

研究テーマ

結節性硬化症原因遺伝子Tsc2関連遺伝子によるゲノム維持機構の解析

1. 序論

結節性硬化症は常染色体優性遺伝疾患であり、てんかん・知的障害・血管繊維腫の3症状が特徴である。結節硬化症の発症頻度は、1956年の報告では15万人に1人であったのに対し、最近では約6千人に1人と徐々に上昇してきている。これまでに、原因遺伝子TSC1およびTSC2がポジショナルクローニングにより単離・同定されている。その後の解析により、TSC1とTSC2が複合体を形成し、TOR (target of rapamycin) と呼ばれるタンパク質リン酸化酵素を負に制御する事がヒトや分裂酵母で明らかにされている。TORはアミノ酸の取り込み、タンパク質合成、ミトコンドリアでのエネルギー生産を促進する一方、細胞死やオートファジーの抑制を行い、細胞増殖を正に制御する極めて重要な役割を果たしている。したがって、TSCタンパク質機能不全はTOR活性の恒常化を引き起こし、その結果結節硬化症の発症に繋がると考えられている。

我々は、分裂酵母を用いて数多くの機能未知遺伝子の機能解析を行っている。分裂酵母には約200種もの癌や神経疾患など様々なヒト疾患関連遺伝子相同遺伝子が存在しており、これは分裂酵母全遺伝子の約4%に相当している。しかしながら、これら遺伝子群の機能はほとんど明らかにされていない。分裂酵母は遺伝学・生化学・細胞生物学的な解析が可能であるため、これら疾患遺伝子群の機能解明に有利であると考えられる。まず、ゲノムおよび細胞内局在データベースサーチにより疾患関連遺伝子を主に含む様々な機能未知遺伝子を選出した。そして、これらの遺伝子を破壊した分裂酵母を多数作製し、これらの欠損株がどのような表現型を示すか、特にヘテロクロマチン領域のサイレンシング、胞子形成能、染色体分配、およびストレス応答に着目し実験を行った。その結果、いくつかの欠損株がDNA傷害に対する高感受性を示すことや、ヘテロクロマチン形成異常、染色体分配異常、ストレス高感受性を示すことを見いだした。このような欠損株の中には、結節硬化症原因遺伝子TSC2と相同性の高い遺伝子tsr1+ (tsc2-related gene 1) が破壊されているものが含まれていた。この破壊株 (tsr1Δ) はDNA傷害を引き起こすブレオマイシンへの感受性が著しく上昇していた。したがって、この破壊株ではDNA修復経路に異常が生じゲノム安定性の維持が出来なくなっている、あるいはストレス応答に機能破綻が生じている可能性がある。そこで、分裂酵母tsr1+およびtsc1/2+の機能解析を行い、tsr1+遺伝子の疾患への関与の可能性を探ることを目的とする。

2. 方法

(1) 種々のDNA障害に対する感受性

細胞は、組換え修復・塩基除去修復・ヌクレオチド除去修復など複数の経路により損傷DNAを修復する。tsr1欠損株がDNA二重鎖切断を引き起こすBleomycinだけでなく、UV・ヒドロキシ尿素・MMS (methyl methane sulfonate) による、種々のDNA損傷に大しても高い感受性を示すか否かを検討し、tsr1がグローバルな修復に関与するのか、あるいは特定の修復経路でのみ機能するのかを明らかにする。

(2) DNA傷害以外のストレスに対する感受性

DNA 傷害以外にも、低温・高温・高塩濃度・活性酸素など様々なストレスが存在しており、常時細胞はこれらストレスに応答している。このようなストレスに対して Tsr1 が何らかの役割を果たしているかを検討し、DNA 傷害時にのみ機能するのか、あるいは一般的にストレスと呼ばれるものに対して機能しうのかどうかを検討する。

(3) *tsr1* と *tsc1/2* との機能的関連

他の高等動物と同様に、分裂酵母にも Tsc1 および Tsc2 が存在し、分裂酵母 TOR の活性を制御することが示されている。

(4) ストレス応答以外の Tsc 関連タンパク質の機能解析

ストレス応答以外にも、細胞増殖・減数分裂・染色体分配などに Tsc 関連タンパク質が何らかの機能を持つかを検討する。

3. 結果

(1) 種々の DNA 障害に対する感受性

薬剤を含む寒天培地上に *tsr1* Δ 細胞の希釈系列をスポットし、野生株と増殖を比較することで感受性を示すを検討した。その結果、*tsr1* Δ はブレオマイシンだけではなく、紫外線・ヒドロキシ尿素・カンプトテシンに対して高感受性になっていた一方、MMS に対しては野生株と差が認められなかった(図 1)。したがって、少なくとも 2 種類の DNA 障害、すなわち DNA 二本鎖切断およびピリミジンダイマー、の修復に何らかの役割を果たすことが明らかとなり、Tsr1 タンパク質は比較的グローバルな修復に関与すると言える。

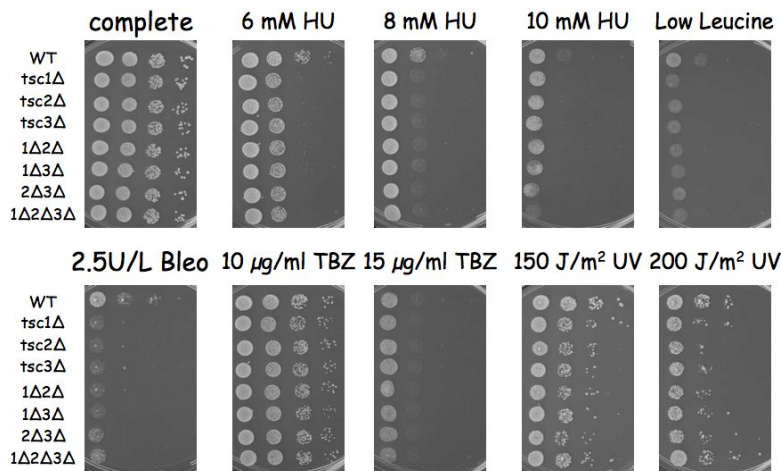


図 1 *tsc* 遺伝子欠損株の DNA 傷害に対する影響

(2) DNA 傷害以外のストレスに対する感受性

(1) DNA 同様に *tsr1* Δ 細胞の希釈系列を寒天培地上にスポットし、低温・高温・微小管重合阻害剤に細胞を曝し、生育に影響が出るかを検討した。その結果、特に低温で *tsr1* Δ 細胞の増殖は著しく阻害された(図 2)。したがって、低温ストレスに対する感受性が上昇していることが明らかとなった。

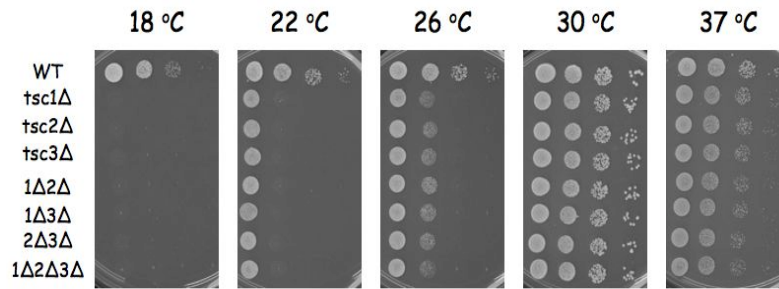


図2 tsc 遺伝子欠損による低温感受性

(3) tsr1 と tsc1/2 との機能的関連

Tsr1 と Tsc1/Tsc2 との間に機能的な差がみられるかどうかを検討したが、薬剤感受性などの表現型に差は認められず、tsc1Δ と tsc2Δ も DNA 傷害と低温に対する感受性の上昇がみられた。さらに、二重あるいは三重欠損株を作製しても、表現型の増強はほぼ見られなかった（図1と2）。

(4) ストレス応答以外の Tsc 関連タンパク質の機能解析

ストレス応答以外にも、細胞増殖・減数分裂・染色体分配などに Tsc 関連タンパク質が何らかの機能を持つかを検討したところ、いずれの欠損株も減数分裂に異常が見られ、減数分裂を誘導したにもかかわらず胞子形成が起りにくくなっていた（図3）。また、二重あるいは三重欠損株を作製しても、減数分裂異常表現型の増強はほぼ見られなかった。

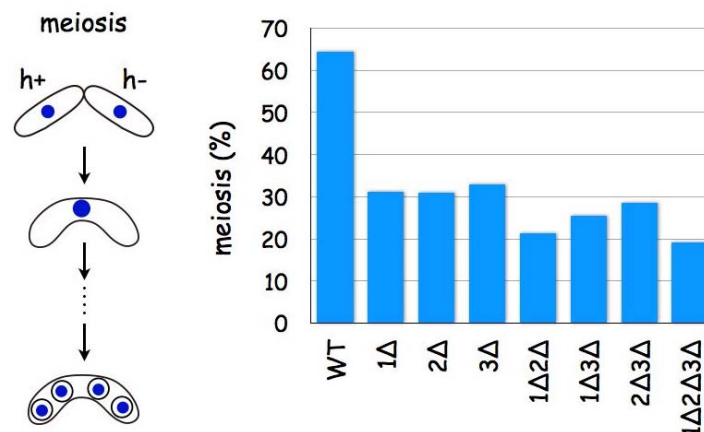


図3 Tsc 遺伝子欠損による減数分裂の異常

4. 考察 まとめ

今回我々が新たに同定したTsr1は、既知のTsc1/2とほぼ同じ経路で、同じような役割を果たしているものと考えられる。また、Tsc関連タンパク質の機能不全がDNA修復に関わること、配偶子を形成する減数分裂においても機能していることを明らかにした。これはヒトにおいて、Tscタンパク質が機能不全になったために、TORの異常活性化によるゲノム不安定化が癌化を引き起こす可能性を示唆するものである。これは、Tscタンパク質の下流因子であるTORの活性化を抑制する薬剤が結節性硬化症の治療に用いられていることと矛盾しない。今後は、Tsr1が一体どのような形でTOR活性制御に関与するのかを明らかにし、Tscタンパク質のより詳細な機能を明らかにしていきたい。

5. 参考文献

Genetics and molecular biology of tuberous sclerosis complex.

Napolioni V. and Curatolo P. Curr Genomics. 2008 Nov;9(7):475-87.