

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：32680

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440065

研究課題名(和文) RecQヘリカーゼ及び関連タンパク質の機能の解析と内因性ゲノム傷害因子の探索

研究課題名(英文) Analyses of function of RecQ helicase and its related proteins and detection of endogenous DNA damaging agents

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：何らかの原因により転写に問題が生じた場合に、RECQL5はRNAポリメラーゼを除去することによりゲノムの安定維持に寄与している可能性が示唆された。また、アルデヒドによるDNAの傷害の修復に参与することが明らかになった。

一方、RecQヘリカーゼ関連タンパク質、WRNIP1の機能の解析では、WRNIP1は損傷乗り越え合成を行うDNAポリメラーゼ (Pol β) の上流で機能し、UVによるDNA損傷があると損傷がPol β の経路で処理されるように制御しているが、両者が存在しない時にはPol β とPrimPolが機能する経路がある可能性を示し、WRNIP1がPrimPolの発現を制御することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The results obtained in this study suggested that RECQL5 removes stacked RNA polymerase to avoid generation of DNA lesions. In addition, RECQL5 plays role in the process to deal with DNA lesions induced by aldehydes. In the case of RecQ helicase related protein, WRNIP1, it was suggested that WRNIP1 functions to regulate the translesion DNA polymerase, DNA polymerase β , and that when both protein are absent, a novel pathway involving Pol β and PrimPol begins to function. In addition, WRNIP1 controls the expression of PrimPol.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ゲノム安定維持 発がん抑制 老化 RECQL5 WRNIP1 RAD52

1. 研究開始当初の背景

本研究で解析の標的となる 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・トムソン症候群原因遺伝子産物 (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。申請者は、真核細胞の DNA ヘリケースの研究で世界をリードしてきており、RECQL1 を発見した。その後、1995 年には BLM、1996 年には WRN、1998 年には、RTS (RECQL4) と RECQL5 が相次いで発見され、RECQL1 の発見は、その後の RecQ ファミリーヘリカーゼの研究が興隆する端緒となった。このような背景のもとに、申請者はこれらの RecQ ファミリーヘリカーゼの機能の解析を精力的に展開してきた。

WRN の機能の解析では、WRN が SUMO 化されることを発見し、酵母のモデル系を使ってその意義を解明した。また、WRN に結合する新規タンパク質 WRNIP1 を発見し (①)、WRN との機能的関連を明らかにした。また、WRNIP1 の機能の解析では、WRNIP1 が損傷乗り越え合成の過程で、損傷を乗り越えて DNA を合成する DNA ポリメラーゼ η の上流で機能することを示す結果を得た。

一方、BLM の機能の解析では、ブルーム症候群患者由来の細胞で増加する姉妹染色分体交換 (sister chromatid exchange: SCE) の形成機構を解明した。また、酵母のモデル系や動物細胞のモデル細胞を使った解析から、BLM が複製した DNA の解離や、複製装置が傷害に遭遇した時に形成される DNA の構造を解消していることを明らかにした。

このように、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* はがん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。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。一方我々は、RECQL5 が RNA ポリメラーゼ II と結合するために必要な領域を同定し、RECQL5 が RNA ポリメラーゼ II と結合できることが、RECQL5 による組換えの抑制 (SCE の抑制) に必要であり、また、この結合活性とは独立に、RECQL5 の DNA ヘリカーゼ活性も SCE の抑制に必要であることを明らかにした (②)。更に、最近の我々の *RECQL5* 遺伝子破壊細胞を用いた研究から、RECQL5 がシスプラチンなどの DNA 架橋剤による傷害の修復過程で、Rad51 フィラメントを破壊して、不要な組換えを抑制していること、さらに、免疫グロブリン遺伝子の組換え産物の詳細な解析から、RECQL5 は不正確な組換えを抑制していることが示唆された (③)。本研究はこれらの研究成果に基づき、それをさらに発展させようとするものである。

2. 研究の目的

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。本研究では、機能解析が比較的遅れている RecQ5 と RecQ ヘリカーゼ関連タンパク質、WRNIP1 の機能の解明を行う。これまでの申請者の研究により、RecQ5 がシスプラチンなどの DNA 架橋剤による DNA の傷害の修復過程で、不要な組換えを抑制していることが明らかになった。本研究では、DNA 架橋剤に誘導される DNA 組換えのどの過程に

RecQ5 が機能するかを解析するとともに、RecQ5 の機能の一つとして報告されている転写の抑制と組換えとの関連を解明することを目的とする。DNA 架橋剤による DNA の傷害の修復過程で主要な役割をする

Fanconi anemia (FA:ファンコニー貧血) 経路の原因遺伝子の欠損細胞がアセトアルデヒドに感受性を示すことから、RecQ5 が、生体内で発生するアセトアルデヒドによる DNA 架橋を処理することにより、ゲノムの安定性に寄与している可能性を検討する。以上より、RecQ5 の Rad51 フィラメント破壊作用と転写抑制機能がどのように RecQ5 の組換えの抑制に寄与するかを明確にすることにより、DNA クロスリンクの修復における RecQ5 の機能を明らかにするとともに、転写制御と組換えという新たな視点を提出する。また、内因性アセトアルデヒドによる DNA 傷害誘起と RecQ5 によるその処理を明らかにすることにより、RECQ5 のがん抑制遺伝子としての役割を明確にすることを目的とする。

また、RecQ へリカーゼ関連タンパク質である WRNIP1 の機能の解析の過程で前述したように、WRNIP1 が損傷乗り越え合成の過程で、損傷を乗り越えて DNA を合成する DNA ポリメラーゼ η (Pol η) の上流で機能することを示す結果を得たことから、WRNIP1 の DNA 傷害の修復あるいは傷害の回避における機能を明らかにすることを目的にした。

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 細胞を親株にして様々な遺伝子破壊細胞株を作製して用いた。また、ヒト由来の細胞としては 293E 細胞を用いた。ヒト細胞を用いて遺伝子発現を抑制する場合には、siRNA を用い、遺伝子を破壊する場合には、CRISPR/Cas9 system を用いた。

(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、薬剤処理後、所定の時間後に細胞

を回収し、生細胞数を計測するか、細胞を播種してコロニー形成率を測定した。また、突然変異は、6-チオグアニン耐性コロニーの出現率で測定した。

(3) WRNIP1 と Pol η 及び、RAD52 との結合の検出

293 細胞に FLAG タグの付いた WRNIP1 と Pol η あるいは RAD52 を過剰発現させ、その細胞抽出液を用いて、抗 FLAG 抗体で免疫沈降することにより検出した。

(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。

4. 研究成果

(1) RECQL5 の機能の解析

RECQL5 遺伝子破壊株や他の遺伝子との二重遺伝子破壊株を作製して解析することにより、これまでに RECQL5 遺伝子破壊細胞は、シスプラチンやマイトマイシン C (MMC) などの DNA クロスリンク剤に感受性であることを見だし、遺伝学的解析により RECQL5 は、DNA 傷害チェックポイントで働く RAD17 や、DNA クロスリンク修復に働くファンコニー貧血 (FANC) 経路の C 群タンパク質 (FANCC) とは別経路で、BRACA2 とは同一経路で働くことが明らかになった。さらに、RECQL5 と BRACA2、RAD54 との機能的関連を、それぞれの遺伝子単独破壊株と二重遺伝子破壊株を用いて、クロスリンク剤に対する感

受性や Rad51 foci の形成と消失を調べることにより、RECQL5 は DNA 組換えにおいて BRCA2 の下流で機能し、それは Rad51 フィラメントの形成以降の過程であることが判明した。また、Rad51 foci の消失が RECQL5/RAD54 二重遺伝子破壊株では、それぞれの遺伝子の単独破壊株より遅れることが観察された。一方、Rad51 に結合できない RECQL5 を発現させた実験から、RECQL5 の機能の発現には、Rad51 に結合できることが必要であることがわかった。以上の結果とこれまでに報告されている結果を考え合わせ、RECQL5 は、2 つある Rad51 フィラメントの一つが相同性をもつ DNA 鎖に侵入して組換えが始まると、もう一つの Rad51 フィラメントを破壊することにより、不適切な組換えを抑制しているというモデルを提出した。

本研究では、まず転写と組換えにおける RECQL5 の役割の解析を行った。RNA ポリメラーゼの進行を阻害して転写を抑制する 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) に対する RECQL5 遺伝子破壊株の感受性を調べたところ、RECQL5 遺伝子破壊株は野生株に比べ高い感受性を示した。この結果は、転写の途中でフリーズした RNA ポリメラーゼを RECQL5 が除去している可能性を示唆している。一方、トリコスタチンにより、ヒストン脱アセチル化酵素を阻害することにより、転写を活性化すると、RECQL5 遺伝子破壊株では、免疫グロブリン遺伝子の組換え頻度が上昇することが判明した。この結果は、転写複合体と DNA 複製複合体が遭遇した際に、RECQL5 が存在しないと、転写複合体が除去できないため DNA 傷害が起きて組換えが誘導され、さらに不正確な組換えが抑制できないために、組換え頻度が上昇した可能性を示唆している。

次に、アルデヒドにより生成する DNA 傷害の修復に RECQL5 が関与する可能性を検討した。RECQL5 遺伝子破壊株のアセトアルデヒド、

ホルムアルデヒド、パラホルムアルデヒドに対する感受性を調べたところ、RECQL5 遺伝子破壊株は、これら全てのアルデヒドに対して野生株に比べ高い感受性を示した。エチルアルコールは細胞内で代謝されアセトアルデヒドになるが、RECQL5 遺伝子破壊株はエチルアルコールに対しても高い感受性を示した。これらの結果は、生体内で生じるアルデヒドによって形成される DNA の傷害の修復に RECQL5 が関与することを示している。どのようにアルデヒド類による DNA 傷害に RECQL5 が関与するかを詳細に検討することが今後の課題である。

(2) WRNIP1 の機能の解析

WRNIP1 は、Two-hybrid 法により WRN と相互作用するタンパク質として我々が発見したタンパク質で、大腸菌からヒトに至るまで高度に保存されている。WRNIP1 は、AAA+ ATPase ファミリーに属するタンパク質で、その分子内にはユビキチンと結合し、WRNIP1 のユビキチン化にも必要な Ubiquitin binding zinc-finger (UBZ) ドメイン、ATP 結合に関与する Walker A, B モチーフ、Leucine zipper ドメインを有する。我々は、これまでの研究で、WRNIP1 がレーザー照射部位に集積し、その集積には WRNIP1 の UBZ ドメインと多量体化に関与する Leucine zipper が必要であることを明らかにした。また、酵母を使った遺伝学的研究や、精製酵素タンパク質を使った研究から、WRNIP1 は DNA 複製酵素である DNA ポリメラーゼ δ (Pol δ) と機能的な関連をもち、物理的に結合し、その活性を促進することを示した。さらに、Pol δ のクランプとして機能する PCNA を DNA 傷害時にユビキチン化する RAD18 と結合し、DNA 上で RAD18 と置き換わることを明らかにした。

本研究では、損傷乗り越え合成に関与する Pol η との機能的関連を解析し、WRNIP1

が Pol η と結合することを示し、遺伝子破壊細胞を使った遺伝学的解析から、WRNIP1 が Pol η の上流で機能し、DNA 損傷があると複製酵素である Pol δ を Pol η に置き換える可能性を示唆した。さらに、シクロブタンダイマー (CPD) の消失速度、DNA 複製フォークの進行、突然変異の出現頻度等を調べることで、WRNIP1 は Pol η の上流で機能して、UV による DNA 損傷があると損傷が Pol η の経路で処理されるように制御しているが、WRNIP1 がなくなると、誤りがちな損傷乗り越えポリメラーゼを使わない未知の経路で、損傷が処理されることが示唆された。この WRNIP1 と Pol η が存在しない時に作動する未知の経路として、Pol δ が CPD を乗り越え、PrimPol がその後を引き継ぎ、再び Pol δ が引き継ぐという仮説をたて、WRNIP1 と PrimPol の機能的関連を解析した。その結果、WRNIP1 と PrimPol が結合するという結果を得た。また、WRNIP1 の発現を抑制すると PrimPol の量が増加し、WRNIP1 の過剰発現で PrimPol の量が減少すること、PrimPol の減少はプロテアソームを介するタンパク質分解が関与することが明らかになった。これらの結果は、WRNIP1 と Pol η の両者が存在しない時に、Pol η の代わりに PrimPol が機能するという我々の仮説を支持するものである。

早老症 Werner 症候群の原因遺伝子産物 WRN は、WRNIP1 だけでなく、DNA 複製、DNA 修復に関わる様々なタンパク質と結合することが報告されている。我々は、WRN と結合するタンパク質の中で RAD52 に着目した。出芽酵母からヒトに至るまで保存されている RAD52 は、出芽酵母において DNA 修復機構の 1 つである相同組換えに必須であることが明らかにされているが、高等真核細胞ではその機能の解析はほとんど進んでいない。そこで、WRNIP1 と RAD52 の機能的関連の解析も試みた。

WRNIP1 過剰発現細胞を用いて免疫沈降法

を行い、WRNIP1 と RAD52 の結合を調べたところ、両者が結合することが判明した。WRNIP1/RAD52 二重破壊株の細胞増殖能を調べると、二重破壊株では若干の細胞増殖の低下が観察され、WRNIP1 と RAD52 が正常な細胞増殖に必要であることが示唆された。次に、WS 細胞が活性酸素の一種である過酸化水素に対して耐性を示すという報告があることから、過酸化水素に対する感受性を解析したところ、RAD52 破壊株は野生株に比べ過酸化水素に対して感受性を示し、WRNIP1 破壊株も感受性であった。一方、二重破壊株ではその感受性が若干抑制されていた。したがって、過酸化水素による傷害の処理において WRNIP1 と RAD52 の両者が欠損すると、新たな修復系が作動する可能性が示唆された。

<引用文献>

- ① Kawabe, Y., Branzei, D., Suzuki, H., Masuko, T., Onoda, F., Heo, S.-J., Ikeda, H., Shimamoto, A., Fruichi, Y., Seki, M., and Enomoto, T. A novel protein interacts with the Werner's syndrome gene product physically and functionally. *J. Biol. Chem.*, 276, 2001, 20364–20369
- ② Islam, M.N., Fox, D., 3rd, Guo, R., Enomoto, T., and Wang, W. RecQL5 promotes genome stabilization through two parallel mechanisms-interacting with RNA polymerase II and acting as a helicase. *Mol Cell Biol.*, 30, 2010, 2460–72
- ③ Hosono, Y., Abe, T., Ishiai, M., Islam, M. N., Arakawa, H., Wang, W., Takeda, S., Ishii, Y., Takata, M., Seki, M., and Enomoto, T. Tumor suppressor RecQL5 controls recombination induced by DNA crosslinking agents. *Biochim. Biophys. Acta*, 1843, 2014, 1002–1012

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Yoshimura, A., Seki, M., and Enomoto, T. The role of WRNIP1 in genome maintenance. *Cell cycle*, 査読有, 16, 2017, 515–521, DOI: 10.1080/15384101.2017.1282585.
- ② Yoshimura, A., Yabe, H., Akatani, M., Seki, M., and Enomoto, T. Simultaneous depletion of WRNIP1 and RAD52 restores resistance to oxidative stress. *Fundam.*

- Toxicol. Sci., 査読有 4, 2017, 1-7,
<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/fts>
- ③ Nakazaki, Y., Tsuyama, T., Seki, M., Takahashi, M., Enomoto, T., and Tada, S. Excess Cdt1 inhibits nascent strand elongation by repressing the progression of replication forks in *Xenopus* egg extracts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 470, 2016, 405-410.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.01.028.
- ④ 関政幸、多田周右、榎本武美 家族性腫瘍学-家族性腫瘍学の最新研究動向-原因遺伝子 BLM (RECQL2), WRN (RECQL3), RTS (RECQL4) 日本臨床 73 巻 2015, PP. 276-280
- ⑤ Yoshimura, A., Kobayashi, Y., Tada, S., Seki, M., and Enomoto, T. Wrip1 functions upstream of DNA polymerase h in the UV-induced DNA damage response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 452, 2015, 48-52,
DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.08.043.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 吉村明、神保仁美、長谷川有里、関政幸、榎本武美 WRNIP1 による PrimPol の発現調節 2017 年 3 月 25 日 日本薬学会第 137 年会 仙台国際センター (仙台市)
- ② 吉村明、追川瑞穂、関政幸、榎本武美 WRNIP1 と PrimPol の機能的関連の解析 2016 年 9 月 26 日 第 89 回日本生化学大会 東北大学 (仙台市)
- ③ 吉村明、矢部晴菜、関政幸、榎本武美 WRNIP1/RAD52 遺伝子破壊株の作製と解析 日本薬学会第 136 年会 2016 年 3 月 29 日 パシフィコ横浜 (横浜市)
- ④ 吉村明、追川瑞穂、関政幸、榎本武美 DNA 損傷時に WRNIP1 は PrimPol と結合する 第 37 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学大会合同大会 2015 年 12 月 1 日 神戸国際会議場 (神戸市)
- ⑤ 追川瑞穂、吉村明、榎本武美 Werner interacting protein 1 (WRNIP1) と PrimPol の相互作用の解析 第 59 回日本薬学会 関東支部大会 2015 年 9 月 12 日 日本大学薬学部 (船橋市)
- ⑥ 吉村明、榊原達也、多田周右、関政幸、榎本武美 WRNIP1 の C 末領域が Pol η 破壊株の UV 感受性の制御に関与する 日本薬学会第 135 年会 2015 年 3 月 28 日 神戸学院大 (神戸市)
- ⑦ 中崎祐太、牛田麻理、津山崇、関政幸、榎本武美、多田周右 Cdt1 による DNA 複製抑制作用に関する各種欠失変異体を用いた解析 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 26 日 パシフィコ横浜 (横浜市)
- ⑧ 吉村明、多田周右、関政幸、榎本武美 WRNIP1/Pol η 二重破壊株で作動する UV 損傷回避/修復経路の解析 第 87 回日本生化学大会 2014 年 10 月 16 日 国立京都国際会館 (京都市)

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：80107383