

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月6日現在

機関番号：32511

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590059

研究課題名（和文） 種々のDNA動態における早老症原因遺伝子産物RecQL4の機能とその連携の解析

研究課題名（英文） Analysis on the function and coalition of RecQL4, a product of a gene mutated in a progeria syndrome, in the DNA transactions.

研究代表者

多田 周右（TADA SHUSUKE）

帝京平成大学・薬学部・教授

研究者番号：00216970

研究成果の概要（和文）：本研究では、早老症原因遺伝子産物 RecQL4 の高等真核細胞内での機能と動態を理解することを目的とし、生化学的手法や培養細胞を利用した解析をおこなった。その結果、1) RecQL4 が DNA 損傷部位へ速やかに移行すること、2) DNA 損傷応答関連タンパク質のほか、種々のタンパク質翻訳後修飾酵素が RecQL4 と相互作用すること、3) RecQL4 に高等真核細胞の生存に必須な領域と DNA 損傷に対応するための領域が共存していること、が示された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to understand the function and behavior of RecQL4, a product of a gene mutated in a progeria syndrome, in higher eukaryotic cells. Cell-biological or biochemical analyses of RecQL4 revealed that 1) RecQL4 is promptly translocated onto a site of DNA lesions, 2) RecQL4 interacts with numbers of post-translational modification enzymes, as well as proteins relevant to recognition and repair of DNA lesions, and 3) RecQL4 possesses domains for viability of higher eukaryotic cells and for coping with DNA damages in separate regions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：Rothmund-Thomson 症候群、RecQL4、DNA 修復、DNA 複製

1. 研究開始当初の背景

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クロマチン構造の変換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、細胞周期の特定の時期に脆弱な状態におかれる DNA を特に保護・監視し、問題が有ればそ

れを迅速に取り除く特別なメカニズムが細胞に備えられていると推測される。遺伝子構造安定性維持への関与が強く示唆されている RecQ ファミリー DNA ヘリカーゼ (RecQ ヘリカーゼ) のひとつである RecQL4 は、DNA 複製開始に必須なタンパク質であるうえ相同組換え修復への関与も示唆されており、DNA 複製と DNA 修復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。

Rothmund-Thomson 症候群 (RTS) は多形皮膚萎縮症や骨形成異常のほか、若年性白内障などの早期老化症状、高頻度の骨肉腫の発症などを特徴とする常染色体劣性遺伝病である。1999 年、Kitao らにより RecQL4 の変異がこの遺伝病の原因となることが報告された。その後、RecQL4 が DNA 複製開始の過程に必須の役割を果たすことが確認されたが、このような細胞増殖に不可欠の機能が遺伝病の原因となることは考え難いうえ、RTS の原因となる RecQL4 の変異点が DNA 複製開始に必須と予想された領域とは異なる領域に位置しているため、RecQL4 には DNA 複製開始以外の場面でも何らかの役割を果たしており、その異常が RTS をもたらすのではないかと考えられている。しかしながら、研究開始時には RecQL4 の DNA 複製開始以外の機能としては DNA 組換え修復で中心的な働きをする Rad51 や種々の修復経路で機能する poly (ADP-ribose) polymerase との相互作用などが断片的に記述されているのみであり、RTS の病態に関わる RecQL4 の機能についての理解はほとんど進んでいなかった。

2. 研究の目的

本研究では、DNA 複製をはじめとした細胞周期の諸段階と遺伝子構造安定性維持機構の分子的な連携を探り、その中での RecQL4 の機能を分子レベルで解明することを目標とした。

より具体的には、DNA 複製開始への役割など細胞の生存に必須な RecQL4 の機能・動態と、RTS の病態に関わると推測される機能・動態とを詳細に記述するとともに、これらの連携 (なぜ同じタンパク質がこれらの機能を同時に保持する必要があったのか、また、これらの機能が関わる過程が細胞内でどのように絡み合っているのか) について明快に提示することを目指した。

3. 研究の方法

(1) ヒト RecQL4 の N 末側に緑色蛍光タンパク質 (GFP) が融合したタンパク質 (C1-RecQL4)、もしくは、ヒト RecQL4 の C 末側に GFP が融合したタンパク質 (N1-RecQL4) を発現するプラスミドをそれぞれ作製し、HeLa 細胞に導入することにより、GFP 融合 RecQL4 を一過性に発現させ

た。この細胞を用いて、細胞核内の任意の領域に 405 nm 波長のレーザーを照射することで、局所的に DNA の損傷を引き起こし、この部位への蛍光タンパク質 (RecQL4) の集積を確認した。この蛍光の集積を指標に種々の解析をおこなった。

(2) RecQL4 と相互作用するタンパク質を同定するため、Flag タグを融合した RecQL4 を安定に発現するヒト 293 細胞を樹立した。作製した RecQL4 安定発現株より細胞抽出液を作製し、抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降した。ブレオマイシン処理もしくは紫外線照射したのちに、細胞抽出液を得たサンプルも調製し、無処理時の条件と比較・検討した。得られたサンプルを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により展開した後、銀染色をおこなった。また、コントロールとしてベクターのみを導入した細胞を作製し、これを用いて同様に免疫沈降をおこなった。

(3) ニワトリ B 細胞由来 DT40 細胞株は高等真核生物由来の細胞株でありながら、標的遺伝子破壊を比較的容易におこなうことができる細胞株である。この細胞株を用いて RecQL4 条件欠損株を樹立した上で、致死性や各種 DNA 傷害処理への感受性について検討をおこなった。

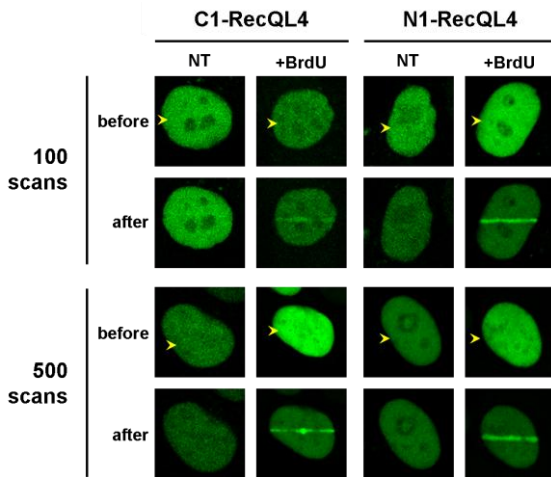
4. 研究成果

(1) レーザー照射により誘発された DNA 損傷部位への RecQL4 の集積について解析した。GFP 融合 RecQL4 を発現させた HeLa 細胞核にレーザーを照射し、核内の特定の領域に DNA 損傷を与えたところ、照射部位への RecQL4 の速やかな集積が観察された。このとき、RecQL4 の N 末端、C 末端のいずれに GFP を融合させた場合でも、同様の挙動で RecQL4 が DNA 損傷部位へ集積することが確認された。

レーザーを細胞核に照射すると、DNA 一本鎖切断、二本鎖切断、塩基損傷など様々な DNA 損傷が誘発されることが知られている。そこで、RecQL4 がどのような DNA 損傷へ集積しているのか検討した。プロモデオキシウリジン (BrdU) を DNA に取り込ませた細胞では、レーザー照射により誘発される DNA 二本鎖切断の生成が促進するため、細胞を BrdU で処理した後に、RecQL4 が損傷部位へ集積する様子を観察した。その結果、BrdU 処理した細胞では集積する RecQL4 の量が顕著に増加した。この結果より、RecQL4 が DNA 二本鎖切断部位へ集積することが示唆された (図 1)。

RecQL4 は poly-(ADP-ribose) polymerase 1 (Parp-1) と相互作用することが報告され

図1 BrdU 処理細胞における RecQL4 のレーザー照射部位への集積



ている。また、XRCC1 や DNA ポリメラーゼ β などの DNA 修復に関わるいくつかのタンパク質は Parp-1 依存的にレーザー照射部位へ集積することが知られる。そこで、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するため、Parp-1 阻害剤である 1,5-ジヒドロキシイソキノリン (DIQ) を処理した細胞を用いてレーザー照射後の RecQL4 の挙動を観察した。その結果、DIQ 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 依存的にレーザー照射部位へ集積すると考えられた。

さらに、レーザー照射部位への集積に必要な領域を絞り込むため、RecQL4 を N 末端側領域、中央領域、C 末端側領域の 3 つに分け、同様の解析をおこなった。その結果、N 末端側領域が全長型 RecQL4 と同様の挙動を示した。したがって、N 末端側のドメインが DNA 損傷部位への集積に重要な役割を果たすと考えられた。

- (2) 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。Flag タグを融合させた RecQL4 を安定に発現するヒト 293 細胞を樹立し、細胞抽出液より抗 Flag 抗体による免疫沈降をおこなった。これにより得られた沈降画分に含まれるタンパク質を、質量分析計を用いて分析した。その結果、様々な DNA 損傷の認識や修復に関わる種々のタンパク質のほか、ユビキチンリガーゼ (E3) や SUMO E3 リガーゼなど、いくつかの翻訳後修飾酵素と RecQL4 との相互作用が見出された。これらの相互作用は、細胞抽出液の調製前に DNA 損傷処理をしたか否かにかかわらず同様に見られた。このとき用いた細胞では、内在性 RecQL4 に加

えて FLAG-融合 RecQL4 が発現している状態であるため、RecQL4 が過剰に発現されていることにより、相互作用タンパク質の結合状態も十分に調節されなくなっているのかもしれない。

これらの相互作用タンパク質の一部について、免疫沈降法とイムノプロットングを組み合わせた確認もおこない、RecQL4 とこれらのタンパク質の相互作用が細胞内においても見られることが示唆された。これらの結果より、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。

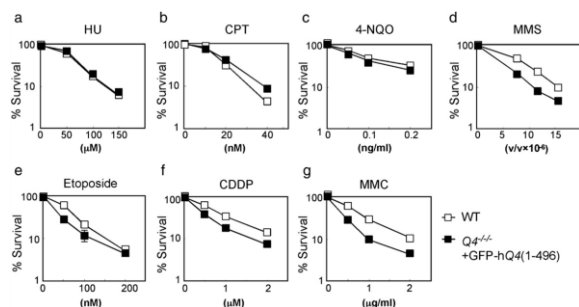
- (3) 細胞生物学的解析の手段として内在性の *RECQL4* 遺伝子を破壊したニワトリ DT40 細胞株を樹立した。この細胞株の樹立に際し、遺伝子組換えにより細胞内でヒト RecQL4 タンパク質を発現するよう操作したが、このヒト RecQL4 の発現を停止すると同細胞株は致死となった。この結果により、RecQL4 が確かに生存に必須なタンパク質であることが、高等真核生物の細胞レベルで明確に示された。

この致死性の回避にはヒト RecQL4 の全長が必要とされているわけではなく、N 末端側 496 アミノ酸のみで抑えることが可能であった。RecQL4 の N 末端側領域は出芽酵母の DNA 複製に必須なタンパク質である Sld2 に相同性を有することが知られており、同領域が DNA 複製に必須な役割を果たすことが予測されていた。本結果は、RecQL4 の N 末端側領域が高等真核細胞においても生存に必須な作用を持つことをはじめて実験的に提示したものである。

ここまで得られた DT40 *RECQL4* 欠損細胞株を用いて、DNA 障害剤であるヒドロキシ尿素 (HU)、カンプトテシン (CPT)、4-ニトロキノリン-1-酸化物 (4NQO)、メチルメタンスルホン酸 (MMS)、エトポシド (Etoposide)、シスプラチン (CDDP)、マイトマイシン C (MMC) に対する感受性を検討した。その結果、野生型細胞や *RECQL4* 欠損の致死性をヒト RecQL4 の全長で回避し生育を維持させた細胞に比べて、N 末端側領域のみで生育を維持した細胞では DNA 二本鎖切断や DNA 架橋剤に対する感受性が高まることが示された (図 2)。

DT40 *RECQL4* 遺伝子欠損細胞を用いた解析から、RecQL4 の中央領域および C 末端側領域が、DNA 傷害に対する応答・修復反応に寄与を果たすことが示唆された。RTS では RecQL4 の中央領域以降に変異がある場合が多いことから、RTS の原因となる RecQL4 の変異では N 末端側の細胞生存に必須な機能が影響を受けることなく中央部以降の機

図2 RecQL4 N 末側領域を補填した *RECQL4* 欠損細胞の各種 DNA 傷害処理に対する感受性



能に欠損を持つと考えられる。すなわち、ヒト RecQL4 の N 末端側のみで生育を維持した RecQL4 欠損細胞株は、RTS 患者細胞を模した樹立細胞株として、他の遺伝的背景を同一とする細胞株との比較による詳細な RecQL4 の細胞生物学的解析を可能にするものである。

一方、培養細胞へのレーザー照射の実験から、RecQL4 の DNA 損傷部位への蓄積にその N 末側領域が重要な役割を果たしていることが示唆されたため、細胞の生存に必須な N 末側領域がゲノム構造安定性の維持にも大きく寄与していると考えられた。

今後はこれらの新たな知見や本実験で利用可能になった実験手法や細胞株などの試料を手がかりとして、RecQL4 の機能やこれを中心とした分子的な連携がさらに明確に示されることが期待できる。

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 12 件)

- ① Ishikawa K., Ohsumi T., Tada S., Natsume R., Kundu L. R., Nozaki N., Senda T., Enomoto T., Horikoshi M., Seki M. (2011) Roles of histone chaperone CIA/Asf1 in nascent DNA elongation during nucleosome replication. *Genes Cells*. 16, 1050-1062. 査読有, DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01549.x
- ② Yoshimura A., Akita M., Hosono Y., Abe T., Kobayashi M., Yamamoto K.-I., Tada S., Seki M., Enomoto T. (2011) Functional relationship between Claspin and Rad17. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 414, 298-303. 査読有, DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.09.037
- ③ 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.,

Enomoto T. (2011) The histone chaperone facilitates chromatin transcription (FACT) protein maintains normal replication fork rates. *J Biol Chem*. 286, 30504-30512. 査読有,

DOI: 10.1074/jbc.M111.264721

- ④ Kundu L. R., Seki M., Watanabe N., Murofushi H., Furukohri A., Waga S., Score A. J., Blow J. J., Horikoshi M., Enomoto T., Tada S. (2011) Biphasic chromatin binding of histone chaperone FACT during eukaryotic chromatin DNA replication. *Biochim. Biophys. Acta*. 1813, 1129-1136. 査読有, DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.002
- ⑤ Abe T., Yoshimura A., Hosono Y., Tada S., Seki M., Enomoto T. (2011) The N-terminal region of RECQL4 lacking the helicase domain is both essential and sufficient for the viability of vertebrate cells. Role of the N-terminal region of RECQL4 in cells. *Biochim. Biophys. Acta*. 1813, 473-479. 査読有, DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.001
- ⑥ Kanamori M., Seki M., Yoshimura A., Tsurimoto T., Tada S., Enomoto T. (2011) Werner interacting protein 1 promotes binding of Werner protein to template-primer DNA. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 1314-1318. 査読有, DOI: 10.1248/bpb.34.1314
- ⑦ Inoue E., Tano K., Yoshii H., Nakamura J., Tada S., Watanabe M., Seki M., Enomoto T. (2010) SOD1 Is Essential for the Viability of DT40 Cells and Nuclear SOD1 Functions as a Guardian of Genomic DNA. *J Nucleic Acids*. 2010, 795946. 査読有, DOI: 10.4061/2010/795946
- ⑧ Kundu L. R., Kumata Y., Kakusho N., Watanabe S., Furukohri A., Waga S., Seki M., Masai H., Enomoto T., Tada S. (2010) Deregulated Cdc6 inhibits DNA replication and suppresses Cdc7-mediated phosphorylation of Mcm2-7 complex. *Nucleic Acids Res.* 38, 5409-5418. 査読有, DOI: 10.1093/nar/gkq262
- ⑨ Khayrutdinov, B. I., Bae, W. J., Yun, Y. M., Lee, J. H., Tsuyama, T., Kim, J. J., Hwang, E., Ryu, K. S., Cheong, H. K., Cheong, C., Ko, J. S., Enomoto, T., Karplus, P. A., Güntert, P., Tada, S., Jeon, Y. H., and Cho, Y. (2009) Structure of the Cdt1 C-terminal domain: Conservation of the winged helix fold in replication licensing factors. *Protein*

Sci. 18, 2252-2264. 査読有,
DOI: 10.1002/pro.236

- ⑩Tsuyama, 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. Biol. Cell* 20, 937-947. 査読有,
DOI: 10.1091/mbc.E08-06-0613
- ⑪Ohuchi, 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. 査読有,
DOI: 10.1016/j.dnarep.2009.01.018
- ⑫Yoshimura, 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. Syst.* 84, 171-178. 査読有,
DOI: /10.1266/ggs.84.171

[学会発表] (計8件)

- ①吉村明ほか The N-terminal region of RECQL4 lacking the helicase domain is both essential and sufficient for the viability of vertebrate cells. 第33回日本分子生物学会年会 2010年12月8日 神戸ポートアイランド (神戸市)
- ②Kundu, L. R. ほか Biphasic chromatin binding of histone chaperone FACT during eukaryotic chromatin DNA replication. 第33回日本分子生物学会年会 2010年12月7日 神戸ポートアイランド (神戸市)
- ③細野嘉史ほか DNAヘリカーゼ RECQL5のDNA組換え・修復における機能の解析. 第33回日本分子生物学会年会 2010年12月7日 神戸ポートアイランド (神戸市)
- ④大隅達也ほか A mutant protein of histone chaperone CIA/Asf1 defective in disrupting histone(H3-H4)₂ tetramer accelerates rate of DNA replication. 第32回日本分子生物学会年会 2009年12月11日 パシフィコ横浜(横浜市)
- ⑤牛田磨理ほか Analysis of DNA replication repression by excess Cdt1. 第32回日本分子生物学会年会 2009年12月10日 パシフィコ横浜(横浜市)
- ⑥井上絵里ほか Nuclear superoxide may trigger spontaneous sister chromatid exchanges. 第32回日本分子生物学会年会 2009年12月9日 パシフィコ横浜(横浜市)
- ⑦大隅達也ほか DNA複製に必須なCdc45の新規機能の解析. 第48回日本薬学会東北支部大会. 2009年10月18日 東北薬科大

学(仙台市)

- ⑧多田周右ほか The initiation of DNA replication is suppressed by Cdc6, a protein essential for the pre-replicative complex formation. 第68回日本癌学会学術総会 2009年10月3日 パシフィコ横浜 (横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多田 周右 (TADA SHUSUKE)
帝京平成大学・薬学部・教授
研究者番号: 00216970

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: