

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
東北大学大学院薬学研究科教授

研究要旨

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)、これらのヘリカーゼの酵母のホモログ Sgs1 及び、RecQ1 の機能の解析を行った。酵母の Sgs1 の解析では、Sgs1 の機能ドメインが明らかになり、高等真核細胞の RecQ 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、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で機能していることが示唆された。

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。また、トリの DT40 細胞を用いて *BLM* 遺伝子及び *RAD54* 遺伝子破壊株を作製して解析することにより、ブルーム症候群で亢進している sister chromatid exchange (SCE; 姉妹染色分体交換) は相同組換えによること、及び、BLM は DNA 複製時に生じる二本鎖 DNA の切断を抑制していることが示唆された。また、BLM の機能が欠損すると targeted integration の頻度が上が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 と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。

A. 研究目的

本研究は、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、我々がヒト細胞から精製し、その cDNA をクローニングした RecQ1 の機能を解析し、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、RecQ1 についてはどのような疾患と関連するかを明らかに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、酵母の RecQ ホモログである 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。

我々の解析により、*SGS1* 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、胞子形成能が低下することがわかっている。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、胞子形成能の低下は患者の不妊に対応する。また *SGS1* 遺伝子破壊株は分裂寿命が短くなる (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。

B. 研究方法及び結果

1. Sgs1 の解析

酵母で姉妹染色分体交換 (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、その頻度が上昇していた。また、*SGS1* にブルーム症候群 (BS) の患者で見い

だされた変異と同じ変異を入れてもその頻度の上昇が観察された。この SCE の頻度の上昇は BS の細胞の最も特徴的な性質であり、*SGS1* 遺伝子破壊株が BS 細胞のよいモデルになることが更に確認でき、*SGS1* に変異を導入して解析することにより *BLM* の機能ドメインの解析ができることが示唆された。そこで *SGS1* 遺伝子破壊株に、部位特異的変異や欠失変異をいれた *SGS1* 遺伝子を導入し、*SGS1* の機能ドメインの解析を行った。

ヘリカーゼ活性をなくすようなミスセンス変異を導入すると、MMS に対する感受性の相補や、相同染色体間の組換え及び SCE の頻度上昇の抑制が起きないが、胞子形成は正常に進行し、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り、欠失変異による解析では N 末の 46 アミノ酸の重要性が明らかになった。さらに、MMS で DNA 傷害を誘導した時の相同染色体間の組換えの頻度を測定し、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。

SGS1 遺伝子と他の遺伝子の二重破壊株を作製して行った遺伝学的解析から、*SGS1* は、DNA 除去修復、塩基除去修復、ミスマッチ修復、誤りがち修復等の修復系ではなく、*MEC1* の下流、*RAD51* の上流で機能していることが明らかになり、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可能性が示唆された。

2. RecQ2 (BLM) の解析

ヒト BLM に対するモノクローナル抗体を作製して BLM の核内の局在を調べ、既知の核内構造体とは異なる構造体 (Bloom body と命名) を形成することを観察した。外から BLM 遺伝子を導入して BLM を強制発現させると rod 状の構造体が形成された。欠失変異体を作製してこの構造体を形成するのに必要な BLM 領域を検索したところ 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。一方、酵母の two-hybrid 系を用いて、BLM が Ubc9 と相互作用することを見いだした。Ubc9 は small ubiquitin related modifier-1 (SUMO-1) を標的タンパク質に結合する活性をもつタンパク質であり、酵母の two-hybrid 系で Ubc9 と相互作用するタンパク質のいくつかは SUMO-1 化されることが観察されている。そこで、抗 SUMO-1 抗体を用いて染色を行ったところ、Bloom body の染色パターンと抗 SUMO-1 抗体による染色パターンが一致し、BLM が SUMO-1 化されている可能性が示唆された。

酵母の解析で得られた結果を高等真核細胞で確認し、また、BLM の核内構造体の形成及び SUMO-1 化と機能との関係を解析する目的で、トリの DT40 細胞を用いて BLM 遺伝子破壊株を作製した。この BLM^{-/-}株は野性株に比べ増殖が若干遅く、MMS に感受性であった。また、予想どおり SCE が増加していた。さらにこの細胞では、外から導入した遺伝子とその遺伝子と相同な塩基配列をもつ部位に組み込まれる (targeted integration) 効率が顕著

に上昇しており、遺伝子が組み込まれた 60 クローンのうち、54 クローン (90%) で targeted integration が起きていた。次に、BLM^{-/-}/RAD54^{-/-}二重破壊株を作製したところ、二重破壊株はそれぞれ遺伝子の単独破壊株より増殖が遅くなり、BLM^{-/-}株で上昇した SCE の頻度は RAD54 の破壊により低下し、BLM^{-/-}株で上昇している 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。さらに、BLM^{-/-}株で上昇した targeted integration も RAD54 の破壊により消失した。フローサイトメトリーにより二重破壊株の細胞周期内の分布を調べたところ、野性株に比べ G2 期の細胞の集団が増加していた。また、二重破壊株の染色体の異常を調べたところ、姉妹染色体の同じ場所で切断が起きているクロモソームタイプの切断が増加していた。

3. RecQ3 (WRN) の解析

昨年度の解析で、RecQ3 と Ubc9、SUMO1 が相互作用することを明らかにしたが、今年度は、実際に RecQ3 が SUMO1 化されることを証明した。また、昨年度、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が、本年度はこの WIP1 と RecQ3 との結合を抗体を用いた免疫沈降でも確認し、さらに両者の核内の局在が一致することを明らかにした。

WIP1 遺伝子は酵母にも存在することから、yWIP1 遺伝子の破壊株を作製した。破壊株は WS 細胞と同様に分裂寿命が短縮した。しかし、この短縮は軽微なものであった。一方、WRN の相

同遺伝子である *SGS1* を破壊すると分裂寿命が短縮することが知られていたが、*WIP1* と *SGS1* の両者を破壊すると分裂寿命の短縮のレベルが *WIP1* 遺伝子単独破壊株のレベルに近づき、短縮の程度が軽減した。さらに、*yWIP1* 遺伝子を破壊することにより、*SGS1* 遺伝子破壊株の MMS 感受性が軽減することが明らかになり、*yWip1* と *Sgs1* が機能的にも関係していることが明らかになり、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り、ウエルナー症候群原因遺伝子産物の機能を分子レベルで解析する突破口が開けた。

4. RecQ1 の解析

トリの DT40 細胞を用いて *RECQ1* 遺伝子破壊株を作製した。この破壊株は野生株とほぼ同様に増殖し、*RecQ1* は増殖には必須ではないことがわかった。また、MMS や紫外線に対する感受性も野生株と変わらなかったため、現在、他の DNA 傷害剤に対する感受性を解析中である。また、DNA 修復や組換えに関与するタンパク質をコードする遺伝子との二重破壊株を作製して機能を解析するために、二重破壊株の作製が進行中である。

C. 考察

酵母の相同遺伝子 (*SGS1*) の破壊株を用いた解析により、破壊株がブルーム症候群の細胞のよいモデルになることがわかり、また、*SGS1* の機能ドメインの解析により *BLM* 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。さらに、抗体を用いた解析では *BLM* は SUMO-1 化され

核内の特殊な構造体に存在することがわかったが、構造体と SUMO-1 化の関係や構造体形成と機能発現との関係の解明は今後の課題として残った。

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。

クロモソームタイプの切断は、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、クロモソームタイプ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。今後は、この SUMO-1 化が WRN の局在や、WRN がもつ DNA ヘリカーゼ活性、ヌクレアーゼ活性にどのような影響を与えるかを解析する必要がある。

一方、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説明していく予定である。

D. 結論

本年度の解析により以下のことが明らかになった。

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で機能している。

BLM は DNA の複製時に生じる二本鎖 DNA の切断を抑制しており、BLM が欠損すると二本鎖切断がおき、それを組換えで修復するため SCE が増加する。また、BLM が欠損すると targeted integration の頻度が上昇する。

WRN は SUNO-1 化される。また、WRN と相互作用するタンパク質として見つかった WIP1 が実際に WRN と結合しており、また、機能的にも関係している。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.

2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) Brnzei 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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)
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) Brnzei 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 *wip1*(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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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 ヘリケース 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.
- 17) 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
- 18) 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

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

ヒト発達期脳および臓器における DNA 修復異常遺伝子発現に関する研究

分担研究者 高嶋幸男
国立精神・神経センター武蔵病院臨床検査部

研究要旨

ヒトにおける RecQ 型 DNA ヘリカーゼは、5 種が同定され、このうち BLM、WRN、RTS は疾患原因遺伝子と判明している。RecQ 型 DNA ヘリカーゼと染色体の保持機構との関連が注目される。今回、BLM について免疫組織化学的に、空間的局在および発達の側面について検討を行った。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。中枢神経でも弱く発現し、細胞脆弱性や DNA 修復に関連していると考えられる。

A. 研究目的

Bloom 症候群は、低身長、日光過敏性血管拡張性紅斑、悪性腫瘍の多発、免疫不全などより特徴づけられる常染色体劣性遺伝として知られている。Bloom 症候群の患者由来の細胞では、染色体切断、ギャップ、染色分体交換といったさまざまな染色体異常が検出される。染色分体交換では、相同染色体分体間の交換、染色分体の交差、姉妹染色分体の交換 (sister chromatid exchange; SCE) などが増加し、とくに SCE が高率に生じることは Bloom 症候群に特徴的である。この疾患の原因遺伝子である BLM は、15q26.1 に遺伝子座を持ち、DNA 修復酵素 RecQ 型 DNA ヘリカーゼをコードし、分裂酵母 *S. Pombe* の Rqh1p、出芽酵母 *S. cerevisiae* の Sgs1p と高い相同性

を有している。ヒトにおける RecQ 型 DNA ヘリカーゼは、5 種が同定されており、このうち RecQ 2 (BLM)、RecQ 3 (WRN: Werner 症候群原因遺伝子)、RecQ 4 (RTS: Rothmund-Thomson syndrome の原因遺伝子) が、疾患原因遺伝子として明らかとなった。これにより、RecQ 型 DNA ヘリカーゼと染色体の保持機構との関連が注目されるようになってきている。我々は、BLM について免疫組織化学的に、空間的局在および発達の側面について検討を行った。

B. 研究方法

対象は、在胎 9 週から 50 歳の各年齢剖検ヒト組織 36 例。中枢神経として小脳と橋、および各臓器について発達に伴う発現の変化を検討した。坑

Bloom ペプチドモノクローナル抗体 (1314-1333aa、東北大学薬理学部遺伝子薬学教室益子高先生より供与) にて、パラフィン包埋切片を免疫ペルオキシダーゼ染色 (biotin-streptavidin 法) し、免疫組織化学的に検討した。

C. 研究結果

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。下オリブ核、弓状核といった底部の神経細胞は、多くが陰性であった。大脳白質の免疫染色性は小脳とほぼ同様で、11 歳以降ではびまん性に陽性を示した。胎児の胚芽細胞層の免疫反応性は陰性であった。脈絡層上皮では、在胎 20 週頃より細胞質に顆粒状の発現が出現し、1 歳以降びまん性に強い反応を認めた。脈絡層上皮および臓器における発現強度は、中枢神経神経細胞および神経突起に比べ強かった。

成人臓器にて陽性を示したのは、精巣の精細管細胞、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。精巣における陽性細胞は、精子細胞であり、精母細胞や精娘細胞は陰性で、また、Leydig 細胞も陰性であった。膵では、連続切片により 3 重染色を行ったところ、陽性細胞はインスリン分泌をおこなう β 細胞であった。各臓器における発現は、消化管上皮、

腎尿細管上皮では在胎 13~21 週に、胸腺の Hassal 小体では 24 週、膵 Langerhans 島では 36 週に、精巣精子細胞では 11 歳以降に認められた。

D. 考察

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 といった遺伝的不安定性をもつ症候群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。Hassal 小体は、先天性免疫不全患者の胸腺の形成不全に伴いしばしば欠損すること、TNF スーパーファミリーの一つ CD30 のリガンドを強く発現することなどより免疫に重要な役割を果たしていることが推察されており、我々の結果と一致する。

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。

一方、Hutchinson-Gilford progeria (HGP) 症候群では染色体不安定性や DNA 修復障害が推測されているが原因遺伝子は不明であり、RecQ1 の Western blotting で発現低下を認め

たために、HGP 症候群においても DNA ヘリカーゼ遺伝子の異常により DNA 修復障害が引き起こされると推測された。そこで HGP 症候群由来線維芽細胞 (4 症例) より mRNA の抽出、RT-PCR 及び direct sequence を行い、RecQ ファミリーの塩基配列決定を行ったが正常であった。更に、RecQ ヘリカーゼと相互作用することが報告されている DNA ヘリカーゼの遺伝子解析を行っている。

E. 結論

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。発達的側面では、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。

F. 研究発表

- 1) Oka A., Takashima S: The up-regulation of metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) in Down syndrome brains. *Acta Neuropath (Berlin)* 97:275-278, 1999
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
 - 6) Suzuki Y, Zhang Z, Shimozawa 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
 - 7) 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
 - 8) Iai M, Takashima S: Thalamocortical development of parvalbumin neurons in normal and periventricular leukomalacia brains. *Neuropediatrics* 30:14-18, 1999
 - 9) 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
 - 10) 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
 - 11) 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
 - 12) Arii N, Mizuguchi M, Mori K, Takashima S: Developmental of telencephalin in the human cerebrum. *Microscopy Research and Technique* 46:18-23, 1999
 - 13) Meng SZ, Takashima S: Expression of transforming growth factor- β 1 in periventricular leukomalacia. *J Child Neurol* 14:377-381, 1999
 - 14) 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
 - 15) Saito Y, Ito M, Ozawa Y, Obonai T, Kobayashi Y, Washizawa k, Ohsone Y, Takami T, Oku K, Takashima S: Changes of neurotransmitters in the brainstem of patients with respiratory-pattern disorders during child hood. *Neuropediatrics* 30:133-140, 1999
 - 16) 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

- 17) 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
- 18) Arai Y, Edwards V, Takashima S, Becker LE: Vascular pathology in galactosialidosis. *Ultrastructural Pathol* 23:369-374, 1999

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

ウェルナー症およびブルーム症患者由来細胞の薬剤感受性と遺伝的不安定性に関する研究

分担研究者 林 真
国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部

分担研究者 祖父尼俊雄
オリンパス光学工業・染色体研究所

研究要旨

早期老化症であるウェルナー症候群(WRN)由来細胞株5種と、ブルーム症候群(BLM)由来細胞株3種、および健常人由来細胞株4種を用いて、カンプトテシン(CAM)、エトポシド(ETO)、4NQO、マイトマイシンC(MMC)の4種類の化学物質に対する細胞毒性と、小核の誘発性を比較した。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。一方、BLM細胞株では細胞毒性には差がなかったが、小核に関しては高い自然誘発性と、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観察した。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。

A. 研究目的

早期老化症の一つであるウェルナー症候群(WRN)およびブルーム症候群(BLM)の原因遺伝子として、最近、RecQタイプのヘリカーゼをコードする *WRN* 遺伝子、*BLM* 遺伝子がそれぞれ同定された。RecQヘリカーゼは組換え修復への関与が指摘されており、その異常は

突然変異頻度、染色体異常の増加をもたらす可能性があり、WRN、BLMにおける早期老化や高発がん性の原因として、このようなゲノム変化の蓄積が考えられる。今回、我々はWRN細胞の遺伝的不安定性機構を探ることを目的として、WRN、BLM症由来細胞の各種変異原に対する細胞毒性および小核誘

発性と、細胞培養に伴う核型の変化を、健常人由来細胞と比較、検討した。

B. 研究方法

EBV でトランスフォームした WRN 患者由来 (7 株)、BLM 患者由来 (3 株)、および健常人由来 (6 株) B-リンパ球細胞株をエイゼン研究所と米国コリエル医学研究所より入手した。

細胞毒性、小核誘発性に関しては、トポイソメラーゼ阻害剤であるカンプトテシン(CAM)と、エトポシド(ETO)、および 4NQO、マイトマイシン C(MMC) を用いて検討した。細胞を炭酸ガス培養器中で 48 時間処理し、その間の細胞の相対増殖率を細胞毒性の指標にし、処理後の小核の誘発をアクリジンオレンジ法により検討した。小核の観察は、細胞の染色状態が良好で、細胞質が完全に保持されているもののみを観察対照とし、1000 個の間期細胞を観察して小核細胞の出現頻度を求めた。

細胞の核型は細胞継代中、適宜定法に従い染色体標本を作製し、スペクトラムカリオタイプ法(SKY)を用いて解析した。

C. 研究結果

1) 自然小核頻度：表 1 に細胞毒性、小核誘発性を検討に用いた細胞の特徴と、自然小核頻度を示す。健常人由来細胞、および WRN 患者由来細胞の小核細胞の頻度は 1 例を除きおおむね 4-8/1000 細胞であり、両群で差は認められなかった。一方、BLM 患者由来細胞のうち、高年齢患者より由来する GM9960A と GM03403G 細胞は明らかに高い小核細胞の出現を示した。

2) WRN 細胞における細胞毒性および小核誘発性：健常人由来細胞 (4 株)

と、WRN 患者由来細胞 (5 株) の 4 種類の化学物質に対する細胞毒性の比較を図 1 に示す。相対増殖率 25% は正常細胞の増殖率を考えると、全く増殖しない状態と考えることができ、従って試験は十分に高い細胞毒性を示す濃度まで行われたと考えることができる。低用量から高用量までの広い濃度領域で試験を行ったが、両者で差は認められなかった。

一方、小核誘発性に関しては、4 種類の化学物質に対して全ての細胞株で用量依存的に小核の誘発が認められ、最高で 5-20% の細胞に小核が観察された。しかしながら、WRN 細胞、健常人由来細胞間で有意な差は認められなかった (図 2)。

3) BLM 細胞における細胞毒性および小核誘発性：高い自然小核頻度を示した GM03403G 細胞について 4 種類の化学物質に対する細胞毒性、小核誘発性を検討したところ、細胞毒性に関しては顕著な差は認められなかったが、小核誘発性に関しては高い感受性を示した。特に MMC に関しては、正常、WRN 細胞の 2 倍以上の誘発性を示し、また、比較的小核誘発性が低い 4NQO に関しても 10% 以上の誘発頻度が観察された。

4) SKY による核型変化の比較：健常人由来細胞 (6 株) と、WRN 患者由来細胞 (7 株) の培養初期における核型を SKY 法により検討した。健常人由来細胞株 6 株中 1 株にクロソナルな染色体転座が、1 株に非クロソナルなアニュプロイドが観察された。一方、WRN 細胞株 7 株中 1 株にクロソナルな染色体の部分欠失が、4 株に非クロソナルな染色体転座や部分欠失が観察された (表 2)。WRN で観察された染色体の構造変化は様々であり、特定の染色体に偏った異常は観察されなかつ

た。

D. 考察

これまで、ウェルナー症候群の患者由来細胞は CAM 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 つであるが、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。また、細胞は EBV によってトランスホームされているが、未だ不安定な状態であり、この状態も各細胞株の薬剤感受性感受性に影響を与えるものと考えられる。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不安定性に深く関与しているのかもしれない。

しかしながら小核の頻度を指標にした遺伝的不安定性はこれまで報告された、遺伝子突然変異や染色体異常と比較すると、その影響は非常に低いと考えられた。小核を持つ細胞の出現は一過性であるため、化学物質による遺伝的損傷を検出するには有効であるが、細胞の性質としての遺伝的不安定性を評価する指標には適さないのかもしれない。

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 細胞株のみ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

ウェルナー患者由来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、染色体の変化に関しては培

養中に生じたと考えられるVTMが高頻度に出現していることから、WRN細胞での遺伝的不安定性は、わずかな染色体の構造的不安定性を引き起こし、その蓄積が染色体異常として現れるものと考えられる。一方、ブルーム患者由来細胞は高い小核誘発性を示した。ブルーム細胞は高い姉妹染色分体交換頻度と、遺伝子突然変異頻度を示すことからウェルナー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) 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 (1999) Evaluation of the mouse lymphoma tk assay (microwell method) as an alternative to the in vitro chromosomal aberration test. *Mutagenesis*, 14, 5-22.
- 2) Honma, M., L.-S. Zhang, H. Sakamoto, M. Ozaki, K. Takeshita, M. Momose, M. Hayashi and T. Sofuni (1999) The need for long-term treatment in the mouse lymphoma assay. *Mutagenesis*, 14, 23-29.
- 3) 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 (1999). Toxicity study of a rubber antioxidant, mixture of 2-mercaptomethylbenzimidazole, by repeated oral administration to rats. *Food and Chem. Toxicol.*, 37, 777-787.
- 4) 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 (1999). 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.
- 5) Uchiyama, T., J. Akiyama, E. Miyai, K. Sakamoto, Y. Takino, M. Ohnuma, K. Ohkoshi, 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 (1999). 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.
- 6) Kobayashi, H. and M. Hayashi (1999) Classification and evaluation of comets in single cell gel electrophoresis assay. *Environ. Mutagen Res.*, 21, 231-236 (in Japanese).
- 7) Nishikawa, T., M. Haresaku, K. Adachi, M. Masuda and M. Hayashi (1999) Study of a rat skin in vivo micronucleus test: data generated by

- mitomycin C and methyl methanesulfonate. *Mutat. Res.*, 444, 159-166.
- 8) 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 (1999). 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.
- 9) 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 (1999) Procarbazine genotoxicity in the MutaTMMouse; strong clastogenicity and organ-specific induction of *lacZ* mutations. *Mutat. Res.*, 444, 269-281.
- 10) Saotome, K., T. Sofuni and M. Hayashi (1999) A micronucleus assay in sea urchin embryos. *Mutat. Res.*, 446, 121-127.
- 11) 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 (1999) Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis*, 14, 569-580.
- 12) Sofuni, T., M. Hayashi, T. Nohmi, A. Matsuoka, M. Yamada and E. Kamata (2000) Semi-quantitative evaluation of genotoxic activity of chemical substances and evidence for a biological threshold of genotoxic activity. *Mutat. Res.*, 464, 97-104.

2. 学会発表

- 1) 田所、本間、松岡、坂本、佐藤、杉本、古市、林：ウエルナー症患者由来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
- 2) 坂本、本間、田辺、今村、藤田、松本、古市、林：ウエルナー型(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