

氏 名	あき 秋 やま 山 こう 康 いち 一
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 91 号
学位授与の日付	平 成 18 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	生 命 科 学 研 究 科 統 合 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	DNA 修復及びテロメア防御因子である <i>Rad54</i> 及び <i>Ku70</i> 遺伝子を破壊した、テロメラーゼ非依存的テロメア維持機構を有するマウス ES 細胞の遺伝学的解析
論文調査委員	(主 査) 教 授 眞 貝 洋 一 教 授 石 川 冬 木 教 授 松 本 智 裕

論 文 内 容 の 要 旨

通常の DNA 複製機構は直鎖状染色体の末端を完全に複製できない。そのため、真核細胞ではそれを解決するためにテロメア維持機構が発達している。哺乳類のテロメア DNA は TTAGGG の繰り返し配列から構成されており、テロメラーゼは染色体の 3' 末端にこのテロメア配列を付加することによりテロメア長を維持している。テロメラーゼは逆転写酵素活性をもつタンパク質成分と、テロメア配列の鋳型となる RNA 成分から成る。生殖細胞や一部の幹細胞を除き、多くの体細胞ではテロメラーゼ活性がみられない。それゆえ細胞分裂のたびにテロメア長は短くなり、遂には細胞分裂が強く阻害され、染色体の不安定化やアポトーシスが誘導される。

テロメラーゼ RNA を欠失させたマウス胚性幹 (ES) 細胞はテロメラーゼ活性をもたず、細胞分裂のたびにテロメアが短くなり、テロメア長が閾値以下になると、染色体の不安定化による増殖阻害が誘導される。ところが、この株の中から、分裂能の回復した細胞が出現し、この細胞ではテロメラーゼ非依存的にテロメア長の維持・回復が起きている。この、テロメラーゼ非依存的テロメア維持機構 (ALT 機構: Alternative Lengthening of Telomeres) は既に酵母やヒトの細胞でも確認されている。

筆者は、ALT 機構が相同組換え修復によるものであるというモデルをもとに、相同組換えに関与する遺伝子であり、テロメア維持にも関与する *RAD54* に着目し、それをコンディショナルにノックアウトしたマウス ALT 細胞を樹立した。また、その対照として非相同末端融合修復に関与し、かつテロメアの末端保護にも関与する *Ku70* のノックアウト ALT 細胞株もあわせて解析した。

予想に反して、*RAD54* もしくは *Ku70* を欠失したマウス ALTES 細胞は ALT 表現型に影響を受けなかった。このことから、哺乳類 ALT 機構は *RAD54* 及び *Ku70* に非依存的な経路で制御されていることが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

通常、テロメア部分の DNA はテロメラーゼによって優先的に維持・伸長されており、生殖細胞および大部分の不死化あるいはガン細胞ではテロメラーゼを発現することで細胞の無限増殖が保障されている。しかし、ある状況下では、テロメラーゼが機能しなくてもテロメア長の維持・伸長が可能となる。

このテロメラーゼ非依存的なテロメア維持には、組み替え修復、特に相同組み換え系が寄与していることが、これまでの解析から示唆されている。

申請者は、いくつかの観点から、この哺乳類のテロメラーゼ非依存的テロメア維持機構の実体を明らかにすることを試みてきた。その解析の 1 つに、*Rad54* とテロメラーゼ非依存的テロメア維持機構の関係がある。*Rad54* は相同組み換え反応に重要な役割を持つ、二本鎖 DNA 依存的な ATPase 活性を持つ因子で、テロメア構造維持にも重要な役割を持つことが示唆されていた。また、*Rad54* を欠損させると相同組み換え反応が阻害されること、しかし *Rad54* 欠損 ES 細胞は樹立可

能であることもすでに報告されていた。そこで、申請者の所属していた研究室で樹立されたテロメラーゼ非依存的にテロメア長の維持・伸長を行うテロメラーゼ欠損 ES 細胞株に、さらに Rad54 欠損を導入することで、テロメア維持にどのような影響が出るかを解析した。定法に従い、Rad54 欠損 ES 細胞を樹立してみると、当初の予想に反して、Rad54 欠損はこの ES 細胞のテロメア維持には影響しないことが明らかとなった。また同時に申請者は、非相同末端組み換えに必須の因子 Ku70 が欠損したテロメラーゼ欠損 ES 細胞に関しても、Ku70 の欠損がテロメラーゼ非依存的テロメア維持機構にどのようなインパクトを持っているかを調べた。残念ながら、Ku70 もテロメラーゼ非依存的なテロメア維持には必須ではないことが判明した。結果、どのような分子がテロメラーゼ非依存的テロメア維持機構に関与しているのか、特に相同組み換え因子の関与についてはどうなのか、といった問題に対しての新たにポジティブな知見を得るには至らなかった。しかし、テロメラーゼ非依存的テロメア維持機構の性状がさらに浮き彫りになったことは、この研究分野に重要な情報を提示したといえる。従って、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。さらに、平成18年10月17日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行なった結果、合格と認めた。