

平成21年 4月27日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590053

研究課題名（和文） 早老症原因遺伝子産物 RecQL4 の遺伝子構造安定性維持機構への関与

研究課題名（英文） Involvement of RecQL4, a progeria syndrome responsible gene product, into the mechanism to maintain stability of genome structure.

研究代表者

多田 周右 (TADA SHUSUKE)

東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：00216970

研究成果の概要：

本研究では、Rothmund-Thomson 症候群の原因遺伝子産物 RecQL4 の機能について検討した。まず、生化学と細胞生物学の手法により、RecQL4 がポリ ADP リボシルポリメラーゼに依存する形で DNA 損傷部位に集まり、損傷の修復に関わる可能性が示された。さらに、RecQL4 と相互作用するタンパク質の同定を試みた結果、DNA 損傷応答や転写に関連するタンパク質の他、様々なタンパク質修飾に関係したタンパク質と相互作用することが見出されたため、種々のタンパク質修飾が RecQL4 の機能を調節していると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2008年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：生化学・ゲノム安定性維持

1. 研究開始当初の背景

遺伝子である DNA は種々の攻撃に対して遺伝情報を正確に保持しようとするようきわめて高度に保護されているが、DNA が関与する様々な代謝経路の中では DNA の高度な保護を外す必要に迫られる過程も多く存在する。例えば、DNA 複製の過程では相補鎖との解離や部分的な二本鎖の生成などに応じて物理的なひずみ・ねじれなどが生じることにより DNA の構造がもろくなり、様々な DNA 傷害誘発作用に対して特に高い感受性を示すことが予想される。また、DNA 複製装置が鋳型

となる DNA 上の異常な構造や障害と遭遇することにより、DNA 複製の停止やこれに伴う DNA 二本鎖切断の生成などを介して遺伝情報の不安定化が引き起こされることも報告されている。したがって、細胞には細胞周期の特定の段階などに脆弱な状態におかれる DNA をとくに保護・監視し、問題があればそれを迅速に取り除くための特別なメカニズムを備えられていると推測される。

広範な生物で共有されている RecQ ファミリー DNA ヘリカーゼ (RecQ ヘリカーゼ) は大腸菌 RecQ に相同性を持つ一群のタンパク

質の総称であり、遺伝子構造安定性維持への関与が強く示唆されている。ヒトでは5種類のRecQヘリカーゼが存在することが報告されているが、そのひとつであるRecQL4の遺伝子に変異を起こすことにより、その変異の状態に応じてRothmund-Thomson症候群、RAPADILINO症候群、Baller-Gerold症候群の3つの遺伝性疾患を引き起こすことが知られている。これらのうち、Rothmund-Thomson症候群は最も重篤なものであり、多形皮膚萎縮症、骨形成異常、若年性白内障、発育不全、早期老化症状、高発癌性(特に骨肉腫)など幅広い臨床症状を呈する常染色体劣性遺伝病である。この遺伝病は1869年、ドイツの眼科医August Rothmundにより稀な皮膚変性を伴う白内障として最初に報告された

RecQL4は1208アミノ酸からなる分子量133kのタンパク質である。細胞内においては、核と細胞質の両方に存在することが報告されており、胸腺、精巣において発現量が多く、細胞周期においてはS期で最も発現が高い。これまでに、RecQL4のDNA複製開始における機能が示されているほか、いくつかの研究室よりDNA傷害に応じた挙動の変化についても報告されている。したがって、RecQL4が細胞周期とDNA修復過程との接点に位置するタンパク質として機能することが推測される。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子構造安定性維持機構におけるRecQL4の役割について生化学的および細胞生物学的手法により解析をおこない、RecQL4の機能とRothmund-thomson症候群の病態について分子的な理解を深めることを目的とした。具体的には以下の点について検討することを目指した。

- (1) DNA複製およびその前後の過程を中心に据えながら、細胞周期に応じたRecQL4の挙動の変化について解析を進める。
- (2) DNA傷害認識・応答反応におけるRecQL4の役割を細胞周期の段階と関連付けながら分子レベルから解明する。
- (3) 広範なDNA傷害に対する応答修復反応をリアルタイムでモニターする実験系、あるいはDNA複製とDNA修復を特定の時点で連動させて細かく解析できるような実験系を利用し、これらの系の中でのRecQL4の機能と挙動の変化について検討する。
- (4) 解析範囲を発展的に拡大していくために、RecQL4と連携して機能するタンパク質の同定を目指す。

3. 研究の方法

前項で述べた通り、本研究では生化学的解析と細胞生物学的手法を利用して解析をお

こなった。また、RecQL4と連携して機能するタンパク質を同定するため、プロテオミクス的手法を用いてRecQL4相互作用タンパク質を検索した。

(1) 生化学的手法

アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)卵から得られた抽出液を用いた実験系は、多くのタンパク質が複雑に連携された細胞周期を無細胞的に再現できる現在のところ唯一のものであり、細胞周期研究に大きく貢献してきた実験系である。本研究では、この*Xenopus*卵抽出液無細胞実験系をもちいて、各種DNA傷害処理をおこなった際のRecQL4の挙動の変化、あるいはRecQL4を卵抽出液から除いた際のDNA損傷応答・修復関連タンパク質の変化について解析をおこなった。

(2) 細胞生物学的手法

siRNAをもちいてRecQL4の発現を抑制したHeLa細胞を用いてDNA損傷修復の効率を検討した。さらに、緑色蛍光タンパク質(GFP)を融合したRecQL4をHeLa細胞などの細胞内で発現誘導し、レーザーを用いて特定の位置のDNAに損傷を与えた際のRecQL4の挙動について検討をおこなった。

(3) プロテオミクスの解析

FLAGタグを融合させたRecQL4をヒト293E細胞内に発現させ、FLAGタグを利用してRecQL4を精製した。その後、精製画分に含まれるタンパク質を電気泳動により分離し、各タンパク質を質量分析により同定した。

4. 研究成果

*Xenopus*卵抽出液中の精子核を添加し反応させるとDNA複製反応が引き起こされる。さらにここに制限酵素EcoRIを添加すると、DNA二本鎖切断(DSB)が誘起され、これに応じてcheckpoint経路が活性化されることは研究代表者により報告されている。このとき、RecQL4がクロマチン画分に蓄積することが見いだされた。これより、RecQL4がDSB部位に集合し、その修復に関与している可能性が考えられた。

このDSBに応じたRecQL4のクロマチン結合は一本鎖DNA結合タンパク質複合体(RPA)に依存していたため、RPAのクロマチン結合以降にRecQL4が機能すると考えられた。これは、DNA複製開始時のRecQL4のクロマチン結合とは明らかに異なる挙動である。すなわち、RPAの集合以前に必要とされるRecQL4のDNA複製開始における機能とは異なる機能を発揮するためにRecQL4がDSB部位に集合していることを示唆している。このとき、RecQL4の近傍に結合しているタンパク質を検出するため、超音波処理によりDNAを断片化した後にRecQL4抗体による免疫沈降をおこなった。その結果、DSB

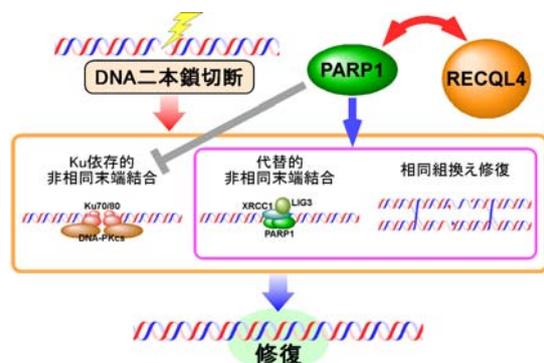
修復のうち非相同末端結合 (NHEJ) に関与する Ku 複合体が検出されたが、相同組換え修復 (HR) に主要な役割を果たす Rad51 は検出されなかった。

さらに、DSB の指標となるリン酸化型ヒストン H2AX (γ H2AX) の減少を検出することにより DSB 修復効率について検討した結果、RecQL4 免疫除去卵抽出液を用いた場合に γ H2AX の減少の顕著な遅れが観察された。同様に、siRNA により RecQL4 の発現を抑制した HeLa 細胞に DNA 二本鎖切断を誘発する zeosin を作用させたところ、 γ H2AX の生成が亢進することが示された。

そこで、GFP 融合型 RecQL4 を細胞内に発現させた後、レーザーによって核内の特定の部位に DSB を誘発し、このときの RecQL4 の動態について検討した。その結果、RecQL4 が DSB 部位にきわめて速やかに集合し解離する一過性の挙動を示すことが示された。さらに、この RecQL4 のクロマチン結合には RecQL4 の N 末端側に位置する領域が重要な役割を果たすことが認められた。

RecQL4 はポリ ADP リボシルポリメラーゼ (PARP) -1 と相互作用することが知られているため、RecQL4 も同様に PARP-1 に依存してレーザー照射部位に集積しているのかを検討した。その結果、PARP の阻害剤で処理した細胞ではレーザー照射部位への RecQL4 の集積が抑制された。さらに PARP-1 欠損細胞を用いた場合にも、同様の結果が得られたため、RecQL4 は PARP-1 依存的に DSB 部位へ集積すると考えられた。

PARP は塩基除去修復経路に重要な役割を果たすことがよく知られているが、近年 DSB の修復においても、Ku 複合体依存的 NHEJ を抑制することにより HR を促進すること、Ku 複合体に依存しない代替的 NHEJ に要求されることが示されている。上記の研究結果より、RecQL4 もこの過程に関連して機能するものと考えられる。



さらに、質量分析を用いて RecQL4 と相互作用するタンパク質の同定を試みた。その結果、紫外線損傷修復因子である DDB1 などの DNA 損傷応答関連タンパク質、転写関連タン

パク質、タンパク質リン酸化酵素やタンパク質脱アセチル化酵素のようなタンパク質翻訳後修飾酵素の他、様々なユビキチンリガーゼ (E3) や SUMO E3 リガーゼが RecQL4 と相互作用することが見出された。したがって、ユビキチン化や SUMO 化などの修飾が RecQL4 の機能を制御している可能性が考えられた。今後、これらのタンパク質と RecQL4 の連携についてさらに解析を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 19 件)

- ① Ohuchi, T., Seki, M., Kugou, K., Tada, S., Ohta, K., Enomoto, T., Accumulation of sumoylated Rad52 in checkpoint mutants perturbed in DNA replication. DNA Repair (Amst) in press (2009) 査読有
- ② Tsuyama, T., Watanabe, S., Aoki, A., Cho, Y., Seki, M., Enomoto, T., Tada, S., Repression of nascent strand elongation by deregulated Cdt1 during DNA replication in *Xenopus* egg extracts. Mol. Biol. Cell. 20, 937-947 (2009) 査読有
- ③ Takada, S., Inoue, E., Tano, K., Yoshii, H., Abe, T., Yoshimura, A., Akita, M., Tada, S., Watanabe, M., Seki, M., Enomoto, T., Generation and characterization of cells that can be conditionally depleted of mitochondrial SOD2. Biochem. Biophys. Res. Commun. 379, 233-238 (2009) 査読有
- ④ Nishino, K., Inoue, E., Takada, S., Abe, T., Akita, M., Yoshimura, A., Tada, S., Kobayashi, M., Yamamoto, K., Seki, M., Enomoto, T., A novel role for Rad17 in homologous recombination. Genes. Genet. Syst. 83, 427-431 (2008) 査読有
- ⑤ Seki, M., Otsuki, M., Ishii, Y., Tada, S., Enomoto, T., RecQ family helicases in genome stability: lessons from gene disruption studies in DT40 cells. Cell Cycle. 7, 2472-2478 (2008) 査読有
- ⑥ Abe, T., Ishiai, M., Hosono, Y., Yoshimura, A., Tada, S., Adachi, N., Koyama, H., Takata, M., Takeda, S., Enomoto, T., Seki, M., KU70/80, DNA-PKcs, and Artemis are essential for the rapid induction of apoptosis after massive DSB formation. Cell Signal. 20, 1978-1985 (2008) 査読有
- ⑦ Ohuchi, T., Seki, M., Branzel, D., Maeda, D., Ui, A., Ogiwara, H., Tada, S., Enomoto, T., Rad52 sumoylation and its

- involvement in the efficient induction of homologous recombination. *DNA Repair (Amst)* 7, 879-889 (2008) 査読有
- ⑧ Hayashi, T., Seki, M., Inoue, E., Yoshimura, A., Kusa, Y., Tada, S., Enomoto, T., Vertebrate WRNIP1 and BLM are required for efficient maintenance of genome stability. *Genes. Genet. Syst.* 83, 95-100 (2008) 査読有
- ⑨ Tada, S., Kundu, L. R., Enomoto, T., Insight into initiator-DNA interactions: a lesson from the archaeal ORC. *Bioessays* 30, 208-211 (2008) 査読有
- ⑩ Otsuki, M., Seki, M., Inoue, E., Abe, T., Narita, Y., Yoshimura, A., Tada, S., Ishii, Y., Enomoto, T., Analyses of functional interaction between RECQL1, RECQL5, and BLM which physically interact with DNA topoisomerase III α . *Biochim. Biophys. Acta.* 1782, 75-81 (2008) 査読有
- ⑪ Otsuki, M., Seki, M., Inoue, E., Yoshimura, A., Kato, G., Yamanouchi, S., Kawabe, Y., Tada, S., Shinohara, A., Komura, J., Ono, T., Takeda, S., Ishii, Y., Enomoto, T., Functional interactions between BLM and XRCC3 in the cell. *J. Cell Biol.* 179, 53-63 (2007) 査読有
- ⑫ Ogiwara, H., Ohuchi, T., Ui, A., Tada, S., Enomoto, T., Seki, M., Ctf18 is required for homologous recombination-mediated double-strand break repair. *Nucleic Acids Res.* 35, 4989-5000 (2007) 査読有
- ⑬ Dong, Y. P., Seki, M., Yoshimura, A., Inoue, E., Furukawa, S., Tada, S., Enomoto, T., WRN functions in a RAD18-dependent damage avoidance pathway. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 1080-1108 (2007) 査読有
- ⑭ Tomizawa, Y., Ui, A., Onoda, F., Ogiwara, H., Tada, S., Enomoto, T., Seki, M., Rad50 is involved in MMS-induced recombination between homologous chromosomes in mitotic cells. *Genes. Genet. Syst.* 82, 157-160 (2007) 査読有
- ⑮ Ui, A., Seki, M., Ogiwara, H., Lai, M. S., Yamamoto, K., Tada, S., Enomoto, T., Activation of a novel pathway involving Mms1 and Rad59 in sgs1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356, 1031-1037 (2007) 査読有
- ⑯ Kawashima, S., Ogiwara, H., Tada, S., Harata, M., Wintersberger, U., Enomoto, T., Seki, M., The INO80 complex is required for damage-induced recombination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355, 835-841 (2007) 査読有
- ⑰ Kumata, Y., Tada, S., Yamanada, Y., Tsuyama, T., Kobayashi, T., Dong, Y. P., Ikegami, K., Murofushi, H., Seki, M., Enomoto, T., Possible involvement of RecQL4 in the repair of double-strand DNA breaks in *Xenopus* egg extracts. *Biochim. Biophys. Acta.* 1773, 556-564 (2007) 査読有
- ⑱ Otsuki, M., Seki, M., Kawabe, Y., Inoue, E., Dong, Y. P., Abe, T., Kato, G., Yoshimura, A., Tada, S., Enomoto, T., WRN counteracts the NHEJ pathway upon camptothecin exposure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355, 477-482 (2007) 査読有
- ⑲ Tada, S., Cdt1 and geminin: role during cell cycle progression and DNA damage in higher eukaryotes. *Front. Biosci.* 12, 1629-1641 (2007) 査読有
- 〔学会発表〕 (計 20 件)
- ① 井上絵里、田野恵三、吉居華子、多田周右、渡邊正巳、関政幸、榎本武美. SOD1 枯渇によるゲノムの不安定化と細胞死はアスコルビン酸で抑制される. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (神戸市) 2008 年 12 月 12 日
- ② 秋田玄武、関政幸、吉村明、阿部拓也、多田周右、榎本武美. 高等動物細胞におけるチェックポイント因子 Claspin の機能の解析. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (神戸市) 2008 年 12 月 11 日
- ③ 吉村明、金森允、多田周右、立石智、関政幸、榎本武美. WRNIP1 は RAD18-RAD6 に結合し、RAD18-RAD6 のもつ複製フォーク様構造への結合を阻害する. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (神戸市) 2008 年 12 月 11 日
- ④ 池上京子、多田周右、Li Lan、菅野新一郎、安井明、関政幸、榎本武美. DNA 傷害に応じた RecQL4 の動態と相互作用タンパク質の機能解明. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (神戸市) 2008 年 12 月 10 日
- ⑤ 津山崇、渡辺沙里、青木彩子、関政幸、榎本武美、多田周右. Nascent DNA elongation is repressed by deregulated Cdt1 in *Xenopus* egg extracts. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (神戸市) 2008 年 12 月 9 日
- ⑥ Abe, T., Seki, M., Ikegami, K., Yoshimura, A., Tada, S., Enomoto, T., Functional analysis of RecQL4 using RecQL4 mutated cells. The 6th 3R Symposium (孀恋) 2008 年 10 月 29 日

- ⑦ Kundu, L. R., Kumata, Y., Tsuyama, T., Seki, M., Enomoto, T., Tada, S., Effects of deregulating Cdc6 during the initiation of DNA replication. The 6th 3R Symposium (孀恋) 2008年10月28日
- ⑧ Tsuyama, T., Watanabe, S., Aoki, A., Cho, Y., Seki, M., Enomoto, T., Tada, S., Repression of nascent strand elongation of DNA replication by deregulated Cdt1 in *Xenopus* egg extracts. The 6th 3R Symposium (孀恋) 2008年10月28日
- ⑨ Kundu, L. R., Kumata, Y., Tsuyama, T., Seki, M., Enomoto, T., Tada, S., Significance of regulating Cdc6 during the initiation of DNA replication. NCI Cancer Conference 2008 (Birmingham, UK) 2008年10月5日
- ⑩ Kundu, L. R., Tada, S., Kumata, Y., Tsuyama, T., Seki, M., Enomoto, T., Inhibition of DNA Replication by the Replication Licensing Factor Cdc6. Second JCA-AACR Special Joint Conference (淡路市) 2008年7月15日
- ⑪ 池上京子、多田周右、Li Lan、安井明、関政幸、榎本武美. RecQL4のDNA二本鎖切断誘発時における挙動の解析. 日本薬学会第128年会(横浜市)2008年3月27日
- ⑫ 津山崇、渡辺沙里、青木彩子、関政幸、榎本武美、多田周右. 異所的なCdt1活性に伴うDNA複製抑制機構の解析. 第19回DNA複製・分配ワークショップ2007年度組換え・染色体再編ワークショップ合同ワークショップ(伊豆市)2008年3月6日
- ⑬ Lena R. Kundu、熊田裕司、津山崇、関政幸、榎本武美、多田周右. Cdc6によるDNA複製開始過程の抑制. 第19回DNA複製・分配ワークショップ2007年度組換え・染色体再編ワークショップ合同ワークショップ(伊豆市)2008年3月6日
- ⑭ 井上絵里、関政幸、吉村明、櫻場秀一、多田周右、榎本武美. ニワトリDT40細胞を用いた抗酸化酵素遺伝子破壊株の解析. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会(横浜市)2007年12月14日
- ⑮ 吉村明、関政幸、多田周右、榎本武美. WRNIP1とRAD18の機能的連携の解明. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会(横浜市)2007年12月13日
- ⑯ 川端亮介、津山崇、多田周右、関政幸、榎本武美. DNA複製ライセンス化因子Cdt1の機能ドメインに関する生化学的解析. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会(横浜市)2007年12月11日
- ⑰ 井坂弘道、前田大介、Davoodi Vijeh Motlagh Niloofar、多田周右、関政幸、榎本武美. 出芽酵母DNA polymerase δ Pol31

サブユニットの機能ドメインの解析. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会(横浜市)2007年12月11日

- ⑱ 多田周右、関政幸、榎本武美. Illegitimate activation of Cdt1 at S-phase possibly leads to a halt of nascent strand elongation in DNA re-replication. 第66回日本癌学会学術総会(横浜市)2007年10月5日
- ⑲ Kundu, L. R., Kumata, Y., Tsuyama, T., Seki, M., Enomoto, T., Tada, S., Cdc6 inhibits the initiation of DNA replication by modulating Cdc7-dependent hyperphosphorylation of Mcm4. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Eukaryotic DNA Replication and Genome Maintenance (New York, USA) 2007年9月6日
- ⑳ 津山崇、渡辺沙里、青木彩子、関政幸、榎本武美、多田周右. Gemininは再複製時における複製フォークの停止を抑制する. 第40回日本発生生物学会・第59回日本細胞生物学会合同大会(福岡市)2007年5月29日

〔図書〕(計1件)

- ① 多田周右、榎本武美、羊土社 分子生物学イラストレイテッド改訂第3版(2009) pp. 30-37 (DNAの複製)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多田 周右 (TADA SHUSUKE)
東北大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号: 00216970

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし