

遺伝性早老症ウェルナー症候群原因遺伝子産物
WRNヘリカーゼの機能解析

総合研究大学院大学 生命科学研究科

遺伝学専攻 平成10年度入学

坂本 修一

指導教官 広海 健

Functional analysis of WRN helicase responsible for premature aging disorder Werner's syndrome.

Shuichi Sakamoto

Department of Genetics, School of Life Science, The Graduate University for Advanced Studies

Werner's syndrome (WS) is an autosomal recessive disorder with many features of premature aging (Martin 1985). The life span of fibroblasts cultured from WS patients is much shorter than that of normal fibroblasts (Salk *et al.* 1985). WS cells also show a prolonged S-phase of the cell cycle and increased sensitivity to genotoxic agents, such as camptothecin (CPT), etoposide and 4-nitroquinolin-N-oxide (4NQO), and genomic instability characterized by translocations and extensive deletions (Shen & Loeb 2000).

The gene responsible for WS (*WRN*) encodes a 3'-5' DNA helicase belonging to the RecQ helicase family including *E. coli* RecQ and *S. cerevisiae* Sgs1 (Yu *et al.* 1996). Mutations in other RecQ family genes also lead to genomic instability. For instance, mutations in human *BLM* and *RTS* genes cause cancer-prone Bloom's (Ellis *et al.* 1995) and premature aging Rothmond-Thomson's syndromes due to genomic instability (Kitao *et al.* 1999), respectively. The gene product of *WRN* (WRN) has a exonuclease activity (Huang *et al.* 1998; Suzuki *et al.* 1999) in addition to DNA helicase activity (Suzuki *et al.* 1997). WRN interacts with proteins that participate in DNA metabolism such as replication protein A (RPA), proliferating cell nuclear antigen, topoisomerase I and p53 (Brosh *et al.* 1999; Lebel *et al.* 1999; Shen & Loeb 2000). The phenotypes of WS cells and biochemical data of WRN

implicate that WRN participates in DNA metabolism involved in maintaining the genomic integrity. The precise biological functions of WRN, however, remain to be elucidated. For the better understanding of WRN functions I have attempted to investigate subcellular localization of this protein, and to identify other proteins that associate with WRN.

After DNA damage, several nuclear proteins involved in DNA repair change their subnuclear locations and, as a result, they concentrate at discrete sites called nuclear foci (Maser *et al.* 1997; Liu *et al.* 1999). These foci formation are considered important processes in DNA damage repair (Nelms *et al.* 1998). For instance, Rad51, a structural and functional homolog of *E. coli* RecA, is one such protein that forms nuclear foci after treatment with various genotoxic agents (Haaf *et al.* 1995). Partial colocalization of Rad51 foci with RPA (Golub *et al.* 1998), and with sites of single-stranded DNA (ssDNA) (Raderschall *et al.* 1999) suggest that these Rad51-RPA foci are sites of DNA repair by homologous recombination. WS cells are sensitive to certain types of genotoxic agents (Ogburn *et al.* 1997; Okada *et al.* 1998; Poot *et al.* 1999; Pichierri *et al.* 2000). The fact implies that WRN participates in DNA damage responses. Thus, I examined subnuclear localization of WRN change after treatment with DNA damaging agents. Here, I report that WRN forms nuclear foci in response to treatment of cells with various agents including CPT, etoposide, 4NQO, hydroxyurea (HU) and a high dose of aphidicolin (10 µg/ml). Moreover, I found that most WRN foci colocalize with RPA foci, and partially overlap with Rad51 foci and sites of BrdU incorporation. These findings prompt me to propose that WRN is engaged in a recombinational repair of chromosomal damage and in the processing of stalled replication

forks.

Next, I analyzed the relationship between WRN and ECTR (extra-chromosomal telomere repeat) a specific nuclear-structure of telomerase-negative immortalized human cells. Telomerase-negative immortalized human cells maintain their telomeres by a mechanism known as alternative lengthening of telomeres (ALT) (Bryan *et al.* 1995). ECTR is specific nuclear-structures in ALT cells consists of extra-chromosomal telomeric DNA and DNA metabolic proteins such as RPA, Rad51/52, PML, NBS1 and TRF1/2 (Yeager *et al.* 1995; Wu *et al.* 2000). It has been shown that the ssDNA-binding protein RPA physically interacts with WRN and stimulates its helicase activity (Shen *et al.* 1998; Brosh *et al.* 1999). Further, WRN dissociates a large non-covalent complex of telomere repeat DNA in the presence of RPA (Ohsugi *et al.* 2000). These previous reports prompted me to examine if WRN localize to ECTR in ALT cells. Double staining with anti-WRN antibody and FISH using telomere specific probe showed that WRN existed in the nuclei and especially condensed to large signals of telomere FISH in ALT cells. Non-telomeric proteins such as RPA and PML also localized to these large signals of telomere FISH, indicated that these nuclear structures are ECTR. The localization of WRN to ECTR imply that WRN may participate in ALT mechanism. The facts that several proteins included in ECTR play important roles in the maintenance of chromosomal telomere in normal cells (van Steensel & de Lange 1997; van Steensel *et al.*, 1998) In additions, WS cells show abnormalities of telomere (Schulz *et al.* 1996; Tahara *et al.* 1997). These findings raise the possibility that WRN may engaged in the maintenance of chromosomal telomere in normal cells.

To identify proteins that associate with WRN, I performed immunoprecipitation with anti-WRN antibodies. Among co-immunoprecipitated proteins, two were identified as Ku86 and Ku70 by mass spectrometry. This result was also confirmed by reciprocal co-immunoprecipitations of WRN with anti-Ku86 or anti-Ku70 antibodies. It is known that Ku proteins associate with DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) and stimulate its kinase activity when double-strand breaks (DSB) are generated in the cells. This protein complex formation and following activation of kinase are critical process of DSB repair by non-homologous end joining (NHEJ) (Smith & Jackson 1999). Therefore, I examined the interaction between Ku and WRN in the DNA-PKcs deficient cell line M059J. Successful precipitation of WRN with antibodies against Ku86 or Ku70 indicated that DNA-PKcs is not essential for Ku-WRN interaction. Since WRN forms nuclear foci in response to DSB inducer CPT, I investigated subcellular localization of Ku and DNA-PKcs in the cells treated with CPT. Immunocytochemical studies revealed that these proteins do not form nuclear foci even in the cells containing WRN foci. Previous studies showed that Ku86-mutant mice exhibit an early onset of senescence (Vogel *et al.* 1999) and cells deficient in Ku86 or Ku70 have a short replicative life span (Gu *et al.* 1997): Although biological significance of Ku-WRN interaction is not clear, WRN functions cooperated with Ku proteins may be critical to aging phenotypes.

These results obtained from this study provide evidence for the roles of WRN in the maintenance of genomic stability and support the idea that genomic instability leads to aging phenotypes of WS.

目次

目次	-----	1
略号表	-----	4
第1章 緒言	-----	6
第2章 DNA損傷剤処理によって誘導されるWRNの核内フォーカス形成		
2-1 序論	-----	10
2-2 材料と方法		
2-2-1 細胞株とその培養	-----	12
2-2-2 薬剤と放射線照射	-----	12
2-2-3 抗体	-----	12
2-2-4 免疫染色及び核内フォーカスの解析	-----	13
2-2-5 イムノプロット	-----	13
2-2-6 ペプチド核酸プローブを用いた蛍光 <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション (FISH)によるテロメア配列の検出	-----	14
2-2-7 DNA合成部位の <i>in situ</i> 標識	-----	14
2-3 結果		
2-3-1 細胞のCPT処理によって誘導されるWRNフォーカス	-----	15
2-3-2 エトポシド、4NQO及びブレオマイシン処理に反応して形成される WRNフォーカス	-----	16
2-3-3 他の薬剤処理によるWRNフォーカス形成の誘導	-----	16
2-3-4 CPTにより誘導されるWRNフォーカスとRPAの共局在	-----	17
2-3-5 CPTにより誘導されるWRNフォーカスのRad51フォーカス及びBrdU の取り込み部位との部分的な一致	-----	17
2-4 考察	-----	19

第3章	テロメラーゼ陰性不死化細胞に特異的な核内構造体ECTRへのWRNの局在	
3-1	序論	23
3-2	材料と方法	
3-2-1	細胞株とその培養	25
3-2-2	抗体	25
3-2-3	ペプチド核酸プローブを用いた蛍光 <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション(FISH)によるテロメア配列の検出	25
3-3	結果	
3-3-1	テロメラーゼ陰性ヒト不死化細胞KMST-6でのECTR	26
3-3-2	ALT細胞WI38-VA13及びテロメラーゼ陽性癌細胞MCF-7でのテロメアFISHシグナルとWRN	26
3-4	考察	28
第4章	新規WRN結合タンパク質としてのKuの同定	
4-1	序論	30
4-2	材料と方法	
4-2-1	細胞株とその培養	32
4-2-2	細胞の ³⁵ Sメチオニンによる標識	32
4-2-3	免疫沈降	32
4-2-4	SDS-PAGE後のシグナルの検出 (³⁵ S標識細胞を用いた免疫沈降)	33
4-2-5	SDS-PAGE後のシグナルの検出 (質量分析用)	33
4-2-6	質量分析によるタンパク質の同定	33
4-2-7	ウェスタンブロッティング	34
4-2-8	免疫染色	34
4-3	結果	
4-3-1	³⁵ S標識した細胞の抽出液を用いた抗WRN抗体による免疫沈降	35
4-3-2	WRN結合タンパク質の免疫沈降法による精製及び質量分析法による同定	35
4-3-3	CPT処理細胞及びDNA-PKcs欠損細胞におけるWRN-Kuタンパク質の結合	36

4-3-4 CPT処理したK562細胞におけるKu/DNA-PKcsの核内局在	36
4-4 考察	37
第5章 総括	40
参考文献	43
図表の説明	56
図及び表	62
謝辞	

略号表

APB : ALT-associated PML body
ALT : alternative lengthening of telomeres
AT : ataxia telangiectasia, 毛細血管拡張性運動失調症
BS : Bloom's syndrome, ブルーム症候群
BLM : Bloom's syndrome gene, ブルーム症候群原因遺伝子
BrdU : 5-bromodeoxyuridine
CPT : camptothecin
CS : Cockayne syndrome, コケイン症候群
DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA-PK : DNA-dependent protein kinase
DNA-Pkcs : DNA-PK catalytic subunit
DSB : DNA double-strand break
dsDNA : double-strand DNA
DTT : dithiothreitol
EBV : epstein-barr virus
ECTR : extra-chromosomal telomere repet
EDTA : ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetate
FBS : fetal bovine serum
FISH : fluorescence *in situ* hybridization
GST : Glutathion S-transferase
HU : hydroxyurea
MALDI : matrix assisted laser desorption ionization
mRNA : messenger RNA
NP-40 : nonidet P-40
4NQO : 4-nitroquinoline-1-oxide
PBS : phosphate-buffered saline

PBST : 0.05 % Tween 20 in PBS
PCNA : proliferating cell nuclear antigen
PI-3 : phosphatidylinositol -3
PMSF : phenylmethanesulphonyl fluoride
RECQL : RecQ protein-like
RPA : replication protein A
rqh1 : recQ homolog 1
RTS : Rothmund-Thompson's sndrome, ロスモンド-トムソン症候群
SDS : sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE : SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SGS1 : slow growth suppressor
SOD : superoxide dismutase
SSB : DNA single-strand break
ssDNA : single-strand DNA
SV40 : simian virus 40
TCR : transcription-coupled repair
TOF : time of flight
Triton X-100 : polyoxyethylene (10) oxtylphenyl ether
Tween 20 : polyoxyethylene sorbitan monolaurate
WS : Werner's sndrome, ウェルナー症候群
WRN : Werner's syndrome gene
WRN : Werner's syndrome protein

第1章 緒言

われわれにとって「老いて死ぬ」ということは避けることのできない生物学的事象である。それゆえに、「ヒトは何故老化するのか?」という疑問は多くの人が一度は抱くものであろう。老化とは、成熟期以降に加齢に伴って生じる、しばしば個体の生存率に悪影響を及ぼす生理的变化であり、生物界に広く見られる現象である。老化の原因については、従来から様々な説が提唱されているが、それらは大別すると2つに分けられる。すなわち、寿命は遺伝子によって制御されており、老化は何らかの遺伝的なプログラムによって進行すると考えるプログラム説と、加齢に伴ってDNAやタンパク質等の生体内高分子に異常が蓄積していくことによって最終的に死に至るというエラーカタストロフ説である。カロリー摂取を制限することによって生物の寿命が延びることや、活性酸素を除去する酵素SOD (Superoxide Dismutase) を強制発現させたショウジョウバエの寿命が延びる (Parkes *et al.* 1998) ことなどは、エラーカタストロフ説を支持するものである。一方、それぞれの生物種には固有の老化パターンが存在し、同じ生物種に属する生物はほぼ同一の老化パターン及び寿命を示すことや、染色体末端のテロメア長に規定されるヒト培養細胞の分裂可能回数 (これを分裂寿命と呼ぶ) 等の現象 (Heyflick *et al.* 1965) は、老化・寿命に関する遺伝的プログラムの存在を暗示している。実際の老化過程には、遺伝子に規定される因子と、環境要因や代謝によってもたらされるエラーの蓄積という因子の両方が関わっていると考えるのが妥当であろう。しかしながら、ヒトをはじめとして個々の生物種の具体的な老化機構については、依然として不明な点が多い。

生物種によってそれぞれ固有の老化パターンが存在する一方で、近縁種であっても老化パターンが大きく異なる場合も多く知られている。そのため、ヒトの老化機構を理解する上ではヒトを対象とした研究が不可欠となる。とりわけ単一遺伝子の変異によってもたらされる遺伝性早老症は、遺伝学及び分子生物学的手法を適用しうる点で望ましい研究対象であり、これらの発症機序を解明することで、複雑な自然老化のメカニズムを理解する手がかりを得ることが期待できる。表1-1にこれまでに知られている主なヒト早老症について示す。

これらの症候群のなかで、原因遺伝子が同定され、その生体内機能も比較的良く明らかにされているのが、毛細血管拡張性運動失調症（Ataxia-telangiectasia: AT）ならびにコケイン症候群である。これらの原因遺伝子はいずれもDNA損傷の修復過程に重要な役割を果たすことが知られている。AT患者は早期老化とともに、小脳性運動失調、免疫不全等を示す。AT患者由来の細胞は、DNA二本鎖切断（DSB）を誘発する電離放射線に対して高感受性であり、染色体不安定性やチェックポイント異常を呈する。原因遺伝子産物ATMはPI3キナーゼファミリーに属するタンパク質リン酸化酵素であり、細胞に電離放射線を照射してDSBを誘発させると、チェックポイントやアポトーシスに参与する転写因子p53を含む複数のタンパク質をリン酸化する。これによってG1/S、S、G2/Mのチェックポイント制御に参与する（Rotman & Shiloh 1997）。一方、コケイン症候群（CS）患者は白内障や生殖機能低下等の早老症状に加えて日光に対する過敏症を呈し、患者由来細胞も紫外線（UV）に感受性である。原因遺伝子はCS-A、CS-Bの二種類が存在し、CS-BはDNAヘリカーゼ、CS-AはCS-Bヘリカーゼに結合するタンパク質である。両者とも異常な修飾を受けた塩基を転写と共役して除去する修復経路（transcription-coupled repair: TCR）で機能する。そのため、CS細胞は転写鎖上のDNA損傷を修復することが出来ず、UV照射後の転写の回復が見られない（Balajee & Bohr 2000）。この様に、DNA修復関連因子の欠損が一部の早老症の原因となっていることは、DNA代謝過程の異常によるゲノム不安定性が早老症発症に深く関わることを示唆している。

遺伝性早老症の中で、健常人で見られる老化徴候に最も類似した病態を示すのがウェルナー症候群（WS）である（表1-2）。WSは1904年ドイツ人医師Otto Wernerが若年性白内障と皮膚硬化症をきたした4人兄弟を報告したのが初例である。常染色体劣性の遺伝形式をとり、今日までに世界各地で約1200例が報告されているが、その内の70%近くを日本人患者が占めている（Matsumoto *et al.* 1997）。WS患者は、一般的に出生後から幼児期にかけては顕著な異常は認められないが、思春期以降は、健常人が加齢に伴って呈する様々な老化症状を若い年齢で示すようになる。主な症状としては、10代後半から20代にかけての発育不全、白髪、禿、皮膚硬化、白内障、30代以降では糖尿病、皮膚潰瘍、性腺萎縮、骨粗鬆症、動脈硬化等が挙げられるが、痴呆や免疫不全等は認められない。最終的に患者は50歳前後で死亡するという短寿命である。

細胞レベルにおいてもWS患者は様々な異常を示す（表1-2）。まず挙げられるのは、分裂寿命の短縮である。一般に、高齢者から得られた体細胞は若年者から得ら

れた体細胞よりも分裂可能回数（すなわち分裂寿命）が少ないことが知られているが、興味深いことに、WS患者から得られた繊維芽細胞も同年代の健常人由来の繊維芽細胞と比較して分裂寿命が短い（Martin *et al.* 1970）。このことは、WSが個体レベルのみならず細胞レベルにおいても健常人の老化現象に類似していることを示している。

また、WS細胞はテロメア維持機構にも異常が見られる。WS患者由来の初代培養細胞は健常人のものと比較してテロメア長が短くなっていること（Schulz *et al.* 1996）、EBV（Epstein-Barr virus）に感染させたWS患者のBリンパ球は継代をつうじてテロメア長が大きく変動することが報告されている（Tahara *et al.* 1997）。更に、WS細胞では染色体転座や欠失型の突然変異率が上昇していること（Salk *et al.* 1985、Monnat *et al.* 1992）や、ある種のDNA損傷剤に対する感受性を示すこと（Ogburn *et al.* 1997、Okada *et al.* 1998、Poot *et al.* 1999、Pichierri *et al.* 2000）、DNA複製に関しても、DNA複製開始点の減少や細胞周期のS期の延長などの異常が認められている（Takeuchi *et al.* 1982）。

原因遺伝子WRNは1996年にポジショナルクローニングによって同定され、大腸菌RecQや出芽酵母Sgs1などが含まれるRecQヘリカーゼファミリーに属することが判った（Yu *et al.* 1996）。RecQ型ヘリカーゼの変異はゲノム不安定性をもたらす。特に、ヒトのBLM、RTSはそれぞれ高発癌性ブルーム症候群、遺伝性早老症ロスモンド-トムソン症候群の原因遺伝子であり、出芽酵母SGS1の変異体も早老・短寿命といった形質を示す（図1-1）（Ellis *et al.* 1995、Kitao *et al.* 1999b、Sinclair *et al.* 1997）。原因遺伝子産物WRNは3'-5'方向のDNAヘリカーゼ活性とエクソヌクレアーゼ活性を持ち（Suzuki *et al.* 1997、Huang *et al.* 1998、Suzuki *et al.* 1999）、RPA、PCNA、p53、トポイソメラーゼIといったDNA代謝に関わる様々なタンパク質と結合することが明らかになっている（Brosh *et al.* 1999、Lebel *et al.* 1999、Cooper *et al.* 2000、Shen & Loeb 2000）。

本研究を開始した時点では、以上述べてきたようなWS細胞の形質やWRNに関するデータから、WRNが何らかの形でDNA代謝に関与し、ゲノム安定性に寄与することが予想されていた。しかしながら、WRNが機能する具体的なイベントについては殆ど明らかになっていなかった。そこで本研究では、WRNの生物学的な機能の詳細を明らかにすることを目的として、WRNの細胞内局在の検討ならびに新規WRN結合タンパク質の探索を行った。第2章では、DNA損傷剤処理によってWRNが形成する核内フォーカスについての解析結果を述べる。第3章では、テロメラーゼ陰性不死

化細胞に特異的に見られる染色体外テロメアDNAにWRNがRPAやPMLタンパク質とともに局在することを示す。第4章では、抗WRN抗体を用いた免疫沈降法によって精製したWRN結合タンパク質を質量分析によって解析し、新規結合タンパク質としてKuを同定したことについて述べる。

第2章 DNA損傷剤処理によって誘導されるWRNの核内フォーカス形成

2-1 序論

WS細胞は、トポイソメラーゼIの阻害剤であるカンプトテシン (CPT)、トポイソメラーゼIIの阻害剤であるエトポシド、そして4-ニトロキノリン-N-オキシド (4NQO) に対して正常細胞よりも高い感受性を示すことが報告されている (Ogburn *et al.* 1997、Okada *et al.* 1998、Poot *et al.* 1999、Pichierri *et al.* 2000)。CPT、エトポシドが主な作用としてDNA二本鎖切断を誘発すること、4NQOが塩基修飾をもたらすことから、WS細胞はX線やUVに対しても高感受性である可能性が考えられるが、これらの放射線に対する感受性は無いとされている (Shen & Loeb 2000)。WS細胞がある種のDNA損傷剤に対して感受性であることは、WRNがDNA損傷に対する細胞の応答機構の何らかの過程に関与することを想像させるものであるが、その詳細についてはこれまで明らかになっていなかった。

