

20020214

厚生労働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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 榎本 武美

平成15年(2003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 ----- 14

多田 周右

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 23

IV. 研究成果の別刷等 ----- 24

厚生労働科学研究費補助金（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、酵母や DT40 細胞を用いて DNA 複製や修復に関連する酵素・タンパク質の遺伝子破壊株や変異株を作製し WHIP、WRN との機能的関連を解析した。また、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 系を確立した。酵母の DNA polymerase  $\delta$  の温度感受性変異株を用いた解析から、WHIP が DNA polymerase  $\delta$  に結合するだけでなく DNA polymerase  $\delta$  と機能的な関連をもつこと、また、DNA 複製後修復に関わる Rad18 や Mms2 も DNA polymerase  $\delta$  と機能的な関連をもつことが明らかになった。

一方、DT40 細胞を用いて種々の遺伝子破壊株を作製して解析した結果から、DNA の傷害の修復や SCE の形成に関しては、WHIP と WRN はそれぞれ別の経路で機能していることが明らかになった。特に、WHIP は RAD18 が含まれる DNA 複製後修復系とは異なる経路で機能するが、WRN はこの経路で機能することが示唆された。RAD18 が含まれる DNA 複製後修復系で WRN が機能することを示す報告はいままでになく、WRN の DNA 修復における機能を知る上で、重要な発見をすることができた。また、WRN は KU70 の下流で機能することが明らかになり、WRN が non-homologous end joining の経路で機能するかどうかは今後の検討課題であるが、少なくとも、WRN は KU70 により DNA の傷害部位ヘリクルートされる可能性が示唆された。さらに、SCE の形成を解析することにより、「WRN は複製フォークが停止した際に、新生鎖同士のアニーリングを促進する、あるいはアニーリングして形成された Holliday junction の切断に関わる」機能をもつことが示唆された。

アフリカツメガエル卵抽出液を用いた cell-free の解析系では、こ

の系を用いて WHIP、WRN の DNA 複製や修復における機能を解析するための基盤を確立することができた。

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い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。14 年度は、酵母と DT40 細胞を用いて、DNA 複製や修復に関連する酵素・タンパク質と WHIP、WRN との機能的関連を解析するとともに、アフリカツメガエル

卵抽出液を用いた cell-free 系を用いて WHIP や WRN の機能を生化学的に解析するための基盤の確立を図った。

## B. 研究方法

1) 出芽酵母の DNA polymerase  $\delta$  の温度感受性変異株の *WHIP*、*RAD18*、*MMS2* を破壊し、増殖の温度感受性や、DNA 傷害剤に対する感受性を調べることにより、DNA polymerase  $\delta$  と yWHIP、Rad18、Mms2 との機能的関連を解析した。

2) DT40 細胞を用いて、WHIP、WRN 遺伝子破壊株や、これらの遺伝子と DNA の複製、修復、組換えに関わ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 (*WHIP/WRN*、*WHIP/BLM*、*WHIP/RAD18*、*WRN/BLM*、*WRN/XRCC3*、*WRN/RAD18*、*WRN/KU70*、*WRN/DNA-PKcs*、*WRN/LIG4*)、それぞれの遺伝子の単独破壊株の増殖や、種々の DNA 傷害剤に対する感受性、SCE の頻度等を比較することにより、これらの遺伝子によりコードされるタンパク質相互の機能的関連を解析するとともに、WHIP や WRN が機能する経路の同定を試みた。

3) 昨年度確立した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 修復が起こる系の性状解析を更に進めるとともに、この系を

用いて WHIP や WRN の機能を解析するために、アフリカツメガエルの WHIP、WRN に対する抗体を作製した。

(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. 研究結果と考察

1) 酵母を用いた WHIP の解析

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、昨年度は、DNA polymerase  $\delta$ 、RFC、PCNA の変異株に WHIP を過剰発現させた。その結果、これら全ての変異株が致死となることがわかり、DNA polymerase  $\delta$ 、RFC、PCNA と yWHIP との機能的関連が示唆された。

本年度は、DNA polymerase  $\delta$  のサブユニットの変異株を用いて、DNA polymerase  $\delta$  と yWHIP との機能的を調べた。DNA polymerase  $\delta$  のサブユニットをコードする遺伝子 *POL31*、*POL32* の温度感受性変異株は、許容温度で、ヒドロキシウレア (HU) に

感受性を示すが、*yWHIP* 遺伝子を破壊することによりこの感受性が抑制された。さらに、*pol32* 変異株の増殖の温度感受性が、*yWHIP* 遺伝子を破壊することにより部分的に抑制されたことから、DNA polymerase  $\delta$  と *yWHIP* との機能的関連が一層明確になった。two-hybrid system で *yWHIP* と DNA polymerase  $\delta$  との結合が確認できている（13年度の研究成果）ことから、WHIP は DNA polymerase  $\delta$  を含む DNA 複製複合体に含まれていて、DNA 複製複合体が DNA の傷害に遭遇した時に重要な機能を果たすものと考えられる。

一方、*pol32* 変異株の増殖の温度感受性や HU 感受性は、複製後修復に関与する *RAD18*、*MMS2* 遺伝子を破壊することによっても抑制されることがわかった。*Rad18*、*Mms2* はタンパク質のユビキチン化に関わるタンパク質であり、我々はヒトの細胞で WHIP がユビキチン化されるという結果を得ている、したがって今後は、WHIP、DNA polymerase  $\delta$ 、*Rad18*、*Mms2* の機能的関連を解析していく必要がある。

## 2) WHIP と WRN 及び RAD18 との関係

WHIP は two-hybrid system で WRN と相互作用する新規タンパク質として我々が見いだしたものであり、両者の結合は免疫沈降によっても確認している。昨年度までに WRN と

WHIP の結合に関し様々な解析を行ってきたが、両者の機能的関連についてはほとんど解析が進んでいない。そこで本年度は DT40 細胞を用いて WHIP 単独破壊株、WHIP/WRN 二重変異株を含め種々の遺伝子破壊株を作製して解析を行った。WHIP 単独破壊株は野生株と同様に増殖し、DNA 傷害剤に対する感受性も野生株の感受性とほとんど同じであり、唯一カンプトテシンに対して若干高い感受性を示した。一方、WHIP/WRN 二重変異株の薬剤感受性は WRN 破壊株の感受性に比べて相乗的に増加した。

ブルーム症候群原因遺伝子、*BLM*、破壊株では姉妹染色分体交換 (SCE) が増加する。この SCE の形成に WRN が関与する (後述)。そこで、*BLM* 破壊株の SCE の形成に WHIP が関与するか否かを確かめるために *BLM/WHIP* 二重変異株を作製した。この二重変異株の SCE の頻度は *BLM* 破壊株の頻度と比べさらに亢進していた。すなわち、WHIP 遺伝子の破壊により WRN 遺伝子の破壊と全く反対の結果が得られた。以上の結果から、DNA 傷害時や SCE 形成においては、WHIP は WRN とは異なる機能を持っていることが明らかになった。

1) 項で述べた酵母を用いた解析から、WHIP と *Rad18* の両者が DNA polymerase  $\delta$  と機能的関連をもつことが示唆され、他の研究者により、*yWHIP* と *RAD18* を同時に欠損する

と致死になることが報告された。そこで *RAD18/WHIP* 二重変異株を作製した。現在までの解析の結果、少なくとも脊椎動物細胞においては *RAD18* と *WHIP* を同時に欠損させても細胞は致死にならないことが判明した。次年度にこの細胞株の詳細な性状解析を行う予定である。

### 3) WRN と DSB 修復との関係

DNA 二重鎖に生じた切断 (double strand breaks, DSB) は修復が行われないと細胞は致死となる。この DSB を修復する修復系として、相同組換え経路 (homologous recombination; HR) と非相同組換え経路 (non-homologous end joining; NHEJ) が存在する。これまでに WRN は NHEJ 経路に関わるタンパク質群 DNA-PKcs や Ku70/80 と細胞内で複合体を形成することや、試験管内で WRN のもつエキソヌクレアーゼ活性が Ku70/80 によって著しく促進されることが報告されている。また、ヒト細胞をカナプトテシン処理した際に生じる DSB に WRN とともに HR に関与する RAD51、RPA が集積することが報告されている。従って、WRN は DSB 修復経路の HR、NHEJ の両方の経路と何らかの関係があると考えられるが、それを示す決定的な証拠は得られていない。そこで、WRN と *KU70* (NHEJ) あるいは *XRCC3* (HR) との二重変異株 *WRN/KU70*、*WRN/XRCC3* を作製し、WRN と NHEJ 及び HR

との関係を解析した。その結果、WRN 破壊株が示す種々の DNA 傷害剤への感受性は *XRCC3* の破壊により増大した。このことは、WRN は相同組換え修復経路とは異なる経路で機能していることを示している。一方、WRN 破壊株の薬剤感受性は *KU70* の破壊により *KU70* 単独破壊株の感受性のレベルまで抑制された。すなわち、WRN は *KU70* の下流で働き、*KU70* の DSB を認識する能力に依存して働くことが示唆された。しかしこのことは WRN が NHEJ 経路で機能していることを必ずしも意味するものではない。NHEJ 経路で働く他のタンパク質 DNA-PKcs, DNA ligase IV と WRN との二重変異株を作製して解析すれば、WRN が NHEJ 経路で機能しているか否か結論をだすことは可能になる。そこで本年度 *WRN/DNA-PKcs*、*WRN/DNA-ligase IV* 二重破壊株を樹立したので、次年度にこれらの株の解析を行う。

### 4) WRN と複製後修復との関係

WRN が DNA polymerase  $\delta$  と結合することが報告されている。また、1) の項で述べたように、WHIP と Rad18 の両者が DNA polymerase  $\delta$  と機能的関連をもつことが示唆された。そこで、*RAD18* 遺伝子破壊株を親株として *WRN* 遺伝子を破壊し *RAD18/WRN* 二重変異株を作製した。この *RAD18/WRN* 二重変異株の示す DNA 傷害剤に対する感受性は *RAD18* 単独

