

と WHIP とは相互作用することなく存在することを示唆している。クロマチン存在下や DNA 傷害誘導時などにこの相互作用に変化が見られるのかについて今後興味を持たれる。

次いで、WRN のクロマチン結合について検討をおこなった。まず、DNA 傷害や DNA 複製の停止を誘起せずに通常の DNA 複製を無細胞的に再現した場合の挙動について検討した。精子核クロマチン添加 5 分後より WRN の結合が確認され、30~60 分頃にピークに達したのちクロマチン上より消失した。この結合のピークは DNA 複製に依存した RPA のクロマチン結合開始時期とほぼ一致していた。また、DNA 複製前複合体形成を抑制する *geminin*、DNA 複製開始に必須な CDK 活性を抑制する p21 の添加により、この結合量の一過的な増加が観察されなくなった。これらの結果より DNA 複製に関連して WRN がなんらかの形で機能するものと考えられた。

さらに、aphidicolin を用いて DNA 複製の伸長反応を阻害したところ、WRN のクロマチンへの結合が増加した。この結合は *caffeine* の添加によりさらに増強されることから、WRN は複製フォークまたは一本鎖 DNA の存在によりクロマチン上に移行して機能すること、また ATR を介したチェックポイント機構による影響を受けていることが示唆された。ここで見られた WRN のクロマチン結合は

aphidicolin を除くことにより極めて速やかに消失した。

同様の結果は精子核クロマチンに UV 照射による傷害を誘起した場合にも見られたが、DNA トポイソメラーゼ I 阻害剤であり、DNA 複製に応じて DNA 二本鎖切断 (DSB) を誘導するカンプトテシン (CPT) を用いた際には観察されなかった。いずれの処理も DNA 複製の部分的な抑制をもたらすが、CPT による抑制がチェックポイント機構の解除により完全に回復されるのに対し、UV 照射による抑制はチェックポイント機構に依らない DNA 複製の障害によるものであることが確認された。すなわち、aphidicolin 処理の結果と併せて、WRN の機能が DNA 複製の進行に対する障害に対処するために要求されるものと推測された。

WRN の DSB 誘導時の機能を確認する目的で制限酵素 *EcoRI* を反応系に加えた際の WRN の挙動について検討した。その結果、この場合にも WRN のクロマチン上への蓄積が観察された。ただし、この結合量の増加は *geminin* の添加によっても影響されなかったため、DSB 誘導時の WRN の結合は DNA 複製の障害が原因ではなく、DSB の生成に依存したものであることが示された。

この *EcoRI* 添加による WRN のクロマチン結合は RPA の除去により消失したが、BRC4 添加による Rad51 のクロマチン結合の阻害によって影

響を受けることはなかったため、DSB 誘導時の WRN の機能は RPA の下流に位置しているが、Rad51 の機能には依存しないことが示唆された。

### 3) *Xenopus* 卵抽出液による RecQL4 の解析

昨年度報告書に、*Xenopus* 卵抽出液無細胞実験系を用いた際に DSB の誘導、DNA 複製に対する障害の誘起によって RecQL4 のクロマチン結合が増加することを報告した。本年度は、この知見についてさらに詳細な検討をおこなった。

*Xenopus* 卵抽出液中の精子核クロマチンに *EcoRI* あるいはメチルメタンシルホン酸 (MMS) によって DSB を誘導した場合や、aphidicolin の反応系への添加、精子核クロマチンの UV 処理によって DNA 複製に障害を与えた際の RecQL4 の挙動について検討した。MMS、aphidicolin、UV 処理時の RecQL4 のクロマチン結合は、DNA 複製開始を阻害する geminin の添加により観察されなくなり、caffeine を添加することにより増加した。これらの結果より、*EcoRI* 添加時以外の場合の xRecQL4 のクロマチン結合は DNA 複製に依存し、チェックポイント機構によって負の制御を受けていることが示唆された。

経時的な解析から、*EcoRI* によって誘起される RecQL4 のクロマチン結合が相同組換え修復機構に関与している可能性が考えられたため、

*Xenopus* 卵抽出液より xRecQL4 を免疫除去したのち DSB 修復機構に關与するタンパク質の挙動について検討した。このとき、Mre11、RPA の挙動に対する影響は認められなかったが、Rad51 のクロマチン結合に若干の遅れが観察された。

RPA 免疫除去抽出液を用いて同様の実験をおこなったところ、Mre11 のクロマチン結合に変化は無かったが、RecQL4、Rad51 のクロマチン結合は抑止された。BRC4 を *Xenopus* 卵抽出液に添加し Rad51 のクロマチン結合を阻害した場合には、RecQL4 のクロマチン結合量が低下した。以上の結果より、DSB の生成によって誘起される RecQL4 のクロマチン結合が RPA に依存することが示唆された。また、RecQL4 のクロマチン結合は部分的に Rad51 に依存しているものと考えられた。これらの結果より、DSB に対する相同組換え修復過程において RecQL4 と Rad51 が、お互いに影響を及ぼし合いながら機能していることが示唆された。

### D. 結論

昨年度までに DSB 生成に応じた様々な応答反応を *Xenopus* 卵抽出液を用いて無細胞的に再現することに成功したことを報告したが、本年度の解析より、Rad51 を介した相同組換え修復過程に DNA ポリメラーゼ  $\epsilon$  が機能していることが示唆された。今後も種々の DNA ポリメラーゼの役

割を含め、DSB 修復過程を始めとする染色体構造安定化機構に関与する様々なタンパク質の機能を分子レベルから明らかにする基盤として本実験系が有効に活用されていくことが期待される。そのためにも、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必要があると考えている。

この実験系を用い、代表的な早老症であるウェルナー症候群、およびロスモンド・トムソン症候群原因遺伝子産物 (WRN、RecQL4) の動態について解析をおこない、種々の知見を得ることに成功した。WRN、RecQL4 のいずれも DNA 複製の異常な停止に伴いクロマチン上に蓄積することが認められた。これらの結果は両者が DNA 複製停止の回復に重要な役割を果たすことを予想させた。これらは DNA 複製フォークを復帰可能な状態で維持するために必要なのではないかと考えている。さらに、チェックポイント機構を阻害することで両者の結合量が増大することから、これらのタンパク質がチェックポイント機構の起点あるいは経路点として負のフィードバックを受けている可能性も考えられる。これらの仮説を基に今後のさらなる解析を進めていく予定である。

また、WRN、RecQL4 の両者とも DSB の生成に応じて DNA 複製とは関係なく RPA の機能に依存するかたちでクロマチン上に結合し機能する

ことが示唆された。とくに RecQL4 については Rad51 との機能的な連携を推測させる知見も得られ、相同組換え修復機構への関与についても興味を持たれる。

本研究で得られた結果からは WRN と RecQL4 の両者の挙動に明確な違いが認められない。ブルーム症候群原因遺伝子産物として同定された RecQ ヘリカーゼである BLM の動態については同様の実験系で異なる結果が得られており、今回報告した WRN、RecQL4 の挙動が RecQ ヘリカーゼに共通のものでないことは確認している。このような BLM と WRN、RecQL4 との挙動の差異は、ウェルナー症候群、ロスモンド・トムソン症候群が早期老化症状を呈する一方でブルーム症候群が早老症に分類されないことと関連があるのかもしれない。ただし、個体レベルでは WRN、RecQL4 のいずれか一方のみが万全であっても疾患となることから、これらの RecQ ヘリカーゼの機能の分担についても今後記述されていかねばならないと考えている。

## E. 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Wang, W., Seki, M., Otsuki, M., Tada, S., Takao, N., Yamamoto, K., Hayashi, M., Honma, M., 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.
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回細胞核ダイナミクス研究会  
2003年5月22日
- 2) 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ェ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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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 $\alpha$ 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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

15) 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

16) 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

17) 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

18) 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

#### 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

研究成果の刊行に関する一覧表

- 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 $\beta$  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, Eureka.com. in press.

20030226

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。