

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790046

研究課題名（和文）WRNIP1 と RAD18 の機能的連携の解明

研究課題名（英文） Physical and functional interaction between WRNIP1 and RAD18

研究代表者 吉村 明 (YOSHIMURA AKARI)

東北大学・大学院薬学研究科・助手

研究者番号：70302164

研究成果の概要：

本研究では、早老症ウェルナー症候群原因遺伝子産物 WRN と相互作用するタンパク質として申請者の所属する研究室で見出された WRNIP1 の機能解析を目的とした。申請者は、損傷トレランス機構で働く RAD18 と WRNIP1 が相互作用することを初めて見出した。そこで、その機能的連携の解析から、WRNIP1 が損傷トレランス機構の中心で働く RAD18 と連携をとりながら、損傷トレランス機構に関与することが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,500,000	0	1,500,000
20年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	450,000	3,450,000

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：DNA修復、WRNIP1、RAD18、ウェルナー症候群

1. 研究開始当初の背景

早老症ウェルナー症候群原因遺伝子産物 WRN は DNA 複製、修復、組換え、テロメア維持などに関与するとされるが、その細胞内での機能は未だ不明な点が多い。当研究室では、WRN と WRNIP1 が細胞内で結合すること (*J.Biol.Chem.* **276**,

20364-20369, 2001)、さらに精製した WRN と WRNIP1 が試験管内で直接結合でき、その結合が ATP によって促進されることを明らかにした (*DNA Repair* **5**, 816-828, 2006)。申請者の研究室や阪大グループのこれまでの成果から、高等動物細胞で WRN, WRNIP1, PCNA, Pol δ , RAD18 の機

能の連携を調べることは、「WRNIP1 の複製フォーク上での役割の解明」につながることを期待された。申請者はニワトリ DT40 細胞を用い、WRNIP1, WRN/WRNIP, WRN/RAD18, WRNIP1/RAD18 などの各種遺伝子破壊細胞の作製と解析を行った。その結果、WRN と WRNIP1 は必ずしも同じ経路で機能するわけではないことを示した(DNA Repair 5, 816-828, 2006)。また、DT40 細胞の RAD18 欠損細胞は抗ガン剤であるカンプトテシン(CPT)に極めて高い感受性を示し、これは Pol η を呼ぶ込む機能とは関係がないことを明らかにした(Yoshimura et al., DNA Repair 5, 1307-1316, 2006)。また、予想外に、DT40 細胞では酵母と異なり WRNIP1/RAD18 二重破壊細胞は生存可能であった。さらに RAD18 破壊株の CPT 高感受性が WRNIP1 の遺伝子破壊により部分的に抑制された(Yoshimura et al. Biol. Pharm. Bull. 29, 2192-2196, 2006)。この結果は、WRNIP1 が RAD18 の上流で機能することを示唆している。

上記の結果を踏まえ、WRNIP1 と RAD18 との物理的な相互作用を調べるために、ヒト WRNIP1 と ヒト RAD18 を 293E 細胞に共発現させたところ、両者は免疫沈降可能な複合体中に含まれた。また、バキュロウイルスを用いた昆虫細胞発現系による精製タンパク質を用いた免疫沈降法によっても、両者の結合が確認された。従って、高等動物細胞では WRNIP1 と RAD18 が緊密に連携をとりながら、PCNA や Polδ の制御を行い、損傷トレランス機構を機能させる可能性が考えられた。本研究は、この独自の視点からの研究をさらに押し進めるものである。

2. 研究の目的

WRNIP1 のDNAに対する結合の解析

RAD18 が DNA 複製中間体様構造に結合することが明らかとなっている。WRNIP1 が DNA 複製フォーク近傍に存在し、様々な複製関連因子と結合するという現在までの知見から、WRNIP1 も DNA 複製中間体様構造に結合することが予想される。また、RAD18 の DNA に対する結合に WRNIP1 がどのような影響を与えるか解析をすることで、複製フォーク上での WRNIP1 と RAD18 の両者の機能的関係を調べる。

3. 研究の方法

(1) WRNIP1 のDNAに対する結合の解析

RAD18 が DNA 複製中間体様構造に結合すること (Genes to Cells 13, 343-354, 2008)、WRNIP1 が様々な DNA 複製関連因子と相互作用することから、WRNIP1 も DNA 複製中間体様構造に結合することが考えられる。また、DNA 複製が停止した際には、一本鎖 DNA 領域ができると考えられるので、WRNIP1 が一本鎖 DNA に結合する性質を持つか、解析を行う。さらにテンプレートプライマー型の DNA など様々な DNA を準備し、精製タンパク質を用いて、ゲルシフトアッセイによる解析を行う。

(2) WRNIP1 がRAD18-RAD6 複合体のDNAに対する結合に及ぼす影響の解析

WRNIP1 が RAD18 の DNA 結合にどのような影響を及ぼすのかゲルシフトアッセイを用いた解析を行い、DNA 複製フォーク上での両者の機能的関連を明らかにする。

4. 研究成果

高等動物細胞において WRNIP1 と Rad18 との間に遺伝学的な関係があることから、WRNIP1 と Rad18 が、直接あるいは間接的な相互作用をする可能性が示唆された。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、精製したヒト 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。

その結果、WRNIP1 と RAD18 が実際に物理的に相互作用することが明らかになった。また、WRNIP1 の DNA 結合能をゲルシフト分析法により調べたところ、WRNIP1 が ATP 依存的に DNA に結合することが明らかになった。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、RAD18-RAD6B の DNA 結合は 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。以上の結果から、WRNIP1 が損傷トレランス機構の中心で働く RAD18 と連携をとりながら、損傷トレランス機構に関与することが示唆された。

また、出芽酵母を用いた遺伝学的解析から、Mgs1 が Rad18 と同一ではないが同様の鋳型鎖乗り換え機構で機能することが示唆されていたが、WRNIP1 と RAD18 の DNA 結合に関する生化学的解析から、WRNIP1 と RAD18 が機能的に連携しながら損傷トレランス機構へ関与することが、本研究において示唆された。即ち、WRNIP1 が損傷乗り越え機構に関わり、RAD18 が WRNIP1 をリクルートし、

WRNIP1 が Pol δ をリクルートすることによりポリメラーゼスイッチの制御に関与する可能性であり、また、鋳型鎖乗り換えが必要な場合には、まず初めに WRNIP1 が関与する経路を選択し、WRNIP1 が欠損した時に RAD18 が関与する可能性である。このように、DNA 複製や修復における様々な局面に応じて、Rad18 と WRNIP1 はお互いに連携をとりながら、部分的に協調する、お互いの機能を制御するなど、相互の関係を変えながら機能していると考えられる。本研究が今後の WRNIP1 が関わる損傷トレランス機構の解明への端緒となることが期待される。

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 8 件)

1. Physical and functional interaction between WRNIP1 and RAD18.

Yoshimura A, Seki M, Kanamori M, Tateishi S, Tsurimoto T, Tada S, Enomoto T.

Genes Genet Syst. in press. 査読有

2. A novel role for Rad17 in homologous recombination.

Nishino K, Inoue E, Takada S, Abe T, Akita M, Yoshimura A, Tada S, Kobayashi M, Yamamoto K, Seki M, Enomoto T.

Genes Genet Syst. 2008, 83, 427-31. 査読有

3. Generation and characterization of cells that can be conditionally depleted of mitochondrial SOD2.

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

Biochem Biophys Res Commun. 2009, 379, 233-8. 査読有

4. KU70/80, DNA-PKcs, and Artemis are essential for the rapid induction of apoptosis after massive DSB formation. Abe T, Ishiai M, Hosono Y, Yoshimura A, Tada S, Adachi N, Koyama H, Takata M, Takeda S, Enomoto T, Seki M. Cell Signal. 2008, 20, 1978-85. 査読有

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

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

7. Functional interactions between BLM and XRCC3 in the cell. 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. J Cell Biol. 2007, 179(1), 53-63. 査読有

8. WRN functions in a RAD18-dependent damage avoidance pathway. Dong YP, Seki M, Yoshimura A, Inoue E, Furukawa S, Tada S, Enomoto T. Biol Pharm Bull. 2007, 30, 1080-3. 査読有

9. WRN counteracts the NHEJ pathway upon camptothecin exposure. Otsuki M, Seki M, Kawabe Y, Inoue E, Dong YP, Abe T, Kato G, Yoshimura A, Tada S, Enomoto T.

Biochem Biophys Res Commun. 2007, 355, 477-82. 査読有

〔学会発表〕（計 3 件）

1. 発表者名 吉村明
発表標題 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
学会等名 日本薬学会 第 129 年会
発表年月日 2009 年 3 月 26 日
発表場所 国立京都国際会館

2. 発表者名 吉村明
発表標題 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
学会等名 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
発表年月日 2008 年 12 月 11 日
発表場所 神戸ポートアイランド

3. 発表者名 吉村明
発表標題 WRNIP1 と RAD18 の機能的連携の解明
学会等名 第 30 回日本分子生物学会年会
発表年月日 2007 年 12 月 13 日
発表場所 パシフィコ横浜

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 明 (YOSHIMURA AKARI)
東北大学・大学院薬学研究科・助手
研究者番号：70302164

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：