

200100069A

厚生科学研究研究費補助金  
長寿科学総合研究事業

WHIP を中心にした Werner 症候群の早期老化の分子機構の研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 榎本 武美

平成14年（2002年） 4月

## 目 次

### I. 総括研究報告書

WHIP を中心にした Werner 症候群の早期老化の分子機構の研究 ----- 1

榎本 武美

### II. 分担研究報告書

WHIP、WRN の機能に関する生化学的解析 ----- 13

多田 周右

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 20

IV. 研究成果の別刷等 ----- 22

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
総括研究報告書

WHIP を中心にした Werner 症候群の早期老化の分子機構の研究

主任研究者 榎本 武美 東北大学大学院薬学研究科・教授

研究要旨

本研究ではウェルナー症候群原因遺伝子産物 (WRN) 及び、我々が発見した WHIP、(Werner helicase interacting protein) の機能を解明するために、酵母を用いて DNA 複製や修復に関連する酵素・タンパク質と WHIP、WRN (酵母では Sgs1) との機能的関連を解析した。また、精製した WHIP と WRN を用いて、その結合様式を解析するとともに、WHIP や WRN の機能を解析するためのアフリカツメガエル卵抽出液を用いた cell-free 系の確立を試みた。

酵母を用いた解析では、WHIP はヌクレオチド除去修復、塩基除去修復、相同組換えには関与せず、DNA 複製に関与する DNA polymerase  $\delta$ 、RFC、PCNA、RPA などと密接な機能的関連をもつことが明らかになった。さらに、DNA polymerase  $\delta$  に結合する可能性が示唆された。

一方、精製した WRN、WHIP を用いて両者の結合を解析したところ、その結合には ATP が必要であり、結合に ATP を要求するのは WHIP であることが明らかになった。WHIP には弱い ATPase 活性があり、ADP では両者の結合が起こらないことから、両者の結合がダイナミックに制御されていることが示唆された。

WRN、WHIP の関与する過程を解析するための cell-free 系に関しては、アフリカツメガエル卵抽出液中で核を形成させ、DNA 複製の途中で傷害を起こさせてその後の応答を解析することが可能な系を構築することができた。

分担研究者氏名

多田周右

東北大学大学院薬学研究科・助手

## A. 研究目的

ウェルナー症候群 (WS) は早老症の代表的疾患で、若年期より、白髪、動脈硬化、糖尿病、骨粗鬆症など老化に関連した種々の症状を発症し、平均寿命は約 46 才である。その死因の主なものは癌、脳血管障害などで、健常人と変わらず、ウェルナー症候群では神経症状を除く種々の老化現象が加速されていると考えられる。このウェルナー症候群は一つの遺伝子の変異で引き起こされることがわかっており、老化のメカニズムを分子レベルで研究するための非常によくモデルとなると考えられる。ウェルナー症候群の原因遺伝子は 1996 年に同定され、大腸菌の RecQ に相同性の高いタンパク質をコードすることが明らかにされたが、この遺伝子産物 (WRN) がどのような過程で、どのような機能を果たすのかは依然不明のままである。本研究は、我々が発見した WRN に結合する WHIP を解析の中心に据え、WRN が機能する過程を同定し、WRN、WHIP の機能を解明することにより、ウェルナー症候群患者由来の細胞で観察される染色体の不安定化の原因を分子レベルで明らかにすることを目的にしている。

解析にあたっては、WRN、WHIP の相同遺伝子が存在する酵母を用いて遺伝学的解析を行ない、これらのタンパク質と機能的に関連するタンパク質を検索、同定し、WRN、WHIP が機能する過程を明らかにする。さらに、酵母で得られた結果を、高等真核細胞で唯一遺伝学的解析が容易に行なえる DT40 細胞を使って高等真核細胞

でも確認する。また、精製したタンパク質を用いて、お互いの活性にどのような影響を与えるかを解析するとともに、遺伝学的解析から得られた結果を参考にして WRN、WHIP が関与する素過程を再構成して、その機能を分子レベルで解明することを目指す。13 年度は、酵母を用いて、DNA 複製や修復に関連する酵素・タンパク質と WHIP、WRN (酵母では Sgs1) との機能的関連を解析し、また、精製した WHIP と WRN を用いて、その結合様式を解析するとともに、WHIP や WRN の機能を解析するためのアフリカツメガエル卵抽出液を用いた cell-free 系の確立を試みた。

## B. 研究方法

1) チェックポイント、DNA 傷害の種々の修復系、DNA 複製に関与する酵素・タンパク質をコードする遺伝子の変異株に WHIP の変異を導入したり、WHIP を過剰発現することにより、チェックポイント、DNA 修復、DNA 複製に関与する酵素・タンパク質との機能的関連を解析した。

2) WRN の酵母ホモログである Sgs1 の機能を DNA トポイソメラーゼ III (Top3) との相互作用から解析した。実際には、SGS1/TOP3 遺伝子二重破壊株を作製し、この株に種々の変異をもつ SGS1 あるいは TOP3 を導入することにより、機能ドメインや機能するプロセスを解析した。

3) マウスの WRN、WHIP をヴァキキュロウイルス系で発現させて精製し、この精製したタンパク質を用いて WRN と WHIP との結合様式を解析した。

4) アフリカツメガエル卵抽出液を用いた DNA 複製系で、DNA 複製中に 2 本鎖 DNA 切断を起こさせ、チェックポイント機構が作動し、DNA 修復がおこる系の確立を試みた。

(倫理面への配慮)

ヒトの遺伝子や細胞を用いていないので、特に倫理面への配慮は必要ない。

### C. 研究結果

#### 1) 酵母を用いた WHIP の機能の解析

データベースの検索の結果、WHIP は大腸菌や酵母からヒトまで、幅広い生物種に保存されたタンパク質で、DNA 複製に関与する RFC (replication factor C) がもつモチーフに似たモチーフをもつことが明らかになった。そこで WHIP の機能を出芽酵母を用いて解析した。酵母 WHIP 遺伝子 (*yWHIP*) の破壊株を作製したところ、破壊株の増殖は野生株に比べ差はなかったが、破壊株では種々のタイプの組換えの頻度が上昇していた。また、破壊株では細胞寿命 (出芽酵母は一定の回数出芽すると増殖できなくなる) が若干短縮し、*SGS1* 遺伝子との二重破壊株では細胞寿命が極端に短縮した。さらに、*whip/sgs1* 二重破壊株ではリボソーム DNA 間の組換えや姉妹染色体間の組換え頻度の上昇が観察された。

また、*whip/sgs1* 二重破壊株では細

胞寿命が短縮するだけでなく、増殖速度が低下した。Flow-cytometry による解析から、*whip/sgs1* 二重破壊株の遅い増殖性は、G2/M 期での細胞周期進行の遅延によることが示唆された。そこで、DNA 損傷のチェックポイントに関与する *RAD17* 遺伝子を破壊した *whip/sgs1 /rad17* 三重破壊株を作製したところ、G2/M 期での細胞周期進行の停止が回避され、*whip/sgs1* 二重破壊株では *Rad17* により感知される DNA の傷害が蓄積していることが示唆された。

次に *yWHIP* が DNA 傷害の修復に関与するか否か、関与するとすればどのような修復系なのかを明らかにするために、相同組換え、ヌクレオチド除去修復、塩基除去修復、損傷乗り越え修復に関与する遺伝子、*RAD52*、*RAD14*、*APN1*、*REV3* 遺伝子と *yWHIP* との二重破壊株を作製して DNA 傷害剤に対する感受性を調べたところ、これらの修復系に *yWHIP* は関与していないことが明らかになった。

DNA 複製酵素である DNA polymerase  $\delta$  は PCNA と呼ばれるクランプと結合することにより初めて長い DNA を合成することが可能になる。このクランプを鋳型の DNA にのせ、DNA polymerase  $\delta$  と結合させる役割をもつのが、クランプローダーという別名でも呼ばれる RFC である。*yWHIP* が RFC と相同性をもつことから、DNA polymerase  $\delta$ 、RFC、PCNA の変異株に

WHIP を過剰発現させたところ、これら全ての変異株が致死となり、DNA polymerase  $\delta$ 、RFC、PCNA と yWHIP との機能的関連が明らかになった。また、真核細胞の一本鎖 DNA 結合タンパク質である RPA との機能的関連も明らかになった。さらに、two-hybrid system で yWHIP と DNA polymerase  $\delta$  との結合を確認した。したがって、DNA polymerase  $\delta$ →WHIP→Sgs1 (WRN) という関係が明らかになり、WRN、WHIP の DNA 複製への関与が明確になった。

## 2) Sgs1 と Top3 との機能的関連の解析

Sgs1 と Top3 との機能的関連を *TOP3* と *SGS1* 遺伝子の二重破壊株を作製し、この細胞に種々の変異をもつ Top3 や Sgs1 をコードする遺伝子を導入してその表現型を調べることにより解析した。二重破壊株を作製したのは、*TOP3* 遺伝子単独破壊株は増殖が非常に遅く解析がほとんど不可能であるが、*TOP3* と *SGS1* 遺伝子二重破壊株ではその遅い増殖が回復するためである。この遺伝子二重破壊株を用いて解析した結果、*top3* 破壊株の遅い増殖にかかわる Sgs1 の領域は DNA 修復に必要な Sgs1 の領域とは異なり、N 末側の 126-585 アミノ酸領域と C 末側の 1269-1447 アミノ酸領域が重要であることがわかった。また、Sgs1 に変異を入れて Top3 との結合に必要なアミノ酸残基を、酵母の two-hybrid system を用いて検討したところ、N 末側の 44 アミノ酸が必要で、そのなかでも特に、9、12、13 番目のアミノ酸が重要であることが明らかになっ

た。これらのアミノ酸が変異すると、Top3 との結合ができなくなるだけでなく、細胞は MMS に高感受性になった。したがって Sgs1 が修復で機能するためには Top3 との相互作用が必須であると考えられる。また、遺伝学的解析により Sgs1・Top3 は相同組換え経路で機能することが明らかになった。

## 3) WRN と WHIP の結合の解析

WHIP は two-hybrid system で WRN と相互作用する新規タンパク質として見いだされたものであるが、両者の結合は免疫沈降によっても確認することができた。また、WRN と WHIP を細胞に強制発現させると、両者は核内に存在し、その局在は一致していた。さらに、WRN と WHIP をヴァキユロウイルスのシステムで発現させて精製し、この精製タンパク質を使って結合を調べた。その結果、精製したタンパク質同士でも結合し、両者の結合には ATP が必要であり、CTP、GTP、UTP、ADP では結合が観察されなかった。また、WRN と WHIP のそれぞれの ATP 結合モチーフに変異を入れ、結合に ATP を要求するのは WRN と WHIP のいずれであるかを調べたところ、ATP を要求するのは WHIP であることが明らかになった。WHIP には弱い ATPase 活性があり、ADP では両者の結合が起こらないことから、両者の結合がダイナミックに制御されてい