DNA修復に関与する幾つかのタンパク質は、DNA損傷が生じると細胞内局在を変化させ、焦点状に集合して核当たり数十から数百個の核内フォーカスを形成することが知られている。例えば、大腸菌RecAの真核生物ホモログであるRad51は、様々なDNA損傷剤処理に反応して核内フォーカスを形成するが、その一部がRPAのフォーカス及び一本鎖DNAが露出している部位と一致することから、Rad51フォーカスは相同組換えによるDNA修復が行われている領域であると考えられている (Haaf *et al.* 1995、Radershall *et al.* 1999)。また、乳癌抑制遺伝子BRCA1や、XRCC3等の他のDNA修復因子の変異によって放射線高感受性を示す細胞においては、Rad51のフォーカス形成が見られないことが示されている (Yuan *et al.* 1999、Bishop *et al.* 1998)。この様な結果から、DNA修復因子の核内フォーカス形成はDNA修復において重要なイベントであると考えられている。

WRNは通常核小体もしくは核全体に分布し、細胞の培養条件によっては核小体から核質に移行することが知られていたが (Kitao *et al.* 1999a)、DNA損傷剤処理等に対する挙動については不明であった。そこで私は、CPT、エトポシド、4NQOといったWS細胞が感受性を示すものを中心に、DNA損傷剤ならびにDNA合成阻害剤が

WRNの細胞内局在に与える影響を細胞免疫化学的手法によって検討した。

2-2 材料と方法

2-2-1 細胞株とその培養

ヒト胎児腎由来細胞株293EBNA (Invitrogen社)、ヒト胸部癌細胞MCF-7及びSV40ウイルスでトランスフォームしたヒトWI38細胞は、50 μ g/mlゲンタマイシンと10%ウシ胎児血清 (Trace-bioscience社、56 $^{\circ}$ Cで30分間処理し非働化した) を含むDMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium、Sigma社) を用いた。ヒト骨髄性白血病細胞K562、ヒトT細胞由来白血病細胞RPMI8402ならびにCPT-K5 (創価大学・安藤俊夫教授より分与)、ヒト前骨髄球性白血病細胞HL-60及びEpstein-Barrウイルス (EBV) でトランスフォームしたヒトBリンパ芽球細胞株は、50 μ g/mlゲンタマイシンと10%ウシ胎児血清を含むRPMI1640を培地として用いた。全ての細胞は、5% CO₂、37 $^{\circ}$ Cのインキュベータ内 (十慈科学工業社) で培養した。培養ディッシュ及びチューブは全てCorning社製のものを使用した。

2-2-2 薬剤と放射線照射

アフィジコリン、ブレオマイシン、CPT、エトポシド、HUはSigma社製を用いた。ICRF-193は全薬工業社より、4NQOはナカライテスク社より購入した。X線照射には、MBR-1520R (日立メディコ社) を用い、出力150 kV/15 mA、線量率4.6 Gy/minにて行った。UV照射にはStratagene社のUVクロスリンカーを使用した。

2-2-3 抗体

ヒトWRNに対する特異的なマウスモノクローナル抗体 (8H3及び4H12) は、(株)エイジーン研究所にて作成された (Shiratori *et al.* 1999)。ヒトWRNに対するウサギ抗血清 (ab200) はAbcam社より購入した。Rad51に対するウサギポリクローナル抗体は京都大学・武田俊一教授より分与された。B23に対するヤギポリクローナル抗体 (sc-6013) はSanta-Cruz社より、RPA70 (NA13) 及びRPA34 (NA18) に対するマウスモノクローナル抗体はOncogene Research Products社より、アクチンに対するマウスモノクローナル抗体 (C4) はICN社より購入した。免疫細胞化学に使用したAlexa488及び594標識二次抗体は、Molecular Probes社より購入した。

2-2-4 免疫染色及び核内フォーカスの解析

293EBNA等の付着細胞についてはコラーゲンコートされた培養用チャンバー（Biocoat collagen I cellware culture slides、Becton-Dickinson社）を使用した。K562細胞等の浮遊細胞は、リン酸緩衝食塩水（PBS、大日本製薬社）で2回洗った後、サイトスピン法によってスライドガラス（s8111、Matsunami社）に付着させた。スライドガラス上の細胞を、3.7%ホルムアルデヒドを含むPBSで、室温10分間処理し固定した。次に0.1% Triton X-100を含むPBSで5分間室温にて処理した後、3%スキムミルクを含むPBSで30分以上室温にてブロッキングした。ブロッキング後、4℃で一晩もしくは室温にて1時間、一次抗体とインキュベートした。一次抗体の濃度は、マウスモノクローナル抗体が5 μ g/ml、抗WRNウサギモノクローナル抗体が1500分の1、抗Rad51ウサギポリクローナル抗体が400分の1の条件で使用した。0.05% Tween20を含むPBS（PBST）で3回、計30分間洗浄した後、室温にて1時間、Alexa標識された二次抗体（最終濃度5 μ g/ml）とインキュベーションした。PBSTで洗浄した後、DNAを染色するために2 μ g/mlの4,6-diamidino-2-phenylindole（DAPI）を載せ、カバーガラスとマニキュアで封入した。免疫染色による蛍光像は共焦点レーザー顕微鏡システム（Fluoview、オリンパス社）を用いて解析した。WRN、RPA、Rad51の核内フォーカスの解析については、それぞれ200個の細胞核を調べ、6個以上のフォーカスが認められた核を核内フォーカス陽性と判定した。

2-2-5 イムノブロット

細胞をPBSで2回洗浄した後、SDSサンプルバッファー（1% sodium dodecyl sulfate、2% β -mercaptoethanol、20% glycerol、30 mM Tris-HCl、pH6.8、0.2 M dithiothreitol）にて溶解した。細胞溶解液を98℃で5分間熱した後、7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した。ゲル中にて分画されたタンパク質をPVDFメンブレン（Immobilon、Millipore社）に転写し、5%スキムミルクを含むPBSで4℃一晩もしくは室温にて1時間ブロッキングした。その後、メンブレンを抗WRNマウスモノクローナル抗体8H3及び4H12（それぞれ最終濃度2 μ g/mlで使用した）もしくは抗アクチンマウスモノクローナル抗体C4（原液を一万倍希釈した）と室温で1時間インキュベートした。PBSTで洗浄した後、HRP（Horse radish peroxidase）標識抗マウスIgGウサギポリクローナル抗体（P0260、Dako社）と室温で1時間インキュベートし、ECLウエスタン検出キット及びHyperfilm（Amersham-Pharmacia社）を用いて感光、現像した。

2-2-6 ペプチド核酸プローブを用いた蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション (FISH) によるテロメア配列の検出

K562細胞をサイトスピン法によってスライドガラスに付着させ、 -20°C で20分間メタノール処理し固定した。次に氷冷アセトン中で10秒間処理した後、5%スキムミルクを含むPBSで室温にて30分間以上ブロッキングした。スライドガラスを0.1 M クエン酸溶液 (pH6.0) に移し、電子レンジ (2450 MHz / 500 W) で5分間、2回加熱した。加熱後、室温で10分間放置した上でエタノールで脱水し、風乾した。0.3 $\mu\text{g/ml}$ Cy3標識 (CCCTAA)₃ペプチド核酸プローブ (PBIO、Biosearch Product社) と30 $\mu\text{g/ml}$ サケ精巢DNA (Sigma社) を含むPBSをスライドに載せ、室温で1時間インキュベートした後、PBSTで洗浄し、DAPIでDNAを染めて共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

2-2-7 DNA合成部位の*in situ*標識

新生DNAの検出には、BrdUラベリング&ディテクションキットI (Roche-Diagnostic社) を使用した。幾つかの改変点を除いては、キット付属のプロトコールに従った。K562細胞を10 μM BrdUを含む培地で2時間培養した後、氷冷PBSで2回洗浄し、サイトスピン法によってスライドガラスに付着させた。 -20°C で20分間メタノール固定し、氷冷アセトン中で10秒間処理した後、5%スキムミルクを含むPBSで室温にて30分間以上ブロッキングした。ブロッキング後、抗BrdUマウスモノクローナル抗体 (キット付属) 及び抗WRNウサギ抗血清と 37°C で1時間インキュベートした。二次抗体処理以降は通常の免疫染色と同様に行った。

2-3 結果

2-3-1 細胞のCPT処理によって誘導されるWRNフォーカス

ヒト骨髄性白血病細胞K562を免疫細胞化学的手法により解析したところ、核小体タンパク質であるB23と比較して判るように、WRNは核質及び核小体にほぼ均一に分布していた(図2-1A, a-d)。K562細胞をWS細胞が感受性を示すトポイソメラーゼI阻害剤CPTによって処理すると、WRNの免疫染色像は劇的に変化した。すなわち、主に核質の数十から数百の部位に焦点状に集合した(図2-1A, e-h)。このCPTの効果は濃度依存性を示した(図2-1B)。抗WRN抗体を用いたウェスタンブロットから明らかのように(図2-1C)、細胞当たりのWRNタンパク質量に大きな変動は無いことから、この免疫染色像の変化は、WRNの核内局在の変化によるものと考えられた。WS細胞がテロメアに関する異常を示すことから、テロメア反復配列へのWRNフォーカスの局在を検討したが、WRNフォーカスとテロメアFISHのシグナルは殆ど一致しなかった(図2-1D)。ヒト胎児腎臓細胞293EBNAでは、Marciniak *et al.* (1998)らの研究で報告された様に、WRNは主に核小体に局在しているが(図2-1A, i-l)、CPT処理後は主に核質でフォーカスを形成した(図2-1A, m-p)。同様の結果は、MCF-7、HL-60、SV40ウイルスでトランスフォームしたWI38といった他のヒト細胞を用いた実験でも得られた(データ未掲載)。

CPTにより誘発される主なDNA損傷は、CPTが結合することによって固定されたトポイソメラーゼI-DNA複合体と、進行中の複製フォークが衝突することによって生じるDNA二本鎖切断(DSB)及び停止した複製フォークであると考えられている(図2-2A、Pommier 1996)。そこで、トポイソメラーゼI上のアミノ酸置換によって、CPT抵抗性となった細胞株CPT-K5について、CPT処理によるWRNのフォーカス形成の有無を調べた。その結果、トポイソメラーゼIが正常である親細胞株RPMI8402ではWRNのフォーカス形成が見られたのに対し、変異株CPT-K5細胞では全く誘導されなかった(図2-2B)。更に、CPTによって誘導されるWRNフォーカスの形成がDNA複製に依存しているか否かを調べるために、DNA合成阻害剤アフィジコリンのWRNフォーカスの形成に与える影響をK562細胞で調べた。図2-3に示すように、1 μ g/mlアフィジコリンによる前処理で、CPTによって誘導されるWRNフォーカスの形成が強く抑制された。すなわち、CPTによるWRNフォーカス形成の誘導は、DNA複製に依存することが示唆された。これらの結果は図2-2Aのモデルに良く合致し、WRNが

CPTによって生じたDSBもしくは停止した複製フォークに反応してフォーカスを形成することを示唆している。

2-3-2 エトポシド、4NQO及びブレオマイシン処理に反応して形成されるWRNフォーカス

WS細胞は、トポイソメラーゼIIの阻害によってDSBをもたらすエトポシドや、DNA塩基の修飾をもたらす4NQOに対しても、感受性を示すことが報告されている（Pichierri *et al.* 2000、Ogburn *et al.* 1997）。そこで、WRNのフォーカス形成がこれらの薬剤によって誘導されるかを調べた。加えて、DNAのデオキシリボースを酸化すること（すなわちDNA複製には全く依存しない）によってDSBを形成させるブレオマイシン（Giloni *et al.* 1981、Povirk *et al.* 1996）に関しても、そのWRNフォーカス誘導能を検討した。その結果、これら3種の薬剤はいずれも強い染色像のWRNフォーカスを誘導すること、その効果は濃度依存性を示すことが明らかになった（表2-1、図2-4）。他方、エトポシドとは異なる機序で作用し、DSBを誘導しないトポイソメラーゼII阻害剤ICRF-193（Fortune & Osheroff 2000）で細胞を処理した場合は、WRNのフォーカス形成は認められなかった（表2-1、図2-4）。続いて、エトポシド、4NQO及びブレオマイシンについて、DNA複製への依存性を調べるためにアフィジコリン存在下でのWRNフォーカス誘導能を検討した。エトポシドと4NQOに関しては部分的にそのWRNフォーカス誘導能が抑制されたが、ブレオマイシンについては1 μ g/mlアフィジコリンの影響は認められなかった（図2-3）。以上の事からWRNは、DNA複製の有無に関わらずDNA損傷の修復過程に関与することが示唆された。

2-3-3 他の薬剤処理によるWRNフォーカス形成の誘導

次に、他の薬剤（X線、UV、HU）について、WRNフォーカス形成を誘導するかどうかを調べた。X線（10 Gy）やUV（40 J/m²）の照射、及びHU（2 mM）処理によっては、小さく弱い染色像のフォーカスしか認められなかった（図2-4、表2-2）。アフィジコリンは、DNA複製を抑制するための前処理に用いた濃度（1 μ g/ml）では、WRNフォーカス形成は見られなかったが、10 μ g/mlの濃度では小さく弱い染色像のフォーカスが認められた（図2-4）。WS細胞は感受性ではないとされているものの、これらの薬剤によって誘発される異常なDNA構造に対してもWRNが反応する可能性が考えられた。

2-3-4 CPTにより誘導されるWRNフォーカスとRPAの共局在

RPAはWRNと結合し、ヘリカーゼ活性を上昇させることが*in vitro*の実験から示されており (Shen *et al.* 1998、Brosh *et al.* 1999)、また、このタンパク質は γ 線照射後に核内フォーカスを形成することが知られている (Golub *et al.* 1998)。そこで、CPT処理後のRPAの核内動態を調べた。抗RPA34抗体による免疫染色から、未処理のK562細胞では、RPAは核質に均一に分布することが判った (図2-5A, b)。ところが、CPT処理後、80%以上の核でRPAのフォーカスが見られ (図2-5A, e,h,k)、その殆ど全てがWRNフォーカスと一致した (図2-5A, f,i,l、2-5B)。このような共局在はエトポシドや4NQO、ブレオマイシンで処理した細胞でも観察された (データ未掲載)。これらの結果から、WRNとRPAがDNA損傷応答の何らかの過程で協調して機能することが示唆された。

Yanらは*Xenopus*の卵抽出液を用いた*in vitro* DNA複製系において、RPAフォーカスの形成に*Xenopus*のWRNホモログFFA-1が必須であることを示した (Yan *et al.* 1998)。CPT処理によって誘導されるRPAのフォーカス形成に、WRNが必要であるか否かを調べるために、WS患者及び健常人由来のBリンパ球細胞を抗RPA抗体を用いた免疫染色を行った。その結果、健常人細胞と同様に、WS細胞においてもCPT処理によってRPAのフォーカス形成が誘導された (図2-6A、2-6B)。患者由来の繊維芽細胞においても同様にRPAフォーカスは認められた (データ未掲載)。これらの結果は、RPAのフォーカス形成にWRNは必須ではないことを示している。

2-3-5 CPTにより誘導されるWRNフォーカスのRad51フォーカス及びBrdUの取り込み部位との部分的な一致

γ 線照射細胞内において、RPAフォーカスの一部はRad51フォーカス (Golub *et al.* 1998) 及び一本鎖DNAが露出した部位 (Raderschall *et al.* 1999) と一致することから、RPA-Rad51フォーカスは相同組換えによるDNA修復の場であることが示唆されている。そこで、WRNフォーカスとRad51フォーカスが一致するかを調べた。未処理のK562細胞では、Rad51は核質中で拡散した状態で存在し、一部の核に数個のフォーカスが見られるのみである (図2-7A,b)。一方、CPT処理細胞では、WRNもRad51もフォーカスを形成し、その一部の局在が一致した (図2-7A, d-l、2-7B)。このWRNとRad51の部分的な共局在は、エトポシドや4NQO、ブレオマイシンで処理した細胞でも観察された (データ未掲載)。

更に、WRNフォーカスの形成されている部位において、DNA合成が起こっている

か否かを検討するために、K562細胞をCPT存在下、非存在下においてBrdUでラベルした。CPT非存在下では、BrdUの取り込みは核全体に見られた（図2-8A,b）。しかしながら、CPT存在下では、BrdUの取り込み部位は劇的に減少したが、その一部はWRNフォーカスと一致した（図2-8A,d-1、2-8B）。これらの結果から、WRNフォーカスの一部は相同組換えによるDNA修復が行われている部位であることが示唆された。

2-4 考察

WRNの核内フォーカスがRPAのそれと非常に良く一致することは、Constantinouら(2000)がHU処理した細胞において観察していたが、本研究ではDNA損傷剤処理した細胞においても両者のフォーカスが形成され、かつ一致することを見出した。この現象は、これらの2つのタンパク質がある生物学的イベントに協調して機能することを示唆している。そのようなイベントの候補の一つとして、細胞周期のS期におけるDNA複製が挙げられる。RPAのS期における免疫染色像は、複製フォーカスへの局在によって、ドット状になることが知られていた(Wold 1997)。Xenopusの卵抽出液を用いた*in vitro* DNA複製系では、XenopusのWRNホモログFFA-1はRPAフォーカスと共局在を示す事が報告されている(Yan *et al.* 1998)。しかし、本研究では、未処理で対数増殖期にあるK562細胞ではWRNフォーカス及びRPAフォーカスは殆ど見られず、DNA損傷剤処理を行うと、大多数の核で両者のフォーカスが認められた(図2-5)。これらの結果は、WRNは複製フォーカスの構成因子ではなく、DNA損傷剤に応答して形成されたフォーカスの構成因子であることを示唆している。

また、このXenopusの系において、RPAフォーカスの形成にXenopusのWRNホモログFFA-1が必須であることが示されていたが(Yan *et al.* 1998)、本研究でのWS患者由来の細胞を用いた実験から、CPT処理によって誘導されるRPAのフォーカス形成には、WRNは必須の因子ではないことが明らかになった(図2-6)。この結果の説明としては、以下の二つの可能性が考えられる。一つはCPT処理した細胞内ではRPAフォーカスが形成された後に、WRNがリクルートされフォーカスを形成するという可能性である。もう一つの可能性はWRNがRPAのフォーカス形成に重要であるものの、WS細胞内ではその機能に関しては他の因子によって補われているというものである。いずれにしても、ヒト細胞でのこれらのタンパク質のフォーカスと、Xenopusの*in vitro* DNA複製系で見られるフォーカスは、その形成機構にも多少の差異が存在すると考えられる。

WRNの核内フォーカスの形成は、様々なDNA損傷剤やDNA合成阻害剤によって誘導された(表2-2)。しかし、薬剤の種類によってフォーカス形成には違いがあり、大きく分けて2つのフォーカス形成のパターンがあった(図2-4)。一つは、CPTやエトポシド、4NQO、ブレオマイシンによって誘導される、強い染色像のフォーカスが核当たり数多く見られるパターンであり、もう一つは、X線やUV照射、HU、高濃度の

アフィジコリン (10 μ g/ml) 処理によって誘導される小さく弱い染色像のフォーカスである (図2-4、表2-2)。このフォーカス形成パタンの違いの原因は今のところよく判らないが、WS細胞の薬剤感受性と相関性があるように思われる。CPTやエトポシド、4NQOに対してWS細胞は感受性であることが示されているが (Ogburn *et al.* 1997、Okada *et al.* 1998、Poot *et al.* 1999、Pichierri *et al.* 2000)、これらの薬剤によって誘導されるWRNフォーカスの染色像は明るく、数が多い。一方、WS細胞は感受性でないとされている、X線やUV照射、HU等によっては小さく弱いフォーカスのみ誘導された。この傾向の例外は、ブレオマイシンで、WS患者由来のリンパ球細胞はこの薬剤に対して非感受性であるという報告 (Gebhart *et al.* 1988) があるにも関わらず、明るく数が多い染色像のフォーカス形成を誘導した。他の薬剤に対する感受性とフォーカス形成パタンの相関性から考えると、細胞の種類や変異のタイプによっては、WS患者由来の細胞がブレオマイシンに対しても感受性を示す可能性があるのではないだろうか。

1 μ g/ml アフィジコリンによる前処理によって、CPTで誘導されるWRNフォーカス形成は強く抑制された (図2-3)。このことはCPTによるWRNフォーカス形成がDNA複製に依存していることを示しており、CPTにより誘発される主なDNA損傷であるDSB及び複製フォークの停止は、固定されたトポイソメラーゼI-DNA複合体と進行中の複製フォークが衝突することによってもたらされるというモデルと矛盾しない (Pommier 1996)。しかし、CPT処理細胞において、DSB及び停止した複製フォークのいずれの構造がWRNフォーカスを誘導するかは、はっきりしない。Constantinouら (2000) は、HU処理によってS期に停止させたHeLa細胞において、WRNフォーカスを誘導することを報告している。本研究においてもHUや高濃度のアフィジコリン (10 μ g/ml) によってWRNフォーカスを誘導することを見出した (図2-4、表2-2)。これらの結果は、WRNが停止した複製フォークに反応して核内フォーカスを形成することを示唆している。一方で、私はブレオマイシンによってもWRNフォーカスが誘導され (図2-4、表2-1)、この効果は1 μ g/ml アフィジコリンによる前処理によって抑制されない (図2-3) ことを明らかにした。この結果は、DNA複製の有無に関わらず、WRNがDSBに反応してフォーカス形成することを示唆している。以上の知見をまとめると、WRNはDSB及び停止した複製フォークに反応してフォーカスを形成すると考えられる。CPT処理細胞においては、おそらく、この両者に反応してWRNはフォーカスを形成したものと考えられる。

一方、エトポシドや4NQOによって誘導されるWRNフォーカス形成は、1 μ g/mlア

フィジコリン前処理によって部分的にしか抑制されなかった（図2-3）。作用機序から推測すると、これらの薬剤により処理された細胞内では、CPT処理の場合と異なり、DNA複製フォークの進行は一部のDNA損傷の生成にのみ関与しているものと考えられる（Fortune & Osheroff 2000、Friedberg *et al.* 1995）。この結果から、DNA損傷剤処理された細胞内においてWRNは、1）DNA複製非依存的に生成されたDNA損傷と、2）DNA複製に依存した機構によって生じたDNA損傷、ならびに3）損傷部位と遭遇した結果停止した複製フォーク、に反応してフォーカスを形成すると考えられる。したがってエトポシドや4NQOによるWRNフォーカスの内、1 μ g/ml アフィジコリン前処理によって抑制されたものには、2）及び3）のタイプが含まれていたと想像される。HUや高濃度のアフィジコリン（10 μ g/ml）によって生じたWRNフォーカス（図2-4）は、DNA合成反応の阻害により停止した複製フォークに反応しているものと考えられる。HUによるWRNのフォーカス形成については、ごく最近他グループからも報告されている（Constantinou *et al.* 2000）。異なる濃度のアフィジコリン（1もしくは10 μ g/ml）によるWRNフォーカス誘導能の違いは今のところ不明である。

それでは、WRNは核内フォーカスの形成を通じてどのようなイベントに関与するのでしょうか？本研究で初めて見出したWRNフォーカスがRad51フォーカスと部分的に一致する（図2-7）という知見と、様々な生物種のRecQ型ヘリカーゼの機能に関するこれまでの報告から考えられる二つの可能性を以下に挙げる。その一つは、相同組換えによるDNA修復へのWRNの関与である。大腸菌RecAの真核生物ホモログであるRad51は、相同組換えの過程においてRPAと協調して作用する。Rad51は、一本鎖DNAに数珠状に結合してヌクレオプロテインフィラメントと呼ばれるらせん構造を形成し、相同DNA配列の検索及びDNA鎖交換反応を行う（Baumann & West 1998）。大腸菌RecQヘリカーゼは、RecAとSSB（RPAの大腸菌ホモログ）によるDNA組換え反応の開始を促進させたり、組換え中間体をほどいたりする活性を持つことが示されている（Harmon & Kowalczykowski 1998）。出芽酵母においては、RecQ型ヘリカーゼSgs1とSrs2ヘリカーゼ（非RecQ型で、ヒトにおけるホモログは見つかっていない）の二重変異株の示す低増殖性が、Rad51の変異によってレスキューされることが判っている（Gangloff *et al.* 2000）。このエピスタシスは、Sgs1が相同組換えのDNA鎖交換反応以降の過程に関与することを示唆している。これに関連して、ヒトWRNを *sgs1* 変異株に導入すると、そのhyper-recombination（過剰な組換え）形質が抑制されることが明らかになっている（Yamagata *et al.* 1998）。生化学的な研究から

も、WRNが組換えの中間体であるHolliday構造を移動させる活性を持つことが示されている (Constantinou *et al.* 2000)。これらの報告や本研究の結果をまとめると、WRNは相同組換えの様々な過程、組換えの開始やDNAヘテロ二本鎖領域の拡張、異常な組換え中間体の解消等に関与していることが考えられる。

WRNのもう一つの推定上の機能は、停止した複製フォークの処理過程におけるものである。ごく最近、Constantinouら (2000) は、WRNがHolliday構造を移動させる活性を持つこと、ならびにHU処理によってRPAと共にフォーカスを形成することを示し、その結果から、停止した複製フォークに生じた異常な構造を解消することで、不必要な組換えが起こるのを抑制すると推測している。しかし、私は本研究で新たに見出された知見であるRad51との共局在から、彼らのモデルよりもむしろ、Rad51と協調してDNA三重鎖構造を形成させることで停止したフォークの安定化を行う、というモデルを提案したい。大腸菌RecQは、RecA及びエクソヌクレアーゼRecJと共に、停止した複製フォークのプロセッシングを行う (Courcelle & Hanawalt 1999) 。RecQとRecJは、新生されたラギング鎖を選択的に消化し、複製フォークの一本鎖領域を拡張する。生じた一本鎖領域は、RecAを介した相同鎖対合によって三重鎖構造を形成し、安定化すると考えられている。DNA損傷剤によるWRNフォーカスが (部分的に) DNA合成に依存していることや、DNA合成阻害剤によってもフォーカスが誘導されうること、Rad51フォーカスと一致すること等から、WRNが停止した複製フォークにおけるRecQ (もしくはRecJも) と同様の機能をもつ可能性があるだろう。WS細胞が示すS期での異常の一部は、この様な活性の欠損が影響しているのかも知れない。

本章では、DNA損傷剤等の処理によってWRNが形成する核内フォーカスの解析について述べた。本論文を作成中に、DNA合成阻害剤であるHUによりWRNの核内フォーカスが誘導されること及びRPAフォーカスと共局在することが報告された (Constantinou *et al.* 2000)。一方私は新たな知見として、DSBを誘発する薬剤によってWRNフォーカスが形成されること、このフォーカスがRPAに加えて、Rad51フォーカス及びBrdUの取り込み部位と部分的に一致することを示し、WRNが相同組換えによるDSB等のDNA損傷修復、ならびに停止した複製フォークのDNA三重鎖構造を介した安定化に関与するモデルを提案した。この様な機能の欠損が、WS細胞の示すゲノム不安定性の原因である可能性が考えられる。しかしながら、Rad51との共局在は部分的なものであることは、WRNが、RPAと共に他のDNA損傷応答機構の過程に関与している可能性も示唆している。

第3章 テロメラーゼ陰性不死化細胞に特異的な核内構造体ECTRへのWRNの局在

3-1 序論

真核生物の染色体末端には、テロメアと呼ばれる繰り返しDNA配列とこれに結合する複数のタンパク質からなる構造が存在する。殆どの真核生物においてその配列はGCリッチであり、哺乳類の場合はTTAGGGの6塩基配列を一単位としている。哺乳類テロメアの3'末端は150bp程度一本鎖DNAが突出しており、この一本鎖DNAが同一DNA分子の二本鎖テロメア領域に侵入してループ構造（tループと呼ばれる）を形成する（Griffith *et al.* 1999）。テロメアによって染色体末端はDNA鎖切断箇所と区別され、染色体構造やゲノムの安定性が保たれると考えられている。染色体末端は、DNA複製時においてラギング鎖の5'最末端のRNAプライマーがDNAに置換されないために、複製される度に短縮する（末端複製問題）。ヒト正常体細胞は継代培養を続けると細胞分裂に伴って一回の分裂につき50-200塩基程度テロメア長が短縮し、ある程度（約5kb）まで短縮すると細胞は増殖停止する。体内組織においても、高齢者の体細胞は若年者の体細胞よりもテロメア長が短いことが明らかになっている。すなわち、テロメアは細胞の分裂回数を計測し、細胞老化をもたらす「分裂時計」という側面も併せ持っている（Sherr & DePinho 2000）。

有限分裂寿命を示す正常体細胞に対して、生殖細胞や無限増殖能を獲得した不死化細胞及び癌細胞ではテロメア長が維持されていることから、これらの細胞に特異的なテロメア伸長酵素の存在が示唆されていた。テロメラーゼは、染色体末端のテロメアDNAを伸長させる逆転写酵素であり、鋳型となるRNA成分（*TERC*）及び活性触媒タンパク質成分（*TERT*）からなる（Weinrich *et al.* 1997）。前述したテロメア3'末端の突出一本鎖DNAにテロメラーゼは結合し、TTAGGG配列を付加していくと考えられている。テロメラーゼ活性は、生殖細胞や大部分の癌細胞・組織で認められる一方、有限分裂寿命を示す正常体細胞においては殆ど検出されない。また、*TERT*の導入によって正常体細胞の分裂寿命が延長することなどが示されている（Bodnar *et al.* 1998）。

不死化細胞におけるテロメア伸長機構は、テロメラーゼの発見によってその説明がついたと考えられた時期もあったが、その後、一部の不死化細胞ではテロメラーゼ活性が見られないことが判ってきた (Bryan *et al.* 1995)。テロメラーゼ陰性不死化細胞は比較的長いテロメアを持っており、そのテロメラーゼ非依存的なテロメア維持機構 (ALT; alternative lengthening of telomeres) はごく最近になって相同組換えを介していることが示されている (Dunham *et al.* 2000)。テロメラーゼ陰性不死化細胞 (以下ALT細胞と呼ぶ) に特徴的な性質として、染色体外にテロメア配列DNA (ECTR; extra-chromosomal telomere repeat) が存在することが挙げられる (Tokutake *et al.* 1998)。Yeagerらは、ALT細胞において核内構造体PML bodyにECTR DNAが含まれることを示し、これをAPB (ALT-associated PML body) と名付けた (Yeager *et al.* 1999)。更に、このAPBにはPML bodyの形成に不可欠な因子であるPMLタンパク質の他、RPA、Rad51、Rad52、TRF1、TRF2といった組換えやテロメア維持に機能するタンパク質が局在することを示している。本研究では、ECTR DNAとPMLやRPA等の複数のタンパク質との複合体 (すなわちAPB) を、ECTRと称することにする。

ECTRに局在するタンパク質の一つであるRPAは、WRNに結合すると共にそのヘリカーゼ活性を上昇させることが明らかになっている (Shen *et al.* 1998; Brosh *et al.* 1999)。また、試験管内で多量体化したテロメア配列DNAを、WRNがRPA存在下で解消することが報告されている (Ohsugi *et al.* 2000)。これらの知見をふまえた上で、WRNがECTRに何らかの形で関与している可能性を考え、免疫細胞化学的手法によってその関連性を検討した。

3-2 材料と方法

3-2-1 細胞株とその培養

ヒト胎児由来不死化細胞であるKMST-6細胞及びWI38-VA13細胞、ヒト乳腺癌MCF-7細胞は、50 μ g/mlゲンタマイシンと10%ウシ胎児血清（Trace-bioscience社、56°Cで30分間処理し非働化した）を含むDMEM（Sigma社）を用い、5% CO₂、37°Cのインキュベータ内（十慈科学工業社）で培養した。

3-2-2 抗体

抗WRN抗体（マウスモノクローナル、ウサギポリクローナル）、抗RPA70抗体については2-2項に記したとおりである。抗PMLマウスモノクローナル抗体（sc-966）はSanta-Cruz社より購入し、最終濃度2.5 μ g/mlで使用した。二次抗体は2-2項に記した様に、Alexa標識されたもの（Molecular Probes社）を最終濃度5 μ g/mlで免疫染色に使用した。

3-2-3 ペプチド核酸プローブを用いた蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション（FISH）によるテロメア配列の検出

細胞をガラス製チャンバー（Lab-Tek Chamber Slide、Nunc社）に播き込み、通常培地で培養した。細胞をPBSにて2回洗浄した後、-20°Cで20分間メタノール処理し固定した。次に、氷冷アセトン中で10秒間処理した後、5%スキムミルクを含むPBSで室温にて30分間以上ブロッキングした。任意の一次抗体と室温で1時間インキュベートした後、0.05% Tween20を含むPBS（PBST）で3回、計30分間洗浄し、更に室温にて1時間、Alexa標識された二次抗体とインキュベーションした。PBSTで洗浄した後、3.7%ホルムアルデヒドを含むPBSで、室温10分間処理し固定した。PBSで2回、計10分間洗浄した後、スライドガラスを0.1 Mクエン酸溶液（pH6.0）に移し、電子レンジ（2450 MHz/500 W）で5分間、2回加熱した。加熱後、室温で10分間放置した上でエタノールで脱水し、風乾した。0.3 μ g/ml Cy3標識（CCCTAA）₃ペプチド核酸プローブ（PBIO、Biosearch Product社）と30 μ g/ml サケ精巢DNA（Sigma社）を含むPBSをスライドに載せ、室温で1時間インキュベートした後、PBSTで洗浄し、DAPIでDNAを染めて共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

3-3 結果

3-3-1 テロメラーゼ陰性ヒト不死化細胞KMST-6でのECTR

KMST-6細胞は、ヒト胎児由来の二倍体繊維芽細胞を γ 線照射によって不死化させた細胞株であり、テロメラーゼ活性が検出されないことから、ALT細胞に分類される (Yeager *et al.* 1999)。通常培地中にて培養し、対数増殖期にあるKMST-6細胞について、テロメア配列に対応したペプチド核酸プローブを用いたFISHを行った (図3-1A、中央)。50%以上の細胞で、FISHのシグナルは核当たり数個から20個程度の非常に強く大きなドット状を示した。その数やシグナルの強さは、染色体末端テロメアのシグナルとは異なっており、ECTRである可能性が示唆された。これまでに、ECTRには、染色体末端テロメアと異なりPMLやRPA等のタンパク質が含まれることが報告されている (Yeager *et al.* 1999)。そこで、KMST-6細胞について、テロメアFISHとこれらのタンパク質に対する免疫染色の二重染色を行った (図3-1A、B)。その結果、PMLやRPAも大きなドット状のシグナルを示し、テロメアFISHシグナルとも一致したことから、この細胞で認められるテロメアFISHの大きなドット状シグナルはECTR DNAに由来するものと考えられた。

次に、KMST-6細胞におけるWRNの細胞内局在を免疫染色法にて検討した (図3-2)。抗WRN抗体のシグナルは、ECTR様の核当たり数個の大きなドット状を示した。更に二重染色によってECTRとの関連性を調べたところ、WRNのドットはテロメアFISHのシグナル (図3-2A) PML (図3-2B) やRPA70 (図3-2C) と局在が一致することが判った。これらの結果から、テロメラーゼ陰性ヒト不死化細胞であるKMST-6細胞において、WRNがECTRに共局在することが示された。

3-3-2 ALT細胞WI38-VA13及びテロメラーゼ陽性癌細胞MCF-7でのテロメアFISHシグナルとWRNの局在

WI38-VA13細胞は、ヒト胎児由来の二倍体繊維芽細胞をSV40ウイルスを感染させて得た不死化細胞であり、テロメラーゼ活性を持たない細胞株 (すなわちALT細胞) である (Bryan *et al.* 1995)。一方、乳癌細胞MCF-7はテロメラーゼ陽性であることが示されている (Yeager *et al.* 1999)。これらの細胞株についても、テロメアDNA配列に対するFISHと、PMLタンパク質に対する免疫染色を行った (図3-3A)。WI38-VA13細胞の場合、およそ25%の核で、大きなテロメアFISHシグナル (ただ

しKMST-6細胞で見られたものよりもやや小さい)が観察された上、PMLタンパク質の共局在も認められた(上段)。すなわちWI38-VA13細胞もECTRを持つことが判った。一方、テロメラーゼ陽性細胞MCF-7では、テロメアFISHシグナルは弱く小さいものであった。テロメラーゼ陽性癌細胞では、染色体末端テロメアがテロメラーゼ陰性の正常細胞よりも短いことが知られており、核当たりの数からも染色体末端テロメアのシグナルと思われる。抗PML抗体による染色も、核内構造体PML body由来と考えられる小さめのシグナルが数個認められたのみであり、これらはテロメアFISHのシグナルとは一致しなかった(下段)。

更に、これらの細胞株でのWRNの細胞内局在を調べたところ(図3-3B)、WI38-VA13細胞では、核小体に局在するものに加えて、大きなドット状のシグナルがあり、テロメアFISHシグナルと一致した(上段)。このことは、WI38-VA13細胞においてもWRNがECTRに含まれることを示している。一方、MCF-7細胞では、WRNは核小体にシグナルが認められるのみであり、テロメアFISHシグナルとは一致しなかった(下段)。

以上の結果から、WRNはテロメラーゼ陰性不死化細胞において、それに特異的な核内構造体ECTRの構成因子の一つであることが示された。

3-4 考察

ECTRは、ALT細胞に特徴的な構造であり、*in vitro*での細胞の不死化過程において、細胞がテロメラーゼ非依存的なテロメア維持能を獲得すると同時にECTRを持つようになることが示されている (Yeager *et al.* 1999)。現在までのところ、ECTRの生物学的意義は明白ではないが、ALT機構においてテロメア反復配列DNAの供給源となっている可能性や、ALT機構の副産物である可能性が指摘されている (Tokutake *et al.* 1998)。最近になって、ECTRにNBS1が局在すること、S/G2においてBrdUの取り込みが見られることが示されている (Wu *et al.* 2000)。これまでにECTRに局在することが明らかになっているタンパク質の内、Rad51、Rad52、RPA、NBS1等は相同組換えに関与する分子である (Dasika *et al.* 1999)。酵母においてもALT機構が存在するが、その遺伝学的解析からは、Rad52を介した相同組換えがALT機構にとって重要であることが示されており (Ten & Zakian 1999)、ヒト細胞におけるALT機構においても、相同組換えが重要な働きをしている可能性が考えられていたが、ごく最近になって証明された (Dunham *et al.* 2000)。WRNについても、第2章において示したように相同組換えへの関与が示唆されている。本章で明らかになったECTRへのWRNの局在は、ECTRに含まれる他のタンパク質と協調して、WRNがALT機構において機能する可能性を示しており、その中心的な過程が相同組換えであると考えられる。

一方、ECTRに局在するタンパク質の内、TRF1とTRF2は、正常体細胞やテロメラーゼ陽性細胞の染色体末端のテロメア構造維持における重要な因子である (van Steensel & de Lange 1997、van Steensel *et al.*, 1998)。NBS1もS期においてTRF2と結合し、染色体テロメアに局在することが明らかになっている (Zhu *et al.* 2000)。この様に、染色体テロメアに存在する因子とECTRへ局在する因子は、少なくとも一部は共通していることから、本研究で見出したWRNのECTRへの局在は、WRNの通常の染色体テロメア維持機構への関与を示唆しているとも考えられる。実際に、WS細胞はテロメアに関連する異常形質を示し、WS患者由来の初代培養細胞のテロメア長は健常人由来の細胞と比較して短いこと (Schulz *et al.* 1996)、EBウイルスに感染させたWS患者由来のBリンパ球では継代を通してテロメア長が大きく変動することが知られている (Tahara *et al.* 1997)。これらの知見もまた、WRNが染色体テロメアの維持機構に機能することを示唆している。現在のところ、免疫染色等の実験からは染

染色体テロメア上にWRNが存在するという直接的な証拠は得られていないが、クロマチン免疫沈降法（DNAとタンパク質の結合を架橋剤によって固定した後、免疫沈降でタンパク質と結合したDNAを回収する）等を用いて染色体末端テロメアへの結合の有無を検証することは可能であろう。

第4章 新規WRN結合タンパク質としてのKuの同定

4-1 序論

生体内においてタンパク質は、他のタンパク質や生体分子と相互作用することによって、はじめてその機能を発揮する。任意のタンパク質の生体内機能を知る上では、相互作用するタンパク質を同定することによって重要な手がかりを得ることが期待できる。本研究を開始した時点では、WRNと結合するタンパク質として、RPAならびにp53が報告されていた (Blander *et al.* 1999、Brosh *et al.* 1999)。p53との結合からは、p53を介したアポトーシスへの関与が指摘されている (Spillare *et al.* 1999)。RPAはWRNのヘリケース活性を上昇させることが明らかになってはいるが (Brosh *et al.* 1999)、様々なDNA代謝 (複製、組換え、修復等) で機能するタンパク質であるため、WRNとの結合の生物学的な意義は未だに明白ではない。これらの知見からWS患者及び細胞の多彩な形質を全て説明するには至っておらず、他の結合タンパク質の存在が想像されていた。そこで私は、WRNに結合するタンパク質の探索を行うことにした。

タンパク質間相互作用を解析するための手法は、分子生物学的手法を基盤とする酵母two-hybrid法やタンパク質をプローブとするファーウェスタン法、GST (Glutathion S-transferase) 融合タンパク質を用いたアフィニティ精製法や特異的抗体を用いた免疫沈降による精製等の方法がある。この中で免疫沈降法による精製の利点としては、内在性のタンパク質を対象とすれば生体内を比較的忠実に反映した結果を得られること、直接結合するものに留まらず、相互作用によって形成される複数のタンパク質からなる複合体の網羅的な同定が期待できることが挙げられ、免疫沈降法に適用可能な抗体が存在する場合には有用な手法である。精製後のタンパク質のアミノ酸配列の決定は、従来主流であったエドマン分解法を用いたアミノ酸シーケンスでは、ある程度まとまった量のタンパク質を精製しなければならない難点があった。しかし、近年普及しつつある手法として、タンパク質の酵素消化物の混合物を質量分析法によって解析し、ペプチド断片の分子量をデータベース検索してタンパク質を同定することが可能になった。質量分析法を用いる場合、SDS-PAGE後

のゲル中に銀染色で検出出来る程度のタンパク質量で十分に同定可能である。本研究では、内在性のWRNの免疫沈降による精製と質量分析法を組み合わせ、WRN結合タンパク質の同定を試みた。

4-2 材料と方法

4-2-1 細胞株とその培養

ヒト神経膠腫細胞株M059J及びM059Kの培養には、DMEM/Ham'sF12 (1 : 1) 混合培地 (Sigma社) に 50 μ g/ml ゲンタマイシン、10 % ウシ胎児血清、0.05 mM 非必須アミノ酸混合液 (ナカライテスク社)、0.5 mM ピルビン酸ナトリウム (ナカライテスク社)、2.5 mM L-グルタミン (Gibco社) を添加したものをを用い、5 % CO₂、37 °Cのインキュベータ内 (十慈科学工業社) で培養した。その他の細胞の通常の培養は、2-2項で述べたとおりである。K562細胞を200 ml以上の培地で培養する場合は、50 μ g/ml ゲンタマイシンと10 % ウシ胎児血清、25 mM HEPES (pH7.3) を含むRPMI1640培地を用い、通常気相の37 °C保温室内にて、回転子付き攪拌フラスコ (Hario社) で攪拌しながら培養した。

4-2-2 細胞の³⁵Sメチオニンによる標識

メチオニン不含RPMI1640培地 (Gibco社) に透析済ウシ胎児血清 (Gibco社) を10 %、ゲンタマイシンを50 μ g/mlの濃度になるように加えたものを標識用培地として使用した。1 x 10⁷個のK562細胞を標識用培地で2回洗った後、2 mlの標識用培地に再懸濁した。5 % CO₂、37 °Cのインキュベータ内に15分静置した後、7.4 MBqの [³⁵S]メチオニン (NEN Life Science Products社) を培地に加え、6時間培養した。標識中は、1時間毎に培養ディッシュを揺すって攪拌した。CPT処理を行う場合は、最終濃度10 μ MになるようにCPTを [³⁵S]メチオニンと同時に培地に添加した。

4-2-3 免疫沈降

細胞をPBSで2回洗ったのち、2 x 10⁷個/ml以上の濃度になるようにLysisバッファー (50 mM Tris-HCl、pH8.0、150 mM NaCl、0.5 % NP-40、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、1 x コンプリートプロテアーゼインヒビター (Roche-diagnostics社)) を加え、溶解した。溶解した細胞を20,000 x g、4 °C、30分間遠心し、得られた上清を細胞粗抽出液とした。この細胞粗抽出液に、50 μ lのProtein G Sepharose 4 Fast Flow (Amersham-pharmacia社) を加え、4 °Cで一晩インキュベートした後、350 x g、4 °C、2分間遠心して、その上清に抗体液 (もしくは抗体を固定したSepharoseビーズ) を添加し、4 °Cで1-3時間インキュベートした。抗体液を用いた場

合は、更に 30 μ l の Protein G Sepharose を添加して 4 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。インキュベーション後、20,000 x g、4 $^{\circ}$ C、5 分間遠心して免疫沈降物を回収し Lysis バッファーで 4 回洗浄した。この免疫沈降物に等量の SDS-サンプルバッファー (1 % sodium dodecyl sulfate、2 % β -mercaptoethanol、20 % glycerol、30 mM Tris-HCl、pH 6.8、0.2 M dithiothreitol) を加えて 98 $^{\circ}$ C で 5 分間熱し、遠心して得た上清を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供した。

4-2-4 SDS-PAGE 後のシグナルの検出 (35S 標識細胞を用いた免疫沈降)

泳動終了後、ゲルを 3MM 濾紙 (Wattman 社) に移し、ゲル乾燥機 (アトー社) にて乾燥させた。乾燥後、イメージングプレート (フジフィルム社) に室温で 72 時間露光し、BAS 1500 System (フジフィルム社) にて画像化した。

4-2-5 SDS-PAGE 後のシグナルの検出 (質量分析用)

質量分析に供するためのサンプルは、SDS-PAGE 後に銀染色を行った。ゲルを 40 % エタノール・10 % 酢酸水溶液で 30 分間振とうし、続いて 30 % エタノール・0.5 M 酢酸ナトリウム・0.2 % チオ硫酸ナトリウム水溶液中で 30 分間振とうした。蒸留水中で 3 回、計 15 分振とうし、0.1 % 硝酸銀・0.02 % ホルマリン水溶液中で 30 分間振とうした。更に蒸留水ですすいだ後、2.5 % 硝酸銀・0.01 % ホルマリン水溶液中で 2 分間ずつ計 10 分間程度振とうして現像し、0.5 % 酢酸水溶液で反応を停止した。以上の作業は全て室温にて行い、試薬はナカライテスク社の製品を使用した。

4-2-6 質量分析によるタンパク質の同定

1) トリプシン処理

銀染色後のゲルよりタンパク質のバンドを切り出し、100 % アセトニトリル中で 15 分間振とうした。これを遠心して得た沈殿を真空ポンプにて乾燥させ、10 mM dithiothreitol・100 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液中で、56 $^{\circ}$ C、1 時間インキュベートした。これを遠心して上清を除き、55 mM ヨウ化アセトアミド・100 mM 炭酸水素アンモニウムを加え、遮光して室温で 45 分間振とうした。ゲル断片を 100 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液で 10 分間振とうした後、100 % アセトニトリル中で 15 分間振とうした。この浸水・脱水操作を数回繰り返した後、真空乾燥させ、25 mg/ml トリプシン (シーケンズ用、Promega 社) を含む 50 mM 炭酸アンモニウム・5 mM 塩化カルシウム水溶液を加えた。45 分間氷上に置いた後、遠心して上清を除き、50

mM 炭酸アンモニウム・5 mM 塩化カルシウム水溶液中に移して37 °Cで一晩処理を行った。処理後、5 % 蟻酸・50 % アセトニトリル溶液でゲルよりペプチド断片を抽出した。抽出したペプチドは、ZipTipC18キット (Millipore社) を用いて精製した。

2) MALDI-TOF質量分析とデータベース検索

精製したペプチド溶液に、 α -シアノ-4-シナム酸 (Sigma社) を 10 mg/ml の濃度で含む 50 % アセトニトリル・0.1 % 三フッ化酢酸溶液を等量加えて混合し、そのうちの 0.5 ml を質量分析に供した。質量分析には、MALDI-TOF質量分析計 (Voyager DE-STR、PE Biosystems社) を使用した。得られた質量分析スペクトルは、インターネット上で公開されているプログラムMS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml3.4/msfit.htm>) を用いて解析した。

4-2-7 ウェスタンブロッティング

PVDFメンブレンへの転写及び抗WRN抗体を用いたウェスタンブロッティングの手順は、2-2項で述べたとおりである。DNA-PKcsについてのウェスタンブロッティングでは、マウスモノクローナル抗体NA57を 0.4 μ g/mlで使用した。Ku86に対しては、ヤギポリクローナル抗体sc-1484を 0.67 μ g/mlで使用した。Ku70に対しては、ヤギポリクローナル抗体sc-1486を 2 μ g/mlで使用した。

4-2-8 免疫染色

基本的な手順は、2-2項と同様に行った。抗Ku86ヤギポリクローナル抗体 (sc-1484、Santa-Cruz社)、抗Ku70ヤギポリクローナル抗体 (sc-1486、Santa-Cruz社) は最終濃度5 μ g/mlで使用した。抗DNA-PKcsマウスモノクローナル抗体 (NA57、Oncogene Research Products社) は最終濃度 4 μ g/mlで使用した。

4-3 結果

4-3-1 ^{35}S 標識した細胞の抽出液を用いた抗WRN抗体による免疫沈降

免疫沈降法を用いてWRN結合タンパク質を精製するための予備実験として、 5×10^6 個のK562細胞を ^{35}S メチオニンを含む培地で培養して標識し、その細胞粗抽出液に抗WRN抗体（8H3及び4H12、Shiratori *et al.* 1999）を加えて免疫沈降した（図4-1）。その結果、抗WRN抗体特異的なシグナルが複数認められた。第2章で述べたように、WRNはCPT処理によって大きく細胞内局在を変化させることから、その際に結合タンパク質の種類や量が増加する可能性を考え、CPT処理した細胞についても免疫沈降を行ったが、未処理細胞と比較して大きな差異は認められなかった。この結果を受けて、K562細胞を大量培養する際には、CPTを添加しない培地で行うことにした。

4-3-2 WRN結合タンパク質の免疫沈降法による精製及び質量分析法による同定

9×10^8 個のK562細胞から細胞粗抽出液を作製し、抗WRN抗体（8H3及び4H12）及びコントロールとしてマウスIgG（ICN社）を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降物を10% SDS-PAGEにて分離し、銀染色によって検出されたシグナルを、MALDI-TOF質量分析によって解析した。その結果、抗WRN抗体特異的な免疫沈降物中に、DNA-PK関連分子（DNA-PKcs、Ku86、Ku70）やmRNA関連分子（Poly (A) binding protein 1、Pre-mRNA cleavage factor）、熱ショックタンパク質（hsp70、mitochondria hsp70）が含まれることが判った（図4-2）。しかしながら、既にWRNとの結合が報告されていたRPAやPCNA等は、免疫沈降物中に見出すことは出来なかった。共沈物の内、DNA-PK関連分子はDNA二本鎖切断の修復に関与すること、これらの分子を欠損したマウス細胞はX線や γ 線といった電離放射線に高感受性を示すことが明らかになっている（図4-3、Smith & Jackson 1999）。興味深いことに、Ku86、Ku70欠損マウス細胞はいずれも分裂寿命の短縮を示し、更に、Ku86欠損マウスは早老様症状を呈することが知られている（Gu *et al.* 1997、Vogel *et al.* 1999）。このような欠損マウスのWSに類似した形質から、Kuタンパク質との結合に着目し、以下これについて解析を行った。

4-3-3 CPT処理細胞及びDNA-PKcs欠損細胞におけるWRN-Kuタンパク質の結合

抗WRN抗体による免疫沈降によって検出されたKuタンパク質との結合を確認するために、抗Ku86抗体による免疫沈降によってWRNが共沈するか否かを検討した。図4-4Aに示すように、抗Ku86抗体を用いた免疫沈降によって、Ku86とともにWRNが共沈した。また、この結合はCPT処理した細胞内においても大きく変動しなかった。次に、DNA-PKcs欠損細胞（ヒト神経膠腫細胞株M059J、Lees-Miller *et al.* 1995）においてもWRNとKuタンパク質が結合しているかを検討した。抗Ku86抗体を用いた免疫沈降を行ったところ、DNA-PKcs欠損株M059J細胞でも、その親株M059K細胞と同様にWRNの共沈が認められた（図4-4B）。抗Ku70抗体を用いた実験でも同様の結果が得られた（図4-4C）。これらの結果から、Kuタンパク質はDNA-PKを介さずにWRNと結合していることが示唆された。

4-3-4 CPT処理したK562細胞におけるKu/DNA-PKcsの核内局在

第2章で示したように、WRNはDSBを誘発するCPTによって処理したK562細胞において核内フォーカスを形成する。一方、KuならびにDNA-PKcsはDSB修復で重要な役割を果たすことが知られている。そこで、CPT処理したK562細胞におけるこれらのタンパク質の細胞内局在を検討した。対数増殖期にあるK562細胞の間期核では、Ku86及びKu70は、同様の染色像を示した。すなわちこれらのタンパク質はいずれも核全体に存在するものの、核小体よりも核質にやや多く存在していた。一方DNA-PKcsは、殆どが核質に存在し、核小体には非常に少なかった（図4-5A）。CPT処理したK562細胞では、WRNがフォーカスを形成している核でも、これらのタンパク質の染色像は大きく変化せず、やや核小体のKu86及びKu70が減少したのみであった（図4-5BCD）。Ku及びDNA-PKcsタンパク質はDNA損傷部位に集合しても、その分子数が少ないためにフォーカスにならないのかも知れない。

4-4 考察

本章では、免疫沈降法を用いたWRN結合タンパク質の精製及び質量分析による同定を試み、共沈してくるタンパク質にDNA-PK関連分子（Ku86、Ku70、DNA-PKcs）が含まれることを見出した。この方法によって、WRN結合タンパク質を網羅的に同定できることを期待したが、実際には、RPA（70、34、14KDa）やDNAポリメラーゼ δ （125、50KDa）、トポイソメラーゼI（100KDa）等の既にWRNとの結合が報告されているタンパク質を見出すことは出来なかった（Brosh *et al.* 1999、Lebel *et al.* 1999、Blander *et al.* 1999）。本研究と同様の手法で家族性乳ガン原因遺伝子BRCA1に結合する多数のタンパク質を同定したWangらは、より塩濃度の低いバッファー（0.1 mM NaCl）を使用するとともに、免疫沈降に用いる抗BRCA1抗体の種類によって、それぞれ共沈するタンパク質のスペクトルが異なることを示している（Wang *et al.* 2000）。細胞粗抽出液の作成に用いるLysisバッファーの塩濃度や使用する抗体、細胞株等の条件を検討することで、今回同定した以外の新規WRN結合タンパク質を発見することが出来る可能性があるだろう。

抗WRN抗体による免疫沈降物にはDNA-PK関連分子の他に、mRNA関連分子（Poly(A) binding protein 1、Pre-mRNA cleavage factor Im）、熱ショックタンパク質（hsp70、mitochondria hsp70）及びリボ核タンパク質Ro52が含まれていた（図4-2）。このうち2種類の熱ショックタンパク質は、1）分子シャペロンであり様々なタンパク質に結合する性質があること（Pilon & Scheckman 1999）、2）やや抗WRN抗体のレーンの方がシグナルが強いものの、コントロールにも同じ位置にシグナルが見られるバンドに含まれること、3）免疫沈降を用いた精製の際に非特異的な結合タンパク質として共沈しやすいこと（柳田ら、私信）を考え併せると、非特異的シグナルである可能性が高い。リボ核タンパク質Ro52は、Sjogren's症候群の自己抗原であるが、その機能・意義は不明であり、更にIgGと結合する性質を持つことから偽陽性の可能性も考えられた（Yang *et al.* 1999、Fabini *et al.* 2000）。mRNA関連分子に関しては、Poly(A)付加等のmRNA代謝にWRNpが関与する可能性を示唆する結果として興味深いものの（Afonina *et al.* 1998、Ruegsegger *et al.* 1998）、本研究ではこれらのタンパク質についての解析は行わなかった。

ノックアウトマウスが、細胞分裂寿命の短縮や個体の早老症といったWSに類似した形質を示す（Gu *et al.* 1997、Vogel *et al.* 1999）ことから、本研究ではKuとWRNの

結合に着目しその解析を行ったが、同時期に他の2グループもKu-WRN結合を見いだしている (Cooper *et al.* 2000、Li & Comai 2000、2001)。そのうちCooperらは、Ku存在下でWRNの3'-5'のエクソヌクレアーゼ活性が上昇することを示している (Cooper *et al.* 2000)。一方Liらは、Ku86がWRNのN末側 (1-50アミノ酸) に結合し、WRNのDNA結合能を上昇させることを報告している (Li & Comai 2000、2001)。これらの他のグループの研究はいずれも *in vitro* での生化学的な解析であるのに対し、本研究では主に細胞内でのKuとWRNの関係について解析を進めた。その結果、DNA損傷の有無に関わらずKu-WRNが結合していること (図4-4A)、DNA-PKcs欠損細胞 (M059J) を用いた解析から、DNA-PKcsを介さずに両者が結合していること (図4-4BC)、そして細胞免疫化学的解析から、CPT処理によってWRNがフォーカスを形成した核において、Kuタンパク質は (そしてDNA-PKcsも) 核 (もしくは核質) に分散し、核内フォーカスを形成しないこと (図4-5) を明らかにした。

核内局在に関してGoedeckeらは、Ku70はX線照射によってもフォーカスを形成しないが、DSB修復に関与する因子Mre11に結合すると共に、X線照射によって誘導されるMre11の核内フォーカス形成に必要であることを報告している (1999)。図4-3Aに示したようにKuヘテロ二量体がDSB末端へ結合することが、WRNのフォーカス形成に重要である可能性があり、更なる検討が必要と思われる。

それでは、KuとWRNの結合はどのようなイベントにおいて機能するのだろうか? 現時点で考えられる可能性を以下に挙げる。

まず考えられるのは、DSB修復における非相同性末端結合である。哺乳類細胞においては、電離放射線等の外因性要因によって誘発されたDSBは主に非相同性末端結合によって修復されると考えられており (Lieber *et al.* 1999)、実際に、非相同性末端結合の重要な因子であるKuやDNA-PKcsの欠損細胞は、非常に高い放射線感受性を示す (図4-3B)。しかしながら、WS細胞は異常な放射線感受性を示さないことが知られている (Fujiwara *et al.* 1977、Prince *et al.* 1999)。このことは、WRNはDSBの非相同性末端結合に関して必須の因子では無いということを示唆している。ただし、切断したプラスミドDNAの末端結合反応を調べる系では、WS細胞では、結合の頻度は正常細胞と変わらないものの、結合部位に変異が生じる頻度が上昇するという報告もあり (Runger *et al.* 1994)、WRNがKu/DNA-PKcsによる非相同性末端結合を正常に行わせる機能をもつ可能性はあるだろう。

二つ目は、複製フォークに生じたDSBに対する応答過程である。Shaoらは、CPT処理によって誘導されるRPA34のリン酸化がDNA-PK (すなわちKu/DNA-PKcs複合体)

によって行われること、このリン酸化がアフィジコリンによって抑制されること、そしてKu及びDNA-PKcsのRPAとの結合がCPT処理によって抑制されること等から、複製フォークに生じたDSBに対する応答過程（主にS期のチェックポイント）にKu及びDNA-PKcsが関与するモデルを提唱している（Shao *et al.* 1999）。WS細胞がCPTに感受性を示すことやWRNがDNA複製装置と共精製される（Lebel *et al.* 1999）ことなどは、WRNもこの過程に関与することを示唆している。WS細胞におけるS期チェックポイント異常の有無や、RPA34のリン酸化とWRNフォーカス形成の関連性等は、今後の興味深い問題である。

三つ目は、染色体末端のテロメア維持機構である。これまでに、酵母では、Hdf1（yKu70）やHdf2（yKu86）の変異株がテロメアの異常短縮を示すことや、クロスリンク法によってテロメアDNAに結合していることなどが示されていた（Boulton *et al.* 1996、Gravel *et al.* 1998）。最近になって哺乳類細胞においても、KuがDNA-PKcs非依存的にテロメアDNAに結合していること（Hsu *et al.* 1999）、Ku86がテロメア結合タンパク質TRF1と結合すること、Ku86欠損マウス細胞では染色体の末端結合の頻度が上昇すること（Hsu *et al.* 2000）が報告されている。このようなテロメアにおけるKuの機能は、Ku欠損マウスが呈する早老症の要因となっている可能性もある。WS細胞のテロメア代謝異常は、WRNがテロメア維持に関与することを示唆しており、Kuと協調して機能するイベントの有力な候補と考えられる。

最後に、核小体において機能する可能性を指摘したい。Kuタンパク質は間期核において核小体に局在し、特にKu86に関してはS及びG2期に核小体に局在する量が増えるという報告がある（Li *et al.* 1992、Higashiura *et al.* 1992）。また、WRNについても核小体への局在が報告されている（Marciniak *et al.* 1998）。Kuタンパク質やWRNの核小体局在の生物学的意義は今のところ不明であるが、何らかの形で共に機能することはあり得ると思われる。

以上に列挙してきたものは、いずれも現時点では可能性の域を出るものではなく、今後検証していく必要がある。欠損マウスの解析からは、DNA-PKcsと独立したKuの機能が早老様症状に重要であることが示唆されており、それがWSの早老症においても重要である可能性が考えられる。結合ドメイン領域の過剰発現によるKu-WRN結合の抑制による影響や、結合ドメイン領域を欠いたタンパク質の発現によるドミナントネガティブな影響を調べる事によって、WRNとKuの結合の生物学的な意義を明らかにすることが出来るものと思われる。

第5章 総括

本研究では、遺伝性早老症ウェルナー症候群原因遺伝子産物WRNの機能を明らかにすることを目的として、WRNの細胞内局在に関する解析ならびに結合タンパク質の探索を行った。細胞内局在の解析からは、DNA損傷剤処理によってWRNが核内フォーカスを形成すること、そのフォーカスがRPA、Rad51のフォーカスと共局在を示すことから、相同組換えによるDNA修復及び停止した複製フォークの安定化に関与することが示唆された（第2章）。また、テロメラーゼ陰性不死化細胞株に特異的な核内構造体ECTR（extra-chromosomal telomere repeat）にWRNが含まれることを見出した（第3章）。免疫沈降法と質量分析法を用いた結合タンパク質の探索により、新規結合タンパク質としてKuを同定した（第4章）。

ヒトにおいては、これまでに5種類のRecQ型ヘリカーゼがクローニングされており、そのうちBLM、RTSはそれぞれ高発癌性ブルーム症候群、遺伝性早老症ロスモンド-トムソン症候群の原因遺伝子である（図1-1）（Ellis *et al.* 1995、Kitao *et al.* 1999b）。これらのRecQ型ヘリカーゼは、恐らく、重複した機能と個々に特異的な機能を併せ持っているものと思われる。現在のところは、全てのヒトRecQ型ヘリカーゼに関して十分に明らかになっている訳ではないが、その中では、BLMヘリカーゼはWRNとともに最も研究が進んでいる。本章では、本研究で明らかになったWRNの知見と他の研究のBLMの知見を比較して論じることにする。

両者は共通して、*in vitro*でHolliday junction構造を基質としてヘリカーゼ活性を発揮する性質を持つ（Karow *et al.* 2000、Constantinou *et al.* 2000）。Karowらは、この活性から、BLMが停止した複製フォークに生じた異常構造（特にHolliday junction構造）の解消を行うというモデルを提唱している（Karow *et al.* 2000）。解消されないHolliday junction構造は、大腸菌RuvC様の活性を持つ酵素によって切断され、DSBが生じると考えられている。この様にして複製フォークに生じたDSBは、相同組換えによって修復される結果、姉妹染色分体交換（sister chromatid exchange; SCE）の原因となる（German 1993）。実際に、ブルーム患者由来の細胞では、高頻度にSCEが認められることが知られており、停止した複製フォークの処理過程において、BLMが重要な役割を果たしていることが示唆される。一方、WS細胞では転座や欠失等の異

常はあるものの、SCEの頻度の上昇は認められない (Salk *et al.* 1985、Monnat *et al.* 1992)。このことは、BLMとWRNが*in vitro*では同様の生化学的活性を示すものの、細胞内では異なった機能を持つことを示している。私は核内フォーカスの研究から、WRNが停止した複製フォークの安定化に関与すること、ならびに相同組換えによるDNA修復に機能することを提案した (第2章)。このモデルから考えると、以下のような理由でWS細胞がSCEが頻発しないと推測される。1) 停止した複製フォークが安定化されなくなったとしても、生じたHolliday junction構造はBLMによってその殆どが解消される。2) 停止した複製フォークの一部にDSBが生じても、WRNが無いために相同組換えが起こりにくくなり、代わりに異常な非相同性末端結合が起こることで、欠失等の染色体異常が生じる。BLMとWRN各々の単独欠損株や二重欠損株のSCEの頻度を比較することで、SCE形成へのWRNの関与について検討出来るだろう。

RPAとの結合もまた、WRNと共通する性質である。RPAはBLMとも物理的に結合し、そのヘリカーゼ活性を上昇させることが報告されている (Brosh *et al.* 2000)。本研究で明らかにした核内フォーカス形成 (第2章) やECTRへの局在 (第3章) では、いずれもWRNはRPAと共局在を示し、RPAとの結合がこれらのイベントに関与する上で重要である可能性を示唆している。BLMがこれらの現象に関与するか否かは、今後の解析を待たねばならないが、WRNと同様に関与する可能性はあるだろう。

BLMと類似した性質の一方で、WRNの特徴的な性質としてはエクソヌクレアーゼドメインの存在が挙げられる。WRNのN末側にあるエクソヌクレアーゼドメインは、これまでクローニングされてきたRecQ型ヘリカーゼの内、*Xenopus*のWRNホモログFFA-1以外には存在しない (Yan *et al.* 1998)。精製した組換えWRNタンパク質は、実際にエクソヌクレアーゼ活性を持つことが示されている (Huang *et al.* 1998、Suzuki *et al.* 1999)。更に、本研究で見出した新規WRN結合タンパク質Ku (第4章) は、最近になって、WRNのヘリカーゼ活性には影響しないがDNA結合能及びエクソヌクレアーゼ活性を上昇させることが報告された (Cooper *et al.* 2000、Li & Comai 2000)。Kuが、ヒトRecQ型ヘリカーゼの中でWRNにのみ存在するエクソヌクレアーゼ活性に関与するという知見からは、WRNがKuと協調して働く経路に関しては、他のRecQ型ヘリカーゼで相補することは不可能であると推測される。Ku欠損マウス由来の細胞が分裂寿命の短縮を示すこと、Ku86欠損マウスが早老症を示すことから、WRNとKuが協調して機能するイベントこそが早老症発症に重要である可能性が考え

られ、その解明は今後の研究テーマとして非常に興味深いものである。ごく最近になって、Ku86がWRNのN末1-50アミノ酸領域に結合することが示された (Li & Comai 2001)。この領域に相当するポリペプチドを過剰発現させてKu-WRN結合を抑制することで、その生物学的意義を明らかにすることができるのではないだろうか。

以上、WRNとBLMの性質の比較について述べた。本研究で得られた結果は、いずれもWRNの生体内における機能を考える上で、より具体的な情報を与えるものである。今後他のRecQ型ヘリカーゼについても機能の詳細を明らかにし、それぞれを比較することで、早老症発症機構やゲノム維持機構の解明に寄与できると考えている。

参考文献

- Afonina, E., Stauber, R. & Pavlakis, G.N. (1998) The human poly(A)-binding protein 1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 273, 13015-13021.
- Balajee, A.S. & Bohr, V.A. (2000) Genomic heterogeneity of nucleotide excision repair. *Gene* 250, 15-30.
- Baumann, P. & West, S.C. (1998) Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. *Trends. Biochem. Sci.* 23, 247-251.
- Bishop, D.K., Ear, U., Bhattacharyya, A., Calderone, C., Beckett, M., Weichselbaum, R.R. & Shinohara, A. (1998) Xrcc3 is required for assembly of Rad51 complexes in vivo. *J. Biol. Chem.* 273, 21482-21488.
- Blander, G., Kipnis, J., Leal, J.F., Yu, C.E., Schellenberg, G.D. & Oren, M. (1999) Physical and functional interaction between p53 and the Werner's syndrome protein. *J. Biol. Chem.* 274, 29463-29469.
- Blunt, T., Finnie, N.J., Taccioli, G.E., Smith, G.C., Demengeot, J., Gottlieb, T.M., Mizuta, R., Varghese, A.J., Alt, F.W., Jeggo, P.A. & Jackson, S.P. (1995) Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. *Cell* 80, 813-823.
- Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S. & Wright, W.E. (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349-352.

Boulton, S.J. & Jackson, S.P. (1996) Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucl. Acids Res.* 24, 4639-4648.

Brosh, R.M., Li, J.L., Kenny, M.K., Karow, J.K., Cooper, M.P., Kureekattil, R.P., Hickson, I.D. & Bohr, V.A. (2000) Replication protein A physically interacts with the Bloom's syndrome protein and stimulates its helicase activity. *J. Biol. Chem.* 275, 23500-23508.

Brosh, R.M., Orren, D.K., Nehlin, J.O., Ravn, P.H., Kenny, M.K., Machwe, A. & Bohr, V.A. (1999) Functional and physical interaction between WRN helicase and human replication protein A. *J. Biol. Chem.* 274, 18341-18350.

Bryan, T.M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S. & Reddel, R.R. (1995) Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J.* 14, 4240-4248.

Constantinou, A., Tarsounas, M., Karow, J.K., Brosh, R.M. Jr., Bohr, V.A., Hickson, I.D. & West, S.C. (2000) Werner's syndrome protein (WRN) migrates Holliday junctions and co-localizes with RPA upon replication arrest. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) Reports.* 1, 80-84.

Cooper, M.P., Machwe, A., Orren, D.K., Brosh, R.M., Ramsden, D. & Bohr, V.A. (2000). Ku complex interacts with and stimulates the Werner protein. *Genes Dev.* 14, 907-912.

Courcelle, J. & Hanawalt, P.C. (1999) RecQ and RecJ process blocked replication forks prior to the resumption of replication in UV-irradiated *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 262, 543-551.

Dasika, G.K., Lin, S.C., Zhao, S., Sung, P., Tomkinson, A. & Lee, E.Y.

- (1999) DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene* 18, 7883-7899.
- Dunham, M.A., Neumann, A.A., Fasching, C.L. & Reddel, R.R. (2000) Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nature Genet.* 26, 447-450.
- Ellis, N.A., Groden, J., Ye, T.Z., Straughen, J., Lennon, D.J., Ciocci, S., Proytcheva, M. & German, J. (1995) The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell.* 83, 655-666.
- Fabini, G., Rutjes, S.A., Zimmermann, C., Pruijn, G.J. & Steiner, G. (2000) Analysis of the molecular composition of Ro ribonucleoprotein complexes. Identification of novel Y RNA-binding proteins. *Eur. J. Biochem.* 267, 2778-2789.
- Fortune, J.M. & Osheroff, N. (2000) Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 64, 221-253.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., and Siede, W. (1995) DNA Repair and Mutagenesis. pp. 42-43. ASM Press.
- Fujiwara, Y., Higashikawa, T. & Tatsumi, M. (1997) A retarded rate of DNA replication and normal level of DNA repair in Werner's syndrome fibroblasts in culture. *J. Cell Physiol.* 92, 365-374.
- Gangloff, S., Soustelle, C. & Fabre, F. (2000) Homologous recombination is responsible for cell death in the absence of the Sgs1 and Srs2 helicases. *Nature Genet.* 25, 192-194.
- Gebhart, E., Bauer, R., Raub, U., Schinzel, M., Ruprecht, K.W. & Jonas, J.B. (1988) Spontaneous and induced chromosomal instability in Werner syndrome. *Hum. Genet.* 80,135-139.

- German, J. (1993) Bloom syndrome: a mendelian prototype of somatic mutational disease. *Medicine* 72, 393-406.
- Giloni, L., Takeshita, M., Johnson, F., Iden, C. & Grollman, A.P. (1981) Bleomycin-induced strand-scission of DNA. Mechanism of deoxyribose cleavage. *J. Biol. Chem.* 256, 8608-8615.
- Goedecke, W., Eijpe, M., Offenbergh, H.H., van Aalderen, M. & Heyting, C. (1999) Mre11 and Ku70 interact in somatic cells, but are differentially expressed in early meiosis. *Nature Genet.* 23, 194-198.
- Golub, E.I., Gupta, R.C., Haaf, T., Wold, M.S. & Radding, C.M. (1998) Interaction of human rad51 recombination protein with single-stranded DNA binding protein, RPA. *Nucleic Acids Res.* 26, 5388-5393.
- Gravel, S., Larrivee, M., Labrecque, P. & Wellinger, R.J. (1998) Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science* 280, 741-744
- Griffith, J.D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Moss, H. & de Lange, T. (1999) Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97, 503-514.
- Gu, Y., Seidl, K.J., Rathbun, G.A., Zhu, C., Manis, J.P., van der Stoep, N., Davidson, L., Cheng, H.L., Sekiguchi, J.M., Frank, K., Stanhope-Baker, P., Schlissel, M.S., Roth, D.B. & Alt, F.W. (1997) Growth retardation and leaky SCID phenotype of Ku70-deficient mice. *Immunity* 7, 653-665.
- Haaf, T., Golub, E.I., Reddy, G., Radding, C.M. & Ward, D.C. (1995) Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92, 2298-2302.
- Harmon, F.G. & Kowalczykowski, S.C. (1998) RecQ helicase, in concert with RecA

and SSB proteins, initiates and disrupts DNA recombination. *Genes Dev.* 12, 1134-1144.

Hayflick, L. (1965) The limited in vitro lifespan of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37, 614-636.

Hsu, H.L., Gilley, D., Blackburn, E.H. & Chen, D.J. (1999) Ku is associated with the telomere in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 12454-12458.

Hsu, H.L., Gilley, D., Galande, S.A., Hande, M.P., Allen, B., Kim, S.H., Li, G.C., Campisi, J., Kohwi-Shigematsu, T. & Chen, D.J. (2000) Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining. *Genes Dev.* 14, 2807-2812.

Huang, S., Li, B., Gray, M.D., Oshima, J., Mian, I.S. & Campisi, J. (1998) The premature ageing syndrome protein, WRN, is a 3'→5' exonuclease. *Nature Genet.* 20, 114-116.

Karow, J.K., Constantinou, A., Li, J.L., West, S.C. & Hickson, I.D. (2000) The Bloom's syndrome gene product promotes branch migration of holliday junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97, 6504-6508.

Kitao, S., Lindor, N.M., Shiratori, M., Furuichi, Y. & Shimamoto, A. (1999a) Rothmund-thomson syndrome responsible gene, RECQL4: genomic structure and products. *Genomics* 61, 268-276.

Kitao, S., Shimamoto, A., Goto, M., Miller, R.W., Smithson, W.A., Lindor, N.M. & Furuichi Y. (1999b) Mutations in RECQL4 cause a subset of cases of Rothmund-Thomson syndrome. *Nature Genet.* 22, 82-84.

Lebel, M., Spillare, E.A., Harris, C.C. & Leder, P. (1999) The Werner syndrome gene product co-purifies with the DNA replication complex and interacts with PCNA and topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 274, 37795-37799.

- Lees-Miller, S.P., Godbout, R., Chan, D.W., Weinfeld, M., Day, R.S. 3rd, Barron, G.M. & Allalunis-Turner, J. (1995) Absence of p350 subunit of DNA-activated protein kinase from a radiosensitive human cell line. *Science* 267, 1183-1185.
- Li, B. & Comai, L. (2000) Functional Interaction between Ku and the Werner syndrome protein in DNA end processing. *J. Biol. Chem.* 275, 28349-28352.
- Li, B. & Comai, L. (2001) Requirements for the nucleolytic processing of DNA ends by the Werner syndrome protein:Ku70/80 complex. *J. Biol. Chem.* Jan 4 [epub ahead of print]
- Lieber, M.R. (1999) The biochemistry and biological significance of nonhomologous DNA end joining: an essential repair process in multicellular eukaryotes. *Genes Cells* 4, 77-85.
- Liu, Y., Li, M., Lee, E.Y. & Maizels, N. (1999) Localization and dynamic relocation of mammalian Rad52 during the cell cycle and in response to DNA damage. *Curr. Biol.* 9, 975-978.
- Marciniak, R.A., Lombard, D.B., Johnson, F.B. & Guarente, L. (1998) Nucleolar localization of the Werner syndrome protein in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95, 6887-6892.
- Martin, G.M. (1985) Genetics and aging; the Werner syndrome as a segmental progeroid syndrome. *Adv. Exp. Med. Biol.* 190,161-170.
- Martin, G.M., Sprague, C.A. & Epstein, C.J. (1970) Replicative life-span of cultivated human cells. Effects of donor's age, tissue, and genotype. *Lab. Invest.* 23, 86-92.
- Maser, R.S., Monsen, K.J., Nelms, B.E. & Petrini, J.H. (1997) hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6087-6096.
- Matsumoto, T., Imamura, O., Yamabe, Y., Kuromitsu, J., Tokutake, Y.,

Shimamoto, A., Suzuki, N., Satoh, M., Kitao, S., Ichikawa, K., Kataoka, H., Sugawara, K., Thomas, W., Mason, B., Tsuchihashi, Z., Drayna, D., Sugawara, M., Sugimoto, M., Furuichi, Y. & Goto, M. (1997) Mutation and haplotype analyses of the Werner's syndrome gene based on its genomic structure: genetic epidemiology in the Japanese population. *Hum. Genet.* 100, 123-130.

Monnat, R.J. Jr., Hackmann, A.F. & Chiaverotti, T.A. (1992) Nucleotide sequence analysis of human hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) gene deletions. *Genomics* 13, 777-787.

Nelms, B.E., Maser, R.S., MacKay, J.F., Lagally, M.G. & Petrini, J.H. (1998) In situ visualization of DNA double-strand break repair in human fibroblasts. *Science*. 280, 590-592.

Ogburn, C.E., Oshima, J., Poot, M., Chen, R., Hunt, K.E., Gollahon, K.A., Rabinovitch, P.S. & Martin, G.M. (1997) An apoptosis-inducing genotoxin differentiates heterozygotic carriers for Werner helicase mutations from wild-type and homozygous mutants. *Hum. Genet.* 101, 121-125.

Ohsugi, I., Tokutake, Y., Suzuki, N., Ide, T., Sugimoto, M. & Furuichi, Y. (2000) Telomere repeat DNA forms a large non-covalent complex with unique cohesive properties which is dissociated by Werner syndrome DNA helicase in the presence of replication protein A. *Nucl. Acids Res.* 28, 3642-3648.

Okada, M., Goto, M., Furuichi, Y. & Sugimoto, M. (1998) Differential effects of cytotoxic drugs on mortal and immortalized B-lymphoblastoid cell lines from normal and Werner's syndrome patients. *Biol. Pharm. Bull.* 21, 235-239.

Parkes, T.L., Elia, A.J., Dickinson, D., Hilliker, A.J., Phillips, J.P. & Boulianne, G.L. (1998) Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motorneurons. *Nature Genet.* 19, 171-174.

- Pichierri, P., Franchitto, A., Mosesso, P., Proietti de Santis, L., Balajee, A.S. & Palitti, F. (2000) Werner's syndrome lymphoblastoid cells are hypersensitive to topoisomerase II inhibitors in the G2 phase of the cell cycle. *Mutat. Res.* 459, 123-133.
- Pilon, M. & Scheckman, R. (1999) Protein translocation: how hsp70 pulls it off. *Cell* 97, 679-682.
- Pommier, Y. (1996) Eukaryotic DNA topoisomerase I: genome gatekeeper and its intruders, camptothecins. *Semin. Oncol.* 23, 1-10.
- Poot, M., Gollahon, K.A. & Rabinovitch, P.S. (1999) Werner syndrome lymphoblastoid cells are sensitive to camptothecin-induced apoptosis in S-phase. *Hum. Genet.* 104, 10-14.
- Poot, M., Hoehn, H., Runger, T.M. & Martin, G.M. (1992) Impaired S-phase transit of Werner syndrome cells expressed in lymphoblastoid cell lines. *Exp. Cell. Res.* 202, 267-273.
- Povirk, L.F. (1996) DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes. *Mutat. Res.* 355, 71-89.
- Prince, P.R., Ogburn, C.E., Moser, M.J., Emond, M.J., Martin, G.M. & Monnat, R.J. Jr. (1999) Cell fusion corrects the 4-nitroquinoline 1-oxide sensitivity of Werner syndrome fibroblast cell lines. *Hum. Genet.* 105, 132-138.
- Raderschall, E., Goulb, E.I. & Haaf, T. (1999) Nuclear foci of mammalian recombination proteins are located at single-stranded DNA regions formed after DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96, 1921-1926.
- Rotman, G. & Shiloh, Y. (1997) Ataxia-telangiectasia: is ATM a sensor of oxidative damage and stress? *Bioessays* 19, 911-917.

Ruegsegger, U., Blank, D. & Keller, W. (1998) Human pre-mRNA cleavage factor Im is related to spliceosomal SR proteins and can be reconstituted in vitro from recombinant subunits. *Mol. Cell* 1, 243-253.

Runger, T.M., Bauer, C., Dekant, B., Moller, K., Sobotta, P., Czerny, C., Poot, M. & Martin, G.M. (1994) Hypermutable ligation of plasmid DNA ends in cells from patients with Werner syndrome. *J. Invest. Dermatol.* 102, 45-48.

Salk, D., Bryant, E., Hoehn, H., Johnston, P. & Martin, G.M. (1985) Growth characteristics of Werner syndrome cells in vitro. *Adv. Exp. Med. Biol.* 190, 305-311.

Schulz, V.P., Zakian, V.A., Ogburn, C.E., McKay, J., Jarzebowicz, A.A., Edland, S.D. & Martin, G.M. (1996) Accelerated loss of telomeric repeats may not explain accelerated replicative decline of Werner syndrome cells. *Hum. Genet.* 97, 750-754.

Shao, R.G., Cao, C.X., Zhang, H., Kohn, K.W., Wold, M.S. & Pommier, Y. (1999) Replication-mediated DNA damage by camptothecin induces phosphorylation of RPA by DNA-dependent protein kinase and dissociates RPA:DNA-PK complexes. *EMBO J.* 18, 1397-1406.

Shen, J.C., Gray, M.D., Oshima, J. & Loeb, L.A. (1998) Characterization of Werner syndrome protein DNA helicase activity: directionality, substrate dependence and stimulation by replication protein A. *Nucleic Acids Res.* 26, 2879-2885.

Shen, J.C. & Loeb, L.A. (2000) The Werner syndrome gene: the molecular basis of RecQ helicase-deficiency diseases. *Trends Genet.* 16, 213-220.

Sherr, C.J. & DePinho, R.A. (2000) Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* 102, 407-410.

Shiratori, M., Sakamoto, S., Suzuki, N., Tokutake, Y., Kawabe, Y., Enomoto, T., Sugimoto, M., Goto, M., Matsumoto, T. & Furuichi, Y. (1999)

Detection by epitope-defined monoclonal antibodies of Werner DNA helicases in the nucleoplasm and their upregulation by cell transformation and immortalization. *J. Cell Biol.* 144, 1-9.

Sinclair, D.A., Mills, K. & Guarente, L. (1997) Accelerated aging and nucleolar fragmentation in yeast *sgs1* mutants. *Science* 277, 1313-1316.

Smith, G.C. & Jackson, S.P. (1999) The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev.* 13, 916-934.

Spillare, E.A., Robles, A.I., Wang, X.W., Shen, J.C., Yu, C.E., Schellenberg, G.D. & Harris, C.C. (1999) p53-mediated apoptosis is attenuated in Werner syndrome cells. *Genes Dev.* 13, 1355-1360.

Suzuki, N., Shimamoto, A., Imamura, O., Kuromitsu, J., Kitao, S., Goto, M. & Furuichi, Y. (1997) DNA helicase activity in Werner's syndrome gene product synthesized in a baculovirus system. *Nucleic Acids Res.* 25, 2973-2978.

Suzuki, N., Shiratori, M., Goto, M. & Furuichi, Y. (1999) Werner syndrome helicase contains a 5'→3' exonuclease activity that digests DNA and RNA strands in DNA/DNA and RNA/DNA duplexes dependent on unwinding. *Nucleic Acids Res.* 27, 2361-2368.

Tahara, H., Tokutake, Y., Maeda, S., Kataoka, H., Watanabe, T., Satoh, M., Matsumoto, T., Sugawara, M., Ide, T., Goto, M., Furuichi, Y. & Sugimoto, M. (1997) Abnormal telomere dynamics of B-lymphoblastoid cell strains from Werner's syndrome patients transformed by Epstein-Barr virus. *Oncogene* 15, 1911-1920.

Takeuchi, F., Hanaoka, F., Goto, M., Yamada, M. & Miyamoto, T. (1982) Prolongation of S phase and whole cell cycle in Werner's syndrome fibroblasts. *Exp. Gerontol.* 17, 473-480.

Tamura, H., Kohchi, C., Yamada, R., Ikeda, T., Koiwai, O., Patterson, E., Keene, J.D., Okada, K., Kjeldsen, E., Nishikawa, K. & Andoh, T. (1991) Molecular cloning of a cDNA of a camptothecin-resistant human DNA topoisomerase I and identification of mutation sites. *Nucl. Acid Res.* 19, 69-75.

Teng, S.C. & Zakian, V.A. (1999) Telomere-telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 19, 8083-8093.

Tokutake, Y., Matsumoto, T., Watanabe, T., Maeda, S., Tahara, H., Sakamoto, S., Niida, H., Sugimoto, M., Ide, T. & Furuichi, Y. (1998) Extra-chromosomal telomere repeat DNA in telomerase-negative immortalized cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247, 765-772.

van Steensel, B. & de Lange, T. (1997) Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 385, 740-743.

van Steensel, B., Smogorzewska, A. & de Lange, T. (1998) TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92, 401-413.

Vogel, H., Lim, D.S., Karsenty, G., Finegold, M. & Hasty, P. (1999) Deletion of Ku86 causes early onset of senescence in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96, 10770-10775.

Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S.J. & Qin, J. (2000) BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev.* 14, 927-939

Weinrich, S.L., Pruzan, R., Ma, L., Ouellette, M., Tesmer, V.M., Holt, S.E., Bodnar, A.G., Lichtsteiner, S., Kim, N.W., Trager, J.B., Taylor, R.D., Carlos, R., Andrews, W.H., Wright, W.E., Shay, J.W., Harley, C.B. & Morin, G.B. (1997) Reconstitution of human telomerase with the template RNA component

hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nature Genet.* 17, 498-502.

Wold, M.S. (1997) Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 61-92.

Wu, G., Lee, W.H. & Chen, P.L. (2000) NBS1 and TRF1 colocalize at promyelocytic leukemia bodies during late S/G2 phases in immortalized telomerase-negative cells.

IMPLICATION OF NBS1 IN ALTERNATIVE LENGTHENING OF TELOMERES. *J Biol. Chem.* 275, 30618-30622.

Yamagata, K., Kato, J., Shimamoto, A., Goto, M., Furuichi, Y. & Ikeda, H. (1998) Bloom's and Werner's syndrome genes suppress hyperrecombination in yeast *sgs1* mutant: implication for genomic instability in human diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95, 8733-8738.

Yan, H., Chen, C.Y., Kobayashi, R. & Newport, J. (1998) Replication focus-forming activity 1 and the Werner syndrome gene product. *Nature Genet.* 19, 375-378.

Yang, Y., Eversole, T., Lee, D.J., Sontheimer, R.D. & Capra, J.D. (1999) Protein-protein interactions between native Ro52 and immunoglobulin G heavy chain. *Scand. J. Immunol.* 49, 620-628.

Yeager, T.R., Neumann, A.A., Englezou, A., Huschtscha, L.I., Noble, J.R. & Reddel, R.R. (1999) Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res.* 59, 4175-4179.

Yu, C.E., Oshima, J., Fu, Y.H., Wijsman, E.M., Hisama, F., Alisch, R., Matthews, S., Nakura, J., Miki, T., Ouais, S., Martin, G.M., Mulligan, J. & Schellenberg, G.D. (1996) Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science.* 272, 258-262.

Yuan, S.S., Lee, S.Y., Chen, G., Song, M., Tomlinson, G.E. & Lee, E.Y.

(1999) BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo. *Cancer Res.* 59, 3547-3551.

Zhu, X.D., Kuster, B., Mann, M., Petrini, J.H. & de Lange, T. (2000) Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nature Genet.* 25, 347-352.

図表の説明

表1-1 ヒトの主な早老症

表1-2 ウェルナー症候群の臨床症状及び細胞の形質

図1-1 RecQヘリカーゼファミリー

RecQヘリカーゼは、大腸菌のような原核生物から、ヒトを含む高等真核生物まで普遍的に存在し、染色体の安定化や遺伝情報の維持に重要な役割を果たしていると考えられる。

図2-1 WRNはトポイソメラーゼI阻害剤であるカンプトテシン（CPT）処理によって核内フォーカスを形成する

(A) WRNの核内局在

未処理 (a-d) もしくは $1\mu\text{M}$ CPTで6時間処理 (e-h) したヒト白血病細胞K562の抗WRN抗体 (緑) 及び抗B23 (核小体マーカー) 抗体 (赤) による二重染色像。浮遊細胞であるK562細胞の場合、WRNは未処理では核全体に分布し、CPT処理によって主に核質にフォーカスを形成する。付着細胞であるヒト胎児腎細胞293EBNAの場合、未処理 (i-l) では主に核小体に局在するが、CPT処理 (m-p) するとK562細胞と同様に主に核質にフォーカスを形成する。白線は $5\mu\text{m}$ を示す。

(B) CPTによって誘導されるWRNフォーカス形成の濃度依存性

K562細胞を0.1、0.5、1、 $10\mu\text{M}$ のCPTで6時間処理し、抗WRN抗体で免疫染色した。200個の細胞核を観察し、核当たり6個以上のWRNフォーカスが認められたものを陽性とした。

(C) CPT処理のWRNタンパク質量に対する影響の検討

未処理もしくは $1\mu\text{M}$ CPTで6時間処理したK562細胞の各々 4×10^5 個分の細胞抽出液について抗WRN抗体及び抗アクチン抗体でイムノブロットを行った。

(D) CPTによって誘導されるWRNフォーカスとテロメア

未処理もしくは $1\mu\text{M}$ CPTで6時間処理したK562細胞を抗WRN抗体 (緑) 及びテロ

メア配列特異的なプローブによるFISH（赤）で二重染色した。

図2-2 トポI変異細胞でのCPT処理によるWRNフォーカス形成の検討

(A) CPTのDNA二本鎖切断（DSB）誘発機構

CPTによって固定されたトポイソメラーゼI-DNA複合体と進行中の複製フォークが衝突することによってDNA二本鎖切断（DSB）が生じる。

(B) トポI変異細胞ではCPTによるWRNフォーカス形成が起こらない。

トポイソメラーゼI変異によってCPT抵抗性となったCPT-K5細胞と、親株RPMI8402細胞を $1\mu\text{M}$ CPTで6時間処理し、抗WRN抗体で免疫染色した。CPT-K5細胞ではCPTによるWRNフォーカス形成は見られなかった。

表2-1 種々の薬剤のWRNフォーカス誘導能の濃度依存性

対数増殖期のK562細胞を種々のDNA損傷剤でそれぞれ6時間処理し、抗WRN抗体で免疫染色した。200個の細胞核を観察し、核当たり6個以上のWRNフォーカスが認められたものを陽性とした。

図2-3 DNA損傷剤によって誘導されるWRNフォーカス形成とアフィジコリン処理による阻害

アフィジコリン存在下（ $1\mu\text{g/ml}$ ）もしくは非存在下でK562細胞をDNA損傷剤（ $1\mu\text{M}$ CPT、 $10\mu\text{M}$ エトポシド、 $5\mu\text{M}$ 4NQO もしくは $50\mu\text{g/ml}$ ブレオマイシン）でそれぞれ6時間処理し、抗WRN抗体で免疫染色した。CPTによって誘導されるWRNフォーカスの形成はアフィジコリンによってほぼ完全に、エトポシドや4NQOによるWRNフォーカス形成は部分的に抑制されたが、ブレオマイシンのWRNフォーカス誘導能には殆ど影響しなかった。

※図2-3に示したグラフは、いずれも200個以上の核について行った実験の3回分のデータの平均及び標準偏差（Standard deviations）をプロットしたものである。

図2-4 種々の薬剤によるWRNフォーカス形成の誘導

K562細胞を薬剤を含む培地で6時間培養し、抗WRN抗体で免疫染色した。X線及びUV照射に関しては、照射後6時間培養したのち固定・免疫染色した。白線は $5\mu\text{m}$ を示す。

表2-2 様々な薬剤のWRNフォーカス誘導能

薬剤の種類によってフォーカス形成には違いがあり、大きく分けて2つのフォーカス形成の様式があった(図2-1、2-4参照)。一つは、CPTやエトポシド、4NQO、ブレオマイシンによって誘導される、強い染色像のフォーカスが核当たり数多く見られる様式であり、もう一つは、X線やUV照射、HU、高濃度のアフィジコリン(10 μ g/ml)処理によって誘導される小さく弱い染色像のフォーカスである。このフォーカス形成様式の違いはWS細胞の薬剤感受性と相関性があるように思われる。CPTやエトポシド、4NQOに対してWS細胞は感受性であることが示されている一方、X線やUV照射、HU等に対してWS細胞は感受性でないとされている。

図2-5 CPTによって誘導されるWRNフォーカスはRPAとほぼ完全に一致する

(A) CPT処理細胞におけるWRNとRPAの核内局在

未処理(a-c)もしくは1 μ M CPTで6時間処理(d-l)したK562細胞の抗WRN抗体(赤)及び抗RPA34抗体(緑)による二重染色像。未処理細胞内ではRPA34は核質に分布するが、CPT処理細胞内ではWRN同様にRPAもフォーカスを形成し、両者はほぼ完全に一致した。白線は5 μ mを示す。

(B) CPT処理細胞におけるWRNとRPAのフォーカス形成の頻度

未処理(a-c)もしくは1 μ M CPTで6時間処理したK562細胞を抗WRN抗体及び抗RPA34抗体を用いて二重染色し、それぞれ200個の細胞核を観察した。最後の欄はWRNフォーカス陽性核のうち、WRNとRPAの共局在が観察された核の割合を示す。

図2-6 WRNはCPT処理により誘導されるRPAフォーカス形成に必須ではない

(A) 健常人(a-c)もしくはウェルナー患者(d-f)由来のEBVトランスフォームBリンパ芽球細胞を1 μ M CPTで6時間処理し、抗WRN抗体及び抗RPA34抗体を用いて二重染色像した。ウェルナー患者由来の細胞においても、RPAのフォーカス形成がCPT処理により誘導された。

(B) 抗RPA70抗体を用いた実験でも、RPAのフォーカス形成が観察された。白線は5 μ mを示す。

図2-7 CPTによって誘導されるWRNフォーカスはRad51フォーカスと部分的に一致する

(A) CPT処理細胞におけるWRNとRad51の核内局在

未処理 (a-c) もしくは $1\mu\text{M}$ CPTで6時間処理 (d-l) したK562細胞の抗WRN抗体 (緑) 及び抗Rad51抗体 (赤) による二重染色像。未処理細胞内ではRad51は核質中に拡散した状態で存在し、一部の核に数個のフォーカスが見られるのみである (b)。一方、CPT処理細胞内ではRad51もフォーカスを形成し (e,h,k)、両者は部分的に一致した (f,i,l)。白線は $5\mu\text{m}$ を示す。

(B) CPT処理細胞におけるWRNとRad51のフォーカス形成の頻度

未処理 (a-c) もしくは $1\mu\text{M}$ CPTで6時間処理したK562細胞を抗WRN抗体及び抗Rad51抗体を用いて二重染色し、それぞれ200個の細胞核を観察した。最後の欄はWRNpフォーカス陽性核のうち、20%以上のWRNフォーカスがRad51フォーカスと一致した核の割合を示す。

図2-8 CPTによって誘導されるWRNフォーカスはBrdU取り込み部位と部分的に一致する

(A) CPT処理細胞におけるWRNとBrdU取り込み部位の核内局在

K562細胞を未処理 (a-c) もしくは $1\mu\text{M}$ CPTで4時間処理 (d-l) した後、培地で2回洗浄した。次に $10\mu\text{M}$ BrdUを含む培地で2時間培養し、抗WRN抗体 (赤) 及び抗BrdU抗体 (緑) を用いて二重染色した。未処理細胞内ではBrdUの取り込みは核全体に見られた (b)。一方、CPT処理細胞内ではBrdUの取り込み部位は劇的に減少したが (e,h,k)、一部はWRNフォーカスと一致した (f,i,l)。白線は $5\mu\text{m}$ を示す。

(B) CPT処理細胞におけるWRNとRad51のフォーカス形成の頻度

未処理 (a-c) もしくは $1\mu\text{M}$ CPTで6時間処理したK562細胞を抗WRN抗体及び抗Rad51抗体を用いて二重染色し、それぞれ200個の細胞核を観察した。最後の欄はWRNフォーカス陽性核のうち、20%以上のWRNフォーカスがBrdU取り込み部位と一致した核の割合を示す。

図3-1 テロメラーゼ陰性不死化細胞KMST-6でのECTR

(A) 通常培地中にて培養し、対数増殖期にあるKMST-6細胞についての、テロメア配列に対応したペプチド核酸プローブを用いたFISHと抗PML抗体による二重染色像

(B) 対数増殖期にあるKMST-6細胞についての、テロメア配列に対応したプローブを用いたFISHと抗RPA70抗体による二重染色像

図3-2 テロメラーゼ陰性不死化細胞KMST-6でのWRNの核内局在

(A) 通常培地中にて培養し、対数増殖期にあるKMST-6細胞についての、テロメア配列に対応したペプチド核酸プローブを用いたFISHと抗WRN抗体による二重染色像

(B) 対数増殖期にあるKMST-6細胞についての、抗WRN抗体と抗PML抗体による二重染色像

(C) 対数増殖期にあるKMST-6細胞についての、抗WRN抗体と抗RPA70抗体による二重染色像

図3-3 テロメラーゼ陰性不死化細胞WI38-VA13ならびにテロメラーゼ陽性癌細胞MCF-7におけるテロメアFISHとWRN

(A) 対数増殖期にあるWI38-VA13（上段）ならびにMCF-7（下段）についての、テロメア配列に対応したペプチド核酸プローブを用いたFISHと抗PML抗体による二重染色像

(B) 対数増殖期にあるWI38-VA13（上段）ならびにMCF-7（下段）についての、テロメア配列に対応したペプチド核酸プローブを用いたFISHと抗WRN抗体による二重染色像

図4-1 ^{35}S 標識したK562細胞についての抗WRN抗体を用いた免疫沈降

5×10^6 個のK562細胞を ^{35}S メチオニンを含む培地で培養して標識し、その細胞粗抽出液に抗WRN抗体（8H3及び4H12）もしくはコントロールとしてのマウスIgGを加えて免疫沈降した。沈降物は7.5%ゲル（A）もしくは12.5%ゲル（B）で分離した。

図4-2 WRN結合タンパク質の免疫沈降法による精製及び質量分析による同定

9×10^8 個のK562細胞から細胞粗抽出液を作製し、抗WRN抗体（8H3及び4H12）及びコントロールとしてマウスIgGを用いて免疫沈降を行った。免疫沈降物を10% SDS-PAGEにて分離し、銀染色によって検出されたシグナルを、MALDI-TOF質量分析によって解析した。

図4-3 DNA-PK複合体 (Ku/DNA-PKcs) の機能

(A) DNA二本鎖切断 (DSB) によるDNA-PK活性化機構

電離放射線等によって生じたDSB末端に、まずKuヘテロ二量体が結合する。それによって、DNA-PKcsがDNA鎖切断面にリクルートされ、タンパク質リン酸化酵素活性を持つようになる。

(B) DNA-PK関連分子の欠損マウスの形質

SCIDは重症複合型免疫不全症 (Severe combined immuno-deficiency) を示す変異マウスで、その原因遺伝子がDNA-PKcsである (Blunt *et al.* 1995)。DNA-PK関連分子の欠損マウスは、非相同性末端結合の欠陥に起因する電離放射線感受性ならびに免疫不全を示す。一方で、Ku欠損マウスに特徴的な形質として、細胞分裂寿命の短縮があり、更にKu86欠損マウスは早老様症状を呈する。

図4-4 CPT処理細胞及びDNA-PKcs欠損細胞におけるWRN-Kuの結合

(A) 未処理 (U) もしくはCPT処理 (C) したK562細胞の粗抽出液について抗Ku86抗体を用いて免疫沈降を行った。

(B) CPT処理したDNA-PKcs欠損細胞株M059J (J) ならびに親株M059K (K) の細胞粗抽出液について抗Ku86抗体を用いて免疫沈降を行った。

(C) CPT処理したDNA-PKcs欠損細胞株M059J (J) ならびに親株M059K (K) の細胞粗抽出液について抗Ku70抗体を用いて免疫沈降を行った。

図4-5 CPT処理したK562細胞におけるKu/DNA-PKcsの核内局在

(A) 対数増殖期のK562細胞についての、抗Ku86抗体、抗Ku70抗体、抗DNA-PKcs抗体を用いた免疫染色像。

(B) CPT処理したK562細胞についての、抗Ku86抗体及び抗WRN抗体を用いた二重染色像。T.L.は透過光像である。

(C) CPT処理したK562細胞についての、抗Ku70抗体及び抗WRN抗体を用いた二重染色像。

(D) CPT処理したK562細胞についての、抗DNA-PKcs抗体及び抗WRN抗体を用いた二重染色像。

表1-1・ヒトの主な早老症

疾患	発症時期	臨床症状	原因遺伝子
ウェルナー症候群	10-20代	低身長、皮膚症、薄毛、白内障、動脈硬化症、発癌	<i>WRN</i> (RecQ)
ロスモンド-トムソン症候群	幼少期	低身長、皮膚症、薄毛、骨形成異常、発癌	<i>RTS</i> (RecQ)
毛細血管拡張性運動失調症 (AT)	生後	小脳性運動失調、毛細血管拡張症、精神発達遅延	<i>ATM</i>
コケイン症候群 (CS)	生後	低身長、精神発達遅延、小頭症、老人様顔貌、白内障	<i>CS-A / CS-B</i>
ハッチンソン-ギルフォード症候群	生後数カ月	低身長、皮膚症、薄毛	—
ダウン症候群	生後	低身長、知的障害、アルツハイマー型痴呆	21番トリソミー

表1-2・ウェルナー症候群の臨床症状及び細胞の形質

臨床症状	細胞の形質
発育遅滞 (18.9 y.o.)	細胞分裂寿命の短縮
白髪、禿頭 (20.1 y.o.)	ゲノム不安定性
皮膚硬化 (26.4 y.o.)	染色体転座
白内障 (31.2 y.o.)	大きな欠失
糖尿病 (31.5 y.o.)	テロメア代謝異常
不妊症 (35.6 y.o.)	S期における異常
骨粗鬆症 (39.5 y.o.)	S期の延長
動脈硬化 (40.6 y.o.)	複製開始点の減少
悪性腫瘍 (41.3 y.o.)	DNA損傷剤に対する感受性
平均寿命 46.0±11.6 y.o.	camptothecin (トポイソメラーゼI阻害剤)
	etoposide (トポイソメラーゼII阻害剤)
	4NQO

カッコ内は発症する平均年齢を示す

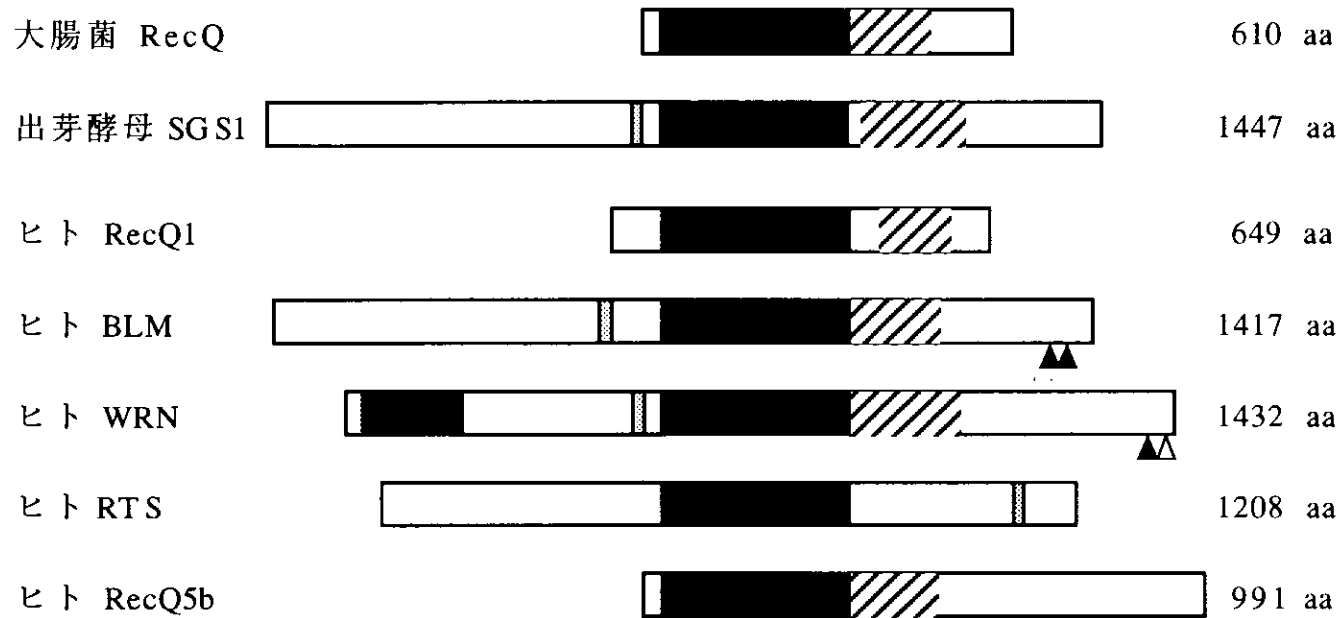


図1-1 RecQヘリカーゼファミリー

- ヘリカーゼドメイン
エクソヌクレアーゼドメイン
- 大腸菌RecQのC末領域との相同性領域
酸性アミノ酸クラスター
- 核移行シグナル (NLS)
核小体移行シグナル (NoLS)

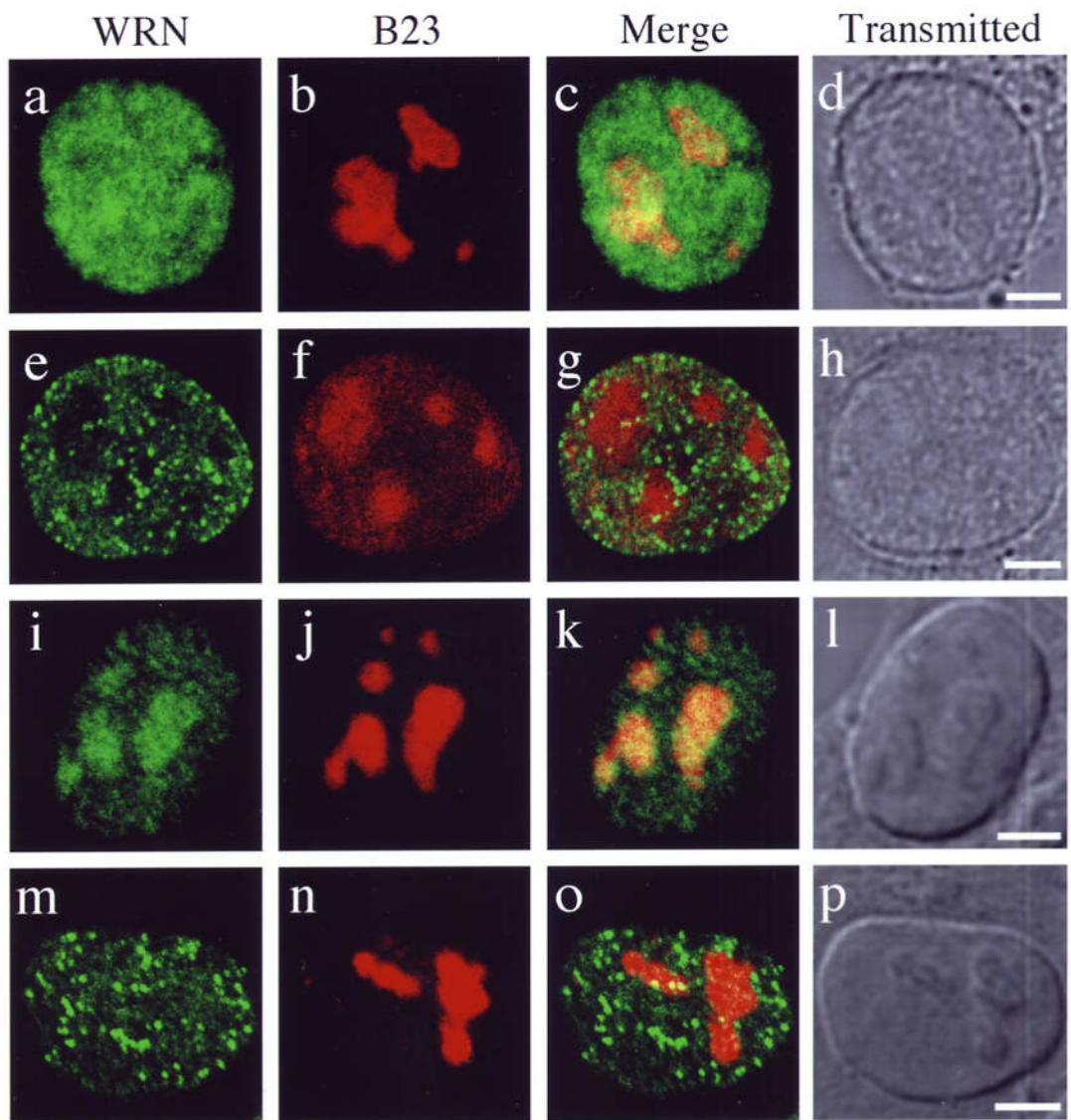
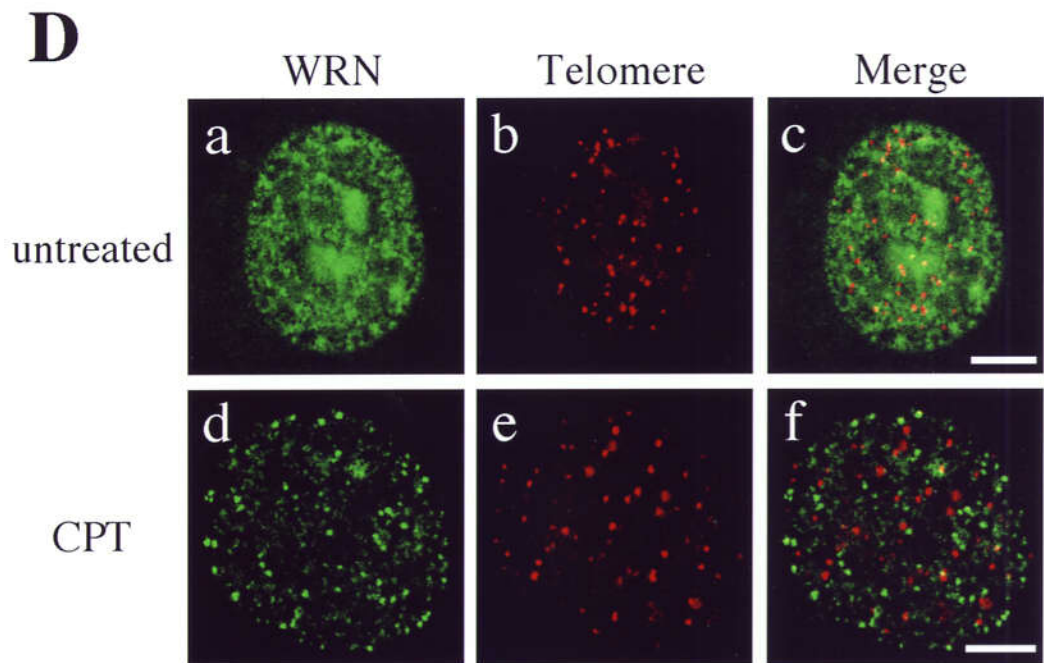
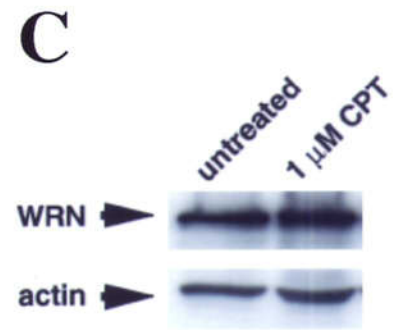
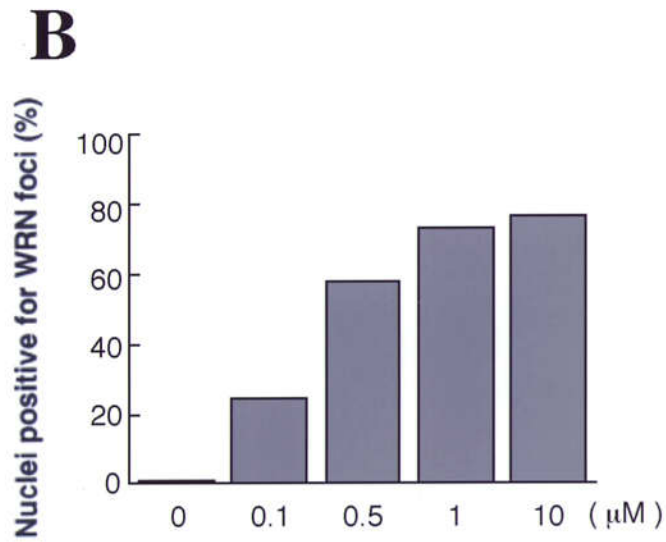


図2-1A

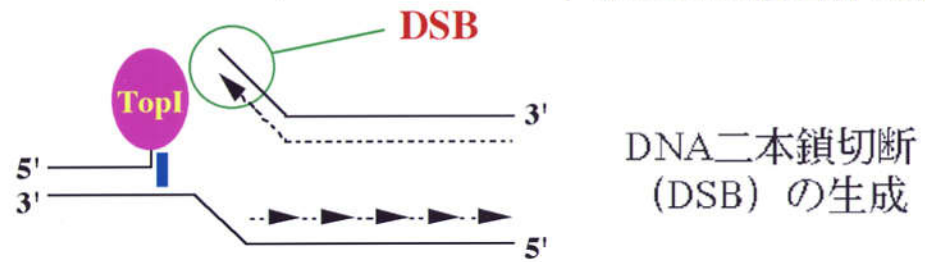


A

トポI-DNA複合体



進行中の複製フォークとトポI-DNA複合体の衝突



B

RPMI8402
(wild)

CPT-K5
(TopI-mutant)

CPT 1 μ M

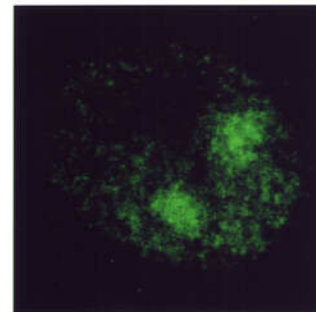
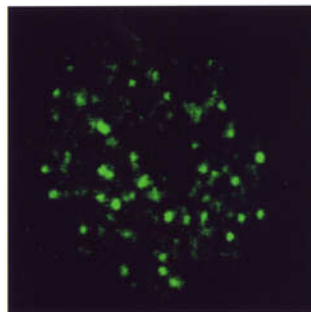


図2-2

表2-1・種々の薬剤のWRNフォーカス誘導能の濃度依存性

薬剤	濃度	WRNフォーカス陽性核 (%)
エトポシド	0.1 μM	0
	1.0	15.3
	10	66.0
ICRF-193	1.0 μM	0.3
	10	0
	50	0.5
4NQO	0.2 μM	1.0
	1.0	18.3
	5.0	47.8
ブレオマイシン	10 $\mu\text{g/ml}$	21.8
	50	56.0
	75	64.8

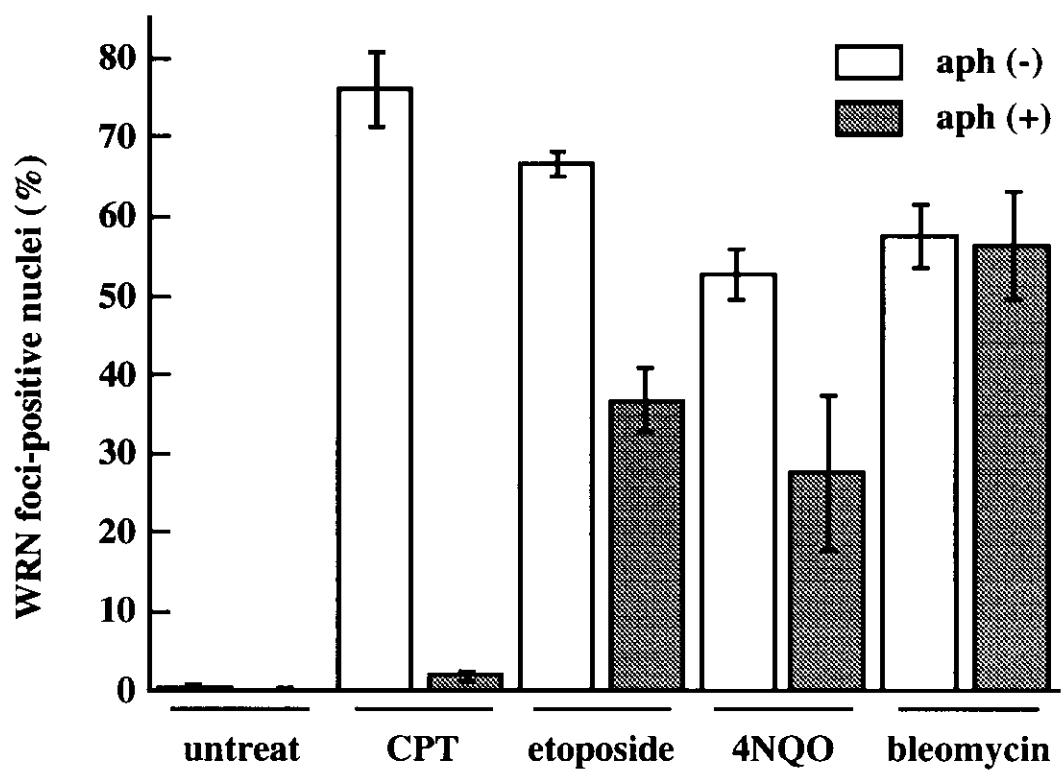


图2-3

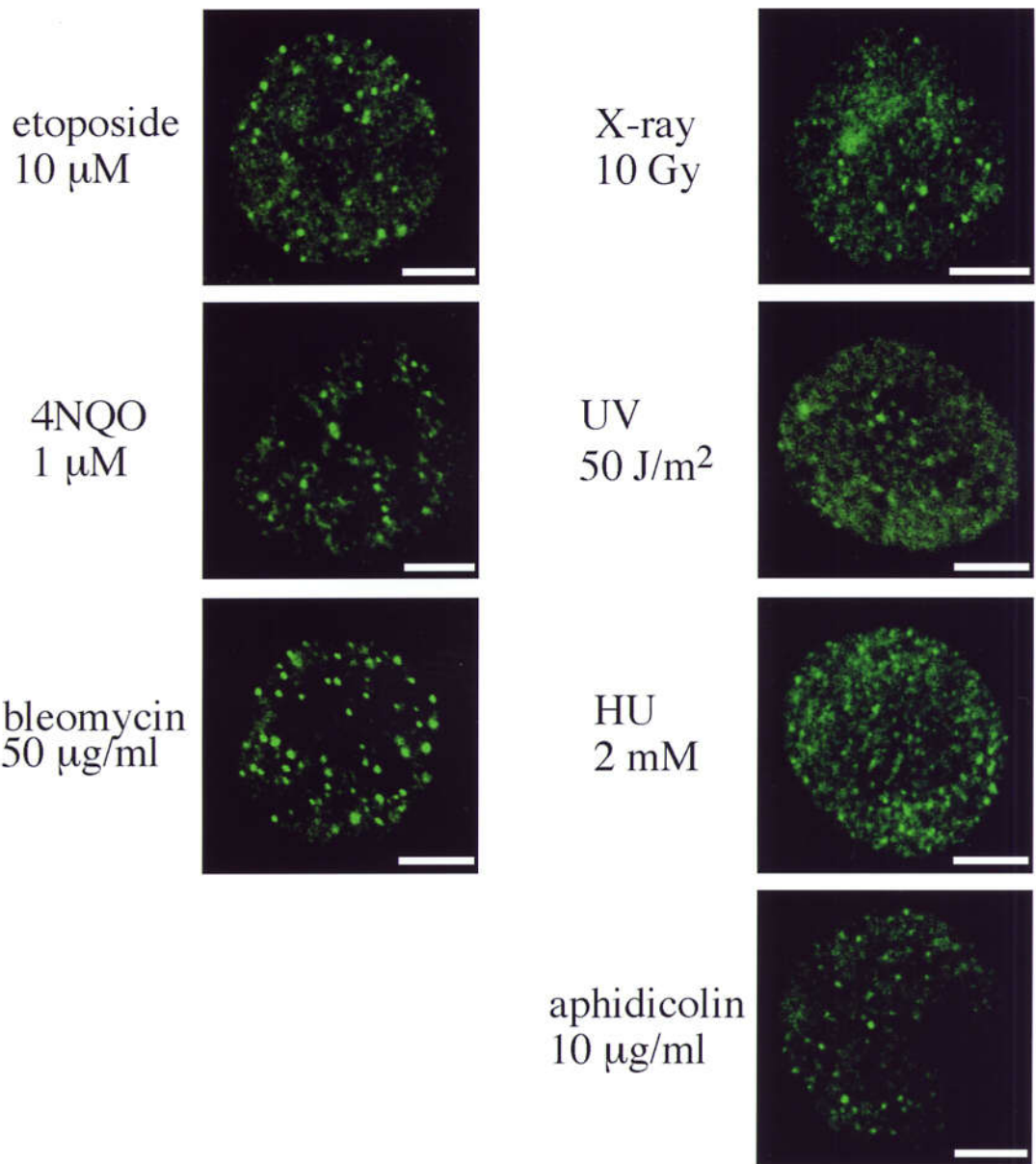


図2-4

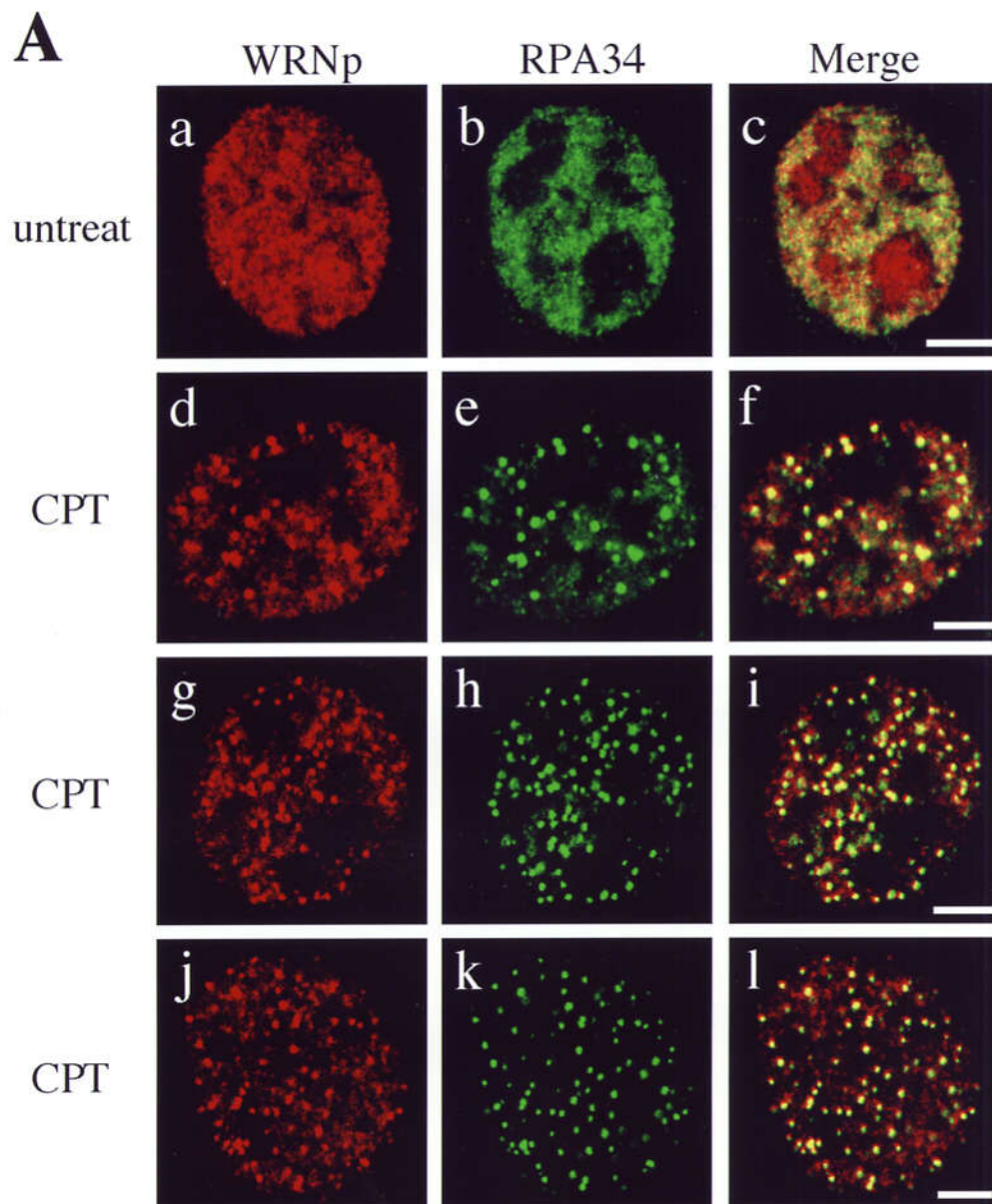
表2-2・種々の薬剤処理によるWRNフォーカスの形成

薬剤	DNAに与える主な影響	用量	WRNフォーカス
CPT	DSB	0.1 μ M	++
エトポシド	DSB	1 μ M	++
ICRF-193	-	50 μ M	-
4NQO	塩基修飾	1 μ M	++
ブレオマイシン	DSB	50 μ g/ml	++
HU	複製フォークの停止	2 mM	+
アフジコリン	複製フォークの停止	1 μ g/ml	-
		10 μ g/ml	+
X-ray	SSB/DSB	10 Gy	+
UV	塩基修飾	40 J/m ²	+

