

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 榎本 武美

平成16年(2004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-----16

多田 周右

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----25

IV. 研究成果の別刷等 -----26

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

本研究はウェルナー症候群の早期老化機構を、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) の機能を解析することにより分子レベルで解明しようとするものである。研究を進めるにあたって、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、これらのタンパク質の機能を解析するための cell-free 系を確立した。

酵母の DNA polymerase δ の温度感受性変異株や複製後修復に関わるタンパク質の変異株を用いた解析から、Rad18、Mms2 による DNA polymerase δ の鋳型スイッチとは異なる機構で WHIP が鋳型スイッチを行っている可能性が示唆された。

一方、DT40 細胞の遺伝子破壊株を用いた解析から、カンプトテシンによる 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。また、WHIP 破壊株、RAD18 破壊株では SCE が増加し、RAD18/WHIP 二重変異株の SCE はさらに増加していたことから、WHIP と RAD18 は別の経路で機能し、WHIP や RAD18 の機能欠損が相同組換え修復により補完されることが示唆された。

WRN と非相同末端結合修復に関与するタンパク質との関係では、MMS により DNA に傷害を誘起した場合には、WRN は KU70 の下流で機能することが明らかになり、WRN が 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。一方、WRN と複製後修復に関わるタンパク質との関係では、WRN がシスプラチン、UV、MMS による傷害に対しては RAD18 と同じ経路で機能していることが明らかになった。

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、WRN が DNA 複製の進行に応じて一過的にクロマチン上に移行する

こと、aphidicolin 等により DNA 複製の正常な進行を抑制した場合にクロマチン上に強く結合すること、caffeine の添加によるチェックポイント機構の阻害により WRN の結合量がさらに増大することなどが判明した。また、WRN が DNA 二本鎖切断の生成に応じて DNA 複製とは関係なくクロマチン上に結合し機能することが示唆された。

以上の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、さらに大きく前進することができた。

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 の機能を解析するとともに、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おこない、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。15 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した。とくに、DT40 細胞を用いて WHIP あるいは WRN と DNA 修復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多数作製し、解析をおこなった。また、アフリカツメガエル卵抽出液を用いた cell-free 系では、同じ RecQ ファミリー属し、その欠損によりウェルナー症候群と同様に早老症を呈するロスモンド-トムソン症候群の原因遺伝子産物、RecQL4 の機能の解析もおこなった。

B. 研究方法

1) 出芽酵母の DNA polymerase δ の温度感受性変異株に WHIP、RAD18、MMS2、SGS1、RAD52 などの変異を導入したり、野生型や変異した PCNA を発現させることにより、WHIP、WRN (酵母では Sgs1) の機能を解析した。また、SGS1 の変異と合成致死になる、MMS4 の機能も解析した。

2) 昨年に引き続き 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、BLM/RAD18、WRN/KU70、WRN/DNA-PKcs、WRN/RAD52)、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) 確立したアフリカツメガエル卵抽出液を用いた DNA 複製修復系で DNA 傷害時の WRN や WHIP の動態を解析した。また、WRN の動態に及ぼす Rad51、RPA の影響を調べた。さらに同様の解析を RecQL4 についてもおこなった。

(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、WRN (Sgs1) の機能の解析

DNA 複製酵素である DNA polymerase δ 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 δ 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、この RFC と yWHIP は相同性をもつ。昨年度までの解析で、yWHIP と DNA polymerase δ 、RFC、PCNA との機能的関連が示唆された。

さらに、DNA polymerase δ のサブユニットの変異株 (*pol32*) を用いた解析から、DNA polymerase δ の温度感受性や、ヒドロキシウレア (HU) 感受性が、yWHIP 遺伝子を破壊することにより抑制されることがわかり、DNA polymerase δ と yWHIP との機能的関連が一層明確になった。また、このような抑制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起こることがわかった。

本年度はさらに、DNA polymerase δ の別の変異株を用いて、yWHIP や *RAD18*、*MMS2* 遺伝子の破壊により DNA polymerase δ の温度感受性やヒドロキシウレア (HU) 感受性が、抑制されることを確認した。従って、yWHIP は Rad18 や Mms2 と同様な機能をしていると考えられる。実際、出芽酵母では、yWHIP と *RAD18* の変異で合成致死になることが報告されている。

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。そこで、yWHIP の機能を知る目的で、Rad18、Mms2 の機能を解析した。

近年、Rad18 により、PCNA がユビキチン化されることが報告された。

そこで、PCNA を DNA polymerase δ の温度感受性変異株に過剰発現させたところ、許容温度でも増殖が阻害され、ヒドロキシウレア (HU) 感受性が増大した。一方、PCNA のユビキチン化を受けるリジンをアルギニンに変えた変異 PCNA を過剰発現させた場合は、増殖の阻害や HU 感受性の増大は観察されなかった。また、DNA polymerase δ の温度感受性変異株の *RAD18* 遺伝子を破壊すると、どちらの PCNA を過剰発現しても阻害が起きなかった。さらに、*MMS2* 又は *RAD5* を破壊しても同様な結果がえられた。Rad18、Mms2、Rad5 は同一の経路に属し、ポリユビキチン化に関与することから、DNA polymerase δ の温度感受性変異株に PCNA を過剰発現した時に観察された現象は PCNA のポリユビキチン化が関与していると考えられる。したがって、yWHIP も PCNA をポリユビキチン化した時と同じ状況を作り出していると考えられる。Rad18、Mms2 の機能として、DNA に障害があると、複製酵素を DNA からはずして別の鋳型に乗せる鋳型スイッチが提唱されている。したがって、*RAD18* や *MMS2* の変異により、Rad18、Mms2 による PCNA のポリユビキチン化による DNA polymerase δ の鋳型スイッチが抑制されることにより、DNA polymerase δ の温度感受性変異株では複製装置の DNA polymerase δ が安定化されると考えられる。yWHIP はポリユビキチン

化とは異なる機構で鋳型スイッチを行っているものと考えられる。

一方、SGS1 や RAD52 のような相同組換えで働く遺伝子の破壊により、DNA polymerase δ の温度感受性変異株の増殖能は著しく低下した。

2) *SGS1* 変異と合成致死になる *MMS4* 遺伝子破壊株の解析

DNA 複製中に何らかの理由で複製フォークが停止すると、新生鎖同士が巻き戻って Holliday junction 様の構造が生み出される。この Holliday junction 構造を巻き戻して複製フォークを再生することが Sgs1 の機能の一つとして考えられている。この Holliday junction 構造は Mms4-Mus81 複合体のもつヌクレアーゼ活性の基質でもあり、*sgs1* 株では Sgs1 が機能しないため Holliday junction 構造が Mms4-Mus81 によって二本鎖切断に変換され、この二本鎖切断が組換えで修復されるため組換え頻度が亢進するとも考えられる。一方、MMS などの DNA 傷害剤により DNA に傷害を与えた場合には、Sgs1 は Top3 とともに働いて組換え経路で機能する。この Sgs1 と Top3 の組換え経路における機能として、Holliday junction の解消が考えられている。一方、SGS1 遺伝子の変異と合成致死になる遺伝子のスクリーニングにより、我々のグループ及び他のグループにより、*MMS4* 遺伝子が同定された。そこで *MMS4* 遺伝子破壊株を作製し、その

性状を解析した。

MMS4 遺伝子破壊株は増殖には欠陥を示さなかったが、MMS、紫外線、4NQO などの DNA 傷害剤や、DNA 合成を阻害する HU に対して感受性であったことから、Mms4 が DNA の傷害の修復、あるいは、DNA の傷害により崩壊した DNA 複製装置の再形成に関与していることが示唆された。そこで、Mms4 がどのような修復経路に関与しているのかを解析する目的で、種々の修復経路やチェックポイントに関与するタンパク質をコードする遺伝子と *MMS4* 遺伝子との二重遺伝子破壊株を作製して、MMS 感受性を指標にして epistasis 解析をおこなった。複製後修復に関わる *RAD6* 遺伝子、複製後修復に修復を切り換える *SRS2* 遺伝子、塩基除去修復に関わる *APNI* 遺伝子、ヌクレオチド除去修復に関わる *RAD14* 遺伝子及び、チェックポイントに関わる *RAD53* 遺伝子、*RAD17* 遺伝子と *MMS4* 遺伝子との二重破壊株は、それぞれの遺伝子の単独破壊株より高い MMS 感受性を示したが、*MMS4* 遺伝子と *RAD52* 遺伝子との二重破壊株は *RAD52* 遺伝子単独破壊株と同程度の感受性を示したことから、Mms4 が相同組換え経路で機能していることが示唆された。また、*MMS4* 遺伝子破壊株に Holliday junction を切断する RusA をコードする遺伝子を導入したところ *MMS4* 遺伝子破壊株の MMS 感受性が抑制された。一方、*SGS1* 遺伝子破壊株に RusA

をコードする遺伝子を導入しても MMS 感受性は抑制されなかった。

3) DT40 細胞を用いた WHIP と WRN 及び RAD18 との機能的関連の解析

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い、WHIP 単独破壊株がカンプトテシンに対して感受性を示すこと、カンプトテシンによる傷害に対し、WHIP と WRN は別の経路で機能することを明らかにした。また、BLM 破壊株の SCE の形成においては、WHIP の破壊により SCE が増加し、WRN の破壊で減少するという全く反対の機能があることが判明した。

1)の酵母を用いた解析から、yWHIP と Rad18 の両者が DNA polymerase δ に対して類似した機能をもつことが明らかになった。また、yWHIP と RAD18 の変異により合成致死になる。そこで RAD18/WHIP 二重変異株を作製した。この二重変異株の増殖は野生株とほとんど変わらず、RAD18 と WHIP を同時に欠損させても高等真核細胞では致死にならないことが判明した。

WHIP 破壊株では SCE が野生株に比べ若干増加し、RAD18 破壊株の SCE

は WHIP 破壊株より多く、RAD18/WHIP 二重変異株の SCE はさらに増加していた。したがって、WHIP や RAD18 の機能欠損が相同組換え修復により補完されると考えられる。

WHIP 破壊が感受性を示すカンプトテシンに対して、RAD18 破壊株は非常に高い感受性を示し、この高い感受性は WHIP 破壊により若干抑制された。したがって、カンプトテシンによる傷害に関しては、WHIP と RAD18 は何らかの機能的関連をもつと考えられる。

4) WRN と非相同末端結合修復との関係

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) と非相同末端結合修復 (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。そこで、WRN/KU70、WRN/DNA-PKcs 二重破壊株を作製し、DNA トポイソメラーゼ II 阻害剤であるエトポシド、ICRF-193 に対する感受性を測定した。

KU70、*DNA-PKcs* 単独破壊株は、エトポシド、ICRF-193 に対して非常に高い感受性を示したが、*WRN* 単独破壊株の感受性は野生株とほぼ変わらず、二重破壊株の感受性は *KU70*、*DNA-PKcs* 単独破壊株の感受性と同程度であった。このことから、エトポシド、ICRF-193 により生じる DNA 傷害の修復に機能する NHEJ に *WRN* は関与していないことが示唆された。

一方、MMS に対する *KU70* 単独破壊株の感受性は野生株と同程度であり、*WRN* 単独破壊株は野生株に比べ高い感受性を示し、*WRN/KU70* 二重破壊株の感受性は野生株と同程度であった。即ち、*WRN* 単独破壊株の MMS 感受性は *KU70* 遺伝子の破壊により抑制される。この事実は *WRN* が、MMS で生じた DNA 傷害を修復する過程で *KU70* に依存して機能していることを示している。MMS による DNA 傷害が *KU* により認識され、*WRN* を介してより間違いの少ない HRR 修復経路で修復されている可能性が考えられる。*BLM/KU70* 二重破壊株の感受性は各単独破壊株の感受性よりも高かったことから、*WRN/KU70* 破壊株に見られる表現型は、RecQ に共通のものではなく *WRN* に特異的なものであると考えられる。

5) *WRN* と相同組換え修復との関係

カンプトテシンを処理した際に生じる DSB に *WRN* とともに相同組換え (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 HR 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、HR に関与する *XRCC3* あるいは *RAD52* と *WRN* との二重破壊株、*WRN/XRCC3*、*WRN/RAD52* を作製した。*WRN/XRCC3* 二重破壊株はシスプラチン、カンプトテシン、MMS などの DNA 傷害剤に対して、単独破壊株より高い感受性を示した。この結果は、*WRN* がこれらの DNA 傷害剤により生じる損傷に対して、*XRCC3* が関与する HR とは異なる DNA 修復経路において機能していることを示している。しかしこの結果は、*WRN* が HR に関与することを完全に否定するものではない。