ることが示唆された。

#### 4) アフリカツメガエル卵抽出液を用いた cell-free 系の確立

WRN、WHIP の関与する DNA 二本鎖切断の障害認識および修復機構を分子レベルで詳細に解析する目的で、細胞内での DNA 傷害認識・修復過程を再現できる cell-free 系を構築することを目指した。そのために、アフリカツメガエル卵由来する抽出液を用い、トポイソメラーゼ阻害剤のカンプトテシン (CPT)、エトポシド (VP16)、あるいは、制限酵素 (*EcoRI*) に起因する傷害によって誘導される DNA 複製タンパク質 A (RPA) のクロマチン上への結合、および DNA 傷害チェックポイント機構の発動について検討を行った。傷害を誘導しない条件下では、RPA の結合は細胞核形成直後に現れ、その後、比較的速やかに消失した。DNA 傷害剤として知られる CPT で抽出液を処理すると、無処理のときに見られる RPA 結合の消失が起きないだけでなく、さらに明確な RPA の蓄積が長時間にわたって見られるようになった。CPT による DNA 二本鎖切断は DNA 複製の進行に依存すると考えられるため、より直接的な方法と考えられる制限酵素、*EcoRI* を用いて DNA 上に傷害を誘導し、CPT での結果と比較した。*EcoRI* 共存下に

においては DNA 複製の影響を受けることなく CPT と同様のクロマチン上への RPA の結合、および、カフェイン感受性 DNA 障害チェックポイント機構による DNA 複製の抑制が引き起こされた。また、DNA 二本鎖切断により引き起こされる RPA のクロマチン結合は、DNA 複製の抑止に働いているカフェイン感受性 DNA 障害チェックポイント機構には依存していないことが明らかとなった。DNA 二本鎖切断により誘起される応答が無細胞 DNA 複製系と制限酵素を用いることで単純化され、DNA 複製の抑制やクロマチンへの RPA の結合が培養細胞による観察に比べてより明確な形で示すことが可能となり、WRN、WHIP の関与する過程を解析するための系を構築するための基盤が確立した。

#### D. 考 察

WHIP は two-hybrid system で WRN と相互作用する新規タンパク質として見いだされたものであるが、精製タンパク質を使って結合を調べることにより両者が直接結合することが明らかになった。

酵母を用いた解析から、yWHIP の機能が欠損すると、DNA に傷害が蓄積するが、遺伝学的解析から yWHIP は相同組換え修復、ヌクレオチド除去修復、塩基除去修復等には関与していないと考えられる。一方、WHIP は RFC

と相同性をもち、RFC は PCNA と呼ばれるクランプを鋳型の DNA にのせ、DNA polymerase  $\delta$  と結合させる役割をもつことから、DNA polymerase  $\delta$ 、RFC、PCNA と WHIP との関連を調べ、WHIP とこれらの酵素・タンパク質との間に機能的関連があることを明らかにした。さらに、two-hybrid system で yWHIP と DNA polymerase  $\delta$  との結合が確認できたことから、WHIP は DNA polymerase  $\delta$  を含む DNA 複製複合体に含まれて機能しているか、DNA 複製複合体が DNA の傷害に遭遇した時に複製複合体に呼び込まれるものと考えられる。

精製した WRN と WHIP を用いた解析から、両者の結合には ATP が必要で、ATP を要求するのは WHIP であること、WHIP には弱い ATPase 活性があり、ADP では両者の結合が起こらないことが明らかになり、両者の結合がダイナミックに制御されていることが示唆された。したがって、これらの結果を総合して考えると、DNA 複製複合体が DNA の傷害に遭遇すると WHIP が ATP 結合型になって WRN を傷害の部位にリクルートし、WHIP が ATP を ADP に分解することにより、WRN が WHIP から離れ DNA の傷害の場で機能するというシナリオが考えられる。アフリカツメガエル卵抽出液を用いて複製の途中で DNA の傷害を起こさせてそ

の後の応答を解析する系を構築することができたので、今後この系を用いて、上記のシナリオが妥当かどうか検討することが可能になるものと思われる。

一方 WRN のホモログである Sgs1 の機能に関しては、MMS 等で DNA の傷害を誘導した場合には、Top3 との相互作用が必要であり、Top3 との相互作用には Sgs1 の N 末の 44 アミノ酸が重要であること、Sgs1・Top3 は相同組換え経路で機能することが明らかになった。しかし、高等真核細胞には、WRN 以外に Sgs1 のホモログが存在し、そのうちのブルーム症候群原因遺伝子産物 (BLM) が Top3 と相互作用することが報告されていることから、Top3 との機能的関連では、BLM も視野に入れて今後解析していく必要がある。

## E. 結 論

two-hybrid system で WRN と相互作用する新規タンパク質として見いだされた WHIP が実際に WRN に直接結合し、両者の結合がダイナミックに制御されていることが明らかになった。また、酵母を用いた解析から、WHIP は DNA polymerase  $\delta$ 、RFC、PCNA と機能的な関連をもち、DNA polymerase  $\delta$  に結合することがわかり、「DNA 複製複合体が DNA の傷害に遭遇すると



WHIP が ATP 結合型になって WRN を傷害の部位にリクルートし、WHIP が ATP を ADP に分解することにより、WRN が WHIP から離れ DNA の傷害の場で機能する」というシナリオを描くことができた。本年度の研究成果により、WRN の機能に関する 20 年来の謎「WRN がどのように複製に関与しているのか？」の解明にむけ、大きく前進することができた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 1) Enomoto, T. Functions of RecQ

family helicases: possible involvement of Bloom's and Werner's syndrome gene products in guarding genome integrity during DNA replication (Review).

*J. Biochem.* **129**, 501-507, 2001

#### 2) Onoda, F., Seki, M., Miyajima A., and Enomoto, T. Involvement of *SGS1* in DNA damage-induced heteroallelic recombination that requires RAD52.

*Mol. Gen. Genet.* **264**, 702-708, 2001

#### 3) Kawabe, Y., Branzei, D., Suzuki, H., Masuko, T., Onoda, F., Heo, S.-J., Ikeda, H., Shimamoto, A., Fruichi, Y., Seki, M., and Enomoto, T. A novel protein interacts with the Werner's syndrome gene product physically and functionally.

*J. Biol. Chem.* **276**, 20364-20369, 2001

#### 4) Ui, A., Satoh, Y., Onoda, F., Miyajima, A., Seki, M., and Enomoto, T.

Possible involvement of Top3 *via* the N-terminal region of Sgs1 in the complementation of MMS sensitivity and the suppression of hyper recombination.

*Mol. Gen. Genet.* **265**, 837-850, 2001

#### 5) Hachiya, Y., Motonaga, K., Itoh, M., Masuko, T., Enomoto, T., Sonobe, H., and Takashima, S.

Immunohistochemical expression and pathogenesis of BLM in the human brain and visceral organs.

*Neuropathol.* **21**, 123-128, 2001

#### 6) Tada, S., Kobayashi, T., Omori, A., Kusa, Y., Okumura, N., Kodaira, H., Ishimi, Y., Seki, M., and Enomoto, T.

Molecular cloning of a cDNA encoding mouse DNA helicase B, which has homology to *Escherichia coli* RecD protein, and identification of a mutation in the DNA helicase B from tsFT848 temperature-sensitive DNA replication mutant cells.

*Nuc. Acids Res.* **29**, 3835-3840, 2001

#### 7) Suzuki, H., Seki, M., Kobayashi, T., Kawabe, Y., Kaneko, H., Kondo, N., Harata, M., Mizuno, S., Masuko, T., and Enomoto, T. The N-terminal internal region of BLN is required for

- the formation of dots/rod-like structures which are associated with SUMO-1.
- Biochem. Biophys. Res. Commun.***  
**286**, 322-327, 2001
- 8) Tada, S., Li, A., Maiorano, D., Méchali, M., and Blow J. J. Repression of origin assembly in metaphase depends on inhibition of RLF-B/Cdt1 by geminin. ***Nature Cell Biol.*** **3**, 107-113, 2001
- 9) Onodera, R., Seki, M., Ui, A., Satoh, Y., Miyajima, A., Onoda, F., and Enomoto, T. Functional and physical interaction between Sgs1 and Top3 and Sgs1-independent function of Top3 in DNA recombination repair. ***Gen. Genet. Syst.***, in press.
- 10) Kobayashi, T., Tada, S., Tsuyama, T., Murofushi, H., Seki, M., and Enomoto, T. Effect of topoisomerase inhibitors on the formation of replication protein A-foci in nuclei reconstituted in *Xenopus* egg extract. ***J. Health Sci.*** in press.
- 11) Hodgson, B., Li, A., Tada, S., and Blow, J. J. Geminin Becomes Activated As an Inhibitor of Cdt1/RLF-B Following Nuclear Import. ***Curr. Biol.*** in press.
2. 学会発表
- 1) 川辺洋一、Branzei Dana、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 WHIP の機能  
 第 18 回染色体ワークショップ  
 2001 年 1 月 26 日
- 2) Takemi Enomoto, Fumitoshi Onoda, Wensheng Wang, Ayako Ui, Yurie Satoh, and Masayuki Seki  
 Functions of RecQ family helicases in DNA repair and recombination  
 International workshop on radiation damage 2001: repair, mutagenesis and visualization. 2001 年 3 月 15 日
- 3) 井口壮太、関政幸、川辺洋一、白鳥美和、松本武久、古市泰宏、榎本武美  
 WRN ヘリカーゼと相互作用するマウス WHIP タンパク質の解析  
 日本薬学会第 121 回年会 2001 年 3 月 29 日
- 4) 宇井彩子、小野田文俊、関政幸、榎本武美  
 ヒト RECQ 欠損による遺伝病原因遺伝子群のミスセンス変異を酵母で評価するシステム  
 日本薬学会第 121 回年会 2001 年 3 月 29 日

- 5) 川辺洋一, 井口壮太, Branzei Dana, 嶋本 顕, 古市 泰宏, 関政幸, 榎本武美  
マウス WRN ヘリカーゼと WHIP の相互作用の解析  
日本分子生物学会第 1 回春期シンポジウム 2001 年 5 月 11 日
- 6) 榎本武美, 川辺洋一, Branzei Dana, 井口壮太, 小野田文俊, 多田周右, 関政幸  
Werner 症候群の原因遺伝子産物と相互作用する新規タンパク質、WHIP (Werner Helicase Interacting Protein) の機能  
第 54 回日本細胞生物学会大会 (シンポジウム) 2001 年 5 月 30 日
- 7) Yoh-ichi Kawabe, Dana Branzei, Fumitoshi Onoda, Masayuki Seki, and Takemi Enomoto  
Characterization of Interaction among WRN, Ubc9, SUMO-1, and WHIP. FASEB Summer Research Conference Helicases: Structure, Function and Roles in Human Diseases. 2001 年 7 月 8 日
- 8) Yoh-ichi Kawabe, Dana Branzei, Sohta Iguchi, Takashi Takeuchi, Fumitoshi Onoda, Shusuke Tada, Masayuki Seki, and Takemi Enomoto  
Physical and functional interaction of the Werner's syndrome gene product with Ubc9, SUMO-1, and WHIP. 特定領域研究 (C) 若手シンポジウム 2001 年 8 月 30 日
- 9) 関政幸, 榎本武美  
早老症ウエルナー症候群原因遺伝子産物と相互作用する WHIP の解析  
第 60 回日本癌学会総会 2001 年 9 月 27 日
- 10) 小林貴之, 多田周右, 関政幸, 榎本武美  
*Xenopus* 卵抽出液による DNA 障害認識機構の解析  
第 40 回日本薬学会東北支部大会 2001 年 10 月 21 日
- 11) 中川学之, 成田吉泰, 吉村明, Wensheng Wang, 関政幸, 榎本武美  
トリ DT40BLM-MRE11 二重変異株の性状解析  
第 74 回日本生化学会大会 2001 年 10 月 27 日
- 12) Branzei Dana, 関政幸, 小野田文俊, 榎本武美  
ウエルナー症候群原因遺伝子産物と相互作用する WHIP の機能的な解析  
第 74 回日本生化学会大会 2001 年 10 月 27 日
- 13) 竹内貴志, 井口壮太, 川辺洋一, 多田周右, 関政幸, 榎本武美  
WHIP の WRN ヘリカーゼへの結合は ATP によって促進される

- 第 74 回日本生化学会大会 2001 年 10 月 27 日
- 14) 川辺洋一、竹内貴志、松本義久、鈴木紀夫、多田周右、関政幸、榎本武美  
WRN ヘリカーゼと WHIP、DNA-PK 複合体との相互作用の解析  
第 74 回日本生化学会大会 2001 年 10 月 27 日
- 15) Branzei Dana、小野田文俊、川辺洋一、関政幸、榎本武美  
ウエルナー症候群原因遺伝子産物 (WRN) と相互作用する WHIP の機能  
第 29 回薬物活性シンポジウム「成人病とゲノム研究の最前線」2001 年 11 月 2 日
- 16) Ayako Ui, Masayuki Seki, Fumitoshi Onoda, Ryoko Onodera, and Takemi Enomoto  
Involvement of Sgs1/Top3 in Rad52 recombination pathway.  
The 3rd Symposium on DNA Replication, Recombination and Repair  
2001 年 11 月 8 日
- 17) Dana Branzei, Masayuki Seki, Fumitoshi Onoda, and Takemi Enomoto  
Whip, a novel protein related to RF-C, interacts with DNA replication proteins.  
The 3rd Symposium on DNA Replication, Recombination and Repair  
2001 年 11 月 8 日
- 18) Takayuki Kobayasi, Shusuke Tada, Hiromu Murafushi, Masayuki Seki, and Takemi Enomoto  
Focus-formation of replication protein A, activation of checkpoint system and DNA repair synthesis induced by DNA double-strand breaks in cell-free extract derived from *Xenopus* eggs.  
The 3rd Symposium on DNA Replication, Recombination and Repair  
2001 年 11 月 8 日
- 19) 関政幸、王文晟、成田吉泰、中川学之、吉村明、榎本武美  
Suppression of sister chromatid exchanges by BLM and RECQL5 (W)  
第 24 回日本分子生物学会年会 2001 年 12 月 9 日
- 20) Dana Branzei, Masayuki Seki, Fumitoshi Onoda, and Takemi Enomoto  
WHIP, a novel gene related to RF-C, interacts with DNA replication genes, and is involved in DNA metabolism and mutagenesis.  
第 24 回日本分子生物学会年会

- 2001年12月10日
- 21) 宇井彩子、関政幸、小野田文俊、  
小野寺涼子、榎本武美  
Sgs1/Top3 複合体は DNA 傷害  
時に相同染色体間組換えを促進す  
る  
第 24 回日本分子生物学会年会  
2001年12月11日
- 22) 関剛彦、関政幸、伊能克敏、榎  
本武美  
分裂酵母 rad18 のヒト相同遺伝  
子産物 hSMC6 および hSMC5 の  
機能解析  
第 24 回日本分子生物学会年会  
2001年12月10日
- 23) 小野田文俊、宇井彩子、関政幸、  
榎本武美  
DNA 修復時の Msh2 と Sgs1 の  
機能的関連  
第 24 回日本分子生物学会年会  
2001年12月10日
- 24) 前田大介、関政幸、林朋子、小  
野田文俊、深川竜郎、八木秀樹、  
榎本武美  
出芽酵母 UBC9 温度感受性変異  
株及び DT40 細胞を用いた Ubc9  
の機能解析  
第 24 回日本分子生物学会年会  
2001年12月10日
- 25) 小野寺涼子、関政幸、宇井彩子、  
小野田文俊、榎本武美  
出芽酵母 Top3 の DNA 修復にお  
ける機能  
第 24 回日本分子生物学会年会  
2001年12月10日
- 26) Wensheng Wang, Masamitsu Honma,  
Masayuki Seki, Noriaki Takao, Ken-  
ichi Yamamoto, Makoto Hayashi, and  
Takemi Enomoto  
ATM partly suppresses increased  
homologous recombination caused by  
BLM defect.  
第 24 回日本分子生物学会年会  
2001年12月10日
- 27) 成田吉泰、関政幸、王文晟、八  
木秀樹、榎本武美  
ニワトリ DT40 細胞株を用いた  
*RECQL5* 遺伝子の機能解析  
第 24 回日本分子生物学会年会  
2001年12月12日
- 28) 草友美子、関政幸、林朋子、関  
剛彦、川辺洋一、Branzei Dana、  
成田吉泰、王文晟、榎本武美  
トリ DT40 *WHIP-/-*/*-BLM-/-* 二重  
破壊株の解析  
第 24 回日本分子生物学会年会  
2001年12月12日
- 29) 小林貴之、多田周右、室伏拵、  
関政幸、榎本武美  
*Xenopus* 卵抽出液による DNA  
二本鎖切断認識および修復  
第 24 回日本分子生物学会年会  
2001年12月12日
- 30) Branzei Dana and Takemi Enomoto  
Functional analysis of the WRN

helicase and its interacting proteins.

U.S./JAPAN workshop cancer and  
RecQ helicase gene diseases

2002年1月31日

- 31) 津山崇、多田周右、関政幸、榎  
本武美

*Xenopus* 卵抽出液による複製開  
始機構の解析

日本薬学会第122年会 2002年3  
月26日

- 32) 小林貴之、多田周右、関政幸、  
榎本武美

*Xenopus* 卵抽出液における  
DNA二本鎖修復過程の解析

日本薬学会第122年会 2002年  
3月26日

#### 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

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

WHIP、WRN の機能に関する生化学的解析

分担研究者 多田 周右 東北大学大学院薬学研究科・助手

研究要旨

WRN、WHIP の関与する DNA 二本鎖切断の障害認識および修復機構を分子レベルから詳細に解析する目的で、細胞内での DNA 傷害認識・修復過程を再現できる無細胞実験系を構築することを目指した。そのために、*Xenopus* 卵に由来する抽出液を用い、トポイソメラーゼ阻害剤のキャンプトテシン (CPT)、エトポシド (VP16)、あるいは、制限酵素 (*EcoRI*) に起因する傷害によって誘導される DNA 複製タンパク質 A (RPA) のクロマチン上への結合、および DNA 傷害チェックポイント機構の発動について検討をおこなった。傷害を誘導しない条件下では、RPA の結合は細胞核形成直後に現れ、その後、比較的速やかに消失した。DNA 傷害剤として知られる CPT で抽出液を処理すると、無処理のときに見られる RPA 結合の消失が起きないだけでなく、さらに明確な RPA の蓄積が長時間に渡って見られるようになった。CPT による DNA 二本鎖切断は DNA 複製の進行に依存すると考えられるため、より直接的な方法と考えられる制限酵素、*EcoRI* を用いて DNA 上に傷害をもたらし、CPT での結果と比較した。*EcoRI* 共存下においては DNA 複製の影響を受けることなく CPT と同様のクロマチン上への RPA の結合、および、カフェイン感受性 DNA 障害チェックポイント機構による DNA 複製の抑制が引き起こされた。また、DNA 二本鎖切断により引き起こされる RPA のクロマチン結合は、DNA 複製の抑止に働いているカフェイン感受性 DNA 障害チェックポイント機構には依存していないことが明らかとなった。DNA 二本鎖切断により誘起される応答が無細胞 DNA 複製系と制限酵素を用いることで単純化され、

DNA 複製の抑制やクロマチンへの RPA の結合が培養細胞による観察に比べてより明確な形で示すことが可能となった。

## A. 研究目的

本研究は、早期老化症状を呈する遺伝的疾患、ウェルナー症候群 (Werner's syndrome) の原因遺伝子産物 (WRN)、および、WRN と相互作用するタンパク質、WHIP の機能を分子レベルで解明することにより、ウェルナー症候群患者由来の細胞で観察される染色体の不安定性の原因と早期老化症状との関係を明らかにすることを目的にしている。

WRN、WHIP の染色体構造安定化への寄与を分子的に理解するに当たり、細胞内での染色体の動態を再現できるような生化学的実験系を構築する必要がある。アフリカツメガエル (*Xenopus*) 卵由来の抽出液を用いた実験系は細胞周期の動的挙動を再現することができる唯一の無細胞実験系である。このため、DNA 複製や染色体の動態などに関する生化学的な解析に広く用いられ多大な成果を上げている。そこで、我々はこの実験系を利用し、染色体構造の障害の検出と、これに対する細胞内応答および傷害修復過程の再現を目指して実験をおこなった。

DNA複製タンパク質A (RPA) は3つの異なるサブユニットから構成され

る真核生物の一本鎖DNA結合タンパク質であり、DNA複製、修復、組換え等の過程で働いている。このRPAは、細胞周期の状態やDNA上の障害などに応じクロマチン上に点状の蓄積 (RPA-foci) を形成することが細胞レベルの実験などから知られていた。一方、*Xenopus*卵無細胞抽出液中では、RPA-fociの形成はむしろDNA複製の開始に呼応するものとしてこれまで解析されてきていた。我々は、比較的簡便にDNA傷害を検出法として、このRPA-fociの形成を指標として利用できないかと考え、*Xenopus*卵抽出液中における種々のDNA動態に呼応したRPAの挙動について検討した。

## B. 研究方法

*Xenopus* 卵を人為的に分裂間期に導入し、これより細胞抽出液を調製した。また、*Xenopus* 精巣より精子核を調製し核膜を除去することによりクロマチン画分を得た。両者を混合し室温下におくことにより 30 分後に核膜の形成が観察され、この直後より DNA 複製が進行することが確認された。形成した核をホルマリンによる固定と同時に界面活性剤処理をおこなったのち、RPA 三量体のうち、32 k



のサブユニットに対する抗体を用いて間接蛍光抗体法により RPA を特異的に蛍光標識した。この標品を共焦点レーザー顕微鏡で観察することにより RPA の挙動を確認した。

### C. 研究結果および考察

#### 1. *Xenopus* 卵抽出液を用いた RPA-foci の検出

DNAの傷害を誘導するような処理を特におこなわない場合には、核形成とほぼ同時期（30分後）に微細な RPA-foci が核内に均一に分布する様子が観察された。この RPA-foci はさらに反応を進行させることにより次第に消失した。さらに、DNA複製開始に必須な Cdt1 の内在性阻害タンパク質である geminin を用いたところ、RPA-foci の形成が抑制された。したがって、ここで見られる RPA-foci の形成は、これまでに報告されていた DNA複製開始に呼応したものであると考えられる。

DNA複製に依存して DNA二本鎖切断を誘導することが知られているトポイソメラーゼ I (TopI) 阻害剤・カンプトテシン (CPT) を添加した場合にも、やはり、核形成と同時期に核内に一様にみられる微細な RPA-foci が観察された。しかしながら、その後、反応の進行に伴いより大きく明確な RPA の蓄積が核内に局在する様子が観察された。geminin を用いた場合には、全ての RPA-foci の形成が抑制

された。

CPT は TopI が DNA二本鎖の片側に切れ目を入れたのち、再結合を抑制することでその活性を阻害している。TopII は TopI とは異なり、DNA二本鎖切断・再結合をおこなう酵素である。この TopII を CPT と同様の機序で阻害する etoposide を用いた場合にも、大きく明確な RPA-foci の形成が観察されたが、この場合には geminin による RPA-foci 形成抑制の効果は見られなかった。

以上の結果は *Xenopus* 卵抽出液を用いた無細胞実験系において、RPA が DNA二本鎖切断を認識しその部位に集合することを強く示唆している。

#### 2. *Xenopus* 卵抽出液中における細胞

周期チェックポイント機構の再現観察される現象をより単純化するため、特異性の高い DNA 傷害剤として制限酵素 *EcoRI* を利用した。制限酵素は培養細胞に添加しても核中の DNA に傷害を与えることは期待できないが、本実験系では *EcoRI* 濃度依存的に大きく明確な RPA-foci の形成を誘導した。この RPA-foci 形成は geminin による DNA複製の阻害によって抑制されることはなかった。

DNA複製活性を測定すると *EcoRI* の共存により DNA複製が効率的に抑制されることが示された。この DNA複製の抑制は、DNAに傷害を有したまま細胞周期が進行することを防いでいる、細胞周期チェックポイント

機構によるものであると考えられた。これを確認するため、細胞周期チェックポイント機構の上位に位置するタンパク質リン酸化酵素、ATM、ATR を caffeine によって阻害したところ、DNA 複製が進行した場合とほぼ同等の DNA 合成が検出された。この DNA 合成は geminin により阻害されることから DNA 複製による DNA 合成であることが確認された。したがって、*Xenopus* 卵抽出液中において DNA 障害依存的細胞周期チェックポイント機構が培養細胞同様に発動することが示唆された。

caffeine の添加は、*EcoRI* および CPT 添加により誘導される RPA-foci の形成には影響を与えなかった。すなわち、RPA-foci の形成が細胞周期チェックポイント機構に依存するものではないことが示された。

### 3. DNA 傷害に応じた DNA 合成

DNA 複製開始のみを極めて効果的に阻害する geminin と DNA 複製などの過程に依存せずに DNA 二本鎖切断を誘起する *EcoRI* を利用することにより DNA 傷害に伴う DNA 合成を効率よく検出することが可能になった。ビオチン標識した dUTP を新生 DNA に取り込ませて蛍光標識アビジンで検出する手法を利用したところ、*EcoRI* による微量の DNA 合成を観察することができた。ここで観察された DNA 合成部位は RPA が蓄積する部位と一致するため、*EcoRI* によって生じた

DNA 二本鎖切断の修復反応により局所的な DNA 合成が引き起こされたものと考えられる。

### 4. xWRN、xWHIP の同定

本実験系で WRN、WHIP の機能を分子的に理解するためには、*Xenopus* における相同タンパク質をコードする遺伝子を単離し、何らかの方法でタンパク質発現させた後、これを抗原として抗体を得ることが必要となる。*Xenopus* における WRN は FFA-1 としてすでに報告されているが、この遺伝子を入手し現在タンパク質発現を試みている。また、WHIP 遺伝子の断片と思われる DNA 配列を *Xenopus* EST データベース上で見いだしており、これをもとに xWHIP 遺伝子の単離を試みている。

## D. 結論

*Xenopus* 卵抽出液を用いた無細胞実験系において RPA の間接蛍光抗体染色により DNA 二本鎖切断が比較的簡便に検出できること、また、本実験系に制限酵素を添加することにより容易に DNA 二本鎖切断が誘起できることが示された。さらに、DNA 二本鎖切断に対する応答として細胞内でみられるような細胞周期チェックポイント機構や DNA 修復反応が本無細胞実験系で再現されることも本研究の結果より強く示唆された。

今後は、本研究結果をさらに詳細

に解析し、得られた結果の信頼性を高めていくとともに、様々な側面から染色体構造安定化機構を探ることができるよう、本無細胞実験系で利用できる指標を多岐に渡り揃えていこうと考えている。同時に xWRN、xWHIP の機能をこの実験系の中で解析できるよう準備を進めることで、近い将来に無細胞実験系における WRN、WHIP の役割について様々な側面から分子的に迫ることができるものと確信している。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Tada, S., Li, A., Maiorano, D., Méchali, M., and Blow J. J. (2001) Repression of origin assembly in metaphase depends on inhibition of RLF-B/Cdt1 by geminin.

*Nature Cell Biol.* **3**, 107-113.

2. Tada, S., Kobayashi, T., Omori, A., Kusa, Y., Okumura, N., Kodaira, H., Ishimi, Y., Seki, M., and Enomoto, T. (2001) Molecular cloning of a cDNA encoding mouse DNA helicase B, which has homology to Escherichia coli RecD protein, and identification of a mutation in the DNA helicase B from tsFT848 temperature-sensitive DNA

replication mutant cells.

*Nucleic Acids Res.* **29**, 3835-3840.

3. Kobayashi, T., Tada, S., Tsuyama, T., Murofushi, H., Seki, M., and Enomoto, T. (2002) Effect of topoisomerase inhibitors on the formation of replication protein A-foci in nuclei reconstituted in *Xenopus* egg extract  
*J. Health Sci.* in press.

4. Hodgson, B., Li, A., Tada, S., and Blow, J. J. (2002) Geminin Becomes Activated As an Inhibitor of Cdt1/RLF-B Following Nuclear Import.

*Curr. Biol.* in press.

### 2. 口頭発表

1. 榎本武美、川辺洋一、Branzei Dana、井口壮太、小野田文俊、多田周右、関政幸  
Werner 症候群の原因遺伝子産物と相互作用する新規タンパク質、WHIP (Werner Helicase Interacting Protein) の機能  
第 54 回日本細胞生物学会大会 (シンポジウム) 2001 年 5 月 30 日

2. Yoh-ichi Kawabe, Dana Branzei, Sohta Iguchi, Takashi Takeuchi, Fumitoshi Onoda, Shusuke Tada,

Masayuki Seki, and Takemi Enomoto

Physical and functional interaction of the Werner's syndrome gene product with Ubc9, SUMO-1, and WHIP.

特定領域研究 (C) 若手シンポジウム 2001年8月30日

3. 小林貴之、多田周右、関政幸、榎本武美  
*Xenopus* 卵抽出液による DNA 障害認識機構の解析  
第 40 回日本薬学会東北支部大会 2001年10月21日
4. 竹内貴志、井口壮太、川辺洋一、多田周右、関政幸、榎本武美  
WHIP の WRN ヘリカーゼへの結合は ATP によって促進される  
第 74 回日本生化学会大会 2001年10月27日
5. 川辺洋一、竹内貴志、松本義久、鈴木紀夫、多田周右、関政幸、榎本武美  
WRN ヘリカーゼと WHIP、DNA-PK 複合体との相互作用の解析  
第 74 回日本生化学会大会 2001年10月27日
6. Takayuki Kobayasi, Shusuke Tada, Hiromu Murafushi, Masayuki Seki, and Takemi Enomoto  
Focus-formation of replication

protein A, activation of checkpoint system and DNA repair synthesis induced by DNA double-strand breaks in cell-free extract derived from *Xenopus* eggs.

The 3rd Symposium on DNA Replication, Recombination and Repair

2001年11月8日

7. 小林貴之、多田周右、室伏拡、関政幸、榎本武美  
*Xenopus* 卵抽出液による DNA 二本鎖切断認識および修復  
第 24 回日本分子生物学会年会 2001年12月12日
8. 津山崇、多田周右、関政幸、榎本武美  
*Xenopus* 卵抽出液による複製開始機構の解析  
日本薬学会第 122 年会 2002年3月26日
9. 小林貴之、多田周右、関政幸、榎本武美  
*Xenopus* 卵抽出液における DNA 二本鎖修復過程の解析  
日本薬学会第 122 年会 2002年3月26日

## F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし