

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32680

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370065

研究課題名(和文)ゲノム安定化に寄与するRECQL1とRECQL5の機能の解析

研究課題名(英文)Functions of RECQL1 and RECQL5 in the maintenance of genome stability

研究代表者

榎本 武美 (ENOMOTO, Takemi)

武蔵野大学・薬学研究所・教授

研究者番号：80107383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,300,000円、(間接経費) 4,590,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではRECQL5の機能を主として行った。遺伝子破壊株を用いた解析から、RECQL5はDNA架橋剤による傷害の修復に関与していることが明らかになった。その関与する過程を解析した結果、BRCA2の下流で、Rad51フィラメントが形成された以降の過程で働き、不要なRad51フィラメントを破壊して不必要な組換えを抑制している可能性が示唆された。また、免疫グロブリン遺伝子座でのDNAの組換えの頻度と正確さを調べたところ、RECQL5遺伝子破壊株では、組換えの頻度が増え、正確さが減少していたことから、RECQL5は架橋剤によって誘導される組換えの頻度と質を制御していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, I mainly focused on the function of RECQL5. Analyses using RECQL5 gene knockout (KO) cells revealed that RECQL5 is involved in DNA interstrand crosslink (ICL) repair. The results obtained in this study suggest that RECQL5 functions down stream of BRCA2, after formation of Rad51-ssDNA filament probably disrupting disused filaments. Furthermore, the frequency and variation of CDDP-induced gene conversion at the immunoglobulin locus were increased in RECQL5 KO cells. These results suggest that RECQL5 plays a role in regulating the incidence and quality of ICL-induced recombination.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ゲノム安定維持機構 発がん抑制 遺伝子組換え RecQヘリカーゼ RECQL5

1. 研究開始当初の背景

本研究で解析の標的となる RecQL1 と RecQL5 は RecQ ファミリーに属するヘリカーゼで、ゲノムの安定維持に関与すると考えられている。ヒトの細胞には5つの RecQ ファミリーヘリカーゼが存在し、それらは、RECQL1、ブルーム症候群原因遺伝子産物 (BLM)、ウェルナー症候群原因遺伝子産物 (WRN)、ロスモンド・トムソン症候群 (RTS; RECQL4) と RECQL5 である。ブルーム症候群は高発がん性、ウェルナー症候群とロスモンド・トムソン症候群は早老症で知られる遺伝性疾患で、これらの患者由来の細胞はゲノムの不安定性を示す。上記5つの RecQ ファミリーヘリカーゼのうち WRN や BLM の機能の解析は、我々を含む多くの研究者の研究により大きく進展した。また、RTS (RECQL4) の機能の解析も近年急速に進展した。一方、RECQL1 と RECQL5 の機能の解析は、上記の3つの RecQ ファミリーヘリカーゼの機能の解析と比べると大幅に遅れていた。

我々は、BLM の機能を解析する過程で、BLM の機能が欠損した時に、RECQL5 が部分的に BLM の機能を代替することを明らかにし、また、RECQL1、RECQL5 と BLM 三者の機能的関連の解析を行った。一方、Huらにより、*Recql5* のノックアウトマウスが作製され、ノックアウトマウスではがんが多発することから、*Recql5* は癌抑制遺伝子として機能していることが示唆された。また、彼らは、生化学的解析により、RECQL5 が Rad51 フィラメントを破壊することにより組換えの初期過程を阻害している可能性を示唆した (Hu *et al.*, Gene Dev. 21, 3073-3084, 2007)。さらに、RECQL5 が RNA ポリメラーゼ II と結合し、その転写活性を阻害することや RECQL5 が RAD51 に結合し組換えを抑制することが報告された。しかし、RECQL5 が実際に、どのような組換えの過程で、どのように組換えを抑制しているのかは解析されていなかった。

一方、RECQL1 の機能の解析は、酵素活性の詳細な解析が主なもので、その解析から、RECQL1 が DNA の組換えに関与する可能性が示唆された。また、ノックアウトマウスが作製され、ノックアウトマウスの細胞は染色体の異数性を示し、染色体の切断や SCE が増加することが報告された。また、疫学的解析からは、*RECQL1* の SNIP が膵臓がんの予後

に関係することが報告された。さらに、siRNA により *RECQL1* の mRNA の発現を抑制すると、がん細胞特異的に細胞死が誘導されることが報告された。しかし、RECQL1 の機能は依然として不明のままであった。

2. 研究の目的

前述したように高等真核細胞には5つの RecQ ファミリーヘリカーゼが存在し、これらのヘリカーゼはゲノムの安定維持に寄与していると考えられている。本研究は、RecQ ファミリーヘリカーゼのうち病気との関係が分からず、機能解析も遅れている2つの RecQ ヘリカーゼ、RECQL1、RECQL5 の機能の解明を目的とする。

我々は、RecQ ファミリーヘリカーゼの機能の解析に、遺伝子破壊や遺伝子導入が容易なニワトリ B 細胞由来の DT40 細胞を用いて多くの成果を挙げてきた。RECQL1 や RECQL5 の機能の解析でも DT40 細胞を用いてそれぞれの遺伝子破壊細胞や関連するタンパク質の遺伝子破壊細胞、それらの二重遺伝子破壊細胞を作製して、これらの細胞を用いて遺伝学的、細胞生物学的な解析を行うことにより、その機能を解明する。

DT40 細胞は B 細胞由来であるので、免疫グロブリン遺伝子の組換えが起こる。この免疫グロブリン遺伝子の組換えの頻度を測定したところ、*RECQL5* 遺伝子破壊細胞では組換えが上昇し、*RECQL1* 遺伝子破壊細胞では、組換えがほとんど誘導されないことが判明した。このアッセイ系を用いて、RECQL5 の組換えにおける役割を調べることにより、*RECQL5* の欠損がどのようにしてゲノムの不安定性につながるのかを明らかにし、RECQL5 の発がん抑制機構の一端を解明する。また、機能の全く分かっていない RECQL1 が組換えに関わっていることを証明し、RECQL1 が関わる過程を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞株と細胞培養

ニワトリ B リンパ球由来 DT40 細胞を用い、この細胞株を親株にして様々な遺伝子破壊細胞を作製した。詳細は文献を参照。細胞は、10%牛胎仔血清、1%ニワトリ血清を含む RPMI1640 培地で、39°C で培養した。

(2) 増殖能と薬剤感受性の測定

細胞浮遊液を1日ごとに回収し、マイクロビーズと混合し、フローサイトメーターで、マイクロビーズ当たりの生細胞数を計測することにより増殖曲線を作成した。薬剤感受性試験では、細胞を播種してから30分後に種々の薬剤を添加し、36-48時間後に細胞を回収し、生細胞数を計測した。

(3) FANCD2のコピキチン化とChk1のリン酸化及び、Rad51fociの検出

FANCD2のコピキチン化とChk1のリン酸化は抗ニワトリFANCD2抗体と抗phospho-Chk1-Ser345抗体を用いてウエスタンブロットにより検出した。Rad51fociは、細胞をスライドグラスに固定後、NP40で細胞膜を透過性にして抗Rad51抗体を作用させ、次に蛍光標識した二次抗体を作用させて検出した。

(4) 免疫グロブリン遺伝子変換

(immunoglobulin gene conversion; IgGC)

IgGCでは、V geneの上流に存在する25個のpseudo Vをドナーテンプレートとして使用してV geneと相同組換えにより組換えを起こすことで、抗体の多様性を生み出している。本研究で使用したDT40細胞の免疫グロブリン軽鎖のV領域にはフレームシフト変異が入っているため、表面IgM (sIgM)を細胞表面に発現できない。IgGCによりこのフレームシフト変異が除かれるとsIgMが発現することから、sIgM陽性細胞をフローサイトメーターにより測定することにより、IgGCの頻度を測定した。また、組換えの正確さはsIgM陽性細胞のDNAの塩基配列を決定することにより調べた。

4. 研究成果

(1) RECQL1の機能の解析

RECQL1の機能を知るためにRECQL1を免疫沈降し、結合しているタンパク質をマスペクトロメーターにより解析した。その結果、RECQL1は、PALF、laminB1、C11orf84、spindlin-1と結合することが判明した。一方、RECQL1遺伝子破壊株では、トリコスタチンにより誘導される免疫グロブリン遺伝子の組換えが抑制されるという結果の追試を行ったところ、そのような結果が得られなかったため、RECQL1の機能の解析は断念し、RECQL5の機能の解析に集中することにした。

(2) RECQL5の機能の解析

RECQL5のinter-strand crosslink (ICL)修復への関与

RECQL5がどのようなDNAの傷害の修復に関与しているかを知るために、RECQL5遺伝子破壊株の様々なDNA感受性を調べた。その結果、RECQL5遺伝子破壊は、カンプトテシン、エトポシド、X線、ヒドロキシウレアに対しては野生株と同程度の感受性しか示さないが、シスプラチン(CDDP)やマイトマイシンC(MMC)などのDNAクロスリンク剤に対して高い感受性を示すことが判明した。

RECQL5の機能とファンコニー貧血(FA)経路との関係

DNAのクロスリンクはFA経路によって修復される。そこで、RECQL5の機能とFA経路との関係を、RECQL5遺伝子、FANCC遺伝子単独破壊株と、その二重遺伝子破壊株を用いて解析した。MMCによるDNA損傷後に、FANCC破壊株では、FANCD2のモノコピキチン化が観察されなかったのに対し、RECQL5破壊株では野生株と同様に観察された。また、FANCC破壊株では、FANCD2がクロマチンヘリクルートされなかったが、RECQL5破壊株ではリクルートされた。また、CCPDに対する感受性を、単独破壊株と二重遺伝子破壊株で比較したところ、それぞれの遺伝子単独破壊株に比べ、二重遺伝子破壊株は高い感受性を示した。以上の結果から、RECQL5はFA経路とは別の経路で機能することが明らかになった。

RECQL5の機能とチェックポイント機構との関係

DNAが損傷を受けるとチェックポイント機構が活性化する。そこで、RECQL5の機能とチェックポイント機構との関連を調べた。チェックポイントに関与するRad17の遺伝子破壊株では、CDDP処理時にChk1のリン酸化は観察されなかったが、RECQL5破壊株ではChk1のリン酸化は起きていた。また、CCPDに対する感受性を、単独破壊株と二重遺伝子破壊株で比較したところ、それぞれの遺伝子単独破壊株に比べ、二重遺伝子破壊株は高い感受性を示した。以上の結果から、RECQL5はチェックポイントには関与しないことが判明した。

相同組換え修復経路との関係 1

相同組換えの過程で、一本鎖 DNA に Rad51 タンパク質が結合した Rad51 フィラメントが形成され、それは細胞核内でフォーカスとして観察される。そこで、MMC 処理後 Rad51 フォーカスの形成を調べたところ、*RECQL5* 破壊株で、野生株と同様に Rad51 フォーカスが形成されていた。次に、組換えにおける Rad51 フィラメントの形成に BRCA2 が関与することが知られていることから、BRCA2 と *RECQL5* との関係を調べた。MMC 処理後、*BRCA2* 破壊株では Rad51 フォーカスは形成されず、*RECQL5/BRCA2* 二重破壊株でも形成されなかった。また、CCPD に対する感受性を、単独破壊株と二重遺伝子破壊株と比較したところ、*RECQL5/BRCA2* 二重破壊株は *BRCA2* 破壊株と同程度の感受性を示した。以上の結果から、*RECQL5* は相同組換え経路で *BRCA2* の下流で機能していることが明らかになった。

相同組換え修復経路との関係 2

で *RECQL5* は相同組換え経路で、*BRCA2* の下流で Rad51 フィラメント形成後の過程で機能していることが示唆されたことから、同様に Rad51 フィラメント形成後の過程で機能する Rad54 との関係を調べた。CCPD に対する感受性を、単独破壊株と二重遺伝子破壊株で比較したところ、それぞれの遺伝子単独破壊株に比べ、二重遺伝子破壊株は高い感受性を示した。また、Rad51 フォーカスの消長を調べたところ、どちらの単独遺伝子破壊株でも、野生株に比べ、Rad51 フォーカスの消失は遅れ、二重破壊株ではさらに遅れていた。以上の結果から、*RECQL5* と Rad51 は Rad51 フィラメント形成後、別の局面で機能していることが示唆された。

RECQL5 の機能と免疫グロブリン遺伝子座における組換え

本研究に用いた DT40 細胞はニワトリ B 細胞由来であるため、免疫グロブリン遺伝子座で、DNA の組換えが起こっている。これは、免疫グロブリン遺伝子変換 (immunoglobulin gene conversion; IgGC) と呼ばれている。この IgGC を調べたところ、何も処理しなければ、野生株及び *RECQL5* 破壊株とも IgGC は低レベルであったが、*CDDP* を処理すると、*RECQL5* 破壊株では IgGC が顕著に増加した。また、IgGC が起こった細胞から DNA を回収し、塩基配列を決定することにより組換えの正確

さを調べたところ、*RECQL5* 破壊株では、組換えの正確さが低下していることがわかった。

以上の結果とこれまでに得られている結果を考え合わせると、*RECQL5* は、組換えの過程で形成される Rad51 フィラメントのうち、相補鎖形成に使われなかった Rad51 フィラメントを破壊することにより、異所的組換えや不正確な組換えを抑制していると考えられる。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計18件)

Hosono, Y., Abe, T., Ishiai, M., Islam M. N., Arakawa H., Wang, W., Takeda, S., Ishii, Y., Takata, M., Seki, M., and Enomoto, T. (2014) Tumor suppressor RecQL5 controls recombination induced by DNA crosslinking agents. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 1002-1012. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.01.005 (以下の全ての論文査読あり)

Hosono, Y., Abe, T., Higuchi, M., Kajii, K., Sakuraba, S., Tada, S., Enomoto, T., and Seki, M. (2014) Tipin functions in the protection against topoisomerase I inhibitor. *J. Biol. Chem.* 289 (16) 11374-11384. doi: 10.1074/jbc.M113.531707

Nakabayashi, Y., Kawashima, S., Enomoto, T., Seki, M., and Horikoshi, T. (2014) Roles of common subunits within distinct multisubunit complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, 699-704. doi: 10.1073/pnas.1316433111

Tamari, Y., Nawata, H., Inoue, E., Yoshimura, A., Yoshii, H., Kashino, G., Seki, M., Enomoto, T., Watanabe, M., and Tano, K. (2013) Protective roles of ascorbic acid in oxidative stress induced by depletion of superoxide dismutase in vertebrate cells. *Free Rad. Res.* 47, 1-7. doi: 10.3109/10715762.2012.734916

Lai, M.S., Seki, M., Tada, S., and Enomoto, T. (2012) Rmi1 functions in S phase-mediated cohesion establishment via a pathway involving the Ctf18-RFC complex and Mrc1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 427, 682-686. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.09.12

Hara, K., Ueda, S., Ohno, Y., Tanaka, T., Yagi, H., Okazaki, S., Kawahara, R., Masayuki, T., Enomoto, T., Hashimoto, Y., Masuko, K., and Masuko, T. (2012) NIH3T3 cells overexpressing CD98 heavy chain resist early G1 arrest and apoptosis induced by serum starvation. *Cancer Sci.* 103, doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02304.x1460-1466.

Ichibangase, T., Sugawara, Y., Yamabe, A., Koshiyama, A., Yoshimura, A., Enomoto, T., and Imai, K. (2012) An FD-LC-MS/MS proteomic strategy for revealing cellular protein networks: A conditional superoxide dismutase 1 knockout cells. PLOS ONE 7, e45483. doi: 10.1371/journal.pone.0045483

Nomura, H., Yoshimura, A., Edo, T., Tada, S., Seki, M., and Enomoto, T. (2012) WRNIP1 accumulates at laser light irradiated sites rapidly *via* its ubiquitin-binding zinc finger domain and independently from its ATPase domain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 417, 1145-1150. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.12.080

Endo, H., Nakabayashi, Y., Kawashima, S., Enomoto, T., Seki, M., and Horikoshi, M. (2012) Nucleosome surface containing nucleosomal DNA entry/exit site regulates H3-K36me3 *via* association with RNA polymerase II and Set2. Genes Cells 17, 65-81. doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01573.x

Saito, Y., Ono, T., Takeda, N., Nohmi, T., Seki, M., Enomoto, T., Noda, T., and Uehara Y. (2012) Embryonic lethality in mice lacking mismatch-specific thymine DNA glycosylase is partially prevented by DOPS a precursor of noradrenarine. Tohoku J. Exp. Med. 226, 75-83.

Yoshimura, A., Akita, M., Hosono, Y., Abe, T., Kobayashi, M., Yamamoto, K., Tada, S., Seki, M., and Enomoto, T. (2011) Functional relationship between Clasp1 and Rad17. Biochem. Biophys. Res. Commun. 414, 298-303. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.09.037

Ishikawa, K., Ohsumi, T., Tada, S., Natsume, R., Kundu, L.R., Nozaki, N., Senda, T., Enomoto, T., Horikoshi, M., and Seki, M. (2011) Roles of histone chaperone CIA/Asf1 in nascent DNA elongation during nucleosome replication. Genes Cells 16, 1050-1062. doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01549.x

Abe, T., Sugimura, K., Hosono, Y., Takami, Y., Akita, M., Yoshimura, A., Tada, S., Nakayama, T., Murofushi, H., Okumura, K., Takeda, S., Horikoshi, M., Seki, M., and Enomoto, T. (2011) The histone chaperone FACT maintains normal replication rates. J. Biol. Chem. 286, 30504-30512. doi: 10.1074/jbc.M111.264721

Kawashima, S., Nakabayashi, Y., Matsubara, K., Sano, N., Enomoto, T., Tanaka, K., Seki,

M., and Horikoshi, M. (2011) Global analysis of core histones reveals nucleosomal surfaces required for chromosome bi-orientation. EMBO J. 30, 3353-3367. doi: 10.1038/emboj.2011.241

Hosono, Y., Abe, T., Ishiai, M., Takata, M., and Enomoto, T. (2011) The role of SNM1 family nucleases in etoposide-induced apoptosis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 410, 568-573 (Jul. 8). doi: 10.1016/j.bbrc.2011.06.027

Kanamori, M., Seki, M., Yoshimura, A., Tsurimoto, T., Tada, S., and Enomoto, T. (2011) Werner interacting protein 1 promotes binding of Werner protein to template-primer DNA. Biol. Pharm. Bull. 34, 1314-1318.

Kundu, L. R., Seki, M., Watanabe, N., Murofushi H., Furukohri, A., Waga, S., Score A. J., Blow, J. J., Horikoshi, M., Enomoto, T., and Tada, S. (2011) Biphasic chromatin binding of FACT during DNA replication. Biochim. Biophys. Acta 1813, 1129-1136. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.002

Abe, T., Yoshimura, A., Hosono, Y., Tada, S., Seki, M., and Enomoto, T. (2011) The N-terminal region of RECQL4 lacking the helicase domain is both essential and sufficient for the viability of vertebrate cells. Biochim. Biophys. Acta 1813, 473-479. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.001

〔学会発表〕(計28件)

細野嘉史、阿部拓也、関政幸、榎本武美 DNAヘリカーゼRecQL5の相同組換え機構における機能の解析 第21回DNA複製・組換え・ゲノム安定性制御ワークショップ 2011年10月25日 サンピア福岡(福岡市)

吉村明、関政幸、榎本武美 Analysis of the functional relationship between WRNIP1 and DNA polymerase eta in the cell 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月15日 パシフィコ横浜(横浜市)

Yoshifumi Hosono, Masayuki Seki, Takuya Abe, Masamichi Ishiai, Shunichi Takeda, Ishii Yutaka, Minoru Takata, Takemi Enomoto Function of RecQL5 helicase in interstrand crosslink repair The 8th 3R Symposium 2012年11月26日 淡路夢舞台(淡路市)

細野 嘉史、関 政幸、阿部 拓也、石合 正道、武田 俊一、石井 裕、高田 穰、榎本武美 RecQヘリカーゼのDNAクロスリンク修復における役割 第35回日本分子生物学会年会 2012年12月11日 福岡国際会議場(福岡市)

吉村明、園田覚、関政幸、榎本武美 WRNIP1

regulates DNA polymerase eta in DNA
damage tolerance 第 86 回日本生化学大会
2013 年 9 月 13 日 パシフィコ横浜(横浜
市)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

榎本 武美 (ENOMOTO, Takemi)

武蔵野大学・薬学研究所・教授

研究者番号 : 8 0 1 0 7 3 8 3