro* with anti-neoplastic tropolone, α , α -Bis(2-Bis(2-hydroxy-6-isopropyl-tropon-3-yl)-4-methoxytoluene (JCI=3661). *Cancer Res.* (in press).
- 7) Wataya, Y., Hirota, Y., Hirota, Y., Hiramoto-Yoshioka, A., Otani, T., Minowada, J., Matsuda, A. and Ueda, T.: The mechanism of 2-

- chlorodeoxyadenosine-induced cell death. In "Human Purine and Pyrimidine Metabolism" (eds. Mikanagi, K. *et al.*), VI, Plenum Publishing Corp., New York (in press)
- 8) Ayusawa, D., Kaneda, S., Shimizu, K., Takeishi, K. and Seno, T.: Structure of the human thymidylate synthase gene and its cell cycle dependent expression in normal human diploid fibroblasts and transformants of rat 3Y1 fibroblasts stimulated to proliferate. *Cell Struct. Funct.* **13**, 348-349 (1988).
 - 9) Yamauchi, M., Ayusawa, D., Shimizu, K., Seno, T. and Matsushashi, M.: Two types of mouse FM3A cell mutants deficient in 5-aminimidazole-4-carboxamide ribotide transformylase and their transformants isolated by human chromosome-mediated gene transfer. *Somat. Cell Mol. Genet.*, **15**, 39-48 (1989)
 - 10) Kaneda, S., Nalbantoglu, J., Takeishi, K., Shimizu, K., Gotoh, O., Seno, T. and Ayusawa, D.: Structure and functional analysis of the human thymidylate synthase gene. *Genome*, **30**, 234, (1988)
 - 11) 辻秀雄, 松戸康, 辻さつき, 堀雅明: 染色体不安定性温度感受性変異株の分離, I. 染色体異常及び SCE を好発する変異株. 日本遺伝学会第 61 回大会, 1989 年 10 月.
 - 12) 松戸 康, 辻 秀雄, 内海俊策, 林 昭子, 堀雅明: 染色体不安定性温度感受性変異株の分離, II. 核分裂に異常を有する変位株. 日本遺伝学会第 61 回大会, 1989 年 10 月.
 - 13) 辻 秀雄, 堀 雅明: 染色体不安定性温度感受性変異株細胞の分離. 日本癌学会第 48 会総会, 1989 年 10 月.
 - 14) 堀 雅明, 高橋永一, 辻 秀雄, 辻さつき, 村田紀: ヒト染色体脆弱部位 (fragile site, FS) の解析, I. DistamycinA 誘導性脆弱部位 (DAFS). 日本遺伝学会第 61 回大会, 1989 年 10 月.
 - 15) 渡部和代, 平本 (吉岡) 晃子, 綿矢有佑: 細胞内 dNTP プールの不均衡に起因する DNA 二本鎖切断の機構について. 第 109 回日本薬学会年会, 1989 年 4 月.
 - 16) 渡部和代, 吉田聖, 平本晃子, 綿矢有佑: 細胞内 dNTP プールの不均衡による DNA 鎖切断の分子機構. 第 62 回日本生化学会大会, 1989 年 11 月.
 - 17) Wataya, Y., Watanabe, K., Yoshida, S. and Hiramoto-Yoshioka, A.: dNTP imbalance and DNA double strand breaks in mouse FM3A cells and mechanism of cell death. 第 16 回核酸化学シンポジウム, 1989 年 10 月.