

## 細胞周期チェックポイントタンパク ATR と相互作用する ミトコンドリアタンパクの探索

### [1] 組織

代表者：東谷 篤志

(東北大学大学院生命科学研究所)

対応者：安井 明

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

安井 明 (東北大学加齢医学研究所)

菅野 新一郎 (東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費25万円，旅費0円

### [2] 研究経過

細胞周期の調節，DNA 損傷の修復に重要な働きをチェックポイントキナーゼ ATR に着目して、これまで全く報告のない，ミトコンドリアへの働きについて解明を試みる新規な課題である。ATR を含む Ataxia telangiectasia (AT) ファミリーは，加齢や酸化障害，発ガンなどにも影響することが報告されているが，これまでには核での役割のみが議論されてきた。一方で，当研究室ではモデル生物の線虫を用いて，ヒト ATR のオルソログ ATL1 の欠損がミトコンドリア DNA の複製（コピー数の増加）を抑えることをはじめて明らかにした。このモデル生物でみられた現象が，ヒトにおいても保存されているならば，細胞周期のチェックポイント機構に関わる因子の新たなミトコンドリアへのアンテログレードシグナリングとしての役割を提唱することになり，ヒトの加齢や酸化障害など直接的な生物影響を解明することに大きく貢献出来るものと期待している。

そこで本研究では，哺乳類の培養細胞を用いて，ATR と相互作用する因子の中から特にミトコンドリアタンパクに関して，免疫沈澱法や蛍光抗体法による細胞内局在の解析などを通して明らかにすることを目的として研究を行った。

以下，研究活動状況の概要を記す。

まず，本共同研究を実施するにあたって，対応者と線虫で得られたデータを中心に議論を展開するとともに，代表者の研究室に所属する大学院博士後期課

程学生 森ちひろを平成22年3月から5月末までの3ヵ月間，直接加齢医学研究所に受入れていただき実験研究を行った。

### [3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は，以下に示す研究成果を得た。

まず第1に，ヒト培養細胞を用いた生化学的な解析ならびに細胞組織化学的な解析から，ATR タンパク質は核や細胞質以外にも，ミトコンドリアにも局在することが確認された（図1）。

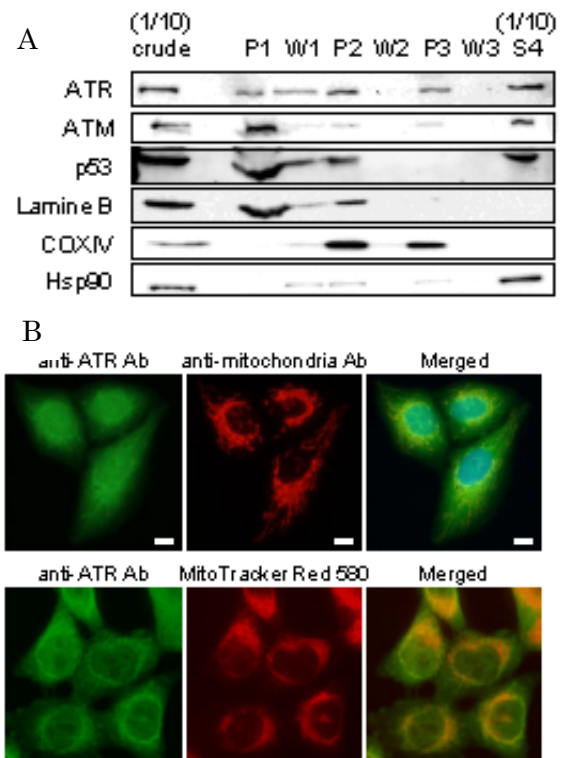


図1 ATR タンパク質のミトコンドリアへの局在 (A) 細胞分画後の各特異的抗体を用いた western blotting 解析の結果。P1: 核画分，P3: ミトコンドリア画分，S4: 細胞質画分。(B) 免疫組織学的な解析の結果。上段 U2OS 細胞，下段 HCT116 細胞における抗 ATR 抗体と抗ミトコンドリア抗体または MitoTracker Red580 を用いた蛍光顕微鏡観察。

第2に、免疫沈澱法を用いて ATR と相互作用するミトコンドリア因子の探索を行った。その結果を図2に示す。抗 ATR 抗体を用いた免疫沈澱画分において、ミトコンドリア DNA の複製と転写を制御する TFAM タンパク質ならびにミトコンドリア DNA 複製のための DNA polymerase  $\gamma$  (POLG) が ATR タンパク質と相互作用することが明らかになった。一方、ミトコンドリア DNA 複製に関わる DNA ヘリカーゼ TWINKLE と一本鎖 DNA 結合タンパク質 SSBP1 とは相互作用しないことも確認された。

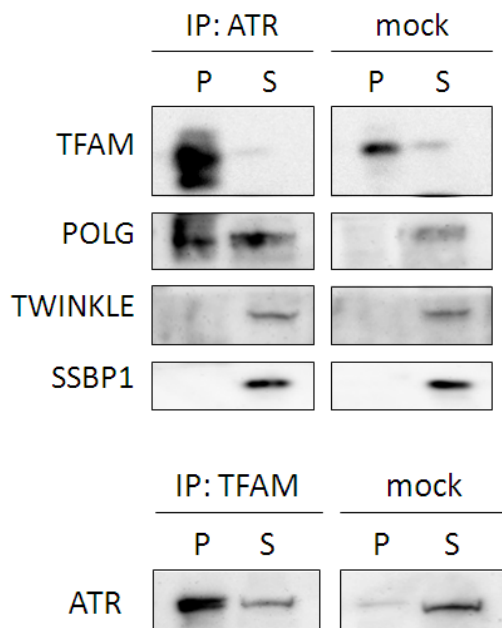


図2 ATRタンパク質とミトコンドリアDNA複製に関わる因子との相互作用

第3に、ATR と相互作用する因子を網羅的に解析する試みを実施した。今回は、ATR-HaloTag 組換えタンパク質や ATR-GFP 組換えタンパク質をヒト培養細胞に形質導入して、それら組換え体を発現させ、次に、HaloTag や GFP を用いて、アフィニティー精製を行い、ともに精製される相互作用因子を質量分析装置を用いて明らかにする実験を行った。その結果、予期せぬ大変興味深い現象として、いずれの組換え体の形質導入においても、それら細胞において、高度に液胞化が生じるとともに、最終的に

ATR の過剰発現は細胞死を誘導するという新たな知見が得られた。

### (3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究において明にすることができた「ヒトにおいても ATR が核以外のミトコンドリアの複製制御に関与する可能性」は、これまでに AT ファミリーの欠損が、ヒトをはじめ様々な生物種において、短寿命や早老になること、また、神経細胞においては酸化障害が強く生じることなどの知見を説明し得る可能性があらわれてきた。ATR を介したミトコンドリア DNA の複製制御・機能維持は、核のチェックポイント制御に関わる鍵因子の新たな局面を提唱するものと思われる。また、その他、ATR と相互作用する新規因子の網羅的な探索は、今回の組換え体を用いた方法では解析することができなかったが、これまで ATR タンパク質の欠損において、細胞はその増殖を停止し細胞複製に必須であることが知られてきたが、その数倍程度の過剰発現においても液胞化を伴う細胞死に至ることが確認され、細胞内において、その発現量は、かなり厳密に制御されていることが示唆された。今後は、これらの研究をさらに発展させることにより、細胞周期の調節、DNA 損傷の修復、酸化障害、加齢などに深く関わる AT ファミリーの研究のさらなる進展が期待される。

### [4] 成果資料

(1) C. Mori, T. Nagase, A. Yasui, and A. Higashitani. A novel function of ATR checkpoint kinase for cellular vacuolation. BMB2010 第33回日本分子生物学会年会 (2010年12月7日-10日神戸)

(2) C. Mori, T. Takanami, T. Nagase, S. Kanno, A. Yasui, and A. Higashitani. ATR over expression causes non-apoptotic cell death with cellular vacuolation. 論文投稿準備中