破壊株のそれと同程度であった。この結果は、WRN が RAD18 の関わる DNA 複製後修復経路で働くことを意味している。この結果は、誰も予想しなかったもので、もし事実ならば WRN の DNA 修復機能を知る上で、決定的な発見をしたことになる。次年度は様々な角度から解析し、この事実の検証を行う。また、この発見が正しければ、WRN は NHEJ とは異なる経路 (RAD18 経路) で働くことになるので、3) 項で作製した *WRN/DNA-PKcs*, *WRN/DNA-ligase IV* 二重破壊株の薬剤感受性は、それぞれ単独破壊株のそれよりも増大することが予想される。さらに WRN は DNA 除去修復経路とも異なるはずである。このことを立証するために、*XPA-WRN* 二重破壊株も作製した。次年度のこれらの細胞の性状解析を行う予定である。

#### 5) WRN の姉妹染色分体交換 (SCE) 反応における役割

我々は、DT40 *BLM* 破壊株において SCE が野性型細胞に比べ約 10 倍亢進することを報告した。一方、他のグループにより *BLM/WRN* 二重破壊株における SCE 頻度が *BLM* 破壊株の 2/3 まで減少することが報告された。*RAD18* 破壊株でも SCE の亢進が報告されていたので、4) 項で作製した *RAD18/WRN* 二重破壊株の SCE の頻度を測定したところ、*RAD18* 単独破壊株の頻度と変わらなかった。

すなわち、「WRN は *BLM* 欠損による SCE 亢進には関わるが、*RAD18* 欠損によって生じる SCE の形成には関与しない」という結論が得られた。さらに、マイトマイシン C (MMC) 処理により野生株で SCE の頻度が 3-4 倍亢進することを利用し、*WRN* 破壊株を MMC で処理して SCE を測定したところ、野生株と同様の値であった。MMC 処理により上昇する SCE のほとんどが相同組換え経路によって生じることを考え合わせると、*BLM* 破壊株で亢進していた SCE が *WRN* 遺伝子破壊により減少したのは、WRN が相同組換えそのものに関与していたためである可能性は非常に低いと考えられる。

現在 *BLM* の機能として、DNA 複製フォークが停止した際に、新生鎖同士のアニーリングによって形成される十字架構造 (Holliday junction; HJ) を、元の複製フォークに戻すモデルが提唱されている。このモデルでは、*BLM* の欠損により蓄積した HJ が切断されて相同組換え経路で複製フォークが再生されることにより SCE が亢進する。従って、このモデルに従えば「WRN は複製フォークが停止した際に、新生鎖同士のアニーリングを促進する。あるいは *BLM* 欠損で蓄積した HJ の切断に関わる」等の機能をもつことが考えられる。次年度はさらに *WRN/BLM/XRCC3* 三重破壊株の作製を試み、WRN の SCE 形成における役割の解析をさら



に進展させる。

6) アフリカツメガエル卵抽出液を用いた cell-free 系による解析

昨年度に、WRN、WHIP の関与する DNA 二本鎖切断の認識および修復機構の詳細な解析を目的とした DNA 傷害認識・修復過程の再現を試み、cell-free 実験系を構築した。同実験系を用いた解析をさらにすすめた結果、DNA 二本鎖切断に応じて傷害部位に Rad51 が蓄積すること、DNA 二本鎖切断に応じた DNA 修復合成が aphidicolin 感受性の DNA ポリメラーゼにより遂行されることが確認された。以上の結果より、*Xenopus* 卵抽出液中で DNA 二本鎖切断に応じた DNA 組換え修復過程が誘導され、DNA ポリメラーゼ  $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  のいずれかを介して修復反応が終結すると考えられた。この実験系による WRN、WHIP の解析を行うため、*Xenopus* における WRN、WHIP の cDNA をクローニングし、組換えタンパク質を抗原として抗体を作成した。得られた抗体による western blotting の結果、*Xenopus* 卵中に WHIP (約 65 kDa)、WRN (約 165 kDa) の両方が存在することが明らかとなった。さらに、ウェルナー症候群と同様に早期老化症状を呈する疾患として知られるロスムンド-トムソン症候群の原因遺伝子産物、RecQL4 の解析を同様の実験系を用いてすすめた。*Xenopus RECQL4* cDNA をクローニングし、組換えタンパク

質を抗原として抗体を作製した。この抗体を用いて、DNA 二本鎖切断を誘導した条件下における RecQL4 のクロマチンへの結合が確認された。また、UV 照射や aphidicolin 添加により DNA 複製を抑制した条件においてもクロマチンへの結合が観察された。これらのことから、DNA 二本鎖切断や複製フォーク進行の障害に応じて RecQL4 がクロマチンに結合し、細胞周期チェックポイントや DNA 修復の過程において何らかの役割を担っていると考えられた。

以上の結果より、WRN、WHIP の関与する過程を cell-free 系で解析するための基盤が確立できた。

#### D. 結論

酵母の DNA polymerase  $\delta$  の温度感受性変異株を用いた解析から、WHIP が DNA polymerase  $\delta$ 、結合するだけでなく機能的な関連をもつことが一層明確になった。また、DT40 細胞の種々の遺伝子破壊株を用いた解析から、DNA の傷害の修復や SCE の形成に関しては、WHIP と WRN はそれぞれ別の経路で機能していることが示唆された。特に、RAD18 が含まれる DNA 複製後修復系とは異なる経路で WHIP は機能するが、WRN はこの経路で機能する可能性がでてきた。RAD18 が含まれる DNA 複製後修復系で WRN が機能することを示す報告はどこにもなく、この結果をさら

に確認できれば、WRN の DNA 修復における機能を知る上で、決定的な発見をしたことになる。また、WRN は KU70 の下流で機能することが明らかになり、WRN が NHEJ の経路で機能するかどうかは今後の検討課題であるが、少なくとも、WRN は KU70 により DNA の傷害部位へリクルートされる可能性が示唆された。さらに、SCE の形成を解析することにより、「WRN は複製フォークが停止した際に、新生鎖同士のアニーリングを促進する、あるいはアニーリングして形成された HJ の切断に関わる」機能をもつことが示唆された。以上のような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、あるいは複製中に遭遇した傷害の修復にどのよう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。

## E. 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Branzei, D., Seki, M., Onoda, F., Yagi, H., Kawabe, Y., and Enomoto, T. (2002) Characterization of the slow-growth phenotype of *S. cerevisiae whip/mgs1 sgs1* double deletion mutants. *DNA Repair (Amst)* **1**, 671-682.
- 2) Branzei, D., Seki, M., Onoda, F., and Enomoto, T. (2002) The product of *Saccharomyces cerevisiae WHIP/MGS1*, a gene related to replication factor C genes, interacts functionally with DNA polymerase  $\delta$ . *Mol. Genet. Genomics* **268**, 371-386.
- 3) Hayashi, T., Seki, M., Maeda, D., Wang, W., Kawabe, Y., Seki, T., Saitoh, H., Fukagawa, T., Yagi, H., and Enomoto, T. (2002) Ubc9 is essential for viability of higher eukaryotic cells. *Exp. Cell Res.* **280**, 212-221.
- 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.* **12**, 678-683.
- 5) 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.* **48**, 296-301.

- 6) Kobayashi, T., Tada, S., Tsuyama, T., Murofushi, H., Seki, M., and Enomoto, T. (2002) Focus-formation of replication protein A, activation of checkpoint system and DNA repair synthesis induced by DNA double-strand breaks in *Xenopus* egg extract. *J. Cell Sci.* **115**, 3159-3169.
- 7) Onodera, R., Seki, M., Ui, A., Satoh, Y., Miyajima, A., Onoda, F., and Enomoto, T. (2002) Functional and physical interaction between Sgs1 and Top3 and Sgs1-independent function of Top3 in DNA recombination repair. *Genes Genet. Syst.* **77**, 11-21.
- 8) Odagiri, N., Seki, M., Onoda, F., Yoshimura, A., Watanabe, S., and Enomoto, T. (2003) Budding yeast *mms4* is epistatic with *rad52* and the function of Mms4 can be replaced by a bacterial Holliday junction resolvase. *DNA Repair (Amst)* **2**, 347-358.
- 9) Wang, W., Seki, M., Narita, Y., Nakagawa, T., Yoshimura, A., Otsuki, M., Kawabe, Y., Tada, S., Yagi, H., Ishi, Y., Enomoto, T. (2002) Functional relation among RecQ family helicases, RecQL1, RecQL5, and BLM in cell growth and SCE formation. *Mol. Cell. Biol.* in press.
2. 口頭発表
- 1) 伊能克敏、多田周右、関剛彦、関政幸、榎本武美  
アフリカツメガエル卵抽出液を用いた SMC5, SMC6 の解析  
日本細胞生物学会第 55 回大会  
2002 年 5 月 21 日
- 2) 津山 崇、多田周右、関 政幸、榎本武美  
Xenopus 卵抽出液中における Cdt1 および geminin のクロマチン結合に関する解析  
日本細胞生物学会第 55 回大会  
2002 年 5 月 21 日
- 3) 小林貴之、多田周右、関政幸、榎本武美  
アフリカツメガエル卵抽出液を用いた DNA 二本鎖切断誘導時の DNA 修復タンパク質の挙動  
第 16 回 DNA 複製・分配ワークショップ  
2002 年 7 月 15 日
- 4) 津山崇、多田周右、関政幸、榎本武美  
Xenopus 卵抽出液中での Cdt1 および geminin の DNA 複製進行における挙動の解析  
第 16 回 DNA 複製・分配ワークショップ  
2002 年 7 月 15 日

- 5) 宇井彩子、小野寺涼子、小野田文俊、関政幸、榎本武美  
出芽酵母 Sgs1 の DNA 複製の進行阻害における機能の検討  
第 16 回 DNA 複製・分配ワークショップ  
2002 年 7 月 15 日
- 6) 榎本武美  
RecQ ファミリーヘリケース及びそれらと相互作用するタンパク質の機能  
平成 14 年度文部科学省がん研究に係わる特定領域研究「発がん」と防御」・「がん治療」領域合同シンポジウム  
2002 年 7 月 26 日
- 7) Takayuki Kobayashi, Shusuke Tada, Takashi Tsuyama, Masayuki Seki, Takemi Enomoto  
Responses to DNA double strand breaks in Xenopus egg extract  
DNA RELICATION and GENOME INTEGRITY at THE SALK INSTITUTE  
2002 年 8 月 17 日
- 8) Takayuki Kobayashi, Shusuke Tada, Masayuki Seki, Takami Enomoto  
Focus-formation of replication protein A, activation of checkpoint system and DNA repair synthesis induced by DNA double-strand breaks in Xenopus egg extract  
文部省特定領域研究「がん」「発がん」と発がん防御の基礎的研究」若手研究者ワークショップ  
2002 年 8 月 28 日
- 9) 上原芳彦、竹田直樹、鈴木 操、能美健彦、関 政幸、榎本武美、野田哲生、小野哲也  
ミスマッチ修復酵素チミン DNA グリコシラーゼ (TDG) のマウス発生過程における機能  
第 45 回日本放射線影響学会大会  
2002 年 9 月 18 日
- 10) 多田周右、関 政幸、榎本武美  
アフリカツメガエル卵抽出液を用いた DNA 二本鎖切断認識修復応答の再現  
第 61 回日本癌学会総会  
2002 年 10 月 2 日
- 11) 竹内貴志、関 政幸、川辺洋一、古川真也、多田周右、榎本武美  
高等動物細胞における WRN と WHIP の相互作用の解析  
第 41 回日本薬学会東北支部大会  
2002 年 10 月 12 日
- 12) 荻原秀明、関 政幸、宇井彩子、多田周右、榎本武美  
出芽酵母 SGS1 と複製との機能的関係の解析

- 第41回日本薬学会東北支部大会  
2002年10月12日
- 13) 中川学之、関 政幸、関 剛彦、榎本武美  
トリ DT40 細胞 TOPO3 破壊株の解析  
第41回日本薬学会東北支部大会  
2002年10月12日
- 14) 前田大介、関 政幸、川辺洋一、  
Branzei Dana、榎本武美  
出芽酵母 Ubc9 の DNA 修復・組換えにおける機能解析  
第41回日本薬学会東北支部大会  
2002年10月12日
- 15) 前田大介、関 政幸、川辺洋一、  
Branzei Dana、榎本武美  
出芽酵母 Ubc9 の DNA 修復・組換えにおける機能解析  
第41回日本薬学会東北支部大会  
2002年10月12日
- 16) 小林貴之、多田周右、津山 崇、  
関 政幸、榎本武美  
Xenopus 無細胞実験系を用いた DNA 二本鎖切断応答及び修復過程の解析  
第75回日本生化学会大会  
2002年10月16日
- 17) 高橋由梨子、多田周右、川辺洋一、  
関 政幸、榎本武美  
アフリカツメガエル DNA トポイソメラーゼ III  $\alpha$ ,  $\beta$  の cDNA クローニング  
第75回日本生化学会大会  
2002年10月16日
- 18) Takemi Enomoto  
Functions of RecQ helicases and DNA topoisomerase III  
1st Japan-US DNA repair meeting  
2002年10月30日
- 19) 釣本敏樹、塩見泰史、矢野雅樹、  
篠崎彩子、小布施力史、関 政幸、榎本武美、杉本勝則、白倉治郎  
ヒト RFC ファミリータンパク質の複製フォーク機能維持における役割  
第25回日本分子生物学会年会  
2002年12月11日
- 20) 佐野訓明、Sevim Isik、榎本武美、  
筒井公子、筒井 研  
特異的阻害剤による DNA トポイソメラーゼ II  $\beta$  の選択的分解  
第25回日本分子生物学会年会  
2002年12月11日
- 21) 小野田 文俊、竹田 昌弘、前田 大介、田島 純一、関 政幸、榎本武美

- 出芽酵母 Smc6 タンパク質の DNA 組換え過程への関与  
第 25 回日本分子生物学会年会  
2002 年 12 月 11 日
- 22) 渡部 聖、小田桐 奈央、小野田 文俊、関 政幸、榎本 武美  
出芽酵母 sgs1 srs2 二重破壊株の合成致死性を抑制する遺伝子の解析  
第 25 回日本分子生物学会年会  
2002 年 12 月 11 日
- 23) 津山崇、多田周右、関政幸、榎本武美  
Xenopus 卵抽出液における DNA 複製ライセンス化関連タンパク質のクロマチン結合に関する解析  
第 25 回日本分子生物学会年会  
2002 年 12 月 11 日
- 24) 竹内貴志、川辺洋一、古川真也、井口壮太、林朋子、松本武久、古市泰宏、多田周右、関政幸、榎本武美  
WHIP と WRN の相互作用は ATP によって促進される  
第 25 回日本分子生物学会年会  
2002 年 12 月 11 日
- 25) Dana Brnzei, Masayuki Seki, Takemi Enomoto  
S. cerevisiae WHIP/MGS1, a gene related to replication factor C genes, interacts functionally with DNA polymerase delta  
第 25 回日本分子生物学会年会  
2002 年 12 月 11 日
- 26) 宇井彩子、小野寺涼子、小野田文俊、関政幸、榎本武美  
出芽酵母 Sgs1 と Top3 の DNA 組換えにおける機能の検討  
第 25 回日本分子生物学会年会  
2002 年 12 月 11 日
- 27) 吉田和真、久保田弓子、多田周右、滝澤温彦  
複製開始ライセンス化阻害因子 geminin の核移行機構の解析  
第 25 回日本分子生物学会年会  
2002 年 12 月 11 日
- 28) T. Nakagawa, M. Seki, T. Seki, T. Enomoto  
ANALYSIS OF THE FUNCTION OF TOP3\* IN HIGHER EUKARYOTIC CELLS  
核ダイナミクス国際ワークショップ  
2002 年 12 月 15 日
- 29) 川辺 洋一、関 政幸、竹内 貴志、井口壮太、山本 和生、榎本 武美  
高等動物細胞における WRN/WHIP 複合体の機能解析  
第 20 回染色体ワークショップ

2003年1月30日

- 30) 熊田 裕司、多田 周右、小林 貴之、董 宇鵬、関 政幸、榎本 武美

Xenopus 卵抽出液中における  
RecQL4/RTS の挙動の解析

第20回染色体ワークショップ

2003年1月30日

- 31) 川辺洋一、関政幸、竹内貴志、  
山本和生、榎本武美

WRN が関わる修復経路の解析

DNA Repair, Recombination and  
mutagenesis 2003

2003年2月24日

- 32) 小野田文俊、竹田昌弘、前田大  
介、田島純一、関政幸、榎本武  
美

出芽酵母 Smc6 タンパク質の DNA  
組換え過程への関与

DNA Repair, Recombination and  
mutagenesis 2003

2003年2月24日

- 33) 小林貴之、多田周右、董宇鵬、  
熊田裕司、関政幸、榎本武美

Xenopus RTS/RecQL4 の DNA 傷  
害に依存した挙動の解析

DNA Repair, Recombination and  
mutagenesis 2003

2003年2月24日

- 34) 大槻誠、関政幸、Wensheng Wang、

成田吉泰、中川学之、吉村明、  
多田周右、榎本武美

細胞増殖と SCE の形成における  
RecQL1, RecQL5, BLM 間の機能  
的関連

日本薬学会第123年会

2003年3月27日

- 35) 古川真也、関政幸、川辺洋一、  
竹内貴志、大槻誠、多田周右、  
松本武久、古市泰宏、榎本武美

ウエルナー症候群原因遺伝子産  
物、WRN は KU70、WHIP の下  
流で働く

日本薬学会第123年会

2003年3月27日

- 36) 前田大介、Branzei Dana、関政幸、  
榎本武美

出芽酵母 Ubc9 は DNA 組換え  
に関与する

日本薬学会第123年会

2003年3月27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

厚生労働科学研究費補助金（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の詳細な解析を目的とした DNA 傷害認識・修復過程の無細胞的再現を試み実験系を構築したことを昨年度の研究報告書で報告した。同実験系を用いた解析をさらにすすめた結果、DNA 二本鎖切断に応じて傷害部位に Rad51 が蓄積すること、DNA 二本鎖切断に応じた DNA 修復合成が aphidicolin 感受性の DNA ポリメラーゼにより遂行されることが確認された。以上の結果より、*Xenopus* 卵抽出液中で DNA 二本鎖切断に応じた DNA 組換え修復過程が誘導され、DNA ポリメラーゼ  $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  のいずれかを介して修復反応が終結すると考えられた。この実験系による WRN、WHIP の解析をおこなうため、*Xenopus* における WRN、WHIP の cDNA をクローニングし、組換えタンパク質を抗原として抗体を作成した。得られた抗体による western blotting の結果、*Xenopus* 卵中に WHIP (約 65 kDa)、WRN (約 165 kDa) の両方が存在することが明らかとなった。さらに、ウェルナー症候群と同様に早期老化症状を呈する疾患として知られるロスムンド-トムソン症候群の原因遺伝子、RecQL4 の解析を同様の実験系を用いてすすめた。*Xenopus* RECQL4 cDNA をクローニングし、組換えタンパク質を抗原として抗体を作製した。この抗体を用いて、DNA 二本鎖切断を誘導した条件下における RecQL4 のクロマチンへの結合が確認された。また、UV 照射や aphidicolin 添加により DNA 複製を抑制した条件においてもクロマチンへの結合が観察された。これらのことから、DNA 二本鎖切断や複製フォーク進行の障害に応じて RecQL4 がクロマチンに結合し、細胞周期チェックポイントや DNA 修復の過程において何らかの役割を担っていると考えられた。



## 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 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アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 卵由来の抽出液を用いた無細胞実験系を利用することとし、クロマチン上の障害の検出と、これに対する細胞内応答および傷害修復過程の再現を同抽出液を用いて試みた。その結果については昨年度の本研究報告書に報告したが、本年度はその実験系の信頼度をさらに高めることも目標として据えた。

また当初の目的に加え、ロスムンド-トムソン症候群 (Rothmund-Thomson syndrome) の原因遺伝子産物、RecQL4 が *Xenopus* 卵中に存在することを確認したため、この RecQL4 についても同様の無細胞実験系をもちいた解析をすすめた。ロスムンド-トムソン症候群は早期老化症状を呈する遺伝的疾患であり、その原因遺伝子産物が RecQ ファミリーDNA へ

リカーゼに属するなどウェルナー症候群と同様の特徴を有する。これら WRN、RecQL4 の両者の解析を同時にすすめ、結果を比較検討することにより、老化症状のより詳細な理解に繋がるものと考えられる。

## B. 研究方法

*Xenopus* 卵を Ca イオノフォア (A23187) で処理することにより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。

間接蛍光抗体染色は *Xenopus* 卵抽出液で生成した細胞核を界面活性剤処理したのちホルマリンにより固定し、目的とするタンパク質の抗体、蛍光色素を会合させた二次抗体と順次反応させてから共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

クロマチン画分は細胞核を界面活性剤存在下で遠心分離することにより単離した。western blotting は定法に従い SDS-PAGE をおこなった後、展開されたタンパク質を PVDF 膜に電氣的に転写した。目的とするタンパク質の抗体とペルオキシダーゼ会合抗ウサギ抗体とを順次反応させ、ECL

kit (Amersham) を用いて可視化した。

### C. 研究結果および考察

#### 1) *Xenopus* 卵抽出液を用いた DNA 二本鎖切断修復反応の解析

DNA 傷害剤処理に応じた一本鎖 DNA 結合タンパク質 (RPA) の動態、細胞周期チェックポイント機構の発動、DNA 修復合成の誘導を昨年度に確認した。その観察結果に基づいてさらに詳細な解析をおこなった。

まず、DNA 組換えを介した DNA 二本鎖切断 (DSB) 修復に中心的な役割を果たす Rad51 の動態を観察した。RPA の場合とは異なり、DNA 複製開始や進行に依存したクロマチン上への局在はほとんど認められなかった。一方、DSB 誘導処理による斑状のシグナルは RPA と同様に観察された。このような条件下では、Rad51 の局在と RPA の局在とはほぼ一致しており、RPA と Rad51 とが DNA 傷害にตอบสนองしてごく近傍に集積していることが示唆された。また、昨年度報告した DNA 修復合成が RPA の局在とほぼ一致することから、RPA と Rad51 の両者が DNA 傷害部位に局在し、DNA 組換えを介した DNA 修復反応により DSB の修復がおこなわれているものと考えられた。

クロマチン画分を反応系から単離した後に western blotting によりクロマチン画分中の RPA または Rad51 を検出した場合にも間接蛍光抗体法で

得られた結果と同様の動態が確認された。同じくクロマチン画分を用いた western blotting により、DSB に応じて形成されるリン酸化型 H2AX ( $\gamma$ -H2AX)、DSB 修復に重要とされる Mre11 など、RPA・Rad51 と同様に DSB の誘導に依存してクロマチン上に蓄積することが確認された。経時的な観察より、これらは DSB の生成に応じて、 $\gamma$ -H2AX、RPA、Rad51 の順にクロマチン上に蓄積することが示唆された。とくに  $\gamma$ -H2AX は DSB の生成後、極めて速やかに形成された。Mre11 に関しては、 $\gamma$ -H2AX の蓄積以後に結合すると考えられたが、RPA、Rad51 との前後関係については明確にできなかった。これらの結合は caffeine により細胞周期チェックポイント経路の起点である ATM、ATR を阻害した条件下でも観察された。

*EcoRI* と *geminin* を反応系に添加することにより検出される DNA 修復合成についてさらに解析をすすめたところ、aphidicolin を添加することにより阻害されることを見いだした。この結果より *Xenopus* 卵抽出液中の DSB 修復反応に応じた DNA 合成が aphidicolin 感受性の DNA ポリメラーゼ、DNA ポリメラーゼ  $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  のいずれかを介しておこなわれていることが示唆された。

#### 2) xWRN、xWHIP の同定および抗体の作製

*Xenopus* 卵抽出液を用いた無細胞実

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 WRN および WHIP をコードする cDNA を単離し、組換えタンパク質を発現させた後、これを抗原として抗体を得ることが必要となる。そこで、*Xenopus* における WRN と WHIP (xWRN、xWHIP) の cDNA を単離した。xWRN の cDNA はすでに RPA-foci の形成に関与するタンパク質 (FFA-1) として報告されているため、この配列を基に PCR により cDNA を得た。xWHIP の報告はこれまで無かったため、ヒトおよびマウス WHIP との相同性を基に検索し、60 kDa のタンパク質をコードする cDNA を得た。この cDNA の産物はヒト WHIP と約 50%の相同性を有していた。

xWRN の N 末側約 70 kDa、xWHIP の C 末側約 30 kDa を組換えタンパク質として大腸菌において発現させ、精製した後、ウサギに免疫して抗 xWRN、抗 xWHIP ウサギ抗血清を得た。両血清を用いて western blotting による解析をおこなった結果、約 170 kDa の位置に泳動されるバンドが抗 xWRN 抗体によって、約 65 kDa の位置に泳動されるバンドが抗 xWHIP 抗体によって検出された。すなわち、xWRN、xWHIP の両者が共に *Xenopus* 卵中に存在することが確認された。

### 3) *Xenopus* 卵抽出液による xRecQL4 の解析

#### *Xenopus RECQL4* (xRECQL4) cDNA

をクローニングした。cDNA 配列から予測されるアミノ酸配列はヒト RecQL4 と比較して約 40%の相同性を有していた。C 末側約 60 kDa を組換えタンパク質として大腸菌で発現させた後、この cDNA 産物に対するウサギ抗体を作製した。この抗体が約 165 kDa の位置に泳動される *Xenopus* 卵抽出液中のタンパク質を特異的に認識したため、*Xenopus* 卵に xRecQL4 が存在し、何らかの働きをしていることが示唆された。

まず、DNA 複製が進行する過程での xRecQL4 の挙動を western blotting により調べたところ、DNA 複製に応じた xRecQL4 のクロマチン画分への顕著な移行は認められなかった。また、この抗体を用いて xRecQL4 を除去した卵抽出液を調製したが、DNA 複製活性に変化は観察されなかった。これらより、RecQL4 は DNA 複製の開始及び進行に関与していないことが示唆された。

次に、DSB を誘導した条件下における xRecQL4 のクロマチンへの結合を検討したところ、RPA の結合に僅かに遅れて xRecQL4 がクロマチン画分に蓄積することが認められた。さらに、UV 照射した精子核クロマチンを基質として用いたり、aphidicolin を反応系に添加したりすることにより DNA 複製の進行を抑制した条件においても、xRecQL4 のクロマチン画分への顕著な蓄積が観察された。これらのことから、DSB の生成や複製

フォーク進行の阻害に応じて RecQL4 がクロマチンに結合し、細胞周期チェックポイント、DNA 傷害発生の予防、DNA 傷害修復などの過程において何らかの役割を担っていることが示唆された。

### 3) WRN との機能的相互作用が予想される種々のタンパク質の解析

出芽酵母を用いた解析などから、RecQ ファミリーDNA ヘリカーゼと機能的な相互作用が予想される多くのタンパク質が確認されている。WRN、WHIP の機能についての分子的理解を深めるため、これらのうちのいくつかについて *Xenopus* における相同タンパク質を確認、単離した。出芽酵母 Sgs1 と遺伝学的な相互作用が見られる DNA トポイソメラーゼ、Top3 については *Xenopus* における cDNA (xTOP3a, xTOP3b) の単離と組換えタンパク質の発現をすでに終えている。やはり、出芽酵母において Sgs1 と遺伝学的相互作用が認められる Mus81 についても *Xenopus* における相同タンパク質の cDNA の単離を終えている。また、DNA ポリメラーゼのサブユニットである Pol31 の *Xenopus* における相同タンパク質についても現在、抗体作製を試みている。今後は、以上のようないくつかのタンパク質と、WRN、WHIP との連関について *Xenopus* 卵抽出液を用いた分子レベルからの解析をすすめていく予定である。

## D. 結論

*Xenopus* 卵抽出液を用いた無細胞実験系における DSB 生成に応じた様々な応答反応をさらに詳細に解析し、昨年度に得られた結果の信頼性を高める事に成功した。今後も、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さらに多岐に渡り揃えていく努力は続けていく予定である。この実験系の中で、xWRN、xWHIP の機能を解析するための準備は今年度の研究実施によりほぼ整ったと考えている。xWRN と xWHIP の会合やクロマチンへの結合などの分子的な動態を種々の条件下で観察しながら、今後利用可能となる指標も駆使して xWRN と xWHIP の遺伝情報安定性への寄与に関する知見を得たいと考えている。

また、ウェルナー症候群と同様に早期老化症状を呈する遺伝病ロスマンド-トムソン症候群の原因遺伝子 RecQL4 の動態に関する知見も蓄積しつつある。xWRN、xRecQL4 の両者の解析を並行しておこない、比較検討することで、両症候群における早期老化症状の理解に繋がると考えている。同様に RecQ ファミリーDNA ヘリカーゼの変異を原因としながら顕著な早期老化症状を示さないブルーム症候群の原因遺伝子産物 BLM についても *Xenopus* 卵抽出液を用いた