

機関番号：32680

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390020

研究課題名(和文) ウェルナー症候群原因遺伝子産物 WRN と WRN に結合する WRNIP1 の機能の解析

研究課題名(英文) Study on the functions of WRN and WRNIP1 that interacts with WRN

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

研究成果の概要(和文): 本研究では、WRNIP1 が関与する DNA 損傷回避の分子機構を解明するとともに、この損傷回避経路に対して WRN や RAD18 がどのような影響を及ぼすのかを明らかにすることを目的にして研究を行い、以下の成果を得た。

- (1) WRNIP1 は N 末端側に存在する UBZ ドメインを介して DNA の単鎖切断部位に集積する。
- (2) 複製フォーク型 DNA に結合した RAD18-RAD6 複合体は WRNIP1 をリクルートし、リクルートされた WRNIP1 は RAD18-RAD6 複合体と置き換わる。
- (3) テンプレート-プライマー型の DNA に結合した WRNIP1 は WRN をリクルートし、リクルートされた WRN は WRNIP1 と置き換わる。

研究成果の概要(英文): In this project, we tried to identify the DNA damage avoidance pathway in which WRNIP1 is involved and to clarify how to affect RAD18 and WRN this pathway, and obtained the following results.

- (1) WRNIP1 localized to the region containing DNA single-strand breaks *via* its N-terminal UBZ domain.
- (2) RAD18-RAD6 complex bound to replication fork like DNA recruited WRNIP1 to the DNA, and recruited WRNIP1 replaced RAD18-RAD6 complex.
- (3) WRNIP1 bound to template-primer DNA recruited WRN to the DNA, and recruited WRN replaced WRNIP1.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2009年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2010年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：ウェルナー症候群、早期老化、WRN、WRNIP1、RAD18、DNA 損傷回避、複製フォーク、ユビキチン化

1. 研究開始当初の背景

ウェルナー症候群 (WS) は早老症の代表的疾患で、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、がん化、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。ウェルナー症候群患者由来の細胞では、DNA の複製に異常があることが報告されているが、その詳細は不明であった。本研究で解析の中心となる WRNIP1 (WRN Interacting Protein 1) はウェルナー症候群原因遺伝子産物 (WRN) と結合するタンパク質として我々が発見したものであり、この WRNIP1 の発見とほぼ同時期に、大阪大学の研究グループにより酵母の WRNIP1 (Mgs1) が発見され、その機能の解析が進められた。その結果、我々及び阪大のグループは、Mgs1 が、Rad18 の関与する損傷回避機構と類似しているが異なる新規な DNA の損傷回避機構に関与することを示唆する結果を得た。また、高等真核細胞の WRNIP1 の機能の解析では、我々は精製したタンパク質を用いた解析から、WRNIP1 が DNA ポリメラーゼ δ に結合し、その活性を促進することを明らかにした。一方、国内外の研究者により、WRNIP1 がポリユビキチンに結合することや、WRNIP1 ががん治療の分子標的になる可能性があるという報告がなされていたが、WRNIP1 の機能に関する報告はほとんどなかった。そこで、本研究では、WRNIP1 の機能を WRN や RAD18 と関連付けて解析することにした。

2. 研究の目的

本研究では、WRNIP1 が関与する新規な DNA 損傷回避の分子機構を解明するとともに、この損傷回避経路に対して WRN や RAD18 (RAD18 が関与する損傷回避経路) がどのような影響を及ぼすのかを明らかにすることを目的にし、以下の3つの解析を中心に研究を展開した。

- (1) WRNIP1 が認識する損傷と損傷への集積のメカニズムの解析
- (2) WRNIP1 と RAD18 の機能的関連のタンパク質レベル、細胞レベルでの解析
- (3) WRNIP1 と WRN の機能的関連のタンパク質レベルでの解析

3. 研究の方法

(1) WRNIP1 が認識する損傷と損傷への集積のメカニズムの解析
GFP を結合した WRNIP1 を細胞に発現させ、この細胞に共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて波長 405 nm のレーザー光を照射し、WRNIP1 の DNA 損傷への集積を観察した。

この際、レーザー光の照射回数の調整や、各種 DNA 傷害剤を用いることにより、WRNIP1 がどのような DNA 損傷を認識して集積するのかを調べた。また、細胞に WRNIP1 の欠失変異体や点変異体を発現させ、これらの変異体の損傷への集積を調べることで、損傷への集積に必要な WRNIP1 の領域を決定した。さらに、クロマチン画分から WRNIP1 を免疫沈降することにより WRNIP1 が標的とするタンパク質の同定を試みた。

(2) WRNIP1 と RAD18 の機能的関連のタンパク質レベル、細胞レベルでの解析
細胞内で WRNIP1 と RAD18 が結合しているかどうかを、WRNIP1 を免疫沈降し、沈降物中の RAD18 を検出することにより調べた。また、精製した WRNIP1 と RAD18-RAD6 複合体を用いて両者の結合を解析した。さらに、テンプレートプライマー型の DNA や停止した複製フォークに似たギャップがあるフォーク型 DNA への WRNIP1、RAD18-RAD6 複合体の結合と、その結合の及ぼす両者の相互の影響をゲルシフトアッセイにより調べた。また、WRNIP1 を過剰発現した細胞を作製し、この細胞に RAD18 が欠損すると感受性が増大する DNA 傷害剤を処理し、これらの DNA 傷害剤に対する感受性を調べた。

(3) WRNIP1 と WRN の機能的関連のタンパク質レベルでの解析
テンプレートプライマー型の DNA への WRNIP1、WRN の結合と、その結合の及ぼす両者の相互の影響をゲルシフトアッセイにより調べた。また、WRN の DNA ヘリカーゼ活性に及ぼす WRNIP1 の影響を調べた。

4. 研究成果

(1) WRNIP1 が認識する損傷と損傷への集積のメカニズムの解析
GFP を結合した WRNIP1 を細胞に発現させ、この細胞に共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いてレーザー光を照射し、WRNIP1 の DNA 損傷への集積を観察した。その結果、WRNIP1 はレーザー光を照射後 7 ~ 10 分をピークに損傷部位に集積し、その後 30 分以上経過しても集積が維持されることが判明した。また、どのような DNA 損傷を認識して WRNIP1 が集積するかを調べるために、種々の DNA 傷害剤や阻害剤を細胞培養系に添加して解析した。その結果、WRNIP1 はポリ ADP リボースポリメラーゼを介することなく、DNA の単鎖切断部位に集積する可能性が示唆された。

次に、DNA の損傷部位への集積に必要な

WRNIP1 の領域の解析を行った。WRNIP1 には N 末端側に ubiquitin binding zinc-finger (UBZ) ドメインが存在するが、このドメインに D37A 変異を導入したところ DNA 損傷部位への集積が消失した。また、(UBZ) ドメインを含む N 末端断片と C 末端断片の融合タンパク質も野生型 WRNIP1 と同様に DNA の損傷部位へ集積したが、この融合タンパク質に D37A 変異を導入するとやはり DNA 損傷部位への集積が消失した。

これまでに、UBZ ドメイン D37A 変異を導入すると WRNIP1 のポリユビキチンへの結合能が失われるとともに、WRNIP1 の全てのユビキチン化部位がユビキチン化されなくなる事が知られていた。

そこで、WRNIP1 の全てのユビキチン化部位に変異を導入して DNA 損傷部位への集積を調べたところ、ユビキチン化部位に変異を導入しても WRNIP1 は DNA 損傷部位へ集積することが判明した。この結果から、WRNIP1 は DNA 損傷部位に存在するユビキチン化されたタンパク質を UBZ ドメインで認識して DNA 損傷部位へ集積する可能性が示唆された。そこで、紫外線照射した細胞のクロマチン画分を調整し、WRNIP1 を免疫沈降することにより WRNIP1 が認識するタンパク質を検索し、ユビキチン化されたヒストン H2A を同定した。したがって、ユビキチン化されたヒストン H2A を認識して WRNIP1 が DNA 損傷部位に集積している可能性が示唆された。

(2) WRNIP1 と RAD18 の機能的関連のタンパク質レベル、細胞レベルでの解析
酵母及び高等真核細胞を用いた遺伝学的解析から、WRNIP1 と Rad18 との間に機能的関連があることが示唆されていたことから、WRNIP1 と Rad18 が、直接あるいは間接的な相互作用をすることが推測された。そこで、両者の物理的相互作用の有無の検討を行い、さらに、精製した WRNIP1 とヒト RAD18 を用いて生化学的解析を行うことにより、両者の機能的関係について検討した。

細胞に WRNIP1 を高発現させ、WRNIP1 を免疫沈降して RAD18 の結合を調べたところ、細胞内で、WRNIP1 が RAD18 と結合することが判明した。また、精製した WRNIP1 と RAD18-RAD6 複合体を用いて両者の結合を調べたところ、結合が観察され、WRNIP1 と RAD18 が直接結合することが明らかになった。WRNIP1 と WRN との結合には ATP が必要であるが、RAD18 と WRNIP1 との結合には ATP は必要ではなかった。

WRNIP1 は全長にわたって replication factor C (RFC) と相同性をもつ。この RFC には DNA 結合活性があり、DNA との結合によって RFC の ATPase 活性が活性化されてその機能が発揮される。WRNIP1 も RFC と同様に DNA に結合して機能するのではないかと考え、WRNIP1 の DNA 結合能をゲルシフト分析法により調べた。その結果、WRNIP1 が ATP 依存的に DNA に結合することが判明し、WRNIP1 が、RFC のように、ATP と結合して DNA に結合し、自身の持つ AAA+ ATPase 活性によって DNA 上で自身の構造を変化させているのではないかと考えられた。WRNIP1 は 120 mer の一本鎖 DNA、テンプレートプライマー型の DNA や停止した複製フォークに似たギャップがあるフォーク型 DNA に結合したが、その中でもフォーク型 DNA に特によく結合した。また、WRNIP1 と RAD18-RAD6B の両者が共存すると、RAD18 が結合している DNA に WRNIP1 がリクルートされること、一方、DNA に結合した RAD18-RAD6B は WRNIP1 に取って代わられるため、WRNIP1 が RAD18-RAD6B の DNA 結合を阻害することが判明した。

上記の結果をふまえ、WRNIP1 を過剰発現する細胞を作製し、*RAD18* 変異株が高感受性を示すカンプトテシンや紫外線に対する感受性を調べたところ、WRNIP1 過剰発現株は野生株に比べこれらの DNA 傷害剤に対して若干耐性になることが判明した。

(3) WRNIP1 と WRN の機能的関連のタンパク質レベルでの解析

我々の以前の遺伝学的解析により、カンプトテシンにより傷害を与えた時には、WRNIP1 と RAD18 が、methyl methanesulfonate により傷害を与えた時には WRN と RAD18 が同一の経路で機能することが示唆されていた。また、我々は、精製した WRNIP1 と DNA ポリメラーゼ δ を用いた解析から、WRNIP1 が DNA ポリメラーゼ δ に結合し、DNA ポリメラーゼ δ の DNA 合成の開始頻度を高めることにより、その活性を促進することを明らかにした。一方、WRN も DNA ポリメラーゼ δ の活性を促進することが報告されていた。WRNIP1 の DNA ポリメラーゼ δ の活性の促進は、WRNIP1 が DNA ポリメラーゼ δ をテンプレート-プライマーのプライマーの 3'末端にリクルートすることによる可能性が考えられた。そこで、WRNIP1 と WRN の機能的関連をテンプレート-プライマー型 DNA を用い、この DNA への WRNIP1、WRN の結合

と、その結合の及ぼす両者の相互の影響をゲルシフトアッセイにより調べた。

WRNIP1 及び WRN のどちらもテンプレート-プライマー型 DNA に結合し、この両者を共存させ場合は、WRN の DNA への結合が観察された。WRN の結合は WRNIP1 の濃度依存的に増加した。WRNIP1 による WRN の DNA 結合の促進を詳細に検討したところ、テンプレート-プライマー型 DNA に結合した WRNIP1 が WRN をリクルートし、リクルートされた WRN が WRNIP1 と置き換わることが判明した。一方、WRN の DNA ヘリカーゼ活性に及ぼす WRNIP1 の効果と同じ DNA を用いて調べたところ、WRN は結合した DNA (この場合はテンプレート DNA) 上を 3' 5' 方向に移動するため、テンプレート-プライマーのプライマーの 3' 末端側に結合した場合にはヘリカーゼの移動方向にはプライマーが存在しないため、ヘリカーゼ活性が検出されない。したがってこの結果は、WRNIP1 が WRN をテンプレート-プライマーのプライマーの 3' 末端側にリクルートしていることを示唆している。

これまでの解析から、DNA の傷害の種類や細胞の状況により、WRN と WRNIP1 は別々の経路で機能することが示唆されている。一方、酵母を用いた遺伝学的解析からは、Mgs1 (WRNIP1) が損傷乗り越え経路あるいはテンプレートスイッチ経路で機能するという可能性が示唆されている。このどちらの経路でも一度 DNA ポリメラーゼδが DNA から解離し、再び DNA に結合する必要がある。このことと、本研究で得られた結果を考え合わせると以下のような可能性が考えられる。

DNA に傷害がおきると、損傷部位に RAD18-RAD6B が集積し、WRNIP1 はユビキチン化されたヒストン H2A と RAD18 を認識して損傷部位に集積する。損傷部位にリクルートされた WRNIP1 は RAD18-RAD6B と置き換わり、DNA ポリメラーゼδをリクルートすることにより DNA 合成を再開するとともに、WRN をリクルートする。リクルートされた WRN は WRNIP1 と置き換わり、DNA ポリメラーゼδによる DNA 合成の伸長過程を促進する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計21件)

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.

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.

Inoue, E., Tano, K., Yoshii, H., Nakamura, J., Tada, S., Watanabe, M., Seki, M., and Enomoto, T. (2010) SOD1 is essential for the viability of DT40 cells and nuclear SOD1 functions as a guardian of genomic DNA. *J. Nuc. Acids in press.*

Kundu, L. R., Kumata, Y., Kakusho, N., Watanabe, S., Furukohri, A., Waga, S., Seki, M., Masai, H., Enomoto, T., and Tada, S. (2010) Deregulated Cdc6 inhibits DNA replication and suppresses Cdc7-mediated phosphorylation of Mcm2-7 complex. *Nucleic Acids Res.* 38, 5409-5418.

Islam, M. N., Fox, D. III, Guo, R., Enomoto, T., and Wang, W. (2010) RecQL5 promotes genome stabilization through two parallel mechanisms -interacting with RNA polymerase II and acting as a helicase. *Mol. Cell. Biol.* 30, 2460-2472.

Ishimi, Y., Sugiyama, T., Nakaya, R., Kanamori, M., Kohno, T., Enomoto, T., Chino, M. (2009) Effect of heliquinomycin on the activity of human MCM4/6/7 helicase. *FEBS J.* 276, 3382-3391.

Yoshimura, A., Seki, M., Kanamori, M., Tateishi, S., Tsurimoto, T., Tada, S., and Enomoto, T. (2009) Physical and functional interaction between WRNIP1 and RAD18. *Genes Genet. System* 84, 171-178.

Ohuchi, T., Seki, M., Kugou, K., Tada, S., Ohta, K., and Enomoto, T. (2009) Accumulation of sumoylated Rad52 in checkpoint mutants perturbed in DNA replication. *DNA Repair* 8, 690-696.

Takada, S., Inoue, E., Tano, K., Yoshii, H., Abe, T., Yoshimura, A., Akita, M., Tada, S., Watanabe, M., Seki, M., and Enomoto,

コメント [関1]: ファイル全体を両端揃えにした。

書式変更: フォント: Times New Roman, 10 pt

書式変更: フォント: Times New Roman, 10 pt

書式変更: フォント: Times New Roman, 10 pt

書式変更: フォント: Times New Roman, 10 pt, 下線

書式変更: フォント: Times New Roman, 10 pt

書式変更: フォント: Times New Roman, 10 pt

書式変更: フォント: Times New Roman, 10 pt

書式変更: フォント: Times New Roman, 10 pt, 下線

T. (2009) Generation and characterization of cells that can be conditionally depleted of mitochondrial SOD2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379, 233-238.

Tsuyama, T., Watanabe, S., Aoki, A., Cho, Y., Seki, M., Enomoto, T., and Tada, S. (2009) Repression of nascent strand elongation by deregulated Cdt1 during DNA replication in *Xenopus* egg extracts. *Mol. Bio. Cell* 20, 937-947.

Xu, D., Guo, R., Sobek, A., Bachrati, C.Z., Yang J., Enomoto, T., Brown, G.W., Hoatlin, M.E., Hickson, I.D., and Wang W. (2008) RMI, a new OB-fold complex essential for Bloom syndrome protein to maintain genome stability. *Gene Dev.* 22, 2843-2855.

Abe, T., Ishiai, M., Hosono, Y., Yoshimura, A., Tsuji, H., Tada, S., Adachi, N., Koyama, H., Takata, M., Takeda, S., Enomoto, T., and Seki, M. (2008) KU70/80, DNA-PKcs, and Artemis are essential for the rapid induction of apoptosis after massive DSB formation. *Cell Signal.* 20, 1978-1985.

Ohuchi, T., Seki, M., and Enomoto, T. (2008) Nuclear localization of Rad52 is pre-requisite for its sumoylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372, 126-130.

Ohuchi, T., Seki, M., Branzei, D., Maeda, D., Ui, A., Ogiwara, H., Tada, S., and Enomoto, T. (2008) Rad52 sumoylation and its involvement in the efficient induction of homologous recombination. *DNA Repair* 7, 879-889.

Hayashi, T., Seki, M., Yoshimura, A., Inoue, E., Kusa, Y., Tada, S., and Enomoto, T. (2008) Vertebrate WRNIP1 and BLM are required for efficient maintenance of genome stability. *Genes Genet. Syst.* 83, 95-100.

Otsuki, M., Seki, M., Inoue, E., Abe, T., Narita, Y., Yoshimura, A., Tada, S., Ishii, Y., and Enomoto, T. (2008) Analyses of functional interaction between RECQL1, RECQL5, and BLM which physically interact with DNA topoisomerase III α . *Biochim. Biophys. Acta* 1782, 75-81.

[学会発表] (計 54 件)

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) 2008 年 12 月 10 日 神戸ポートアイランド (神戸市)

吉村明、金森允、多田周右、立石智、関政幸、榎本武美 WRNIP1 の RAD18-RAD6 複合体への結合と複合体の DNA 結合に及ぼす影響 日本薬学会 第 129 年会 2009 年 3 月 26 日 京都国際会議場 (京都市)

吉村明、立石智、関政幸、榎本武美 WRNIP1 (WRN 結合タンパク質) と RAD18 の相互作用の解析 遺伝学研究所研究集会 2009 年 9 月 7 日 遺伝学研究所 (三島市)

[図書] (計 1 件)

関政幸・Mong Sing Lai・榎本武美、共立出版、蛋白質 核酸 酵素 別冊 ; 染色体サイクル 2009 543-546.

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

(2) 研究分担者

多田 周右 (TADA SHUSUKE)

帝京平成大学・薬学部・教授

研究者番号 : 00216970

削除: Alternative title: