

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 林 真
国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部長

研究要旨

新たに2種類のRecQヘリカーゼ遺伝子RecQ4とRecQ5のクローニングに成功し、その全塩基配列を決定すると共に、タンパク質の一次構造を推定した。また、RecQ4はがん多発と早老症を伴う遺伝病であるロスムンド・トムソン症の原因遺伝子であることを明らかにした。この結果、ヒトのRecQヘリカーゼ5種類全の塩基配列が決定され、そのうちの3つに関しては、疾患との関連が明らかとなった。この5種類のヘリカーゼの発現をイムノブロットで調べたところ、BLM(RecQ2)、WRN (RecQ3)、RTS(RecQ4)は細胞のトランスフォーメーションや増殖にともない発現が著しく亢進するが、RecQ5は増殖していない細胞でも同じように発現していることが分かった。WRNおよびRecQ1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示さなかった。

これらRecQヘリカーゼファミリー (RecQ2、RecQ3) と相互作用するタンパク質の機能解析を行う目的で、酵母のカウンターパートであるSgs1とRecQの機能の解析を行ったところ、RecQがMEC1の下流、RAD51の上流で機能していること、即ち、Mec1からきたシグナルを受け取り、Rad51が関与する組換え修復系に至る経路で機能していることが明らかとなった。このことは、BLM(RecQ2)がDNAの複製時に生じる二本鎖DNAの切断を抑制して、それを介してゲノム安定化に寄与していることを支持するものである。

ヒト正常組織における老化に伴うBLM (RecQ2) ヘリカーゼの発現様式の変化を疫組織化学的方法を用いて、空間的局在および発達の側面について検討を行ったところ、ヒトにおけるBLMの発現は、精巣、胸腺および腺上皮に認められた。発達の側面では、胎生中～後期に各臓器に出現し、乳幼児期に増強した。中枢神経でも弱い発現が見られた。これらのことはBLMが、細胞脆弱性やDNA修復に関連していることを示唆するものである。

WRN および BLM 症患者由来細胞の遺伝的不安定性を明

らかにする目的で、各種変異原物質に対する細胞毒性、および小核誘発性に対する感受性を検討した。その結果、WRN由来細胞は正常人由来細胞株と比較して、すべての化学物質に対する細胞毒性および小核誘発性に関して顕著な差を示さなかったが、BLM細胞株では小核に関して、高い自然誘発性と、化学物質に対し高感受性を示す傾向が認められた。また、WRN細胞の染色体をスペクトラムカリオタイプ法(SKY)で解析したところ、転座等の染色体異常がモザイク上に観察されるいわゆる variegated translocation mosaicism (VTM)を半数以上の細胞株で認められた。これらの結果からWRNとBLMは両者ともRecQに異常をもつ早期老化症でありながら、その細胞レベルにおける遺伝的不安定性の特徴はかなり異なることが示唆された。

分担研究者氏名

祖父尼俊雄

オリンパス光学工業染色体研究所所
長

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・神経センター武蔵病院臨床
検査部 部長

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が共通の特徴である。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、および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。

具体的には、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に、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した。

ウエルナー症候群およびブルーム症候群患者由来の 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たり、疾患に特徴的な染色体異常を解析することにより、RecQ2 および RecQ3 遺伝子の染色体安定性におよぼす影響を検討する。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) 昨年作製したトリ DT40 細胞の、WRN と BLM のノックアウト細胞に対する薬剤感受性を調べた。

2) 昨年構築したベクターを用い、RecQ1 をノックアウトした ES 細胞を作製し、さらにそのノックアウトマウスを作製した。

3) 酵母において姉妹染色单体交換 (SCE) を測定する系を導入し、各種 RecQ 破壊株の SCE 頻度の変化を検討した。また、RecQ1、RecQ2 と相互作用するタンパク質の性質を明らかにし、酵母の two-hybrid 系などを用いて RecQ3 と相互作用するタンパク質の検索を行った。

4) 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・ブ

ロットを行った。

5) 染色体異常やガン多発をともなう遺伝病患者の細胞サンプルを入手し、RecQ1、RecQ4、RecQ5 に遺伝子変異があるかどうか検討した。

6) EBV や SV40 でトランスフォームした B-細胞や線維芽細胞、あるいは各種ガン細胞での、5 種類の RecQ の発現を、immunoblot 法により調べた。

7) EBV でトランスフォームした健常人、WRN 患者、BLM 患者由来の B-リンパ球細胞を用いて各種化学物質に対する細胞毒性、および小核誘発性を検討した。また、スペクトルカリオタイプ (SKY) 法を用いて細胞老化に伴う核型の変化をモニターした。

(倫理面への配慮)

遺伝子疾患が対象になるので、患者のサンプルの採取などにおいては、「国立精神・神経センター倫理委員会」の審査を基に、秘密の保持とインフォームドコンセントの確認を行う。さらに、各種診断システムの確立に当たっても、同様に扱う。

C. 研究結果

1) WRN ノックアウト細胞では、細胞増殖能がやや低下し、4NQO と Camptothecin に対して感受性を示した。BLM のノックアウト細胞は、やはり細胞増殖能が低下し、4NQO、Etoposide、Bleomycin、MMS に高い感受性を示した。

2) WRN ノックアウトマウスでは特に顕著な早老症を示す兆候は認められなか

った。また、RecQ1 ノックアウトマウスでも現時点で特筆すべき兆候は認められていない。

3) 酵母で SCE を測定する系を導入し、*SGS1* 遺伝子破壊株の SCE の頻度を測定したところ、その頻度の上昇が認められた。この系を用いて *SGS1* の機能の解析を行ったところ、*Sgs1* の機能にはヘリカーゼ活性を必要とする機能と必要としない機能があることが明らかになった。また、RecQ ヘリカーゼの間で保存されている C 末側の領域のシステインが、*Sgs1* の MMS に対する感受性の相補や相同染色体間の組換え頻度上昇の抑制する機能に不可欠であることが明らかになった。さらに、*Sgs1* は通常の状態では組換えを抑えているが、DNA 傷害時には組換えを誘導する機能をもつことを明らかにした。

RecQ2 (BLM) の解析では、BLM が特殊な構造体に存在し、その構造体に局在するためには BLM の N 末の 238-586 のアミノ酸配列が必要であることが明らかになった。RecQ3 (WRN) の解析では、WRN が実際に SUMO-1 化されることがわかった。また、two-hybrid system で相互作用することが示唆された WIP1 が実際に WRN 結合することが明らかになり、また、核内の局在も一致することがわかった。さらに、酵母を用いた遺伝学的解析から、WRN と WIP1 の機能的に関連していることが明らかになった。RecQ1 の解析では、*RECQ1* 遺伝子を破壊しても増殖に影響がでなかったことから、RecQ1 は細胞の増殖に必須ではないことが明らかになった。

4) RecQ2 は小脳では、在胎 21 週ごろよ

り Purkinje 細胞細胞質に微細顆粒状に陽性を示し、出生前後に免疫反応性は最も強く Purkinje 細胞樹状突起にも陽性となり、その後減弱した。小脳白質にも乳児期以降神経突起様の染色性が出現し、学童期以降増強し、顆粒細胞層にも神経突起が陽性に認められた。脳幹では、被蓋部神経細胞胞体は、胎生後期に陽性となった。

成人臓器にて陽性を示したのは、精巢の精細管細胞、腎の尿細管上皮、消化管腺上皮、胸腺の Hassal 小体、膵 Langerhans 島であった。

5) 三人のロスムンド・トムソン症の患者細胞の DNA を解析したところ、RecQ4 の遺伝子の両側のアレルに、変異が見つかった。また、その両親の遺伝子にも、それぞれに対応する変異が片側のアレルに見つかった。以上の結果より、ロスムンド・トムソン症の患者の一部は、RecQ4 に変異があるためであると結論した。そして、この遺伝子を便宜上 RTS と命名した。また、RTS ヘリカーゼに対する単クローン抗体を用いて患者細胞の immunoblot を行ったところ、健常人にみられる正常な RTS ヘリカーゼのバンドが検出できなかった。したがって、免疫診断の上でもわれわれの結論が裏付けられた。

6) 5 つのヘリカーゼに対する抗体を用いた immunoblot により、細胞での発現を調べた。末梢血液から得られた resting B-細胞では、5 つのうち強く発現しているのは RecQ5 のみであった。EBV あるいは発ガン促進物質である PMA でトランスフォームすると他の 4 つのヘリカーゼの発現が著しく高まった。

SV40 による線維芽細胞においても同様の発現亢進がみられた。また、細胞分裂に伴い、特に BLM、WRN、RTS の発現が高まることが分かった。

7) WRN および BLM 症患者由来細胞を用いて各種変異原物質に対する細胞毒性、および小核誘発性に対する感受性を検討したところ、WRN 由来細胞は正常人由来細胞株と比較して、検討したすべての化学物質に対する細胞毒性および小核誘発性に関して顕著な差を示さなかった。一方、BLM 細胞株では小核に関して、高い自然誘発性と、化学物質に対し高感受性を示す傾向が認められた。また、WRN 細胞の染色体をスペクトラムカリオタイプ法(SKY)で解析したところ、転座等の染色体異常がモザイク上に観察されるいわゆる variegated translocation mosaicism (VTM)を半数以上の細胞株で認められた。

D. 考察

本研究は、RecQ1、RecQ2(BLM)、RecQ3(WRN)、RecQ4(RTS)、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。

RecQ4 がロスムンド・トムソン症の原因遺伝子であることが判明し、これで、BLM、WRN とともに、三つの RecQ ヘリカーゼ遺伝子のがん多発の遺伝病の原因遺伝子産物であることが分かった。また、immunoblot の解析で明らかとなったように、これら三つのヘリカーゼ及び

RecQ1 は細胞の増殖と関連した発現が高まり、また、がん DNA ウイルスや発がん促進化合物によるトランスフォーメーションで発現が著しく高まることが分かった。したがって、これらの RecQ ヘリカーゼは細胞分裂の時に必要であることが示唆された。RecQ5 は resting B-細胞でも強く発現され他の RecQ ヘリカーゼとは発現様式が大きく異なった。したがって、RecQ5 は他の RecQ ヘリカーゼと異なり、resting 細胞で重要な役割をしていることが示唆された。

昨年報告したように、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、約2年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。また、RecQ1 のノックアウトマウスも、正常なマウスと異なるような顕著な症状は示していない。

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、本年度の研究では、この系を用いて BLM(SGS1)の機能ドメインに関する情報を得ることができた。また遺伝学的解析

から、*SGS1*は*MEC1*の下流、*RAD51*の上流で機能していることが明らかになった。

トリ DT40 細胞を用いた解析により、ブルーム症候群の細胞で上昇している SCE のかなりの部分が Rad54 を介する相同組換えにより生じていることが初めて明らかになった。ブルーム症候群患者由来の細胞で SCE 及び、相同染色体間の組換えの頻度が上昇していることから、targeted integration の頻度が上がる可能性はある程度予測できたが、*BLM*^{-/-}DT40 細胞を用いることによりそれを初めて実証できた。この発見は高等真核細胞で targeted integration の効率を上げる方法論の開発に手がかりとなるものである。

染色体型の切断は、DNA 複製時に DNA の二本鎖切断が起きた可能性を示唆しており、*BLM*の機能が欠損すると DNA の二本鎖切断が起きやすくなり、その切断を DNA 組換えにより修復しているため *BLM*^{-/-}株では SCE が増加し、組換え機構に欠陥のある *BLM*^{-/-}/*RAD54*^{-/-}二重破壊株では、SCE が起こらず、染色体型の切断が増加したものと考えられる。

今後は、*MEC1* の高等真核細胞の相同遺伝子 *ATM*やその他の遺伝子と *BLM*との二重破壊株を作製したり、*BLM*^{-/-}株に、酵母の解析で得られた情報をもとに作製した *BLM* の変異遺伝子や核内構造体を形成できない *BLM*、あるいは SUMO-1 化の起きない *BLM* をコードする遺伝子を導入し、その表現型を解析することにより、*BLM*の機能する経路を解明していくとともに、*BLM*の機能ドメインを明らかにし、さらに、SUMO-1 化や核内構造体の形成と機能との関係を解析する予定である。

WRN に関連する解析では、WRN が実際に SUMO-1 化されることが証明された。また、two-hybrid system で相互作用することが示唆された WIP1 が実際に WRN 結合することが明らかになり、また、核内の局在も一致することがわかった。さらに、酵母を用いた遺伝学的解析から、WRN と WIP1 の機能的関連が明らかになり、*yWIP1*の破壊が *sgs1* (*yWRN*) の表現型を抑制したことから WIP1 は WRN の上流で機能している可能性がある。今後は WIP1 を中心にして、このタンパク質と相互作用して機能する WRN 以外のタンパク質を検索し、WRN が機能する過程を分子レベルで解明していく予定である。

BLM 遺伝子蛋白は、臓器においては臨床像と一致する部位(精細管、膵、胸腺)および腺管上皮に発現した。中枢神経系では、部位特異的発現があり、発達の段階により発現が異なった。DNA ヘリカーゼは、DNA の複製・修復・組換え・転写の際に二重らせん構造を巻き戻す酵素群の総称である。このうち、RecQ 型 DNA ヘリカーゼファミリーは、ヒトにおいては、*BLM*、*WRN*、*RTS* の原因遺伝子を含む、少なくとも 5 種類が存在することが明らかとなった。

5 種類の RecQ ヘリカーゼ各々の、機能的多様性を検討するために、組織特異的発現を検討されている。mRNA の発現では *BLM* は、おもには胸腺と精巣、また心と脳に splicing によると考えられた小さい分子の発現を認めている。その他の RecQ ファミリーでも、*WRN* は膵と精巣および卵巣、*RTS* は胸腺と精巣、*RecQ5* では膵と精巣で特異的発現が認められるのに対して、*RecQ1* では、全臓器に発現が認められている。この臓器特異的発現と各症候群の臨床所見はよく一致す

るとされている。今回の我々の検討では、胸腺では Hassal 小体に BLM の発現が認められた。Bloom 症候群で認められる分泌型 IgM および IgA の低値、B 細胞により強い細胞性免疫の低下は、免疫系における遺伝子可変性に、BLM 機能障害による DNA 修復の異常が関与するためと推察されている。また、精巣では思春期以降の精子細胞に発現が認められ、高齢者および性腺機能不全や精子形成不全の症例では発現が認めがたかった。また、消化管上皮や脈絡叢、腎尿細管をいった分泌腺細胞の細胞質にも、BLM の発現が見られたことは、細胞質での蛋白合成の盛んな細胞での BLM の利用が伺われる。しかし発現のつよい腎において Bloom 症候群の臨床所見を認めないということは、これを補う他の RecQ ファミリーあるいはその他の因子/系路の存在を示唆する。

脈絡層を除く中枢神経の発現は、一般臓器の発現に比べ全体に弱かったが、小脳の Purkinje 細胞や脳幹被蓋の神経細胞に出生前後に強い発現が見られたこと、成人においても白質の神経突起に一致する発現を見ることは、神経細胞の脆弱性とも関連しており、中枢神経系における BLM の働きは更に検討する必要がある。

各臓器において、BLM は胎生期中～後半に出現し、乳幼児期にかけて増強した。精巣については、思春期以降に陽転し、老年期や性腺機能不全では消失し、精子の形成能とよく相関する所見と考えられる。

これまで、WRN 患者由来細胞はカンプトテシンや 4NQO に対して高い感受性を示し、また、変異をヘテロにもつキャリアー由来細胞も正常と患者由来細胞の

中間程度の感受性を示すと報告されてきた。しかしながら、今回の我々の結果はこれらの現象を再現することはできなかった。ヒト細胞は極めて多様であり、薬剤感受性を決定する因子は多数存在するものと考えられる。おそらく WRN 遺伝子はそれら因子の 1 つで、個体差に基づく他の因子の影響が強くなるため差が現れにくいものと考えられる。今後は、遺伝的背景を統一した系（同一家系内細胞やノックアウト細胞など）を用いて検討する必要があるものと考えられる。WRN や BLM 患者の末梢血細胞を調べると染色体異常や、遺伝子突然変異が蓄積していることが報告され、これら細胞は遺伝的不安定性を示すことが報告されている。今回、遺伝的不安定性を評価する指標として小核の誘発性を検討した。小核は化学物質の処理により容量依存的に誘発されたが、健常人と WRN 患者由来細胞では差は認められなかった。一方、BLM 患者由来細胞では高い自然小核頻度と化学物質に対する感受性を示した。これまで、小核の誘発は p53 欠損細胞で認められることが報告されている。p53 がゲノムの安定化に関与し、その異常が細胞のがん化を導くことを考えると、BLM 遺伝子の方ががんに関与する遺伝的安定性に深く関与しているのかもしれない。

一方、WRN 細胞の核型を SKY 法によって検討したところ、7 株中 4 株に非クローナルな染色体転座や部分欠失が観察された。これに対して、健常人由来細胞で観察された染色体の構造異常は 1 細胞株にクローナルな変異として観察されたのみだった。クローナルな染色体の構造異常は、細胞樹立時にできたものであるが、非クローナルな転座は細胞培養

中に起きた変異と考えることができる。これは WRN 患者においてしばしば観察される Variegated Translocation Mosaicism (VTM)の反映と推察される。WRN 細胞は染色体構造が不安定性であるため、容易に染色体異常を引き起こし、転座のような安定型の染色体の構造異常が蓄積するためと考えられる。このような、染色体異常と BLM 遺伝子の変異との関連について、現在ノックアウト細胞を用いて検討中である。

E. 結論

この研究班で新たにクローニングされた2種類の RecQ DNA/RNA ヘリカーゼの遺伝子(RecQ4 と RecQ5)のうち、RecQ4 は Rothmund-Thomson の原因遺伝子であることが解明された。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。また、RecQ1 のノックアウトマウスも顕著な症状は示していない。

酵母 *SGS1* 遺伝子破壊株の解析により、真核細胞の RecQ が *MEC1* の下流、*RAD51* の上流で機能していること、即ち、*Mec1* からきたシグナルを受け取り、*Rad51* が関与する組換え修復系に至る経路が明らかとなった。このことから BLM 欠損による SCE および targeted integration 頻度の上昇のメカニズムが明らかとなった。また、WRN は SUNO-1 化されること、WRN と相互作用するタンパク質として見つかった WIP1 の WRN との結合様式が明らかとなり、WRN タンパクの機能が解明されつつある。

ヒトにおける BLM の発現は、精巣、胸腺および腺上皮に認められた。発達の側面では、胎生中～後期に各臓器に出現し乳幼児期に増強した。中枢神経でも、弱いながら発現がみられた。これらのことは細胞脆弱性や DNA 修復に関連していると考えられる。

WRN 細胞が健常人由来細胞と比較して、化学物質に対する細胞毒性や、小核誘発性に対して特に感受性を示す知見は得られなかった。一方、核型は培養によって激しく変化することから、WRN の遺伝的不安定性は、わずかな染色体の構造的不安定性に関連していることが示唆された。また、BLM 細胞は高い小核誘発性を示したことから、BLM とは異なるタイプの遺伝的不安定性と予想された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kitao, 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, 443-52 (1998).
2. Kitao, S., Shimamoto, A., Goto, M., Miller, R. W., Smithson, W. A., Lindor, N. M., and Furuichi, Y., Mutations in RECQL4 cause a subset of cases of Rothmund-Thomson syndrome, *Nat Genet*, 22, 82-4 (1999).
3. Kitao, S., Lindor, N. M., Shiratori, M., Furuichi, Y., and Shimamoto, A., Rothmund-thomson syndrome responsible gene, RECQL4: genomic structure and products [In Process Citation], *Genomics*, 61, 268-76

- (1999).
4. Shiratori, M., Sakamoto, S., Suzuki, N., Tokutake, Y., Kawabe, Y., Enomoto, T., Sugimoto, M., Goto, M., Matsumoto, T. & Furuichi, Y. *J Cell Biol* 144, 1-9 (1999)
 5. Sugimoto, M., Ide, T., Goto, M. & Furuichi, Y. *Mech Ageing Dev* 107, 51-60 (1999).
 6. Sugimoto, M., Ide, T., Goto, M., and Furuichi, Y., Incorrect use of "immortalization" for B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus, *Journal of Virology*, 73, 9690-9691 (1999).
 7. Goto, M., Yamabe, M., Shiratori, M., Okada, M., Kawabe, T., Matsumoto, T., Sugimoto, M., and Furuichi, Y., Immunological diagnosis of Werner syndrome by down-regulated and truncated gene products, *Human Genetics*, 105, 301-7 (1999).
 8. Suzuki, N., Shiratori, M., Goto, M., and Furuichi, Y., Werner syndrome helicase contains a 5'→3' exonuclease activity that digests DNA and RNA strands in DNA/DNA and RNA/DNA duplexes dependent on unwinding, *Nucleic Acids Res*, 27, 2361-2368 (1999).
 9. Heo, S.-J., Tatebayashi, K., Ohsugi, I., Shimamoto, A., Furiichi, Y. and Ikeda, H. DNA helicase of human BLM suppresses premature aging caused by sgs1 deficiency in yeast. (1999) *Genes Cells* 4, 619-626.
 10. Hara, K., Kudoh, H., Enomoto, T., Hashimoto, Y., and Masuko, T. Malignant transformation of NIH3T3 cells by overexpression of early lymphocyte activation antigen CD98. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262: 720-725, 1999.
 11. Matsumoto, Y., Satoh-Ueno, K., Yoshimura, A., Hashimoto, Y., Enomoto, T., and Masuko, T. Identification and Immunological Characterization of a Novel 40-kDa Protein Linked to CD98 Antigen. *Cell Struct. Funct.* 24: 217-226, 1999.
 12. Onoda, F., Seki, M., Miyajima, A., and Enomoto, T. Elevation of sister chromatid exchange in *Saccharomyces cerevisiae* sgs1 disruptants and the relevance of the disruptants as a system to evaluate mutations in Bloom's syndrome gene. *Mutation Res.* in press.
 13. Shishido, T., Ohkawa, M., Itoh, A., Enomoto, T., Hashimoto, Y., and Masuko, T. Colocalization of GP125/CD98 with tropomyosin isoforms at the cell-cell adhesion boundary. *J. Biochem.* in press.
 14. Shishido, T., Uno, S., Kamohara, M., Tsuneoka-Suzuki, T., Hashimoto, Y., Enomoto, T., and Masuko, T. Transformation of Balb3T3 cells caused by overexpression of rat CD98 heavy chain (HC) requires its association with light chain: Missense mutation in a cysteine residue of CD98HC eliminates its transforming activity. *Int. J. Cancer* in press.
 15. Oka A., Takashima S: The up-regulation of metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) in Down syndrome brains. *Acta Neuropath*

- (Berlin) 97:275-278, 1999
16. Komaki H, Sasaki M, Yamamoto T, Iai M, Takashima S: Connatal Pelizaeus-Merzbacher disease associated with the *Jimpysd* mice mutation. *Pediatr Neurol* 20:309-311, 1999
 17. Sohma O, Mizuguchi M, Takashima S, Satake A, Itoh K, Sakuraba H, Suzuki Y, Oyanagi K: Expression of protective protein in human tissue. *Pediatr Neurol* 20:210-214, 1999
 18. Saito Y, Ito M, Hanaoka S, Ohama E, Akaboshi S, Takashima S: Dopamine receptor upregulation in Lesch-Nyhan syndrome: a postmortem study. *Neuropediatrics* 30:66-71, 1999
 19. Meng SZ, Oka A, Takashima S: Developmental expression of monocyte chemoattractant protein-1 in the human cerebellum and brainstem. *Brain and Dev* 21:30-35, 1999
 20. Suzuki Y, Zhang Z, Shimosawa M, Muro M, Shono H, Toda S, Miyahara S, Hashimoto T, Usuda N, Ito M, Takashima S, Kondo N: Perinatal diagnosis of peroxisomal D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase/D-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional protein deficiency. *J Hum Genet* 44:143-147, 1999.
 21. Ohyu J, Marumo G, Ozawa H, Takashima S, Nakajima K, Kohsaka S, Hamai Y, Machida Y, Kobayashi K, Ryo E, Baba K, Kozuma S, Okai T, Taketani Y: Early axonal and glial pathology in fetal sheep brains with leukomalacia induced by repeated umbilical cord occlusion. *Brain Dev* 21:248-252, 1999.
 22. Iai M, Takashima S: Thalamocortical development of parvalbumin neurons in normal and periventricular leukomalacia brains. *Neuropediatrics* 30:14-18, 1999.
 23. Takei Y, Takashima S, Ohyu J, Takami T, Miyajima T, Hoshika A: Effects of nitric oxide synthase inhibition on the cerebral circulation and brain damage during kainic acid-induced seizures in newborn rabbits. *Brain Dev* 21:253-259, 1999.
 24. Deguchi K, Oguchi K, Matsuura N, Armstrong DD, Takashima S: Periventricular leukomalacia: relation to gestational age and axonal injury. *Pediatr Neurol* 20:370-374, 1999.
 25. Ozawa Y, Obonai T, Itoh M, Aoki Y, Funayama M, Takashima S: Catecholaminergic neurons in the diencephalon and basal ganglia of SIDS. *Pediatr Neurol* 21:471-475, 1999.
 26. Arai N, Mizuguchi M, Mori K, Takashima S: Developmental of telencephalin in the human cerebrum. *Microscopy Research and Technique* 46:18-23, 1999.
 27. Meng SZ, Takashima S: Expression of transforming growth factor- β 1 in periventricular leukomalacia. *J Child Neurol* 14:377-381, 1999.
 28. Itoh M, Suzuki Y, Takashima S: A novel peroxisomal enzyme, D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase/D-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional protein: its expression in the

- developing human brain. *Microscopy Research and Technique* 45:383-388, 1999.
29. Saito Y, Ito M, Ozawa Y, Obonai T, Kobayashi Y, Washizawa k, Ohson Y, Takami T, Oku K, Takashima S: Changes of neurotransmitters in the brainstem of patients with respiratory-pattern disorders during childhood. *Neuropediatrics* 30:133-140, 1999.
 30. Meng SZ, Ozawa Y, Itoh M, Takashima S: Developmental and age-related changes of dopamine transporter, and dopamine D1 and D2 receptors in human basal ganglia. *Brain Res* 843:136-144, 1999.
 31. Mizuguchi M, Qin J, Yamada M, Ikeda K, Takashima S: High Expression of doublecortin and KIAA0369 protein in fetal brain suggests their specific role in neuronal migration. *Am J Pathol* 155:1713-1721, 1999.
 32. Arai Y, Edwards V, Takashima S, Becker LE: Vascular pathology in galactosialidosis. *Ultrastructural Pathol* 23:369-374, 1999.
 33. Honma, M., M. Hayashi, H. Shimada, N. Tanaka, S. Wakuri, T. Awogi, K.I. Yamamoto, N.-U. Kodani, Y. Nishi, M. Nakadate and T. Sofuni Evaluation of the mouse lymphoma tk assay (microwell method) as an alternative to the in vitro chromosomal aberration test. *Mutagenesis*, 14, 5-22 (1999)
 34. Honma, M., L.-S. Zhang, H. Sakamoto, M. Ozaki, K. Takeshita, M. Momose, M. Hayashi and T. Sofuni The need for long-term treatment in the mouse lymphoma assay. *Mutagenesis*, 14, 23-29 (1999)
 35. Saitoh, M., T. Umemura, Y. Kawasaki, J. Momma, Y. Matsushima, K. Sakemi, K. Isama, S. Kitajima, Y. Ogawa, R. Hasegawa, T. Suzuki, M. Hayashi, T. Inoue, Y. Ohno, T. Sofuni, Y. Kurokawa and M. Tsuda Toxicity study of a rubber antioxidant, mixture of 2-mercaptomethylbenzimidazole, by repeated oral administration to rats. *Food and Chem. Toxicol.*, 37, 777-787 (1999)
 36. Ohno, Y., T. Kaneko, T. Inoue, Y. Morikawa, T. Yoshida, A. Fujii, M. Masuda, T. Ohno, M. Hayashi, J. Momma, T. Uchiyama, K. Chiba, N. Ikeda, Y. Imanishi, H. Itakaki, H. Kakishima, Y. Kasai, A. Kurishita, H. Kojima, K. Matusukawa, T. Nakamura, K. Ohkoshi, H. Okumura, K. Saijo, K. Sakamoto, T. Suzuki, K. Katano, H. Tatsumi, N. Tani, M. Usami and R. Watanabe Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (1) Overview of the validation study and Draize scores for the evaluation of the tests. *Toxicology in Vitro*, 13, 73-98 (1999)
 37. Uchiyama, T., J. Akiyama, E. Miyai, K. Sakamoto, Y. Takino, M. Ohnuma, K. Ohkosi, Y. Okamoto, Y. Morito, H. Kojima, H. Okumura, J. Sawamura, N. Ikeda, Y. Sumida, K. Chiba, I Makino, K. Kawakami, R. Yamamoto, H. Torishima, H. Yanase, A. Miyajima, M. Sunouchi, M. Hayashi and Y. Ohno Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic

- ingredients (7) Evaluation of cytotoxicity test by CornePack. *Toxicology in Vitro*, 13, 163-173 (1999)
38. Kobayashi, H. and M. Hayashi Classification and evaluation of comets in single cell gel electrophoresis assay. *Environ. Mutagen Res.*, 21, 231-236 (in Japanese)(1999)
39. Nishikawa, T., M. Haresaku, K. Adachi, M. Masuda and M. Hayashi Study of a rat skin in vivo micronucleus test: data generated by mitomycin C and methyl methanesulfonate. *Mutat. Res.*, 444, 159-166 (1999)
40. Tsuchiya, T., M. Umeda, H. Nishiyama, I. Yoshimura, S. Ajimi, M. Asakura, H. Baba, Y. Deqa, Y. Ebe, Y. Fushiwaki, S. Hamada, T. Hamamura, M. Hayashi, Y. Iwase, Y. Kajiwara, Y. Kasahara, M. Kawabata, E. Kitada, K. Kubo, K. Mashiko, D. Miura, F. Mizuhashi, F. Mizuno, M. Nakajima, Y. Nakamura, N. Nobe, H. Oishi, E. Ota, A. Sakai, M. Sato, S. Shimada, T. Sugiyama, C. Takahashi, Y. Takeda, N. Tanaka, C. Toyozumi, T. Tsutsui, S. Wakuri, S. Yajima and N. Yajima . An interlaboratory validation study of the improved transformation assay employing Balb/c 3T3 cells: Results of a collaborative study on the two-stage cell transformation assay by the non-genotoxic carcinogen study group. *ATLA*, 27, 685-702 (1999)
41. Suzuki, T., Y. Uno, K. Idehara, T. Baba, J. Maniwa, A. Ohkouchi, X. Wang, M. Hayashi, T. Sofuni, M. Tsuruoka, H. Miyajima and K. Kondo Procarbazine genotoxicity in the MutaTMMouse; strong clastogenicity and organ-specific induction of *lacZ* mutations. *Mutat. Res.*, 444, 269-281 (1999)
42. Saotome, K., T. Sofuni and M. Hayashi A micronucleus assay in sea urchin embryos. *Mutat. Res.*, 446, 121-127 (1999)
43. Matsushima, T., M. Hayashi, A. Matsuoka, M. Ishidate, Jr., K.F. Miura, H. Shimizu, Y. Suzuki, K. Morimoto, H. Ogura, K. Mure, k. Koshi and T. Sofuni Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis*, 14, 569-580 (1999)
44. Sofuni, T., M. Hayashi, T. Nohmi, A. Matsuoka, M. Yamada and E. Kamata Semi-quantitative evaluation of genotoxic activity of chemical substances and evidence for a biological threshold of genotoxic activity. *Mutat. Res.*, 464, 97-104 (1999)
2. 学会発表
1. 嶋本 : Workshop on DNA repair, recombination and mutagenesis. (大阪)
2. 宮島敦子、大野泰雄、太田邦史、関政幸、小野田文俊、榎本武美 DNA修復および減数分裂における出芽酵母 SGS1 の機能の解析 日本薬学会第119回年会 徳島
3. 鈴木裕史、吉村明、関政幸、益子高、榎本武美 抗ペプチドモノクローナル抗体を用いた Bloom タンパクの細胞局在の解析 日本薬学会第

- 119回年会 徳島
4. Branzei Dana、川辺洋一、小野田文俊、関政幸、榎本武美 Werner 症候群原因遺伝子産物と相互作用するタンパク質、Wip1 の機能 日本生化学会東北支部第65回例会 仙台
 5. 小野田文俊、佐藤友里恵、小野寺涼子、関政幸、榎本武美 Werner 症候群・Bloom 症候群の出芽酵母相同遺伝子 SGS1 の機能 日本生化学会東北支部第65回例会 仙台
 6. 川辺玉恵、白鳥美和、松本武久、後藤眞、関政幸、榎本武美、杉本正信、古市泰宏 トランスフォーメーションや不死化に伴う RecQ ヘリカーゼの Up-regulation 第72回日本生化学会大会 横浜
 7. Suzuki, H., Seki, M., Kobayashi, T., Kawabe, Y., Masuko, T. and Enomoto, T. Localization of Bloom's Syndrome Protein in Speckled Subnuclear Structures. 3R Symposium (Replication, Repair and Recombination)
 8. 榎本武美 RecQ ファミリーヘリカーゼの機能欠損と癌化、老化 第113回日本薬学会北海道支部例会特別講演 札幌
 9. 川辺玉恵、津山尚宏、白鳥美和、松本武久、北尾沙織、嶋本顕、関政幸、榎本武美、後藤眞、井出利憲、杉本正信、古市泰宏 DNA 腫瘍ウイルスによる RecQ 型 DNA ヘリカーゼ発現量増加 第22回日本分子生物学会年会 福岡
 10. 嶋本顕、川辺洋一、若宮昭子、西川香里、関政幸、榎本武美、磯部俊明、古市泰宏 WRN ヘリカーゼ結合タンパク質、ヒト WIP1 のクローニングと解析 第22回日本分子生物学会年会 福岡
 11. Branzei Dana、川辺洋一、小野田文俊、許碩晋、池田日出男、関政幸、榎本武美 出芽酵母 *wipl*(Werner Interacting Protein 1)変異株の解析 第22回日本分子生物学会年会 福岡
 12. 宇井彩子、小野田文俊、佐藤友里恵、宮島敦子、小野寺涼子、関政幸、榎本武美 RecQ ヘリカーゼファミリーに保存されたアミノ酸の機能 第22回日本分子生物学会年会 福岡
 13. 小野寺涼子、小野田文俊、佐藤友里恵、宇井彩子、関政幸、榎本武美 過剰発現 Sgs1p は出芽酵母野生株の増殖を阻害する 第22回日本分子生物学会年会 福岡
 14. Wang, W.-S., Narita, Y., Sonoda, E., Takeda, S., Seki, M., and Enomoto, T. Targeted disruption of chicken BLM gene increases homologous recombination. 第22回日本分子生物学会年会 福岡
 15. 小野田文俊、宮島敦子、関政幸、榎本武美 出芽酵母 *sgs1* 変異株における DNA 傷害誘導時の相同染色体組換えの減少 第22回日本分子生物学会年会 福岡
 16. 竹田昌弘、小野田文俊、関政幸、榎本武美 温度感受性変異株による出芽酵母 RHC18 の機能解析 第22回日本分子生物学会年会 福岡
 17. 坂本栄、市川幸司、杉谷善信、伊藤志帆子、中山ひとみ、関政幸、榎本武美、松本武久、今村宰、古市泰宏、野田哲生 RecQ ヘリカーゼ Q1 遺伝子

ノックアウトマウスの作製および
解析 第22回日本分子生物学会
年会 福岡

18. 榎本武美 Bloom 症候群及び Werner
症候群原因遺伝子産物の局在と機
能 文部省科学研究費特定領域研究
(A) 公開シンポジウム「細胞複製装
置と DNA 修復装置の共役」 大阪
19. 榎本武美 ブルーム症候群遺伝子
産物の局在と機能 文部省科学研
究費特定領域研究 (A) がん公開・
合同シンポジウム 東京
20. 田所、本間、松岡、坂本、佐藤、杉
本、古市、林：ウェルナー症患者由
来 B リンパ球細胞株の小核誘発性
と染色体不安定性、第 28 回環境変
異原学会、岐阜
21. 坂本、本間、田辺、今村、藤田、松
本、古市、林：ウェルナー型 (WRN)
またはブルーム型 (BLM) RecQ ヘリ
カーゼ欠損トリ DT40 細胞の染色体
不安定性、第 28 回環境変異原学会、
岐阜

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。このうちで、RecQ4 が常染色体劣性遺伝病であるロスムンド・トムソン症の原因遺伝子であることをつきとめた。5種類のヘリカーゼのタンパクレベルでの発現が細胞のトランスフォーメーションや細胞分裂でどう変化するか、イムノブロット法にて解析した。さらに、WRN と BLM 遺伝子をノックアウトしたトリ DT40 細胞を作製し調べた結果、これら細胞が特定の化学物質に高い感受性を示すことが分かった。また、WRN ノックアウトマウスの性質を解析するとともに、RecQ1 のノックアウトマウスを作製した。

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 と遺伝病との関係を調べること。二つ目は、5つの RecQ 遺伝子の機能に関する大まかなあたりをつけるために、イムノブロット法により、細胞のトランスフォーメーションや細胞分裂で5つの RecQ へ

リカーゼの発現がどう変化するか解析すること。三つ目はトリ 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、まず、WRN と BLM のノックアウト細胞と RecQ1 のノックアウトマウスを作製すること、また、昨年度に作成した WRN ノックアウト細胞の性質を解析すること。

B. 研究方法

1. RecQ4 と RecQ5 については、ゲノムの不安定化とガン多発を伴い、できれば早老症をも伴うような、遺伝病の患者細胞を取得し、この二つの遺

- 伝子に異常がないかどうか調べた。
2. RecQ1、BLM、WRN、RecQ4 および RecQ5 の 5 種類の抗体を確保し、各種細胞のトランスフォーメーション前後、細胞分裂などで発現がどう変化するか、イムノプロット法にて解析した。
 3. 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、WRN と BLM のノックアウト細胞および RecQ1 ノックアウトマウスを作製した。また、昨年度作製した WRN のノックアウトマウスの性質を調べた。

C. 結果と考察

<RecQ4 及び RecQ5 遺伝子と遺伝病との関連>

RecQ4 : 3 人のロスムンド・トムソン症の患者由来の線維芽細胞株の RecQ4 遺伝子のエクソン部分の配列を、健常人の配列と比較したところ、二つのアレルともに変異を持っていることを見いだした。この変異は両親の片アレルにも見いだされたので、遺伝により伝わったことも確認された。また、RecQ4 ヘリカーゼに対する単クローン抗体を作成し、患者細胞での発現をイムノプロットで調べたところ、患者細胞では正常な RecQ4 ヘリカーゼの発現は認められなかった。以上の結果より、少なくともロスムンド・トムソンの患者の一部は RecQ4 遺伝子の両アレルに変異が起きたために引き起こされたと結論した (Kitao et al., 1999)。

RecQ5 : エイジーン研究所で集めた、ウェルナー症ではない早老症患者細

胞を 8 株解析したが、RecQ5 に異常のある患者は見つからなかった。

<RecQ ヘリカーゼの発現>

RecQ1、WRN、RecQ4、RecQ5 ヘリカーゼに対する単クローン抗体はエイジーン研究所で作製し、また、RecQ1 および BLM に対するポリクローン抗体は共同研究者より入手した。これら抗体を用いて、イムノプロット法によりこれらヘリカーゼの発現をタンパクレベルで解析したところ、次のことが分かった。

1) resting B-細胞 (以下 B-細胞と略す) は、BLM、WRN、RecQ4 ヘリカーゼを殆ど発現せず、RecQ1 は僅かに、また RecQ5 は大量に発現していた。Epstein-Barr virus (EBV) でトランスフォームするか、発がん促進化合物の PMA で刺激すると、RecQ1、BLM、WRN、RecQ4 ヘリカーゼの発現は著しく上昇したが、RecQ5 ヘリカーゼの発現は変化しなかった。

2) 線維芽細胞を SV40 でトランスフォームすると同様の変化が見られたが、RecQ1 ヘリカーゼはトランスフォーム前の細胞でも強く発現していた。

3) BLM、WRN、RecQ4 ヘリカーゼは細胞分裂期の細胞で発現が強まったが、RecQ1 と RecQ5 の発現はそれほど変化しなかった。

以上の結果より、BLM、WRN、RecQ4 は DNA 複製とリンクし、一方 RecQ5 は休止期の細胞でも何らかの役割を担っていることが示唆された。

<WRN および BLM をノックアウトしたトリ DT40 細胞の解析>

昨年より開始した WRN および BLM をノックアウトしたトリ DT40 細胞の作製

を完了し、細胞の増殖能を正常細胞と比較するとともに、各種薬剤に対する感受性を調べた。WRN および BLM ノックアウト細胞はいずれも正常細胞と比較し、細胞増殖能が低下した。WRN のノックアウト細胞はカンプトテシン、4NQO、UV に感受性を示した。BLM ノックアウト細胞は 4NQO、ブレオマイシン、エトポシド、MMS、シスプラチン、UV に感受性を示した。これらの結果は両者、特に BLM ヘリカーゼが DNA の修復の一部に関与していることを示唆する。現在、BLM と WRN のダブルノックアウト細胞の作製を行っている。

<WRN ノックアウトマウスの解析と RecQ1 ノックアウトマウスの作製>

昨年度に作製した WRN ノックアウトマウスは 2 年目にさしかかったが、特に顕著な早老症を示す兆候は認められなかった。また、RecQ1 遺伝子のノックアウトマウスも作製したが、今の所特筆すべき兆候は認められていない。

<その他の関連した研究>

WRN ヘリカーゼは 5' から 3' の方向に働くエクソヌクレアーゼ活性を持ち、DNA/DNA の二重鎖および RNA/DNA のヘテロ二重鎖をほどこきつつ、ほどこれた DNA および RNA を分解することを明らかにした。(Suzuki et al., 1999)。

D. 考察

ヒトの 5 つの RecQ ヘリカーゼである、RecQ1、BLM、WRN、RecQ4、RecQ5 のうち、RecQ4 がロスムンド・トムソン症の原因遺伝子であることが解明された。この結果、BLM、WRN ヘリカーゼとともに RecQ5 も、ゲノムの安定化

に寄与し、発ガンを防ぐ役割を担っていることが分かった。また、この三つのヘリカーゼは細胞のトランスフォーメーションや分裂と関連して発現が増加することが明らかになり、DNA の複製時に重要な役割を果たしていることが示唆された。一方、RecQ5 は休止期の細部でも強く発現され、細胞のトランスフォーメーションや細胞分裂で増加しないので、他の役割、例えば転写などに関与している可能性がある。ノックアウトしたトリ DT40 細胞の結果より、WRN と BLM、特に BLM は DNA の修復で重要な役割を果たしていることが示唆された。

E. 結論

RecQ4 は、少なくとも一部のロスムンド・トムソン症の原因遺伝子である。このことから、BLM、WRN、とならんで RecQ4 ヘリカーゼはゲノムの安定化に重要な働きをしており、発ガンの抑制に大きく寄与していると結論された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kitao, 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, 443-52 (1998).
- 2) Kitao, S., Shimamoto, A., Goto, M., Miller, R. W., Smithson, W. A., Lindor, N. M., and Furuichi, Y., Mutations in RECQL4 cause a subset of cases of Rothmund-Thomson syndrome, *Nat*

- Genet*, 22, 82-4 (1999).
- 3) Kitao, S., Lindor, N. M., Shiratori, M., Furuichi, Y., and Shimamoto, A., Rothmund-thomson syndrome responsible gene, RECQL4: genomic structure and products [In Process Citation], *Genomics*, 61, 268-76 (1999).
 - 4) Shiratori, M., Sakamoto, S., Suzuki, N., Tokutake, Y., Kawabe, Y., Enomoto, T., Sugimoto, M., Goto, M., Matsumoto, T. & Furuichi, Y. (1999) *J Cell Biol* **144**, 1-9.
 - 5) Sugimoto, M., Ide, T., Goto, M. & Furuichi, Y. (1999) *Mech Ageing Dev* **107**, 51-60.
 - 6) Sugimoto, M., Ide, T., Goto, M., and Furuichi, Y., Incorrect use of "immortalization" for B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus, *Journal of Virology*, 73, 9690-9691 (1999).
 - 7) Goto, M., Yamabe, M., Shiratori, M., Okada, M., Kawabe, T., Matsumoto, T., Sugimoto, M., and Furuichi, Y., Immunological diagnosis of Werner syndrome by down-regulated and truncated gene products, *Human Genetics*, 105, 301-7 (1999).
 - 8) Suzuki, N., Shiratori, M., Goto, M., and Furuichi, Y., Werner syndrome helicase contains a 5'→3' exonuclease activity that digests DNA and RNA strands in DNA/DNA and RNA/DNA duplexes dependent on unwinding, *Nucleic Acids Res*, 27, 2361-2368 (1999).
 - 9) Heo, S.-J., Tatebayashi, K., Ohsugi, I., Shimamoto, A., Furuichi, Y. and Ikeda, H. DNA helicase of human BLM suppresses premature aging caused by sgs1 deficiency in yeast. (1999) *Genes Cells* 4, 619-626.
2. 学会発表
 - 1) 北尾ら：Rthmund-Thomson 症候群の原因遺伝子の同定、日本生物学会。
 - 2) 白鳥ら：WRN ヘリカーゼ、核質局在と発動動態。日本分子生物学会
 - 3) 川辺ら：DNA 腫瘍ウイルスによる RecQ 型 DNA ヘリカーゼ発現量の増加。日本分子生物学会
 - 4) 大杉ら：ウェルナー症候群ヘリカーゼのリン酸化について。日本分子生物学会
 - 5) 西川ら：DNA 損傷にゆる WRN ヘリカーゼの核内局在動態変化。日本分子生物学会
 - 6) 嶋本ら：WRN ヘリカーゼ結合タンパク質、ヒト WIP1 のクローニングと解析。日本分子生物学会
 - 7) 今村ら：DT40 細胞株を用いたジーンターゲティングによる Bloom ヘリカーゼおよび Werner ヘリカーゼの機能解析。日本分子生物学会
 - 8) 許ら：出芽酵母での老化の原因は ERC の蓄積ではない。日本分子生物学会
 - 9) 鈴木（貴）ら：Werner ヘリカーゼの核小体移行機構の解析。日本分子生物学会
 - 10) 市川ら：ジーンターゲティングによるウェルナーDNA ヘリカーゼファミリーの機能解析。日本分子生物学会
 - 11) 坂本（栄）ら：DNA ヘリカーゼ Q1

遺伝子ロックアウトマウスの作製
および解析。日本分子生物学会
12)白鳥ら：Werner helicase is in the
nucleoplasm. Keystone Symp. USA.