哺乳類テロメアとテロメラーズ研究の
新展開

Recent Advance in Mammalian Telo-
mere and Telomerase Research
Fuyuki ISHIKAWA, 東京工業大学
大学院生命理工学研究科

最近, テロメア DNA とは直接結合しないが, TRF1 や TRF2 との蛋白質間結合を介してテロメアに局在し, テロメア長を制御すると思われる因子がいくつか同定されている. TRF1 との two-hybrid アッセイによって同定されたタンキラーゼ (tankyrase ; TRF1-interacting, ankyrin-related ADP-ribose polymerase) は, 中央部分のアンキリンリピートと C 末端の PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) ドメインをもつことを特徴としている⁽⁹⁾. 少なくとも *in vitro* において, タンキラーゼは自分自身および TRF1 をポリ (ADP-リボシル) 化し, こうして修飾された TRF1 はテロメア配列への結合能が低下する. *in vivo* において, タンキラーゼはテロメアに

存在するので、TRF1の修飾を介してテロメア長を制御している可能性がある。興味深いことに、タンキラーゼは間期核においてテロメアの他に核膜孔にも存在し、分裂期では中心体近傍に位置を移すが、その生理的意義は知られていない⁽¹⁰⁾。

同様にTRF1とのtwo-hybridアッセイによって同定されたTIN2 (TRF1-interacting nuclear protein 2) はTRF1と結合し、TIN2のドミナントネガティブ変異体は、DNA結合ドメインを欠いたTRF1のそれと同様にテロメアをテロメラーゼ依存的に著しく伸長させる効果があった⁽¹¹⁾。最近、TRF2とのtwo-hybridアッセイによって、hRap1 (human Rap1) が同定された⁽¹²⁾。hRap1は、出芽酵母Rap1と同じようにN末端にBRCT (BRCA1 (breast cancer susceptibility gene 1) C-terminal) ドメイン、中央にmybドメインをもつ。出芽酵母Rap1は、そのC末端にSir3、Sir4のようなサイレンシング蛋白質が作用したり、Rif1、Rif2のようなテロメア長を制御する蛋白質が作用してテロメアヘテロクロマチンの構造維持に重要な役割を果たしている。ヒトRap1蛋白質はmybドメインをもつにもかかわらずテロメアDNAへの結合活性がなく、TRF2依存的にテロメアに局在しテロメア長を負に制御する。

以上のように、ヒトテロメアDNA結合蛋白質であるTRF1、TRF2のテロメア長制御機構は、タンキラーゼ、TIN2、Rap1などのTRF1、TRF2と結合する蛋白質を介しているものと思われる。Rap1やTIN2がいかにしてテロメア長を制御するのかについては、互いに排他的ではない2通りの可能性がある。

第一は、これらの蛋白質がテロメラーゼの作用を負に制御する第3の蛋白質をリクルートする可能性である。出芽酵母ではRif1、Rif2が出芽酵母Rap1C末端に結合してテロメア長を負に制御することが知られている⁽¹³⁾。興味深いことに、Rif1、2と結合する酵母Rap1のC末端の一部の領域は、ヒトRap1でも保存されている。Rif1、Rif2蛋白質のホモログがヒトにおいても存在し、このヒトRap1C末端にリクルートされる可能性がある。

第二は、TRF1、TRF2によってテロメラーゼが作用しにくいテロメア構造が誘導される可能性である。最近、テロメアDNAの末端Gテイル一本鎖配列が折れ戻って、より内側の二本鎖DNAとDループを作る可能性が指摘された⁽¹⁴⁾(図1)。この構造はt-loopと広く呼ばれている。少なくとも*in vitro*においては、TRF2はDループ領域に結合してt-loopの形成を促進する。Dループ領域では、Gテイルの二本鎖DNA形成によって約100～

200塩基程度の一本鎖TTAGGGができていると考えられている。TRF2は、このようなループ構造、すなわち二本鎖DNAと一本鎖DNAが平行に存在する状態によく結合するという。一方、TRF1はホモダイマーとして2個所のテロメア配列と結合するが、1つのTRF1ホモダイマーは同時にDNA上で離れたテロメア配列に結合することが可能である。1つのTRF1ホモダイマーが同時に2本の逆方向のテロメア配列に結合すると、2本のテロメアDNAがアンチパラレルにペアリングすることになり、長いテロメア配列がこのようにしてTRF1により折り畳まれることが示唆されている⁽⁴⁾。このようにしてテロメアDNAが幾重にも折り畳まれたテロメアシナプス構造は、t-loopの形成を促進するであろう(図1)。

このようにして、TRF1とTRF2はともにt-loop形成を促進するものと考えられている。t-loopにおいて、テロメアDNAの3'末端はDループ内に隠されている状態にあり、テロメラーゼはこれに作用しにくいと思われる。したがって、TRF1およびTRF2のテロメア長に対する負の制御効果は、このt-loopの形成を促進することによる可能性がある。

テロメラーゼ蛋白質成分

少なくとも試験管内で測定されるテロメラーゼ活性は、テロメラーゼ鋳型RNAであるTR (telomerase RNA)と触媒サブユニットTERT (telomerase reverse transcriptase)が必要にして十分である。たとえば、試験管内ウサギ網状赤血球転写・翻訳系(RRL; rabbit reticulocyte lysate)を用いてTRとTERTを同時に発現させると、高いテロメラーゼ活性が得られる^(15,16)。興味深いことに、すでに試験管内で個別に生成されたTR転写産物とTERT蛋白質を精製後混ぜ合わせても、それほど高いテロメラーゼ活性は得られなかった。このことから、RRL内には、TRとTERTの機能的な複合体形成を促進する未知の因子が存在するものと思われる。

Holtらは、TERTアミノ末端195アミノ酸を用いてtwo-hybridアッセイを行ない、p23蛋白質を同定した⁽¹⁷⁾。p23は、多くの種の主要な細胞質シャペロン蛋白質hsp90と結合し、hsp90は蛋白質リン酸化酵素やステロイドレセプター転写因子の高次構造の制御に関わることが知られている⁽¹⁸⁾。実際、抗p23抗体や抗hsp90抗体は細胞抽出液よりテロメラーゼ活性を免疫沈降でき、これらの蛋白質が少なくとも部分的には安定にテロメラーゼ複合体と結合していることが示唆された。hsp90

図 1 ■ TRF1, TRF2, t-loop によるテロメア長制御機構のモデル (文献 14) より改変)

短いテロメア DNA がテロメラーゼにより伸長されると(①), 結合する TRF1, TRF2 の数が増加する。TRF1 (濃いハーフトーン) は二量体を形成して専らテロメア二本鎖 DNA に結合する。それぞれがテロメア DNA と結合している 2 つの TRF1 二量体は, TRF 四量体を形成して 2 本のテロメアを近接させる。このような TRF1 の蛋白質間相互作用によるテロメア DNA の折り畳み, あるいは“シナプス化”は, G テイルと内側の二本鎖テロメア DNA を接近させる。G テイルがテロメア二本鎖 DNA に DNA 鎖侵入して t-loop を作ると, TRF2 (薄いハーフトーン) がこれに結合して安定化させる。以上のように, 長いテロメア DNA に多数結合した TRF1, TRF2 とともに t-loop 形成を正に促進する(②)。t-loop の状態では, テロメア DNA 3' 末端は t-loop 内に隠されており, テロメラーゼは作用できない。したがって, 細胞分裂のたびに末端複製問題によってテロメア長は短小化する(③)。その結果, 結合している TRF1, TRF2 の数が減少しテロメア DNA の折り畳みが弱くなり, t-loop は解離しやすくなる(④)。t-loop が解離してテロメア DNA の 3' 末端が露出するとテロメラーゼが作用しやすくなり, テロメア長は再び伸長する(①)。

は, ヌクレオチド結合モチーフをもち, ATP-hsp90 のみが p23 をはじめとする付属因子と結合してシャペロン作用をもつ。このヌクレオチド結合モチーフには, ゲルダナマイシン (geldanamycin) やハービマイシン A (herbimycin-A) が結合して ATP の結合を競合阻害することにより, hsp90 のシャペロン機能を抑制する。ゲルダナマイシンで細胞を処理すると TERT の蛋白質量には変化がないままテロメラーゼ活性を抑制することができた⁽¹⁷⁾。このことは, 実際に, hsp90-p23 複合体が細胞内でテロメラーゼ複合体の形成に関わっていることを示唆している。

テロメラーゼ鋳型 RNA

ヒトおよびマウス TR の 5' 末端を塩基レベルで決定したところ, 前者は鋳型領域より 45 塩基上流が 5' 末端であったのに対し, 後者では鋳型領域よりわずか 2 塩基上流が 5' 末端であった。さらに, それらの転写開始点よりも上流のゲノム配列には, TATA 配列と CAAT 配列が認められ, このことは哺乳類 TR は, 織毛虫でみられ

るように RNA ポリメラーゼ III ではなく, RNA ポリメラーゼ II によって転写されることを示唆している⁽¹⁹⁾。一方, 哺乳類鋳型 TR の 3' 末端にも酵母や織毛虫類では認められない興味深い配列が同定された。ヒト TR の 3' 末端を正確に決定したところ, それは RNA ポリメラーゼ III 転写産物でしばしばみられるような少しずつ異なった長さの U の繰り返しで終わっているわけではなく, ヒト TR が RNA ポリメラーゼ III で転写されるわけではないことを支持しているが, 同時に, 多くの RNA ポリメラーゼ II 転写産物でみられるような poly(A) 配列も認められず, 451 番目のシトシンで正確に末端を形成していた⁽²⁰⁾。このことは, ヒト TR の 3' 末端は何らかのプロセシング反応により, 一定の長さで切断されることを示唆している。

TR と同じように構造 RNA として機能する rRNA は, 核小体において rDNA より RNA ポリメラーゼ I によって約 13 キロ塩基長の 45 S RNA としてまず転写される。この前駆 RNA は最終的に 5.8 S, 18 S, 28 S の 3 種類の rRNA に切断されるが, その前に rRNA 上の特異な塩基において, リボース 2' 位のメチル化 (2'-O-Me)

およびウリジンのシュードウリジン化修飾が行なわれる。snoRNA (small nucleolar RNA) は、これらの前駆体 rRNA の修飾と切断の特異性を決定する重要な役割を果たしている (最近の総説としては文献 21))。構造上の特徴から、snoRNA は box C/D snoRNA と box H/ACA snoRNA に大別される。前者は、リボースのメチル化の特異性を決定し、後者はシュードウリジン合成酵素による修飾塩基の導入部位を決定する。box H/ACA snoRNA は、その 3' 末端にヘアピン・ヒンジ・ヘアピン・テイル構造をもち、特にヒンジ領域に H ボックス (ANANNA 配列, N は任意の塩基)、テイル部分に ACA 配列が存在し、3 塩基後に 3' 末端があることを特徴としている。一般に、多くの snoRNA は、RNA ポリメラーゼ II で転写される遺伝子のイントロンにコードされており、宿主遺伝子のイントロンがスプライシングを受けた後、snoRNA に相当する部分が切り出されて生成される。box H/ACA snoRNA の切り出し反応には、上記の H ボックスと ACA 配列が必須であることが知られている⁽²²⁾。

Collins らは、マウスとヒトの鋳型 RNA 3' 末端の 3 塩基上流に ACA 配列があり、ヘアピン・ヒンジ・ヘアピン・テイル構造を含む H/ACA ボックス様の構造をとることを見いだした⁽²³⁾。興味深いことに、ヒト鋳型 RNA コーディング領域の全長を含むゲノム配列を CMV プロモーターとポリ(A)付加配列をもつポリメラーゼ II の発現ベクターに組み込み一過性に発現させると、予想される転写産物の 3' 末端がプロセスされて、正確に鋳型 RNA の 3' 末端と同じ構造をもつ RNA が生成された。さらに、このキメラヒト鋳型 RNA の H/ACA ボックスに突然変異を入れると、この 3' プロセッシングはみられなくなることから、この過程が box H/ACA snoRNA の切り出し反応と共通の機構によって起こることが示唆された⁽²³⁾。出芽酵母では、snoRNA の box H/ACA 領域には、Gar1p, Cbf5p, Nhp2p が結合することが知られている⁽²⁴⁾。これらの蛋白質が snoRNA さらにはテロメラーゼ鋳型 RNA のプロセッシングに関わる可能性がある。

Cbf5p は、大腸菌のシュードウリジン合成酵素とホモロジーをもち、その遺伝子破壊株ではシュードウリジンが生成されないことから^(25,26)、現在では、真核生物シュードウリジン合成酵素であると信じられている。Cbf5p は、高等真核生物まで保存されているが、興味深いことにそのヒトホモログは、骨髄や皮膚などの細胞増殖が著しい組織の低形成を主徴とする X 染色体伴性遺伝性疾患 ディスケラトーシス (dyskeratosis) の原因遺伝子ディス

図 2 ■ 推定されるヒト鋳型 RNA の二次構造 (文献 29) による) 全長 451 塩基のヒト鋳型 RNA は、脊椎動物鋳型 RNA に共通して保存されている領域 CR1~8 をもつ。CR1 は 5' 末端近くにある鋳型部分に相当し、続いて CR2 と CR3 からなるシュードノット、CR4 と CR5 からなるステムループが存在する。CR6 には Box H 配列が、3' 末端に 3 塩基おいて CR8 には、ACA 配列が存在する。CR6 と CR8 は、これらの配列以外の部分でステム構造をとる。Box H 配列は、このステムとそれよりも 5' 側のステムを結ぶヒンジ領域にあり、ACA 配列とあわせて Box H/ACA を形成する。もともと、5' 末端部分は CR3 の下流とステムをつくる可能性があるが、この配列はマウス鋳型 RNA には存在せず (マウス RNA は、鋳型配列の 2 塩基上流が 5' 末端である)、活性に必須ではないと思われる。番号は塩基番号。

ケリン (dyskerin) であった⁽²⁷⁾。免疫沈降実験によりディスケリンは、ヒト box H/ACA snoRNA と結合しているのみならず活性をもつテロメラーゼ複合体の一構成成分であることが示された⁽²⁸⁾。さらに、調べられた限りのディスケラトーシス患者由来細胞では、シュードウリジン合成酵素としてのディスケリンの異常から予想される rRNA や snoRNA の有意な異常が観察されない一方、テロメラーゼ鋳型 RNA の発現低下、テロメラーゼ活性の低下、テロメア長の短小化が観察された。このことから、ディスケラトーシスの原因の一つとしてディスケリンの機能異常によるテロメラーゼの機能低下、さらにはテロメア長の過度の短小化による細胞増殖異常、染色体不安定性に関わるものと示唆された⁽²⁸⁾。

最近、魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳類にわたる様々な脊椎動物の鋳型 RNA が多数クローニングされ、既知のものと併せて合計 32 種の脊椎動物鋳型 RNA が比較検討された⁽²⁹⁾。塩基配列上、CR (conserved region) 1~8 の 8 個所の保存された配列が同定された (図 2)。CR1 は、鋳型配列 CUAACCCU であり (脊椎動物テロメア配列は TTAGGG_n で保存されている)、CR6~8 は、先に述べた box H/ACA に相当する。塩基配列置換の同期性により、二次構造が予測され、その結果、CR2, 3 はシェードノットを、CR4, 5 はステムループ構造をとることが示唆された。

ヒト TR 上のどの領域がテロメラーゼ活性に必須であるかは、興味深い問題である。ヒト TERT がクローン化される以前の初期の研究では、細胞抽出液中の内因性テロメラーゼをヌクレアーゼ処理して鋳型 RNA 成分を除去した後に、*in vitro* 転写で作った様々な変異ヒト TR を加え直す実験が行なわれ、その結果、1~203 塩基の間のヒト TR だけで活性が生じることが示された⁽³⁰⁾。一方、最近行なわれたヒト TERT と変異ヒト TR を別々に試験管内でリコンビナント産物として作製し、それらを混ぜ合わせる実験では、ヒト TR 上の 33~325 塩基が活性に必要であった⁽³¹⁾。興味深いことに、この活性をもつ最小ヒト TR を 33~147 塩基および 164~325 塩基の 2 つの断片に分けてヒト TERT と再構成しても活性を得ることができた。そのことより、33~147 塩基の部分は鋳型機能をはじめとする酵素活性に、164~325 塩基の部分は蛋白質と鋳型 RNA が複合体を作るときに必要な構造的機能をもつことが示唆された。

以上のことから、ヒト TR は大きく 3 つの領域に分けられることが予想される。第一は 5' 末端の鋳型領域を中心とする触媒活性に関わる領域、第二は CR4/CR5 を中心とするヒト TERT-ヒト TR リボヌクレオチド蛋白質の複合体形成に関わる領域、第三は Box H/ACA 領域を中心とする 3' 末端のプロセッシングに関与する領域である (図 2)。第二の領域は、TERT との複合体形成に重要な役割を果たしていることが提唱されている⁽³¹⁾。

テロメラーゼノックアウトマウス

テロメラーゼ鋳型 RNA をコードする TERC のノックアウトマウスは DePinho, Blasco, Greider らのグループにより作製され、詳しく解析されている。マウスでは、テロメア長が約 50~100 kb あり、ヒトに比べて長いので、TERC-/-マウスにおいて生殖細胞系列が 1 世代を経るのに必要な細胞分裂回数 (オスでは約 60 回、メス

では 25 回といわれている) では、表現型が出るまでに十分にテロメアが短小化しない。したがって、TERC-/-マウスどうしを交配させて第 5 世代に至ってはじめて、不妊、精巣・卵巣の萎縮が著明に観察された^(32,33)。第 3 世代のマウスでも詳細に観察すると、15 カ月以上経過した年老いた個体では、正常型の同年齢の個体と比較して、白髪化、脱毛、創傷治癒の遅延、貧血からの回復の遅延などの早老症の症状がみられた⁽³⁴⁾。また、第 6 世代のものは、老化症状が著しく寿命の短縮が観察された。これらの観察は、TERC 遺伝子の欠損の効果は、テロメラーゼが失活した状態で細胞増殖が続いた結果としてのテロメアの短小化により、はじめてもたらされることを示している。

テロメラーゼが短小化している TERC-/-マウスに四塩化炭素投与などにより肝障害を起こさせると、肝障害に反応して起こる肝細胞再生が著明に低下しており、組織の線維化が観察された。分裂後期で染色体ブリッジが形成されアレストしている細胞が多く観察されたことにより、テロメア短小化による染色体の末端融合、それによる染色体の分配異常が増殖低下の原因と考えられた。この現象は、肝炎ウイルスや薬剤障害により過度の肝細胞増殖が起きた結果としての肝硬変成立のモデルと考えることができる⁽³⁵⁾。興味深いことに、欠損しているマウス TERC 遺伝子をもったアデノウイルスを尾静脈より投与すると、肝再生能が向上し線維化の程度が軽減した。この成果は、テロメラーゼを用いた遺伝子治療のプロトタイプとして評価できる。

最近、テロメラーゼのもう一つの構成要素、触媒サブユニット TERT のノックアウトマウスが報告されたが、このマウスも第一世代の未だテロメアが有意に短小化していないときには表現型を示さず⁽³⁶⁾、TERT-/-マウスどうしの交配を重ねて第 5 世代に至ってはじめて TERC-/-と同様の所見を示した (袁 勳梅, 石川冬木, 未発表)。はじめに作製された TERC-/-マウスは、C57BL6 と ES 細胞が由来する 129 Sv 株とのキメラであったが、Blasco らは、これを C57BL6 に 3 回バッククロスした系統では、約 4 世代で著明にテロメアが短小化し、成長不全、リンパ球の反応性低下、腸管上皮の萎縮、生殖細胞の萎縮が認められ、不妊に加えて短命であることを認めた⁽³⁷⁾。完全な C57BL6 のバックグラウンドでは、さらに早い世代で出現する可能性がある。TERC-/-マウスと様々なノックアウトマウスとの掛け合わせを行なって、テロメアの異常と他の遺伝子とのあいだの遺伝学的な解析をするためには、ダブルノックアウトマウスを作製してからテロメア表現型が出現する

まで交配を続ける必要があるが、以上の結果は、C57BL/6 バックグラウンドのマウスを用いると、交配する回数がある程度少なく済む可能性を示している。TERC-/-マウスと p16 あるいは p53 遺伝子のノックアウトマウス間のダブルノックアウトマウスを作製することでテロメア長が癌化に果たす役割が解析された。その詳細はすでに別稿にまとめたので、そちらを参照されたい⁽³⁸⁾。

ポリ(ADP-リボース)転移酵素 (PARP; poly(ADP-ribose) transferase) は、DNA 障害による DNA のニックや二重鎖切断を認識して結合するとともに活性化され、その修復過程に関与すると考えられている。最近、PARP ノックアウトマウスのテロメア長が短小化していることが報告されたが⁽³⁹⁾、その意義は不明である。

生体におけるテロメラーゼの役割

テロメラーゼは、生体内で細胞増殖を活発に行なう組織において重要な働きをしているものと思われるが、いくつかの組織では、それが詳細に調べられている。

リンパ球と造血細胞は、テロメラーゼ活性をもつ正常体細胞として最も早く同定された細胞の一つである⁽⁴⁰⁾。近年、リンパ球の発生、分化、活性化が形態学的、分子生物学的に詳しく解析され⁽⁴¹⁾、その一連の発生過程におけるテロメラーゼ制御も研究されている。

骨髄で産生された未だ抗原刺激を受けたことがないナイーブ B 細胞は、リンパ節、パイエル板、扁桃、脾臓などの二次リンパ系器官において抗原刺激によって抗体を産生するプラズマ細胞になり、一部はメモリー B 細胞として免疫記憶を形作る。このとき、活性化された B 細胞は、二次リンパ系器官の濾胞内の胚中心において盛んに増殖しながら免疫グロブリン遺伝子を高頻度に突然変異させ、その中からさらに抗体特異性の高いクローンを選ぶ増幅・選択過程を繰り返す。このようにして選ばれた抗原に対して高特異性をもつクローンは、やがて濾胞を離れてプラズマ細胞やメモリー B 細胞となる。プラズマ細胞は抗原がなくなるとアポトーシスで死滅するのに対して、メモリー B 細胞は一生の間生体内で維持される。同じ抗原による 2 回目の免疫時には、すでに初回免疫時

図3 ■免疫系における B 細胞のテロメアとテロメラーゼ活性

抗原刺激にさらされていないナイーブ B 細胞は、テロメラーゼ活性が低くテロメア長も長くない。初回抗原刺激時、ナイーブ B 細胞は活性化された T 細胞によって刺激され、多くはプラズマ細胞に分化して盛んに抗体を作る。プラズマ細胞は抗体産生として終末分化した増殖を行わない細胞であるが、中程度のテロメラーゼ活性をもつ。一方、一部の活性化 B 細胞は、リンパ節内の濾胞に移動し盛んに分裂するとともに、免疫グロブリン遺伝子の突然変異を行ない、抗原に対して様々な反応性をもつクローンを作る（セントロプラスト：異なる濃さの細胞で示してある）。これらは、抗原に対する反応性の強さで選択され（セントロサイト）、また細胞増殖と免疫グロブリン突然変異を行なった後に選択されることで、その特異性をさらに強める。最終的に、セントロサイトはこのサイクルから脱してメモリー B 細胞として生涯存続し続ける。セントロプラストとセントロサイトでは強いテロメラーゼ活性が認められ、テロメア長がナイーブ B 細胞と比較して伸長していた^(42,43)。セントロプラストは活発に増殖をしているが、セントロサイトは増殖をしていないにもかかわらず高いテロメラーゼ活性をもつことから、増殖刺激以外の機構でテロメラーゼ活性が誘導されているものと考えられている。メモリー B 細胞はテロメラーゼ活性をもたない。

に選ばれた高特異的なメモリー B 細胞がただちに活性化されクローン性に増殖し、迅速かつ効率的な二次免疫反応を示す(図 3)。

このように、様々な分化・刺激状態にある B 細胞について、テロメア、テロメラーゼが検討された結果、胚中心で活発に増殖と突然変異を行なっているセントロプラストは一過性にテロメラーゼが強く誘導され、テロメア長がナイーブ B 細胞よりも伸長していることが示された^(42,43)。一般に、テロメラーゼ活性の有無は、触媒サブユニット TERT の発現の有無により決定されており、鋳型 RNA の発現はテロメラーゼの有無にかかわらず構成的であると考えられている。しかし興味深いことに、リンパ球系においては、テロメラーゼ活性が見いだされないナイーブおよびメモリー B 細胞においても、鋳型 RNA と TERT の両者の発現が確認され、転写後修飾により活性が制御されているものと考えられた⁽⁴⁴⁾。抗原刺激により B 細胞が活発に増殖を開始すると一過性にテロメラーゼを強く発現する意義として、クローナルな増殖を必要とする免疫反応に必要であると考えられる⁽⁴⁵⁾。実際、第 5 世代 TERC^{-/-}マウスでは、二次リンパ器官内の濾胞の数が減少しており、抗原刺激による B 細胞増殖がわずかで、抗原チャレンジ後の血中免疫グロブリン増加反応も低下していた⁽⁴⁶⁾。このテロメア短小化マウスにおける免疫力低下は、高齢者でみられる免疫不全を表わしている可能性がある。

T 細胞に関しては、CD4、CD8 の陽性・陰性に関係なくあらゆる種類の胸腺 T 細胞で高いテロメラーゼ活性が検出され、扁桃 T 細胞では中程度の活性が認められるのに対して、末梢血 T 細胞では活性が認められないことが知られている。しかし、TERT と TERC は、テロメラーゼ活性が検出されない末梢血 T 細胞も含めてすべての細胞種で検出され、B 細胞同様転写後調節の可能性が示唆された⁽⁴⁴⁾。

クローン動物とテロメア

クローン動物作出の成功当初より、得られたクローン動物のテロメア長はドナー体細胞のまま短いのか、あるいは一度、卵細胞や初期胚を経由することで「生殖質」により伸長するのは興味的であるばかりでなく、クローン技術を応用して有用家畜を作製する上でも大きな問題であった。血清飢餓によって G₀ 期でアレストした細胞核を移植したクローンヒツジの予備的な解析結果は、クローン動物は由来する体細胞の短いテロメアのままであるらしいことを示唆していた⁽⁴⁷⁾。ウシではクロー

ン動物の作出に血清飢餓は必要ないことが報告されている⁽⁴⁸⁾。細胞寿命に達していない若いウシ線維芽細胞と老化したウシ線維芽細胞よりそれぞれクローン動物を作出すると、その成功率にはほとんど差がなかった⁽⁴⁹⁾。このことは、少なくとも老化線維芽細胞が細胞増殖の過程で DNA 障害などの非可逆的な変化を著しく受けているわけではないことを示唆している。

老化細胞から得たクローンウシ胎仔より線維芽細胞を採取し培養すると、正常ウシ胎仔線維芽細胞と同様、あるいはそれ以上の分裂寿命が観察され、細胞老化をもたらす機構(テロメアの短小化が想定される)は、クローン個体の発達過程でリセットされたことが示唆された^(48,49)。実際、老化細胞に由来するクローンウシは、対照と比較して同等もしくはより長いテロメアをもっていた⁽⁴⁹⁾。ウシ線維芽細胞はテロメラーゼをもたないために、以上の「テロメア老化時計」の(過度な)リセットは、胎仔の間に起きたものと考えられる。報告されたクローンヒツジとクローンウシの間でテロメア長について反対の結果が得られた理由は明らかではないが、種差、クローンに用いたドナー細胞や核を移植された胚の培養条件の差などが考えられる。しかし、クローンウシの結果は、胚細胞という適切な環境「核外因子」が与えられれば、テロメア長は元に戻りうることを示しているの、今後その因子を同定することができれば、試験管内でも同様の「若返り操作」が可能となるかもしれない。

*

テロメア研究は、原生動物や出芽酵母で最も進んでいるが、近年のヒトを含めた哺乳類テロメアの研究の進展の速さには目を見張るばかりである。最近、出芽酵母テロメアは、ほとんどの真核生物とは違った独自の進化を施したらしいという仮説が提唱されている⁽¹²⁾。テロメアに関していえば、出芽酵母よりも分裂酵母のほうがヒトを含めた大部分の真核生物をより反映したモデル生物となる可能性がある。今後、分裂酵母や哺乳類において新しいテロメア関連遺伝子が同定され、さらにテロメアの機能に関する理解が深まるものと期待される。

文献

- 1) 石川冬木：生化学，印刷中（2000）。
- 2) V.L. Makarov, Y. Hirose & J.P. Langmore : *Cell*, 88, 657 (1997)。
- 3) A. Bianchi, S. Smith, L. Chong, P. Elias & T. de Lange : *EMBO J.*, 16, 1785 (1997)。
- 4) A. Bianchi, R.M. Stansel, L. Fairall, J.D. Griffith, D. Rhodes & T. de Lange : *EMBO J.*, 18, 5735 (1999)。
- 5) B. van Steensel & T. de Lange : *Nature*, 385, 740 (1997)。
- 6) A. Smogorzewska, B. van Steensel, A. Bianchi, S. Oel-

- mann, M.R. Schaefer, G. Schnapp *et al.* : *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 1659 (2000).
- 7) B. van Steensel, A. Smogorzewska & T. de Lange : *Cell*, **92**, 401 (1998).
 - 8) J. Kaekseder, D. Broccoli, Y. Dai, S. Hardy & T. de Lange : *Science*, **283**, 1321 (1999).
 - 9) S. Smith, I. Gariat, A. Schmitt & T. de Lange : *Science*, **282**, 1484 (1998).
 - 10) S. Smith & T. de Lange : *J. Cell Sci.*, **112**, 3649 (1999).
 - 11) S.H. Kim, P. Kaminker & J. Campisi : *Nature Genet.*, **23**, 405 (1999).
 - 12) B. Li, S. Oestreich & T. de Lange : *Cell*, **101**, 471S (2000).
 - 13) D. Wotton & D. Shore : *Genes Dev.*, **11**, 748 (1997).
 - 14) J.D. Griffith, L. Comeau, S. Rosenfield, R.M. Stansel, A. Bianchi, H. Moss *et al.* : *Cell*, **97**, 503 (1999).
 - 15) S.L. Weinrich, R. Pruzan, L. Ma, M. Ouellette, V.M. Tesmer, S.E. Holt *et al.* : *Nature Genet.*, **17**, 498 (1997).
 - 16) T.L. Beattie, W. Zhou, M.O. Robinson & L. Harrington : *Curr. Biol.*, **8**, 177 (1998).
 - 17) S.E. Holt, D.L. Aisner, J. Baur, V.M. Tesmer, M. Dy, M. Ouellette *et al.* : *Genes Dev.*, **13**, 817 (1999).
 - 18) D.O. Toft : *Trends Endocrinol. Metabol.*, **9**, 238 (1998).
 - 19) C.S. Hinkley, M.A. Blasco, W.D. Funk, J. Feng, B. Villeponteau, C.W. Greider *et al.* : *Nucl. Acids Res.*, **26**, 532 (1998).
 - 20) A.J. Zaug, J. Lingner & T.R. Cech : *Nucl. Acids Res.*, **24**, 532 (1996).
 - 21) L.B. Weinstein & J.A. Steitz : *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**, 378 (1999).
 - 22) P. Ganot, M. Caizergues-Ferrer & T. Kiss : *Genes Dev.*, **11**, 941 (1997).
 - 23) J.R. Mitchell, J. Cheng & K. Collins : *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 567 (1999).
 - 24) N.J. Watkins, A. Gottschalk, G. Neubauer, B. Kastner, P. Fabrizio, M. Mann *et al.* : *RNA*, **4**, 1549 (1998).
 - 25) D.L.J. Lafontaine, C. Bousquet-Antoneli, Y. Henry, M. Caizergues-Ferrer & D. Tollervey : *Genes Dev.*, **12**, 527 (1998).
 - 26) Y. Zebarjadian, T. King, M.J. Fournier, L. Clarke & J. Carbon : *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 7461 (1999).
 - 27) N.S. Heiss, S.W. Knight, T.J. Vulliamy, S.M. Klauck, S. Wiemann, P.J. Mason *et al.* : *Nature Genet.*, **19**, 32 (1998).
 - 28) J.R. Mitchell, E. Wood & K. Collins : *Nature*, **402**, 551 (1999).
 - 29) J.-L. Chen, M.A. Blasco & C.W. Greider : *Cell*, **100**, 503 (2000).
 - 30) C. Autexier, R. Pruzan, W.D. Funk & C.W. Greider : *EMBO J.*, **15**, 5928 (1996).
 - 31) V.M. Tesmer, L.P. Ford, S.E. Holt, B.C. Frank, X. Yi, D. L. Aisner *et al.* : *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 6207 (1999).
 - 32) M.A. Blasco, H.W. Lee, M.P. Hande, E. Samper, P.M. Lansdorp, R.A. DePinho *et al.* : *Cell*, **91**, 25 (1997).
 - 33) H.W. Lee, M.A. Blasco, G.J. Gottlieb, J.W. Horner 2nd, C.W. Greider & R.A. DePinho : *Nature*, **392**, 569 (1998).
 - 34) K.L. Rudolph, S. Chang, H.W. Lee, M. Blasco, G.J. Gottlieb, C. Greider *et al.* : *Cell*, **96**, 701 (1999).
 - 35) K.L. Rudolph, S. Chang, M. Millard, N. Schreiber-Agus & R.A. DePinho : *Science*, **287**, 1253 (2000).
 - 36) X. Yuan, S. Ishibashi, S. Hatakeyama, M. Saito, J. Nakayama, R. Nikaido *et al.* : *Genes Cells*, **4**, 563 (1999).
 - 37) E. Herrera, E. Samper, J. Martin-Caballero, J.M. Flores, H.W. Lee & M.A. Blasco : *EMBO J.*, **18**, 2950 (1999).
 - 38) 石川冬木 : 蛋白質 核酸 酵素, **45**, 1077 (2000).
 - 39) F. d'Adda di Fagagna, M.P. Hande, W.M. Tong, P.M. Lansdorp, Z.Q. Wang & S.P. Jackson : *Nature Genet.*, **23**, 76 (1999).
 - 40) K. Hiyama, Y. Hirai, S. Kyoizumi, M. Akiyama, E. Hiyama, M.A. Piatyszek *et al.* : *J. Immunol.*, **155**, 3711 (1995).
 - 41) R. Ahmed & D. Gray : *Science*, **272**, 54 (1996).
 - 42) B.T. Hu, S.C. Lee, E. Marin, D.H. Ryan & R.A. Insel : *J. Immunol.*, **159**, 1068 (1997).
 - 43) N.-P. Weng, L. Granger & R.J. Hodes : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 10827 (1997).
 - 44) K. Liu, M.M. Schoonmaker, B.L. Levine, C.H. June, R.J. Hodes & N.-P. Weng : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 5147 (1999).
 - 45) R.J. Hodes : *J. Exp. Med.*, **190**, 153 (1999).
 - 46) E. Herrera, C. Martinez-A & M.A. Blasco : *EMBO J.*, **19**, 472 (2000).
 - 47) P.G. Shiels, A.J. Kind, K.H. Campbell, D. Waddington, I. Wilmut, A. Colman *et al.* : *Nature*, **399**, 316 (1999).
 - 48) J.B. Cibelli, S.L. Stice, P.J. Golueke, J.J. Kane, J. Jerry, C. Blackwell *et al.* : *Science*, **280**, 1256 (1998).
 - 49) R.P. Lanza, J.B. Cibelli, C. Blackwell, V.J. Cristofalo, M. K. Francis, G.M. Baerlocher *et al.* : *Science*, **288**, 665 (2000).

お知らせ

第3回国際ゲノム会議「SNPs—その技術と応用」

日時：平成12年11月13日(月)～14日(火)

会場：パシフィコ横浜・会議センター(横浜みなとみらい)

主催：日本学術振興会ゲノムテクノロジー第164委員会

後援：財団法人バイオインダストリー協会, HUGO Pacific

トピック：SNPs and Diseases, Whole Genome Sequencing (Human and Plants), Proteome, Functional Genomics, Emerging Technologies

ポスター発表・参加申込：インターネットにて申込みできますが, Fax, E-mail, 郵便の場合は氏名, 勤務先, 所属, 役職名, 所在地, 〒, Tel, Fax 番号を明記して下さい。後

日, 詳細な資料を送付いたします。

ポスター原稿締切日：9月15日(金)

参加予約申込締切日：9月15日(金)

参加費(予約)：一般・企業 30,000 円, 大学・官公庁 15,000 円, 学生 10,000 円, ※9月16日(土)以降は各 5,000 円増

申込先：〒160-8711 港区六本木3-2-12

IBMビル(HQ-YA-4)(株)エル・ビー・エス

Tel. 03-5563-4267, Fax. 03-5563-4887

E-mail : genome@lbs.co.jp

http://advanced-genomics.genome.ad.jp