DT40 細胞において *XRCC3* は *RAD52* と合成致死性を示し、両者は HR において相補的に機能することが報告されている。また最近、*WRN* と *RAD52* とが相互作用し、*RAD52* は *WRN* の酵素活性を調節し、*WRN* は *RAD52* が介する strand annealing の効率を上昇させることが報告された。したがって *WRN* は *RAD52* の関わる HR 経路で機能している可能性が考えられる。最近、*WRN/RAD52* 二重変異株の作製に成功したので、*WRN* と *RAD52* との関係が近い将来解明できるものと思われる。

6) *WRN* と複製後修復との関係

WRN が DNA polymerase δ 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 δ 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。本年度は、この *RAD18/WRN* 二重変異株の示す DNA 傷害剤に対する感受性を詳細に解析した。

RAD18/WRN 二重破壊株のシスプラチン、UV、MMS に対する感受性は *RAD18* 単独破壊株の感受性と同程度であり、カンプトテシンに対する感受性は *RAD18*、*WRN* それぞれの単独破壊株の感受性よりも高かった。この結果は、*WRN* がシスプラチン、UV、MMS による傷害に対しては *RAD18* と同じ経路で機能しており、カンプトテシンによる傷害に対しては別経路で機能することを意味している。同時に行った *RAD18/BLM* 二重破壊株の各種 DNA 傷害剤に対する感受性は、それぞれの単独破壊株の感受性よりも高かったことから *RAD18/WRN* 二重破壊株に見られる表現型は、*RecQ* 共通に見られるのものではなく *WRN* に特異的なものであると考えられる。

WRN は DNA polymerase δ をはじめとして、複製因子である PCNA、FEN-1、RPA と相互作用することが報告されている。この事実を考え合わせると、*WRN* は、*RAD18* が機能する鋳型スイッチ型の複製後修復経路で機能し

ている可能性が考えられる。

7) 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

DNA 傷害認識・修復過程を再現した無細胞実験系を用いた解析をすすめた結果、DNA 二本鎖切断に応じて傷害部位に Rad51 が結合し DNA 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。aphidicolin 感受性の DNA ポリメラーゼのうち DNA polymerase α 、 ϵ が DNA 二本鎖切断に応じて顕著にクロマチン上に結合することが確認され、これらのうち DNA polymerase ϵ の結合については Rad51 の機能に関係することが示唆された。

この実験系を用い、*WRN*、WHIP の動態について解析をおこなった。まず、*Xenopus* 卵抽出液中で両者の相互作用について検討したがこれを見いだすことは出来なかった。次いで、*WRN* の動態について検討したところ、*WRN* が DNA 複製の進行に応じて一過的にクロマチン上に移行すること、aphidicolin 等により DNA 複製の正常な進行を抑制した場合にクロマチン上に強く結合すること、caffeine の添加によるチェックポイント機構の阻害により *WRN* の結合量がさらに増大することなどが認められた。また、*WRN* が DNA 二本鎖切断の生成に応じて DNA 複製とは関係なくクロマチン上に結合し機能することが示唆された。この DNA 二本鎖切断に応じた

WRN のクロマチン結合は実験系から RPA を除去することにより消失したが、Rad51 のクロマチン結合を阻害した場合には認められたことから WRN の機能は RPA の下流に位置しているが、Rad51 の機能には依存していないと推察された。

ロスモンド・トムソン症候群原因遺伝子産物 RecQL4 についても本実験系を用いて解析をおこなったが、WRN で認められるものと同様の挙動を示した。さらに、RecQL4 については、実験系から除いた場合に Rad51 のクロマチン結合に若干の遅れが観察されること、Rad51 のクロマチン結合を阻害した場合に、RecQL4 のクロマチン結合量が低下することなども認められた。これにより RecQL4 と Rad51 のクロマチン結合に相互の依存性はないものの、相同組換え修復過程において互いに影響を及ぼしながら機能することが示唆された。

D. 結 論

酵母の DNA polymerase δ の温度感受性変異株や複製後修復に関わるタンパク質の変異株を用いた解析から、Rad18、Mms2 による PCNA のポリユビキチン化による DNA polymerase δ の鑄型スイッチとは異なる機構で WHIP が鑄型スイッチを行っている可能性が示唆された。

また、DT40 細胞の遺伝子破壊株を用いた解析から、カンプトテシンに

よる 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。

RAD18/WHIP 二重破壊株の増殖は野生株とほとんど変わらず、*RAD18* と *WHIP* を同時に欠損させても高等真核細胞では致死にならないことが判明した。*WHIP* 破壊株、*RAD18* 破壊株では SCE が増加し、*RAD18/WHIP* 二重変異株の SCE はさらに増加していたことから、WHIP や *RAD18* の機能欠損が相同組換え修復により補完されると考えられる。

WRN と非相同末端結合修復との関係では、MMS により DNA に傷害を誘起した場合には、WRN は KU70 の下流で機能することが明らかになり、WRN が 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。一方、WRN と相同組換え修復との関係では、シスプラチン、カンプトテシン、MMS などによる DNA 傷害に対して、WRN は XRCC3 が関与する相同組換え経路とは異なる DNA 修復経路で機能していることが判明した。WRN が *RAD52* が関与する組換え経路で機能するかどうかを確認することが今後に残された課題である。

WRN と複製後修復との関係では、WRN がシスプラチン、UV、MMS による傷害に対しては *RAD18* と同じ経路で機能していることが明らかになった。*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、WRN の DNA 修復における機能を知る上で、重要な発見をしたことになる。

以上の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、さらに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) 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.
- 2) Wang, W., Seki, M., Narita, Y., Nakagawa, T., Yoshimura, A., Otsuki, M., Kawabe, Y., Tada, S., Yagi, H., Ishi, Y., Enomoto, T. (2003) Functional relation among RecQ family helicases, RecQL1, RecQL5, and BLM in cell growth and SCE formation. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 3527-3535.
- 3) Isik, S., Sano, K., Tsutsui, K., Seki, M., Enomoto, T., Saitoh, H., Tsutsui, K. (2003) The SUMO pathway is required for selective degradation of DNA topoisomerase II β induced by a catalytic inhibitor ICRF-193. *FEBS Lett.* **546**, 374-378.
- 4) Maeda, D., Seki, M., Onoda, F., Branzei, D., Kawabe, Y., and Enomoto, T. (2004) Ubc9 is required for damage-tolerance and damage-induced interchromosomal homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* **3**, 335-341.
- 5) Wang, W., Seki, M., Otsuki, M., Tada, S., Takao, N., Yamamoto, K.-i., Hayashi, M., Honma, M., and Enomoto, T. (2004) The absence of a functional relationship between ATM and BLM, the components of BASC, in DT40 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1688**, 137-144.
- 6) Onoda, F., Takeda, M., Seki, M., Maeda, D., Tajima, J., Ui, A., Yagi, H., and Enomoto, T. *SMC6* is required for MMS-induced interchromosomal and sister chromatid recombinations in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA*

Repair 3, 429-439.

- 7) Branzei, D., and Enomoto, T. (2004)
Proteins that interact with the
Werner syndrome gene product.
*Molecular mechanism of Werner's
syndrome*, edited by Michel Lebel,
Eurekah. com. in press.

2. 口頭発表

- 1) 小野田文俊、田島純一、関政幸、
多田周右、榎本武美
Smc6 タンパク質が関与する染
色体安定化機構の解析
第3回細胞核ダイナミックス研
究会
2003年5月22日
- 2) 榎本武美
早老症、Werner 症候群原因遺伝
子産物の機能の遺伝学的、生
化学的解析
日本生化学会東北支部第69回
例会・シンポジウム
2003年6月7日
- 3) 関政幸、榎本武美
DNA 修復・組換えにおけるユ
ビキチン化、SUMO 化の役割
国立遺伝学研究所研究集会「ユ
ビキチンファミリー-SUMO によ
る修飾コードの解読」
2003年6月27日
- 4) 榎本武美

ブルーム症候群の高発癌性の分
子機構

がん特定研究「発がんと防御」

2003年8月5日

- 5) Fumitoshi Onoda, Jun-ichi Tajima,
Masahiro Takeda, Daisuke Maeda,
Masayuki Seki, Takemi Enomoto
Involvement of budding yeast
Smc6 in cell proliferation and
DNA repair
第4回文部科学省特定領域研究
「がん」6 領域若手研究者ワー
クショップ
2003年8月27日
- 6) 大槻誠、関政幸、川辺洋一、古
川真也、井上絵里、多田周右、
榎本武美
DT40 細胞を用いた早老症ウエ
ルナー症候群遺伝子産物のDNA
修復における機能解析
日本遺伝学会第75回大会
2003年9月24日
- 7) 荻原秀明、宇井彩子、関政幸、
小野田文俊、多田周右、榎本武
美
Saccharomyces cerevisiae Dpb11
functions in DNA repair
日本遺伝学会第75回大会
2003年9月24日
- 8) Sei Watanabe, Fumitoshi Onoda,
Jun-ichi Tajima, Masahiko Harata,

- Ulrike Wintersberger, Masayuki Seki, Takemi Enomoto
The function of *S.cerevisiae* Arp4 in maintenance of nuclear structure
日本遺伝学会第 75 回大会
2003 年 9 月 24 日
- 9) 関政幸、多田周右、榎本武美
早老症ウェルナー症候群遺伝子産物 (WRN) に相互作用する WHIP の解析
第 62 回日本癌学会総会
2003 年 9 月 25 日
- 10) Takemi Enomoto
Functions of RecQ helicases and DNA topoisomerase.
The 20th RBC International Symposium: Genome repair dynamics and human diseases.
2003 年 10 月
- 11) 関政幸、榎本武美
DNA 複製フォーク停止時のユビキチンの役割
国立遺伝学研究所研究集会「ユビキチン系を介した DNA 損傷応答のメカニズム」
2003 年 10 月 1 日
- 12) Ayako Ui, Masayuki Seki, Fumitoshi Onoda, Takemi Enomoto
Budding yeast RecQ helicase, SGS1, is involved in recombination repair.
第 76 回生化学会大会
2003 年 10 月 15 日
- 13) Masayuki Seki, Daisuke Maeda, Dana Brnzei, and Takemi Enomoto
Ubc9 is required for damage-tolerance in *S. cerevisiae*.
第 76 回生化学会大会
2003 年 10 月 15 日
- 14) 高橋由梨子、関政幸、中川学之、関剛彦、小林貴之、多田周右、榎本武美
ニワトリ DT40 細胞を用いた DNA トポイソメラーゼ III α の機能の解析
第 42 回日本薬学会東北支部会
2003 年 10 月 19 日
- 15) 熊田裕司、多田周右、小林貴之、董宇鵬、二藤望、関政幸、榎本武美
ロスモンド-トムソン症候群原因遺伝子産物の機能における *Xenopus* 卵抽出液を用いた生化学的解析
第 42 回日本薬学会東北支部会
2003 年 10 月 19 日
- 16) 伊能克敏、多田周右、関剛彦、関政幸、福永浩司、榎本武美
新規染色体構造維持タンパク質複合体の機能に関する生化学的

解析

第 42 回日本薬学会東北支部会
2003 年 10 月 19 日

- 17) Yuji Kumata, Shusuke Tada, Takayuki Kobayashi, Dong Yu Ping, Masayuki Seki and Takemi Enomoto
Analysis of the function of *Xenopus* RecQL4 in DNA repair process.
The 4th 3R SYMPOSIUM
2003 年 11 月 9 日
- 18) Takashi Tsuyama, Shusuke Tada, Saori Watanabe, Masayuki Seki, Takemi Enomoto
Chromatin association of Cdc6 is prerequisite for Cdt1 function.
The 4th 3R SYMPOSIUM
2003 年 11 月 9 日
- 19) Takeshi Mizuno, Ken-ichiro Yanagi, Yasuyuki Miyake, Toshihiko Eki, Shusuke Tada, Takemi Enomoto and Fumio Hanaoka
Mouse and *C. elegans* Geminin Inhibit not only Cdt1-Mcm6 Interaction but also a Novel Intrinsic Cdt1 DNA binding Activity
The 4th 3R SYMPOSIUM
2003 年 11 月 9 日
- 20) Tsurimoto, T., Shiomi, Y., Seki, M., Enomoto, T., Sugimoto, K., Usukura, J
Structure and function of RFC-family protein complexes
The 4th 3R SYMPOSIUM
2003 年 11 月 9 日
- 21) Dana Branzei, Masayuki Seki, and Takemi Enomoto
UBC9/SUMO modification pathway is involved in the DNA damage response and regulation of replication fork recovery in budding yeast
The 4th 3R SYMPOSIUM
2003 年 11 月 9 日
- 22) 荻原秀明、宇井彩子、関政幸、小野田文俊、多田周右、榎本武美
DNA 傷害時における出芽酵母 Dpb11 の機能の検討
第 26 回日本分子生物学会年会
2003 年 12 月 10 日
- 23) Toshiki Tsurimoto, Yasushi Shiomi, Masayuki Seki, Takemi Enomoto, Sugimoto Katsunori
Signaling networks for genome integrity by RFC family proteins
第 26 回日本分子生物学会年会
2003 年 12 月 10 日
- 24) 津山崇、多田周右、関 政幸、

- 榎本武美
WRN ヘリカーゼと WHIP/Mgs1
の DNA 傷害誘発時における挙
動の解析
第 26 回日本分子生物学会年会
2003 年 12 月 10 日
- 25) 多田周右、小林貴之、関政幸、
榎本武美
Xenopus 卵抽出液無細胞実験系
を用いたゲノム安定性維持機構
の解析
第 26 回日本分子生物学会年会
2003 年 12 月 10 日
- 26) 大槻誠、関政幸、川辺洋一、
古川真也、井上絵里、多田周右、
榎本武美
高等動物細胞の DNA 修復にお
けるウェルナー症候群遺伝子産
物の役割
第 26 回日本分子生物学会年会
2003 年 12 月 10 日
- 27) 伊能克敏、多田周右、関剛彦、
関政幸、福永浩司、榎本武美
細胞周期における SMC5/SMC6
複合体の解析
第 26 回日本分子生物学会年会
2003 年 12 月 10 日
- 28) 田島純一、小野田文俊、関政
幸、榎本武美
細胞増殖における出芽酵母
Smc6 の機能の解析
第 26 回日本分子生物学会年会
2003 年 12 月 10 日
- 29) 渡部聖、小野田文俊、田島純
一、原田昌彦、Ulrike
Wintersberger、関政幸、榎本武
美
出芽酵母 Arp4 タンパク質が関
与する核構造形成機構の解析
第 26 回日本分子生物学会年会
2003 年 12 月 10 日
- 30) 柳憲一郎、水野武、浴俊彦、
津山崇、多田周右、榎本武美、
花岡文雄
線虫 Cdt1 の cDNA クローニン
グと機能解析
第 26 回日本分子生物学会年会
2003 年 12 月 10 日
- 31) 小野田文俊、渡部聖、田島純
一、原田昌彦、Ulrike
Wintersberger、関政幸、榎本武
美
核構造の形成における出芽酵母
Arp4 タンパク質の機能の解析
第 21 回染色体ワークショップ
2004 年 1 月 29 日
- 32) 田島純一、小野田文俊、関政
幸、榎本武美
出芽酵母 *Smc6* が関与する細胞
増殖に必須な機能の解析
第 21 回染色体ワークショップ
2004 年 1 月 29 日

33) 榎本武美

真核細胞の DNA 複製フォーク
の障害回避と組換え及び、複製
フォークの再生

横浜市立大学木原生物学研究所
セミナー「核機能とクロマチン
ダイナミックス」

2004 年 3 月 19 日

34) 大槻誠、関政幸、川辺洋一、
古川真也、井上絵里、多田周右、
榎本武美

DNA 修復におけるウェルナー
症候群原因遺伝子産物の機能

第 124 年会日本薬学会

2004 年 3 月 29 日

35) 熊田裕司、多田周右、小林貴
之、関政幸、榎本武美

DNA 傷害時における *Xenopus*

RecQL4 の挙動の解析

第 124 年会日本薬学会

2004 年 3 月 29 日

36) 関政幸、吉村明、榎本武美

脊椎動物細胞におけるカンプロ
テシン損傷乗り越え機構

第 124 年会日本薬学会

2004 年 3 月 29 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

DNA 傷害認識・修復過程を再現した無細胞実験系を用いた解析をすすめた結果、DNA 二本鎖切断に応じて傷害部位に Rad51 が結合し DNA 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。aphidicolin 感受性の DNA ポリメラーゼのうち DNA ポリメラーゼ α 、 ϵ が DNA 二本鎖切断に応じて顕著にクロマチン上に結合することが確認され、これらのうち DNA ポリメラーゼ ϵ の結合については Rad51 の機能に関係することが示唆された。

この実験系を用い、WRN、WHIP の動態について解析をおこなった。まず、*Xenopus* 卵抽出液中で両者の相互作用について検討したがこれを見いだすことは出来なかった。次いで、WRN の動態について検討したところ、WRN が DNA 複製の進行に応じて一過的にクロマチン上に移行すること、aphidicolin 等により DNA 複製の正常な進行を抑制した場合にクロマチン上に強く結合すること、caffeine の添加によるチェックポイント機構の阻害により WRN の結合量がさらに増大することなどが認められた。また、WRN が DNA 二本鎖切断の生成に応じて DNA 複製とは関係なくクロマチン上に結合し機能することが示唆された。この DNA 二本鎖切断に応じた WRN のクロマチン結合は実験系から RPA を除去することにより消失したが、Rad51 のクロマチン結合を阻害した場合には認められたことから WRN の機能は RPA の下流に位置しているが、Rad51 の機能には依存していないと推察された。ロスモンド・トムソン症候群原因遺伝子産物 RecQL4 についても本実験系を用いて解析をおこなったが、WRN で認められるものとはほぼ同様の挙動を示した。さらに、RecQL4 については、実験系から除いた場合に Rad51 のクロマチン結合に若干の遅れが観察されること、Rad51 のクロマチン結合を阻害した場合に、RecQL4 のクロマチン結合量が低下することなども認められた。これにより RecQL4 と Rad51 のクロマチン結合に相互の依存性はない

ものの、相同組換え修復過程において互いに影響を及ぼしながら機能することが示唆された。

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して解析をおこなった。

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 についても同様の解析をすすめた。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 ヘ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。

昨年度までの解析より、*Xenopus*

卵抽出液を用いてクロマチン上の傷害の検出と、これに対する細胞内応答および傷害修復過程の再現について報告した。また、*Xenopus* における WRN、WHIP、RecQL4 の cDNA 単離、抗体作製、卵抽出液中での存在の確認をおこなった。さらに、RecQL4 については、DNA 二本鎖切断や DNA 複製の進行に障害を与えることでクロマチン上に蓄積することを昨年度報告書で報告した。本年度はこれらの成果をもとに、さらに WRN、WHIP、RecQL4 の生化学的動態の理解を深めることを目指した。

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。両者を混合することにより約 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。

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 によって展開されたタンパク質を PVDF 膜に転写した。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

昨年度までに、DNA 二本鎖切断に応じた細胞周期チェックポイントの発動、 γ -H2AX、RPA、Rad51 の DNA 傷害部位への蓄積、DNA 複製によらない DNA 合成の誘起を卵抽出液中で再現することに成功した。また、ここで見られた DNA 合成が aphidicolin に感受性であることから、これが DNA ポリメラーゼ α 、 δ 、 ϵ 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ことを昨年度報告書に報告した。本年度はこの DNA 合成に注目して解析を進めた。

DNA 二本鎖切断誘導後に卵抽出液よりクロマチン画分を単離し、DNA ポリメラーゼ α 、 δ 、 ϵ のクロマチンへの結合について western blotting により検討した。その結果、これら 3 つの DNA ポリメラーゼすべてについて DNA 二本鎖切断に応じたクロマチン上への結合が観察された。とくに、DNA ポリメラーゼ α 、 ϵ の 2 つについては極めて顕著なものであった。

これらの DNA ポリメラーゼうちのいずれが DNA 組換え反応に関係するかを検討するために、BRCA2 の BRC リピートのうちのひとつ (BRC4) を組換えタンパク質として

発現させ、卵抽出液に導入した。BRCA2 は Rad51 の DNA 二本鎖切断部位への導入に必須なタンパク質であり、その一部のみを発現させた BRC4 は細胞レベルで Rad51 の核内におけるフォーカス形成を阻害することが示されている。今回、このタンパク質を卵抽出液中に添加することにより、DNA 二本鎖切断に応じた Rad51 のクロマチン結合を完全に阻害することに成功した。このとき、DNA ポリメラーゼ α のクロマチン結合の程度には影響を与えることなく、DNA ポリメラーゼ ϵ のクロマチン結合が著しく抑制された。したがって、少なくとも本研究の条件下では DNA 組換え機構に依存して DNA ポリメラーゼ ϵ が機能することが示唆された。

2) *Xenopus* 卵抽出液による WRN、WHIP の動態の解析

Xenopus の WRN、WHIP に対する抗体を作成し、WRN、WHIP の動態について *Xenopus* 卵抽出液を用いて検討をおこなった。まず、各抗体を用いて卵抽出液より免疫沈降をおこなった。抗 WRN、抗 WHIP の各抗体はそれぞれ特異的に認識される約 170 k、約 65 k のタンパク質を免疫沈降法により沈降させた。しかしながら、抗 WRN 抗体を用いた沈降画分に WHIP は検出されず、また逆に、抗 WHIP 抗体を用いた沈降画分に WRN は検出されなかった。このことは、抽出液中に存在する状態では WRN