

1998年度厚生科学研究費

ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業

DNA修復異常遺伝病の分子機構の解明に関する研究

主任研究者

祖父尼 俊雄

国立医薬品食品衛生研究所

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
総括研究報告書

DNA修復異常遺伝病の分子機構の解明に関する研究

主任研究者名 祖父尼俊雄
国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部長

研究要旨

5つのRecQヘリカーゼファミリーのうち、残された2つのRecQ4とRecQ5の遺伝子のクローニングに成功し、その全塩基配列を決定、タンパク質の一次構造を推定した。各組織における発現を、RecQ1、BLM(RecQ2)、WRN(RecQ3)と比較しながら検討したところ、これら5種類の遺伝子は、それぞれの組織での発現パターンが異なり、RecQヘリカーゼが細胞、組織の分化機能と密接に関連した形で発現していることが示唆された。WRNのノックアウトマウス作製にも成功したが、このマウスは必ずしもウェルナー症患者に見られるような顕著な早老現象をしめさなかった。これらRecQヘリカーゼファミリー（RecQ1、RecQ2、RecQ3）と相互作用するタンパク質の機能解析を行ったところ、RecQ2とRecQ3が、SUMO-1というタンパク質を標的タンパク質に結合させる反応に関与するUbc9と相互作用することを見出し、RecQ3に関しては、さらにWip1との相互作用も見出した。RecQ2やRecQ3のプロトタイプと考えられる酵母のSgs1の解析から、RecQと相互作用して機能する可能性が示唆されているDNAトポイソメラーゼIII (TOP3b)のクローニングに成功し、この遺伝子は、RecQ1やRecQ2と同様に精巣で特に発現が高く、特にパキテン期の細胞が増加する時期に顕著であることがわかった。また、酵母Sgs1遺伝子の機能の解析により、アルキル化剤に対する感受性を相補し、姉妹染色体分体交換(SCE)の抑制に関わるドメインと、胞子形成（高等真核生物では精子形成）に関わるドメインとは異なることが明らかになった。ヒト正常組織における老化に伴うRecQ1ヘリカーゼの発現様式の変化と、早発老化を示す疾患でのRecQ1ヘリカーゼの発現異常の有無を検討したところ、RecQ1ヘリカーゼは気管、腸管粘膜上皮、精巣精母細胞などの細胞増殖が高い部位で強い発現が認められ、本タンパクの細胞分裂後の分化への関与が示唆された。神経細胞での発現は胎生期後半から乳幼児初期にかけてのプルキンエ細胞で増強が認められ、本タンパクの神経細胞やグリア細胞の分化・発達への関与も示唆され

た。一方、早発老化を示す疾患のうち Hutchinson-Gilford progeria syndrome では、premyelination glia で発現の低下が観察され、本疾患との関連が示唆された。ウェルナー症患者由来細胞の染色体異常誘発性に対する感受性を検討する目的で、トポイソメラーゼ I の阻害剤、およびアルキル化剤に対する小核誘発性を検討したところ、正常人由来、ウェルナー症患者由来細胞で全て陽性の結果を示したが、両グループ間に顕著な差は認められず、疾患との関連は確認できなかった。

分担研究者氏名

古市泰宏

エイジーン研究所 所長

榎本武美

東北大学薬学部遺伝子薬学講座
教授

高嶋幸男

国立精神・神経センター神経研究所
疾病研究第2部 部長

林 真

国立医薬品食品衛生研究所
変異遺伝部第一室 室長

A. 研究目的

近年、末梢血管拡張性アタキシア、コケイン症候群、ウェルナー症候群、あるいはブルーム症候群などの遺伝的疾患の原因遺伝子が明らかにされ、いずれも DNA 修復関連酵素遺伝子の異常に起因する事が判明した。これらの疾患では、神経症状、老化促進、免疫異常、発がんを伴い、患者由来の細胞は染色体異常を伴うのを共通の特徴とする。RecQ ファミリーに属するヒト DNA ヘリカーゼはこれまで5種類がクローニングされ、Bloom 症候群、Werner 症候群はそれぞれ、RecQ2 (BLM)、RecQ3 (WRN) が原因遺伝子であることが明らかとなっている。ヒトの細胞にはこれら以外にも3つの RecQ、すなわち RecQ1、RecQ4、RecQ5

が存在する。これらの遺伝子の変異に基づく異常を染色体の変異を中心に解析し、遺伝的不安定性および染色体異常を引き起こす分子機構を解明するとともに、遺伝子変異による病態を神経疾患および熟年期以降に頻発する諸種の老年病に焦点を当て、RecQ1、RecQ4、RecQ5 が関与する遺伝性疾患の発見につとめる。さらにそれらの患者の遺伝子診断、免疫診断の手法を確立するとともに、その治療法の開発を行うことを最終目的とする。

エイジーン研究所で発見した RecQ4 と RecQ5 の構造と発現を調べることで、5つの RecQ 遺伝子の機能を解析する手段として、トリ DT40 細胞を用いたノックアウト細胞およびノックアウトマウスの系を樹立し、WRN と BLM のノックアウト細胞と WRN のノックアウトマウスを作製すること、組織化学的な検索の手始めとして、WRN 抗体を作製し細胞内分布を調べることを目的とする。

また、RecQ1、RecQ2、RecQ3 の機能を解析することにより、遺伝子疾患との関連が明らかでない RecQ1 についてはどのような疾患と関連するかを明らかにし、RecQ2 に関しては高発癌性の分子機構、RecQ3 に関しては早老症の発症の分子機構を解明することを目的とする。この目的を達成するために高等真核細胞で RecQ の機能の

解析を行うとともに、酵母 Sgs1 の機能の解析を平行して行い、酵母と高等真核細胞から得られた知見を相互にフィードバックしながら解析を進める。

RecQ ファミリーに属する 5 種類のヒト DNA ヘリカーゼの内、RecQ1、RecQ4、RecQ5 については遺伝子の異常に対応する疾患はこれまで報告されていない。一方、DNA 修復障害や染色体不安定性を示す疾患のうち Hutchinson-Gilford progeria syndrome と neonatal progeroid syndrome では原因遺伝子は判明していない。我々は、RecQ1 ヘリカーゼの中樞神経系における正常発達を検討し、Hutchinson-Gilford progeria syndrome や neonatal progeroid syndrome を含めた各種疾患での発現異常について検索を行い、遺伝子の異常と疾患の発現について検討することを目的とする。

健常人およびウエルナー症候群患者由来の EBV でトランスフォームした B 細胞を用いて、薬剤に対する感受性を小核の誘発を指標に調べ、RecQ3 遺伝子の染色体不安定性におよぼす影響を検討することを目的とする。また、ウエルナー症候群の細胞遺伝学的診断のための基礎データを蓄積する。

B. 研究方法

1) RecQ4 と RecQ5 については、全塩基配列を決定し、タンパク質の一次構造を推定するとともに、ノザン・プロットにより各組織、器官および細胞分裂周期での mRNA の発現を調べた。また、目的とする遺伝子のなかに、薬剤耐性遺伝子を組み込んだベクターを構築し、相同組み換えにより、目的の遺伝子を破壊することで、ノックアウト細胞およびノックアウトマウスを作製した。さらに、バキュロウイルスベクターを用いた昆虫細胞の系お

よび大腸菌で WRN ヘリカーゼを発現し、これを抗原に用いてモノクローン抗体を作製し、イムノブロットおよび蛍光抗体法にて細胞でのヘリカーゼの発現と局在を観察した。

2) RecQ1 の機能を解析する手段としてのノックアウトマウス作製のため、マウス相同遺伝子のクローニング及びその発現を解析した。さらに、マウスの RecQ2 遺伝子及び、RecQ2 あるいは RecQ3 と相互作用すると考えられている DNA トポイソメラーゼ III の遺伝子 (TOP3) のクローニングを行った。酵母の two-hybrid 系を用いて RecQ3 と相互作用するタンパク質の検索を試みた。また、酵母を用いて姉妹染色分体交換 (sister chromatid exchange、SCE) を測定する系を導入し、SGS1 遺伝子破壊株の SCE の頻度を調べた。

3) 正常コントロールとして胎生 13 週から 31 歳までの 27 例を用い、発達に伴う RecQ1 発現の変化を検討した。また、早発老化や脳腫瘍、先天奇形症候群などの 19 の疾患群、計 34 例においても検索を行い正常群と比較した。免疫組織化学には streptavidin-biotin peroxidase 法を用いた。また、一部の症例で RecQ1 の発現を確認する目的でウエスタン・プロットを行った。

4) 健常人由来細胞とウエルナー症候群の患者由来細胞において、化学物質の染色体異常誘発性に対する感受性に差があるか否かを評価するため、モデル化学物質を用いて小核誘発性を比較検討した。細胞は EBV で株化したものを用い、被験物質で 25~40 時間処理後、空気乾燥法により標本作製した。標本は全てコード化し、アクリジンオレンジ蛍光染色を施し、

1000 個の細胞について小核の有無を判定した。

C. 研究結果

1) RecQ4 と RecQ5 はそれぞれ 1208 と 410 アミノ酸残基よりなり、ともに RecQ ヘリカーゼドメインを持つことが判明した。RecQ4 及び RecQ5 の発現は調べた 16 種類のすべての組織で発現されていたが、中でも、胸腺、小腸、大腸、精巣に強い発現がみられた。RecQ4 および RecQ5 について蛍光抗体法により調べたところ、RecQ4 は核内に局在し、RecQ5 は、細胞質に局在することが判明した。RecQ1、RecQ4、RecQ5 遺伝子は、それぞれヒト染色体の第 1 2 番短腕、第 8 番長腕および第 17 番長腕に存在することが分かっており、データベースにあたりこの部分にリンクした遺伝子疾患を検索したが、有力なものは見つからなかった。また、トリ DT40 細胞を使用した WRN および BLM ノックアウト細胞を作製するため、ニワトリの WRN および BLM の cDNA (cWRN と cBLM) をクローニングし、その全塩基配列を決定した。このターゲティングベクターをニワトリの DT40 細胞に導入し、相同組み換えにより、宿主遺伝子に導入し、WRN と BLM について、両アレルをノックアウトした細胞を得ることができた。さらに、ウエルナー患者の変異 4 を含む遺伝子部位を持つベクターを作製し、WRN の片アレルを欠損した ES 細胞を作製した。これをマウスに導入して、掛け合わせを行い、両アレルがノックアウトされたホモ、片側のみがノックアウトされたヘテロ、および両アレルとも正常なマウスが得られ、その比率はメンデルの法則にほぼ従った。また、正常なマウス細胞とノックアウトマウス細胞の間に顕著な差は認められなかった。WRN ヘリカ

ーゼの発現は、線維芽細胞や B-細胞の形質転換や細胞の不死化により著しく上昇することが判明した。SGS1 遺伝子は分裂酵母に存在する唯一の RecQ ヘリカーゼであり、その変異株に、正常の WRN および BLM を導入したところ、BLM 導入株ではいずれの形質も正常に戻り、また、WRN 導入株では遺伝子の過剰な組み換え現象が抑制された。以上の事実は、WRN ヘリカーゼは DNA の組み換えを抑制するように働いていることを示唆するものである。

2) マウス Q1 遺伝子のクローニングの結果、C 末端アミノ酸配列が異なる 2 種類の Q1cDNA を得た。a 型は全臓器で発現し、特に精巣・胸腺での発現が高く、b 型は精巣でのみで発現していることが判明した。RecQ2 の解析の過程で新たな DNA トポイソメラーゼ III をコードする遺伝子 TOP3b を発見した。RecQ2 と TOP3b の mRNA の発現を調べたところ、精巣で特に高い発現が観察された。RecQ3 と相互作用するタンパク質 (Werner interacting protein 1) をコードする新規な遺伝子 wip1 のクローニングに成功した。また、Wip1 が高等真核細胞では RecQ3 の機能と関連して、ウエルナー症候群の原因遺伝子産物の機能と関連するタンパク質が初めて明らかになった。出芽酵母の SGS1 遺伝子破壊株がブルーム症候群のよいモデル細胞になることが確認され、さらにアルキル化剤に対する感受性と孢子形成には異なる部分が発現していることが明らかになった。

3) 胎生臓器のなかでとくに強い発現のみられた気管と腸管の粘膜上皮、および精巣の精母細胞は、いずれも細胞回転率が高い部位であり、RecQ1 タ

ンパクの作用が細胞分裂後に関与していることが示唆された。小脳プルキンエ細胞では胎生期後半から乳児期初期にかけて RecQ1 発現の増強がみられた。この時期はプルキンエ細胞の primary dendritogenesis が起こっている時期に相当する。また、premyelination glia でみられた強い一過性の発現は oligodendroglia が分化する時期に相当すると考えられた。以上より RecQ1 ヘリカーゼは神経細胞やグリア細胞の分化・発達に関連していると考えられた。DNA 修復障害や早発老化を示す疾患等で RecQ1 の発現について検討した結果、過剰な RecQ1 の発現が neonatal progeroid 症候群、Zellweger 症候群、holoprocencephaly、lissencephaly において認められ、同時に髄鞘化の遅延が観察された。Hutchinson-Gilford progeria 症候群患者について Western blotting を行った結果、明らかな RecQ1 の発現の低下が認められた。

4) トポイソメラーゼ I の阻害剤であるカンプトテシン、トポイソメラーゼ II 阻害剤エトポシドおよびアルキル化剤である 4NQO をモデル化合物として用い、健常人由来細胞 4 株、ウエルナー症候群患者由来細胞 3 株に対する小核誘発性を比較したところ、全て陽性の結果を示したが、両グループ間に顕著な差は認められなかった。ただし、細胞ごとに増殖速度に差があり、処理条件が染色体異常誘発性の結果に大きく影響を与えることが判明した。

D. 考察

本研究は、RecQ1、RecQ2(BLM)、RecQ3(WRN)、RecQ4、RecQ5 の機能を解析することにより、遺伝子疾患との関連が明らかでない RecQ1、RecQ4、RecQ5 についてどのような疾患と関

連するかを明らかにし、RecQ2 に関しては高発癌性の分子機構、RecQ3 に関しては早老症の発症の分子機構を解明することを目的にしている。

RecQ1、BLM、WRN、RecQ4 および RecQ5 の 5 種類の遺伝子について各組織、器官での mRNA の発現をみると、それぞれの組織で発現パターンが異なる。このことは、これら RecQ ヘリカーゼが細胞、組織の分化機能と密接に関連した形で発現していることを示唆する。WRN のノックアウトマウスでは、52 週を経過した現時点においても顕著な老化現象を示していない。マウスの最大寿命は 3 年、人の最大寿命は 120 年であるが、単純にマウスの 1 年をヒトの 40 年に対応させれば、ウエルナー症候群患者で顕著な老化現象を示すのは 30 歳近くになってからであるため、52 週でも変化が見られてもおかしくはないが、このような対応関係で律して良いかどうか問題は残る。ノックアウトのトリ DT40 細胞については作製が順調に進んでおり、今後の解析が期待される。また、RecQ4 の変異に関連した遺伝病については、最近非常に興味ある事実が見つかり、現在確認を急いでいる。

ブルーム症候群は、発育不全、免疫不全、男性における不妊、種々の悪性腫瘍の若年での発生等を呈する常染色体劣性の遺伝病で、患者由来の細胞では染色体が不安定になり姉妹染色分体交換 (SCE) が高頻度に観察され、EMS などのアルキル化剤に高感受性になる。我々は酵母の相同遺伝子 SGS1 をクローニングし、その遺伝子破壊株を作成してその表現型を解析し、破壊株がブルーム細胞のよいモデルになることを示してきたが、本年度の研究により、その有用性をさらに確認することができた。ブルーム症候群患者で観察された変異と同じ変異を

SGS1 に導入することにより、酵母が MMS に感受性になり、SCE の頻度が上がり、胞子形成能が低下したことは、このモデルの有用性を示している。このモデルにより、胞子形成（ヒトでの精子形成に相当）にはヘリカーゼ活性が必須ではないことが明らかになった。一方、アルキル化剤やヒドロキシ尿素に対する感受性の相補や、SCE 頻度の低下には、ヘリカーゼ活性が必須であり、RecQ2 は少なくとも 2 つの機能をもつことが示唆された。さらに、SGS1 の欠失変異体による解析から、RecQ2 の精子形成における役割にはヘリカーゼドメインより N 末側が重要であることが示唆された。また、マウスの RecQ2 の精巣での高い発現はブルーム症候群患者の不妊に対応するものであり、パキテン期の細胞の増加に同調する発現の増加は、ブルーム症候群の減数分裂への関与を示唆している。一方、酵母を用いた解析では RecQ2、RecQ3 が、タンパク質の SUMO-1 化に関与する酵素 Ubc9 と相互作用することが明らかになり、DNA の修復や組み換えに関与する酵素・タンパクに結合していることが報告されている。したがって SUMO-1 化はゲノムの安定性にかかわる機構の調節に関与している可能性が考えられる。さらに、RecQ3 と相互作用するタンパク質 (Werner interacting protein 1) をコードする新規な遺伝子 WIP1 をクローニングした。Wip1 の機能が Sgs1 の機能、高等真核細胞では RecQ3 の機能と関連していることが酵母の相同遺伝子破壊株の解析からわかり、ウエルナー症候群の原因遺伝子産物の機能と関連するタンパク質が初めて明らかになった。

胎生臓器のなかで RecQ1 ヘリカーゼのとくに強い発現が認められた気管と腸管の粘膜上皮、および精巣の精

母細胞は、いずれも細胞回転率が高い部位であり、本タンパクの作用は細胞分裂後の分化に関与していると考えられた。また、神経細胞における発現のパターンを解析することにより、RecQ1 ヘリカーゼは中枢神経系において神経細胞やグリア細胞の分化・発達に関連していることが示唆された。過剰な RecQ1 の発現のみられた neonatal progeroid syndrome、Zellweger syndrome、holoprocencephaly、lissencephaly において髄鞘化の遅延が観察された。したがってこれらの疾患における premyelination glia での RecQ1 の過剰発現は、髄鞘化が遅延しているために本来胎生期後半にみられる premyelination glia での発現が遅延して出現したものと考えられた。さらに、Hutchinson-Gilford progeria 症候群での RecQ1 発現量の低下は、本疾患が RecQ1 ヘリカーゼタンパクの発現に異常をきたす疾患である可能性が示唆するものである。

健常人とウエルナー症候群患者由来の細胞株で染色体異常誘発性を小核の誘発を指標として比較検討したが、系統だった顕著な差は検出できなかった。各細胞株で倍加時間が大きく異なるため、細胞株によって被験物質に暴露される期間が 1 細胞周期より長いものや、1 細胞周期に達していないものもあった。従って、今回の試験結果より、両群に差がないと結論するのは早計であると考えられる。暴露の絶対時間と細胞周期を考慮に入れた相対時間と小核誘発の関係を明確にする必要があり、試験手法の確立が急務である。今後、サイトカラシン B を組み込み、2 核細胞を観察対象とすることにより被験物質暴露の細胞周期に対する相対時間を考慮に入れた試験法について検討する予定である。

E. 結論

新たに2種類の RecQ DNA/RNA ヘリカーゼの遺伝子 (RecQ4 と RecQ5) がクローニングされ、その塩基配列が決定された。これでヒトの RecQ ファミリーの遺伝は RecQ1、RecQ2、RecQ3、RecQ4 および RecQ5 の5種類存在することになった。これらはそれぞれ組織で固有の発現パターンを示し、それぞれ異なる役割を果たしていることが示唆された。RecQ3 遺伝子のノックアウトマウスは、必ずしもウエルナー症候群患者に見られるような顕著な早老現象を示さなかった。

RecQ1、RecQ2、トポイソメラーゼ III が精子形成の特定の時期で機能していることが明らかになった。また、酵母の Sgs1 の機能の解析により、アルキル化剤に対する感受性や SCE の抑制には主として、ヘリカーゼドメインと RecQ タイプのヘリカーゼの間で保存されている領域が関与し、胞子形成にはヘリカーゼドメインより N 末側が重要であることが明らかになった。Sgs1 と RecQ2 の構造と機能の類似性から、RecQ2 に関しても同様であると考えられる。また、新たに見つかった Wip1 は RecQ3 と関連して働くタンパク質であることが示唆された。

RecQ1 ヘリカーゼは中枢神経系においては神経細胞やグリア細胞の分化・発達に関連している知見を得た。また、ミエリン化が遅延する疾患においては RecQ1 ヘリカーゼの発現も遅延する。Hutchinson-Gilford progeria 症候群の患者において RecQ1 ヘリカーゼの発現が低下していることが判明し、本疾患と RecQ1 遺伝子発現との関連が示唆された。

トポイソメラーゼ阻害剤を含む3種類のモデル化合物の染色体異常誘発性を健常人とウエルナー症候群患者由来細胞で検討したが、両グループに

おいて顕著な差は認められなかった。しかし、細胞の増殖速度に差のあることが判明し、評価手法の改良の必要性が判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tokutake, Y., T. Matsumoto, S. Maeda, T. Watanabe, H. Tahara, S. Sakamoto, H. Niida, M. Sugimoto, T. Ide and Y. Furuichi. Extra-chromosomal telomere repeat DNA in telomerase-negative immortalized cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 247, 765-722 (1998).
2. Kiatao, S., Ohsugi, I., Ichikawa, K., Goto, M., Furuichi, Y. and Shimamoto, A. Cloning of two new human helicase genes of the RecQ family: Biological significance of multiple species in higher eukaryotes. *Genomics* 54, 443-452 (1998).
3. Matsumoto, T., Imamura, O., Goto, M. and Furuichi, Y. Characterization of the nuclear localization signal in the DNA helicase involved in Werner's syndrome. *International Journal of Molecular Medicine* 1, 71-76 (1998).
4. Niida, H., Matsumoto, T., Satoh, H., Shiwa, M., Tokutake, Y., Furuichi, Y. and Shinkai, Y. Severe Growth Defect in Mouse Cells Lacking a Telomerase RNA Component. *Nature Genet.* 19, 203-206 (1998).
5. Ichikawa, K., Shimamoto, A., Imamura, O., Tokutake, Y., Yamabe, Y., Kitao, S., Suzuki, N., Sugawara, K., Matsumoto, T., Thomas, W., Drayna, D., Goto, M., Sugimoto, M., Sugawara, M. and Furuichi, Y. Physical map of the human chromosome 8p11-p21 encompassing tumor suppressor and Werner's syndrome gene loci. *DNA Research* 5,

- 103-113 (1998).
6. Matsumoto, T., Tsuchihashi, Z., Ito, C., Fujita, K., Goto, M. and Furuichi, Y. Genetic diagnosis of Werner's syndrome, a premature aging disease, by mutant allele specific amplification (MASA) and oligomer ligation assay (OLA). *J. of Anti-Aging Medicine* 1, 131-140 (1998).
 7. Yamagata, K., Kato, J., Shimamoto, A., Goto, M., Furuichi, Y. and Ikeda, H. Bloom's and Werner's syndrome genes suppress hyperrecombination in yeast sgs1 mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 8733-8738 (1998).
 8. Yamabe, Y., Shimamoto, A., Yokota, J., Goto, M., Sugawara, M. and Furuichi, Y. The Sp1-mediated transcription of the Werner's Syndrome gene is modulated by Rb and p53. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6169-6200 (1998).
 9. Shiratori, M., Sakamoto, O. Suzuki, N., Tokutake, Y., Kawabe, Y., Enomoto, T., Sugimoto, M., Goto, M., Matsumoto, T. and Furuichi, Y. Detection by epi-tope-defined monoclonal antibodies of Werner DNA helicases in the nucleoplasm and their upregulation by cell transformation and immortalization. *J. Cell Biol.* 144, 1-9 (1999).
 10. Sugimoto, M., Ide, T., Goto, M. and Furuichi, Y. Reconsideration of senescence, immortalization and telomere maintenance of Epstein Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines. *Mechanisms of Ageing and Development* 107, 51-60 (1998).
 11. Seki, T., Seki, M., Katada, T., and Enomoto, T. Isolation of a cDNA encoding mouse DNA topoisomerase III which is highly expressed at the mRNA level in the testis. *Biochim. Biophys. Acta* 1936, 127-131 (1998).
 12. Seki, T., Wang, W.-S., Okumura, N., Seki, M., Katada, T., and Enomoto, T. cDNA cloning of mouse BLM gene, the homologue to human Bloom's syndrome gene, which is highly expressed in the testis at the mRNA level. *Biochim. Biophys. Acta* 1398, 377-381 (1998).
 13. Seki, T., Seki, M., Onodera, R., Katada, T., and Enomoto, T. Cloning of cDNA encoding a novel mouse DNA topo-isomerase III (Topo III?) possessing negatively supercoiled DNA relaxing activity, whose message is highly expressed in the testis. *J. Biol. Chem.* 273, 28553-28556 (1998).
 14. Wang, W.-S., Seki, M., Yamaoka, T., Seki, T., Tada, T., Katada, T., Fujimoto, H., and Enomoto, T. Cloning of two isoforms of mouse DNA helicase Q1/ RecQL cDNA: α form is expressed ubiquitously and β form specifically in the testis. *Biochim. Biophys. Acta* 1443, 198-202 (1998).
 15. Obonai T., Mizuguchi M., and Takashima S. Developmental and aging changes of Bak expression in the human brain. *Brain Research* 783, 167-170 (1998).
 16. Kato M., Mizuguchi M., Hattori S., Nakamura S., and Takashima S. Loss of neurofibromin in the leptomeningeal astroglial heterotopia of NF-1. *Pediatr. Neurol.* 18, 227-230 (1998).
 17. Isumi H., Takashima S., Ikeda K., and Mizuguchi M. Expression of a 45K subunit of platelet-activating factor acetyl-hydrolase in the developing mouse cerebellum. *Anat. Embryol.* 197, 415-419 (1998).
 18. Oka A., and Takashima S. Expression of the ataxia-telangiectasia gene(ATM) product in human cerebellar neurons during

- development. *Neurosci. Letters* 252, 195-198 (1998).
19. Oka A., Kurachi Y., Mizuguchi M., Hayashi M., and Takashima S. Expression of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN2) gene product in human brains. *Neuroscience Letters* 257, 113-115 (1998).
 20. Takashima S., Mizuguchi M., and Arai N. Neuronal migration disorder: expression of gene products in the neocortex. *Neuropathology* 18, 427-432 (1998).
 21. Hayashi, M., T. Ueda, K. Uyeno, K. Wada, K. Kinoue, K. Saotome, N. Tanaka, A. Takai, Y.F. Sasaki, N. Asano, T. Sofuni and Y. Ojima Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutat. Res.*, 399, 125-133 (1998)
 22. Suzuki, T., Y. Miyata, K-i. Saeki, Y. Kawazoe, M. Hayashi and T. Sofuni In vivo mutagenesis by the hepatocarcinogen quinoline in the *lacZ* transgenic mouse: Evidence for its in vivo genotoxicity. *Mutat. Res.*, 412, 161-166 (1998)
 23. Hayashi, M., M. Honma and T. Sofuni Dilution series for test chemicals in the mouse lymphoma mutation assay. *Mutat. Res.*, 415, 165-166 (1998)
 24. Asano, N., Y. Katsuma, H. Tamura, N. Higashikuni and M. Hayashi An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravitaly stained peripheral blood cells. *Mutat. Res.*, 404, 149-154 (1998)
 25. Wakata, A., Y. Miyamae, S. Sato, T. Suzuki, T. Morita, N. Asano, T. Awogi, K. Kondo and M. Hayashi Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: The summary of the 9th collaborative study by CSGMT/MMS-JEMS. *Environ. Mol. Mutagen.*, 32, 84-100 (1998)
 26. Adler, I.-D., J. Bootman, J. Favor, G. Hook, G. Schriever-Schwemmer, G. Welzl, E. Whorton, I. Yoshimura and M. Hayashi Recommendations for statistical designs of in vivo mutagenicity test with regard to subsequent statistical analysis. *Mutat. Res.*, 417, 19-30 (1998)
 27. Morita, T. and M. Hayashi 1,4-Dioxane: Induction of micronuclei in mouse liver but not in peripheral blood and lack of in vitro genotoxicities. *Environ. Mol. Mutagen.*, 32, 269-280 (1998)
 28. Miyamae, M., M. Yamamoto, Y.F. Sasaki, H. Kobayashi, M. Igarashi-Soga, K. Shimoi and M. Hayashi Validation of in vivo single cell gel electrophoresis (Comet) assay using the homogenate derived from mouse organs (liver, kidney, spleen, lung and bone marrow) *Mutat. Res.*, 418, 131-140 (1998)
 29. Matsuoka, A., M. Hayashi and T. Sofuni In vitro clastogenicity of 19 organic chemicals found in contaminated water and 7 structurally related chemicals. *Environ. Mutagen Res.*, 20, 159-16 (1998)
2. 学会発表
 1. 古市：Genetics of aging. コールドスプリングハーバーシンポジウム、米国
 2. 杉本、古市ら：Characteristic telomere dynamics of WS cells and telomere-negative immortalized cells. テロメアシンポジウム、米国
 3. 北尾、古市、嶋本ら：Cloning of two new human helicase genes of the RecQ family: Biological significance of multiple species in higher

- eukaryotes. ゴードン会議、米国
4. 古市：東大医科研創立シンポジウム、東京
 5. 古市：ウエルナー早老症と癌。家族性腫瘍研究会、東京
 6. 古市：老化のシンポジウム 日本癌学会第57回総会、横浜
 7. 北尾、嶋本、古市：Two new human RecQ helicases Q4&Q5. キーストーンシンポジウム、米国
 8. 嶋本、北尾、古市：染色体不安定性疾患と RecQ ヘリケースファミリー遺伝子。DNA 修復ワークショップ、大阪
 9. 丹伊田、松本、古市：Severe growth defect in mouse cells lacking a telomerase RNA component. 日本生化学会
 10. 市川、古市、野田：WRN ヘリカーゼのノックアウトマウスの加齢に伴う変化。第21回日本分子生物学会年会、横浜
 11. 白鳥、坂本、古市：モノクローナル抗体を用いた WRN ヘリカーゼの機能解析。第21回日本分子生物学会年会、横浜
 12. 鈴木、古市：WS 症候群遺伝子産物 WRN ヘリカーゼは 5'-3'exonuclease 活性を持つ。第21回日本分子生物学会年会、横浜
 13. 大杉、今村、古市：ウエルナー症候群細胞における遺伝子発現の変動。第21回日本分子生物学会年会、横浜
 14. 白鳥、坂本、古市：WRN ヘリカーゼ；核質局在と発現動態。第21回日本分子生物学会年会、横浜
 15. 白鳥、古市：Werner helicases are in the nucleoplasm. キーストーンシンポジウム、米国
 16. 古市：Molecular biology of Werner syndrome. International Symposium on Molecular medicine、米国
 17. 小野田文俊、宮島敦子、佐藤友里恵、関政幸、榎本武美：出芽酵母の RecQ ホモログ、Sgs1 の機能の解析。ワークショップ「DNA repair and Mutagenesis '98」 仙台
 18. 川辺洋一、関剛彦、今村幸、菅原稔、古市泰宏、関政幸、榎本武美：マウス・ウエルナー症候群原因遺伝子産物と相互作用する蛋白質の解析。ワークショップ「DNA repair and Mutagenesis '98」 仙台
 19. 関剛彦、関政幸、榎本武美、堅田利明：DNA トポイソメラーゼ III およびブルーム症候群原因遺伝子の発現の解析。日本薬学会第118年会、京都
 20. 川辺洋一、関剛彦、今村幸、菅原稔、古市泰宏、関政幸、榎本武美：マウス・ウエルナー症候群原因遺伝子産物と相互作用する蛋白質の解析。日本薬学会第118年会、京都
 21. 川辺洋一、Branzei Dana、関剛彦、関政幸、榎本武美：マウス・ウエルナー症候群、ブルーム症候群原因遺伝子産 SUMO-1、Ubc9 の相互作用の解析。日本薬学会東北支部会第151回例会、仙台
 22. 鈴木裕史、吉村明、関政幸、益子高、榎本武美：モノクローナル抗体による RecQ ファミリーヘリカーゼの解析。日本薬学会東北支部会第151回例会、仙台
 23. 鈴木裕史、吉村明、関政幸、益子高、榎本武美：RecQ ファミリーヘリカーゼタンパクの正常及び癌細胞での発現：抗ペプチドモノクローナル抗体による解析。日本癌学会第57回総会、横浜
 24. 榎本武美：ブルーム症候群・ウエルナー症候群の原因遺伝子産物 RecQ ファミリーヘリケースの機能。広島大学遺伝子実験施設第13回公開学術講演会「細胞増殖・分化と

- 遺伝病」、広島
25. 榎本武美：RecQ・トポイソメラーゼ．第13回ワークショップ「遺伝的組換えとその制御」、横浜
 26. 宮島敦子、関政幸、小野田文俊、大田邦史、大野泰雄、榎本武美：出芽酵母 SGS1 の減数分裂における機能の解析．第13回ワークショップ「遺伝的組換えとその制御」、横浜
 27. 小野田文俊、佐藤友里恵、小野寺涼子、宮島敦子、関政幸、榎本武美：出芽酵母 SGS1 の機能ドメインの遺伝学的解析．第13回ワークショップ「遺伝的組換えとその制御」、横浜
 28. 関剛彦、関政幸、堅田利明、榎本武美：マウス DNA トポイソメラーゼ III の cDNA クローニングと発現及び性状解析．第21回日本分子生物学会年会、横浜
 29. 宮島敦子、関政幸、小野田文俊、大田邦史、大野泰雄、榎本武美：減数分裂における出芽酵母 SGS1 の機能の解析．第21回日本分子生物学会年会、横浜
 30. 小野田文俊、佐藤友里恵、小野寺涼子、宮島敦子、関政幸、榎本武美：出芽酵母 SGS1 の遺伝学的解析．第21回日本分子生物学会年会、横浜
 31. 佐藤友里恵、小野寺涼子、小野田文俊、宇井彩子、宮島敦子、関政幸、榎本武美：出芽酵母 Sgs1 の機能ドメインの解析．第21回日本分子生物学会年会、横浜
 32. 王文成、関政幸、関剛彦、多田周右、堅田利明、藤本弘一、榎本武美：2種のマウス DNA ヘリカーゼ Q1CDNA クローニング及びその発現解析．第21回日本分子生物学会年会、横浜
 33. 川辺洋一、関剛彦、関政幸、今村宰、菅原稔、古市泰宏、榎本武美：

マウス・ウエルナー症候群原因遺伝子産物と SUMO-1 化蛋白質との相互作用の解析．

第21回日本分子生物学会年会、横浜

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生科学研究補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療）
分担研究報告書

各種 RecQ DNA/RNA ヘリカーゼファミリーに関する研究

分担研究者 古市 泰宏
エイジーン研究所所長

研究要旨

RecQ DNA/RNA ヘリカーゼファミリー遺伝子は、RecQ1、BLM、WRN、RecQ4 および RecQ5 の5種類存在するが、このうちで、エイジーン研究所では当研究所が新たに発見した RecQ4 と RecQ5 の遺伝子の構造と発現の解析を、RecQ1、BLM、WRN と比較しながら行った。また、WRN と BLM についてはトリ DT40 細胞を用いたノックアウト細胞の作製、そして WRN についてはノックアウトマウスの作製を行った。また、WRN ヘリカーゼについては、核に局在することを見いだした。

A. 研究目的

最終目的は、RecQ1、RecQ4、RecQ5 遺伝子と遺伝病との関係を明らかにし、また、すでにそれが明らかになっている WRN と BLM を含めた5つの RecQ 遺伝子の DNA 修復機構における役割を解明することである。本年度は、この目的のために、次のような小目標をたてた。一つは、エイジーン研究所で発見した RecQ4 と RecQ5 の構造と発現を調べること。二つ目は、5つの RecQ 遺伝子の機能を解析する手段として、トリ DT40 細胞を用いたノックアウト細胞およびノックアウトマウスの系を樹立し、手始めに、WRN と BLM のノックアウト細胞と WRN のノックアウトマウスを作製すること。三つ目は、組織化学的な検索の手始めとして、WRN 抗体を作製し細胞内分布を調べること。

B. 研究方法

1. RecQ4 と RecQ5 については、全塩基配列を決定し、タンパク質の一次構造を推定するとともに、ノザン・プロットにより各組織、器官および細胞分裂周期での mRNA の発現を調

べる。

2. 目的とする遺伝子のなかに、薬剤耐性遺伝子を組み込んだベクターを構築し、相同組み換えにより、目的の遺伝子を破壊することで、ノックアウト細胞およびノックアウトマウスを作製した。
3. バキュロウイルスベクターを用いた昆虫細胞の系および大腸菌で WRN ヘリカーゼを発現し、これを抗原に用いてモノクローン抗体を作製し、イムノプロットおよび蛍光抗体法にて細胞でのヘリカーゼの発現と局在を観察した。

C. 結果と考察

<RecQ4 及び RecQ5 の遺伝子およびその機能解析>

- a. 構造：RecQ4 と RecQ5 はそれぞれ 1208 と 410 アミノ酸残基よりなり、ともに RecQ ヘリカーゼドメインを持つことがわかった。（図1）
- b. RecQ4 及び RecQ5 のヒトの各組織、器官での発現：ノザン・プロット法を用いて、RecQ4 及び RecQ5 の発現をヒトの各組織、

器官で調べた。RecQ4 の mRNA は 4.0 Kb 付近に主なバンドを示し、調べた 16 種類のすべての組織で発現されていた。その中でも、胸腺、小腸、大腸、精巣に強い発現がみられ、細胞分裂の盛んな組織で発現の高いことが示唆された。RecQ5 の主のバンドは 3.8 および 3.6 Kb に認められ、この mRNA も調べた 16 種類のすべての組織で発現されており、その中でも脾臓、胸腺、前立腺、精巣での発現が高かった。同調培養した K562 白血病細胞で調べたところ、RecQ4 は DNA 合成期において転写活性が上昇していた。

<細胞内分布>

FLAG エピトープと融合させた形で発現させ RecQ4 及び RecQ5 のキメラタンパク質の細胞内分布を、FLAG に対する抗体を用いた蛍光抗体法により調べたところ、RecQ4 については核内に局在することが分かった。また、410 アミノ酸残基よりなる RecQ5 については、細胞質に局在した。

<モノクローン抗体の作製>

RecQ4 については、ヘリカーゼドメインを含まない、6His で標識した C 末側のペプチド断片 (314 アミノ酸) を大腸菌で発現させ、抗原を精製し、マウスに免疫しモノクローン抗体を作製中である。RecQ5 については、抗原作製の準備を進めている。

<病気との関連>

RecQ1、RecQ4、RecQ5 遺伝子は、それぞれヒト染色体の第 1 2 番短腕、第 8 番長腕および第 17 番長腕に存在することが分かっており、データベースにあたりこの部分にリンクした遺伝子疾患を検索したが、有力なものは見つからなかった。しかしながら、最近、RecQ4 についてはこの遺伝子と関連すると思われる遺伝子疾患の候補が他の検索から見つかり、現在その詰めを行っている。

<トリ DT40 細胞を使用した WRN お

よび BLM ノックアウト細胞の作製>

a. ベクター構築：まず、ニワトリの WRN および BLM の cDNA (cWRN と cBLM) をクローニングし、その全塩基配列を決定した。その結果 cWRN は 1384 のアミノ酸残基よりなり、cBLM は 1380 のアミノ酸残基成ることが分かり、ヒトの遺伝子とは、ヘリカーゼドメインでは高いホモロジーを有する (73-84%) が、それ以外の部分でのホモロジーは低く、とくに N 末端のホモロジーは 27-45% と低かった。次に、これら遺伝子の一部のエクソン配列を挟んで、薬剤耐性遺伝子を持つターゲティングベクターを作製した。

b. ノックアウト細胞の作製：このターゲティングベクターをニワトリの DT40 細胞に導入し、相同組み換えにより、宿主遺伝子に導入した。片側のアレルをこの方法でノックアウトした細胞を得た後、反対側のアレルも異なる薬剤耐性遺伝子をもつベクターでノックアウトし、最終的に、WRN と BLM のいずれにおいても、両アレルをノックアウトした細胞を得ることができた。今後これらノックアウト細胞の生物学的性質を、薬剤感受性試験などを適用し検索する。また、RecQ1、RecQ4、RecQ5 のノックアウト細胞の作製も随時進める。

<WRN ノックアウトマウスの作製>

ウェルナー患者の変異 4 を含む遺伝子部位 (エクソン) に薬剤耐性遺伝子を挿入し、両端に WRN のエクソン配列を持つベクターを作製し、ES 細胞に導入して、相同組み換えにより、WRN の片アレルを欠損した ES 細胞を作製した。これをマウスに導入して、子ども (F₁) を生まれ、子ども同士をさらに掛け合わせた。この際得られた F₂ マウスを調べたところ、両アレルがノックアウトされたホモ、片側のみがノックアウトされたヘテロ、および両

アレルとも正常なマウスの比率はメンデルの法則にほぼ従ったが、ノックアウトマウスの比率がやや低い傾向を示した。52週以上経た今日に至るまで、顕著な老化現象は認められないが、卵巣に萎縮、唾液腺に上皮細胞の減少などが認められた。マウス繊維芽細胞の分裂寿命を調べたが、正常なマウス細胞とノックアウトマウス細胞の間に顕著な差は認められなかった。現在、種々の遺伝毒性物質に対する感受性を調べている。また、RecQ1、RecQ4、RecQ5についてもベクターの構築を進めている。

<その他の関連した研究>

- a. WRN ヘリカーゼの細胞での発現を蛍光抗体法およびイムノブロット法で調べたところ、この酵素は主に核質に存在し、また、繊維芽細胞のSV40による、あるいはB-細胞のEBVによるトランスフォーメーション、あるいは細胞の不死化により発現が著しく上昇することが分かった (Shiratori et al., 1999)。
- b. SGS1 遺伝子は分裂酵母に存在する唯一のRecQヘリカーゼであり、そのSgs1変異株は老化が早く進行し、ヒドロキシウレアに高い感受性を持つとともに、遺伝子の過剰な組み換えを起こすことが分かっている。この変異株に、正常のWRNおよびBLMを導入したところ、BLM導入株ではいずれの形質も正常に戻り、また、WRN導入株では遺伝子の過剰な組み換え現象が抑制された。以上の事実は、WRNヘリカーゼはDNAの組み換えを抑制するように働いていることを示唆する (Yamagata et al., 1998)。

D. 考察

組織、器官での mRNA の発現をみると、RecQ1、BLM、WRN、RecQ4 および RecQ5 の 5 種類の遺伝子は、それぞれの組織での発現パターンが

異なる。このことは、これら RecQ ヘリカーゼが細胞、組織の分化機能と密接に関連した形で発現していることを示唆する。WRN のノックアウトマウスでは、52 週を経た時点では顕著な老化現象を示していない。WS 患者で顕著な老化現象を示すのは 30 歳近くになってからである。マウスの最大寿命は 3 年、人の最大寿命は 120 年であるが、単純にマウスの 1 年をヒトの 40 年に対応させれば、52 週でも変化が見られてもおかしくはないが、このような対応関係で律して良いかどうか、問題は残るのではないか。ノックアウトのトリ DT40 細胞については作製が順調に進んでおり、今後の解析が期待される。また、RecQ4 の変異に関連した遺伝病については、最近非常に興味ある事実が見つかり、来年度にはその結果を報告できる。

E. 結論

新たに RecQ4 と RecQ5 という RecQ DNA/RNA ヘリカーゼの遺伝子がクローニングされ、その塩基配列が決定された。これでヒトのこのファミリーの遺伝は RecQ1、BLM、WRN、RecQ4 および RecQ5 の 5 種類存在することになり、これらはそれぞれ組織で固有の発現パターンを示し、それぞれ異なる役割を果たしていることが示唆された。WRN 遺伝子のノックアウトマウスは、必ずしも WS 患者に見られるような顕著な早老現象を示さなかった。

F. 研究発表

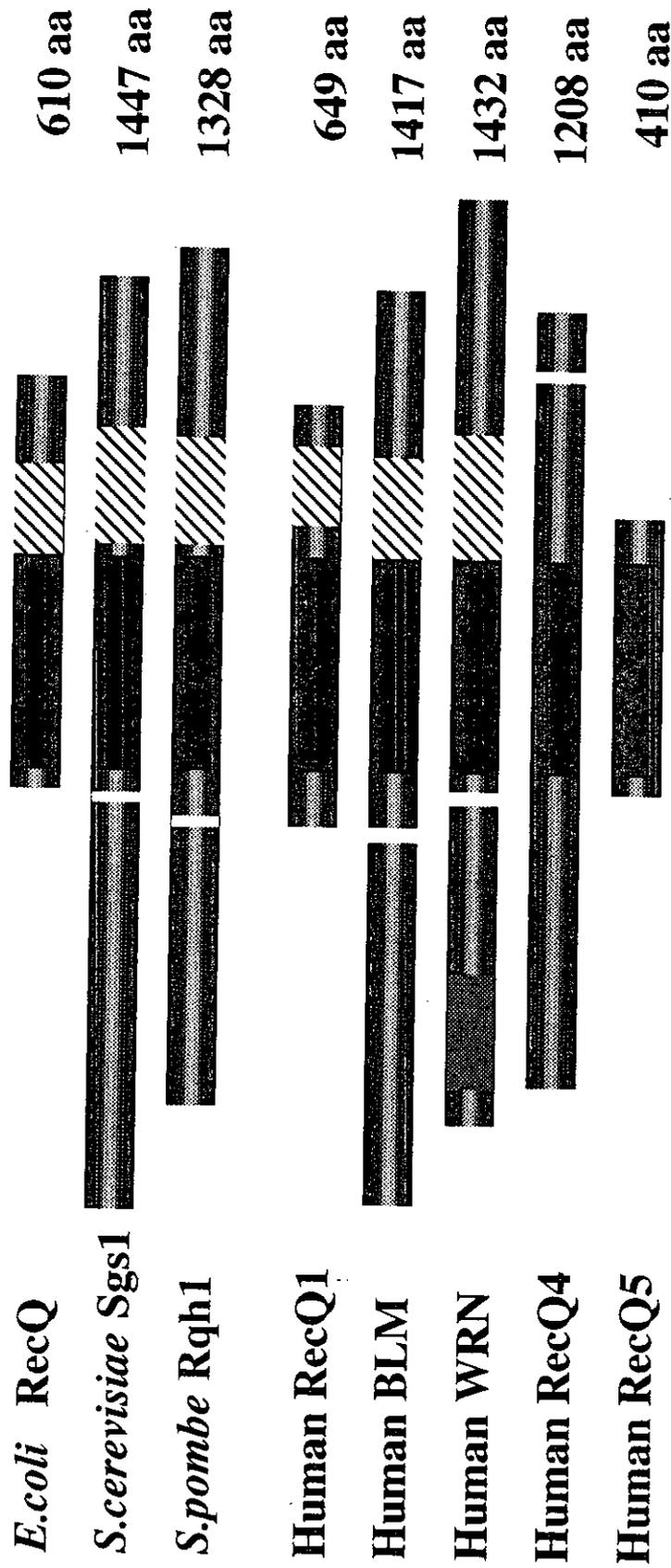
1. 論文発表

- 1) Tokutake, Y., T. Matsumoto, S. Maeda, T. Watanabe, H. Tahara, S. Sakamoto, H. Niida, M. Sugimoto, T. Ide and Y. Furuichi. Extra-chromosomal telomere repeat DNA in telomerase-negative immortalized cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 247, 765-722 (1998).
- 2) Kiatao, S., Ohsugi, I., Ichikawa, K.,

- Goto, M., Furuichi, Y. and Shimamoto, A. Cloning of two new human helicase genes of the RecQ family: Biological significance of multiple species in higher eukaryotes. *Genomics* 54, 443-452 (1998).
- 3) Matsumoto, T., Imamura, O., Goto, M. and Furuichi, Y. Characterization of the nuclear localization signal in the DNA helicase involved in Werner's syndrome. *International Journal of Molecular Medicine* 1, 71-76 (1998).
 - 4) Niida, H., Matsumoto, T., Satoh, H., Shiwa, M., Tokutake, Y., Furuichi, Y. and Shinkai, Y. Severe Growth Defect in Mouse Cells Lacking a Telomerase RNA Component. *Nature Genet.* 19, 203-206 (1998).
 - 5) Ichikawa, K., Shimamoto, A., Imamura, O., Tokutake, Y., Yamabe, Y., Kitao, S., Suzuki, N., Sugawara, K., Matsumoto, T., Thomas, W., Drayna, D., Goto, M., Sugimoto, M., Sugawara, M. and Furuichi, Y. Physical map of the human chromosome 8p11-p21 encompassing tumor suppressor and Werner's syndrome gene loci. *DNA Research* 5, 103-113 (1998).
 - 6) Matsumoto, T., Tsuchihashi, Z., Ito, C., Fujita, K., Goto, M. and Furuichi, Y. Genetic diagnosis of Werner's syndrome, a premature aging disease, by mutant allele specific amplification (MASA) and oligomer ligation assay (OLA). *J. of Anti-Aging Med.* 1, 131-140 (1998).
 - 7) Yamagata, K., Kato, J., Shimamoto, A., Goto, M., Furuichi, Y. and Ikeda, H. Bloom's and Werner's syndrome genes suppress hyperrecombination in yeast *sgs1* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 8733-8738 (1998).
 - 8) Yamabe, Y., Shimamoto, A., Yokota, J., Goto, M., Sugawara, M. and Furuichi, Y. The Sp1-mediated transcription of the Werner's Syndrome gene is modulated by Rb and p53. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6169-6200 (1998).
 - 9) Shiratori, M., Sakamoto, O., Suzuki, N., Tokutake, Y., Kawabe, Y., Enomoto, T., Sugimoto, M., Goto, M., Matsumoto, T. and Furuichi, Y. Detection by epitope-defined monoclonal antibodies of Werner DNA helicases in the nucleoplasm and their upregulation by cell transformation and immortalization. *J. Cell Biol.* 144, 1-9 (1999).
 - 10) Sugimoto, M., Ide, T., Goto, M. and Furuichi, Y. Reconsideration of senescence, immortalization and telomere maintenance of Epstein Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines. *Mechanisms of Ageing and Development* 107, 51-60 (1998).
- 学会発表
- 1) 古市：Genetics of aging。コールドスプリングハーバーシンポジウム、米国
 - 2) 杉本、古市ら：Characteristic telomere dynamics of WS cells and telomere-negative immortalized cells。テロメアシンポジウム、米国
 - 3) 北尾、古市、嶋本ら：Cloning of two new human helicase genes of the RecQ family: Biological significance of multiple species in higher eukaryotes。ゴードン会議、米国
 - 4) 古市：東大医科研創立シンポジウム、東京
 - 5) 古市：ウエルナー早老症と癌。家族性腫瘍研究会、東京
 - 6) 古市：老化のシンポジウム 日本癌学会第57回総会、横浜
 - 7) 北尾、嶋本、古市：Two new human RecQ helicases Q4&Q5。キーストーンシンポジウム、米国
 - 8) 嶋本、北尾、古市：染色体不安定性疾患と RecQ ヘリケースファミリー

- 一遺伝子. DNA 修復ワークショップ、大阪
- 9) 丹伊田、松本、古市: Severe growth defect in mouse cells lacking a telomerase RNA component. 日本生化学会
- 10) 市川、古市、野田: WRN ヘリカーゼのノックアウトマウスの加齢に伴う変化。第21回日本分子生物学会年会、横浜
- 11) 白鳥、坂本、古市: モノクローナル抗体を用いた WRN ヘリカーゼの機能解析。第21回日本分子生物学会年会、横浜
- 12) 鈴木、古市: WS 症候群遺伝子産物 WRN ヘリカーゼは 5'-3'exonuclease 活性を持つ。第21回日本分子生物学会年会、横浜
- 13) 大杉、今村、古市: ウェルナー症候群細胞における遺伝子発現の変動。第21回日本分子生物学会年会、横浜
- 14) 白鳥、坂本、古市: WRN ヘリカーゼ; 核質局在と発現動態。第21回日本分子生物学会年会、横浜
- 15) 白鳥、古市: Werner helicases are in the nucleoplasm. キーストーンシンポジウム、米国
- 16) 古市: Molecular biology of Werner syndrome. International Symposium on Molecular medicine、米国

The structures of RecQ-type DNA helicase family



厚生科学研究補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療）
分担研究報告書

RecQ ヘリカーゼ、Q1、Q2、Q3、及びこれらのヘリカーゼと相互作用するタンパク質の機能の解析

分担研究者 榎本 武美
東北大学薬学部教授

研究要旨

DNA ヘリカーゼ Q1 (RecQ1)、ブルーム症候群原因遺伝子産物 (RecQ2)、ウエルナー症候群原因遺伝子産物 (RecQ3) 及びこれらのヘリカーゼと相互作用するタンパク質の機能の解析を行った。RecQ1 と RecQ2 のマウスの相同遺伝子をクローニングし、種々の臓器で発現を調べ、RecQ1、RecQ2 ともマウスでは精巣で特に発現が高く、その精巣での発現はパキテン期の細胞が増加する時期に増加することを明らかにした。次に、これらの RecQ ヘリカーゼがどのような過程で機能するのかを明らかにするために、RecQ1、RecQ2、RecQ3 と相互作用するタンパク質の検索を行い、RecQ2 と RecQ3 が、SUMO-1 というタンパク質を標的タンパク質に結合させる反応に関与する Ubc9 と相互作用することを見出した。RecQ3 に関しては、さらに Wip1 (Werner interacting protein 1) を見出した。この Wip1 の相同タンパク質をコードする遺伝子が酵母にも存在し、酵母の WIP1 遺伝子破壊株の解析により Wip1 が RecQ3 が関与する過程で機能することが明らかになった。また、RecQ2 や RecQ3 のプロトタイプと考えられる酵母の Sgs1 の解析から、RecQ と相互作用して機能する可能性が示唆されている DNA トポイソメラーゼ III のマウスの cDNA のクローニングを試み、新たな遺伝子 TOP3b をクローニングした。この遺伝子の mRNA は RecQ1 と RecQ2 の mRNA と同様に精巣で特に発現が高く、その発現はパキテン期の細胞が増加する時期に増加した。さらに酵母をモデルにして、Sgs1 の遺伝子 (SGS1) にブルーム症候群及びウエルナー症候群の患者で観察されたものと同様な変異を導入するとともに、種々の欠失変異体を作製し、アルキル化剤に対する感受性、姉妹染色体分体交換の頻度、孢子形成能を観察することにより、RecQ2、RecQ3 の機能ドメインの解析を行った。その結果、アルキル化剤に対する感受性を相補する機能と姉妹染色体分体交換の頻度を下げる機能に関わるドメインと、孢子形成（高等真核生物では精子形成）に関わるドメインとは異なることが明らかになった。さらに、ヒト RecQ1、RecQ2、RecQ3 に対するモノクローナル抗体を作製して抗体による免疫染色を行い、三者が異なった存在様式を示すこと、RecQ2 が核内で比較的大きなドット状に分布することを発見した。

A. 研究目的

ブルーム症候群 (BS) は若年で種々の癌を多発する遺伝性疾患で、ウエルナー症候群 (WS) は早老症として知られる遺伝性疾患である。近年、これらの疾患の原因遺伝子がクローニングされ、両者とも大腸菌の RecQ タンパク質に相同性の高いタンパク質 (RecQ2、RecQ3) をコードすることが明らかになった。また、DNA ヘリカーゼ Q1 (RecQ1) は我々がヒト細胞から精製し、その cDNA をクローニングしたタンパク質で、Q1 も大腸菌の RecQ 相同タンパク質である。一方、出芽酵母には、RecQ 相同タンパク質をコードする遺伝子は一つしか存在しない。この遺伝子は SGS1 と呼ばれ、DNA トポイソメラーゼ III (トポ III) 変異株の遅い増殖性を抑制する遺伝子 (Slow Growth Suppressor) として単離されたものである。この遺伝子が破壊された酵母は、アルキル化剤に感受性になり、染色体が不安定になり、孢子形成能が低下することが我々の解析によりわかっている。この表現型はブルーム症候群患者の細胞のアルキル化剤感受性、染色体の不安定性に対応し、孢子形成能の低下は患者の不妊に対応する。また SGS1 遺伝子破壊株では早く老化が起き (酵母は一定の回数出芽するとそれ以上増殖できなくなる)、これはウエルナー症候群患者由来の細胞の分裂寿命の短縮に符合し、SGS1 遺伝子破壊株は、ウエルナー症候群やブルーム症候群の病態発症解析のよいモデルになるものと考えられる。

本研究は、RecQ1、RecQ2、RecQ3 の機能を解析することにより、遺伝子疾患との関連が明らかではない RecQ1 についてはどのような疾患と関連するかを明らかにし、RecQ2 に関しては高発癌性の分子機構、RecQ3 に関しては早老症の発症の分子機構を解明することを目的にしている。この目的を達成するために高等真核細胞で RecQ の機能の解析を行うとともに、

酵母 Sgs1 の機能の解析を平行して行い、酵母と高等真核細胞から得られた知見を相互にフィードバックしながら解析を進めた。

B. 研究方法及び結果

1. RecQ1 の解析

RecQ1 の機能を解析する手段としてノックアウトマウスの作製を念頭におき、その出発点となるマウス相同遺伝子のクローニング及びその発現を解析した。

マウス Q1 遺伝子のクローニングの結果、C 末端アミノ酸配列が異なる 2 種類のマウス Q1cDNA (α 、 β) を得た。マウス α 型は 648 アミノ酸からなるポリペプチドをコードし、C 末端に核移行シグナル KKRK をもっている。一方 β 型は 631 のアミノ酸からなるポリペプチドをコードし、明瞭な核移行シグナルを持っていない。ノザン・プロット及び RT-PCR 法による発現解析より、 α 型は全臓器で発現し、特に精巣・胸腺での発現が高く、 β 型は精巣でのみで発現していることがわかった。マウス精巣では生後同調的に減数分裂に入ることが知られている。そこで日を追って精巣での発現を調べたところ、 α 型は 7 日後から 8 週齢まで同じレベルで発現するのに対し、 β 型はパキテン期の細胞が増加し、減数分裂組換えが盛んになる 14 日齢より発現が急激に増大することが明らかになった。

現在、Q1 のノックアウトマウスの作製が進行中であり、また、Q1 遺伝子が破壊されたトリの DT40 細胞の作製も最終段階に入っている。

2. RecQ2 の解析

マウスの RecQ2 遺伝子及び、RecQ2 あるいは RecQ3 と相互作用すると考えられている DNA トポイソメラーゼ III の遺伝子 (TOP3) をクローニングした。この過程で新たな DNA トポイソメラーゼ III をコードする遺伝子 TOP3b を発見した。RecQ2 と TOP3b の mRNA の種々の臓器での発現をノ