++ 強い染色像のフォーカスが多く認められる

+ 弱い染色像のフォーカスのみ

- WRNフォーカスは認められない



B

	Foci contained in nuclei (%)			colocalization of WRNp and RPA (%)
	WRNp	RPA	WRNp and RPA	
untreat	0	2.5	0	—
CPT 1 μ M	87.0	88.0	87.0	100

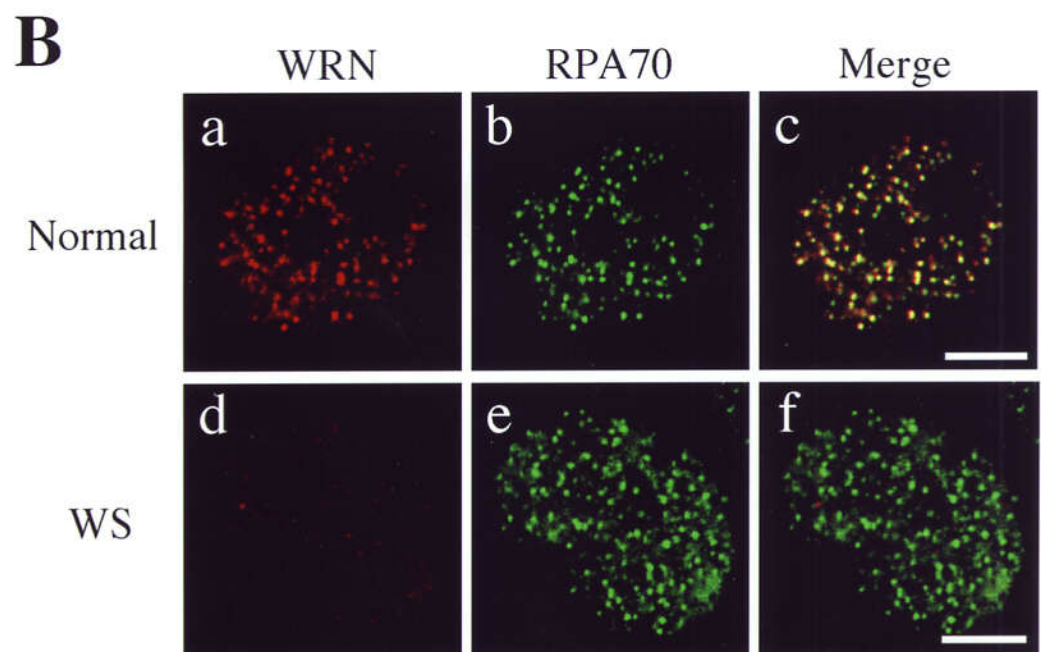
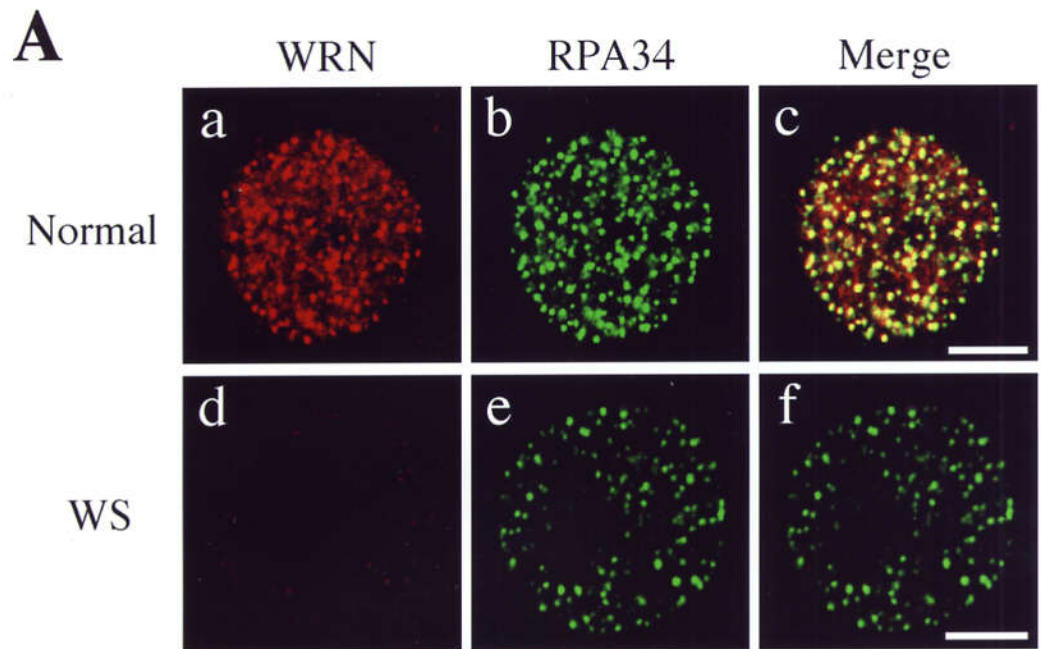
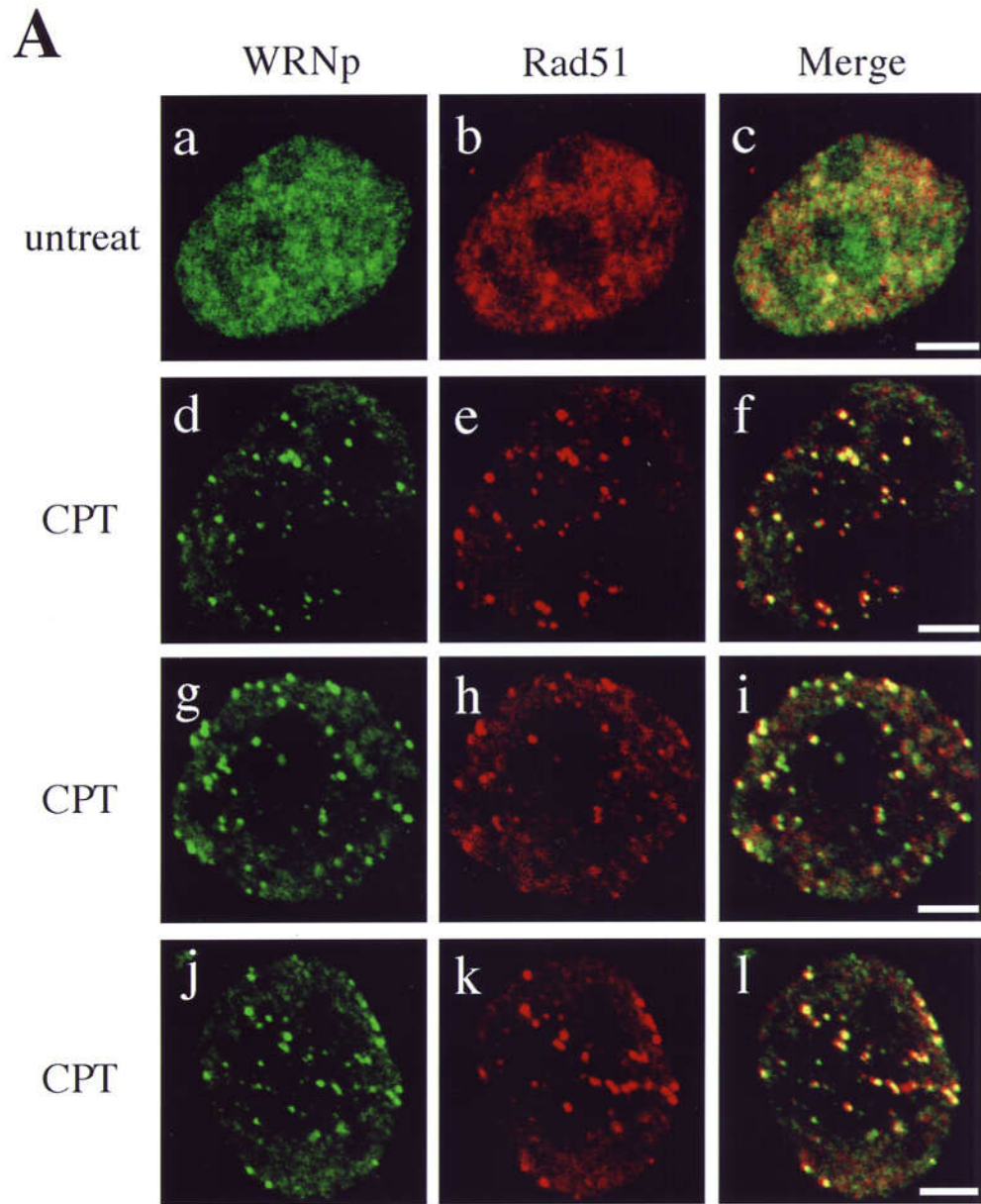
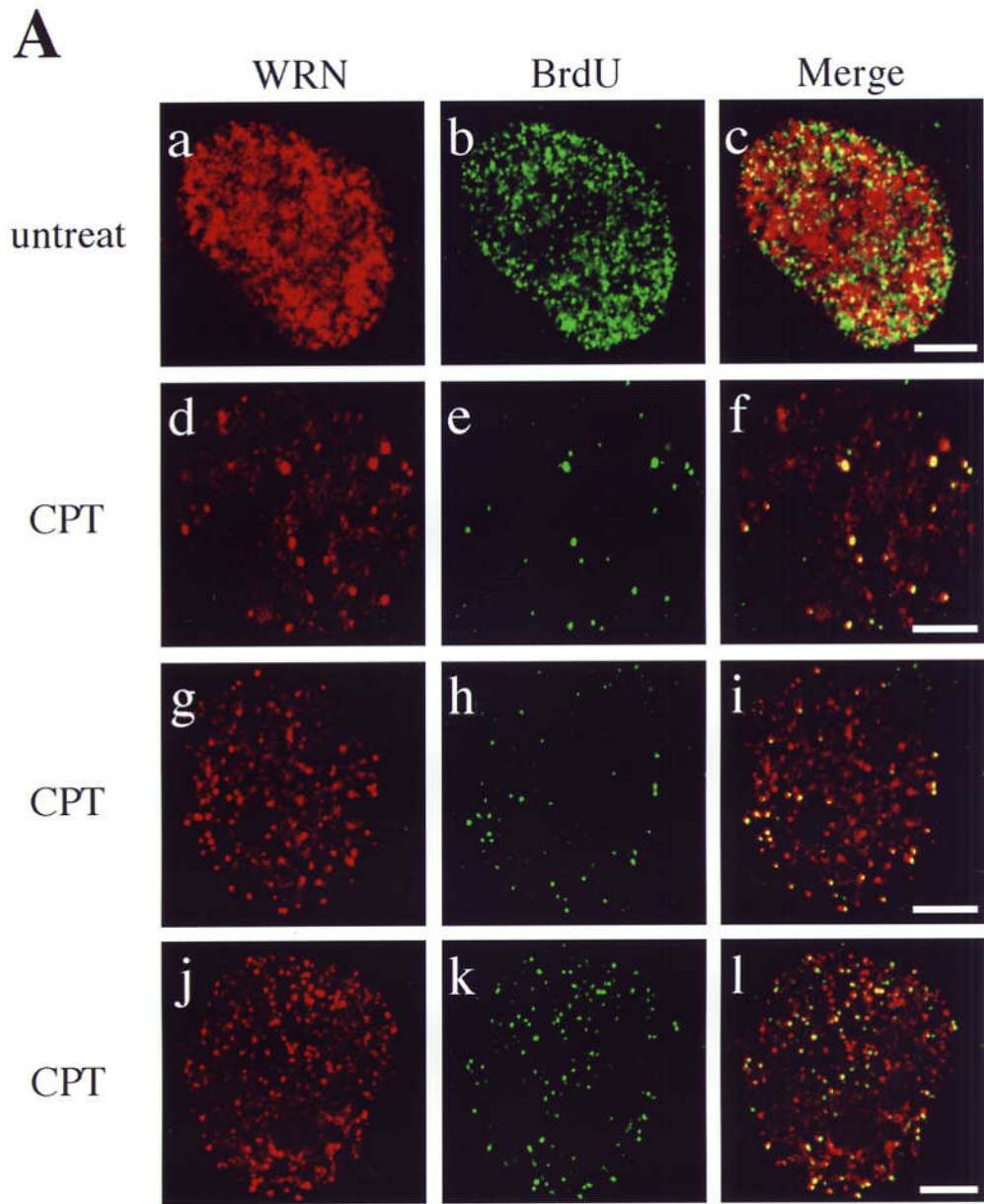


図2-6



B

	Foci contained in nuclei (%)			colocalization of WRNp and Rad51 (%)
	WRNp	Rad51	WRNp and Rad51	
untreat	0.5	56.5	0.5	—
CPT 1 μ M	89.5	79.0	78.0	62.6



B

	Foci contained in nuclei (%)			colocalization of WRN and BrdU (%)
	WRN	BrdU	WRN and BrdU	
CPT 1 μ M	72.0	69.0	64.5	53.5

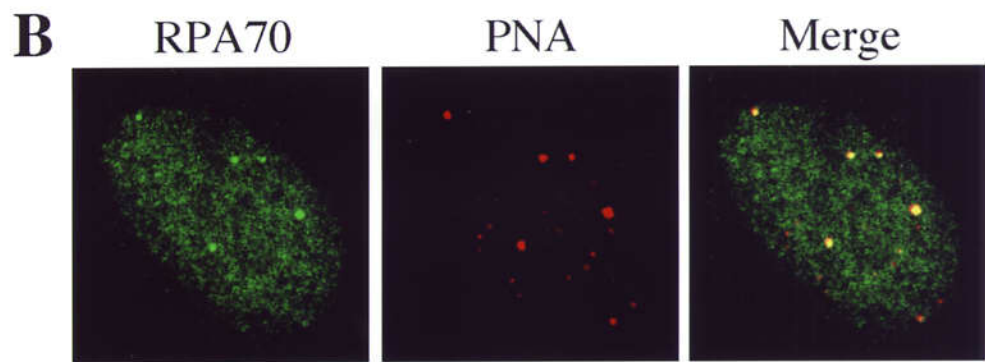
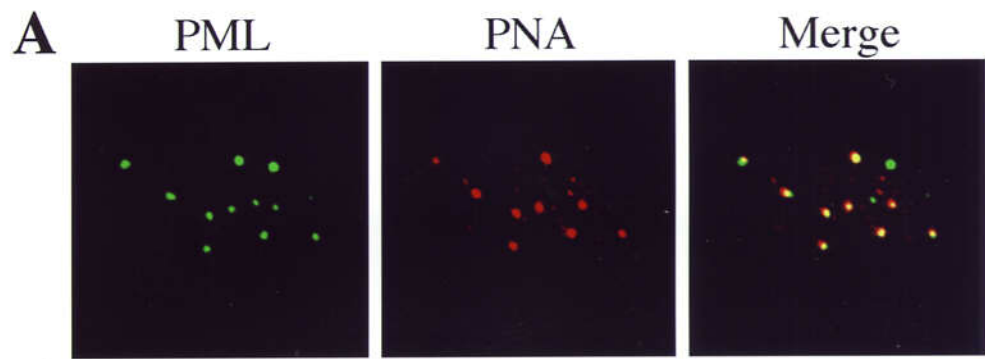


图 3-1

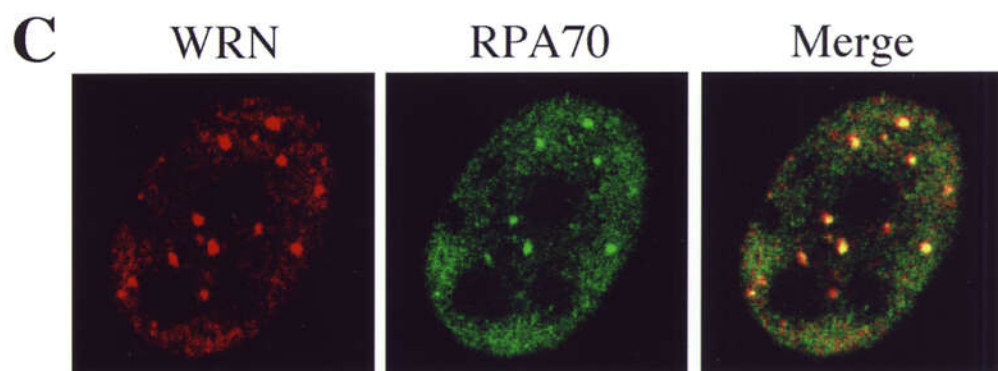
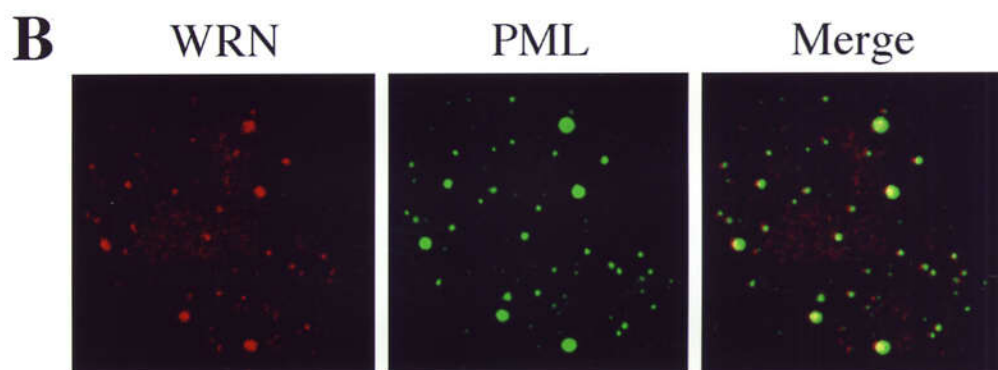
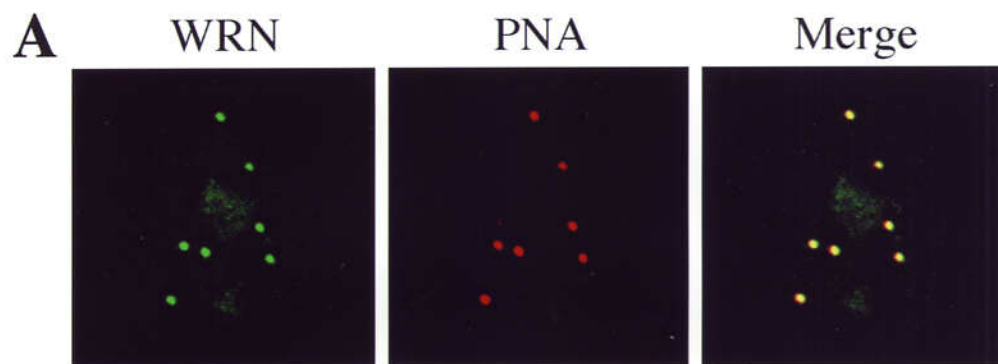


図3-2

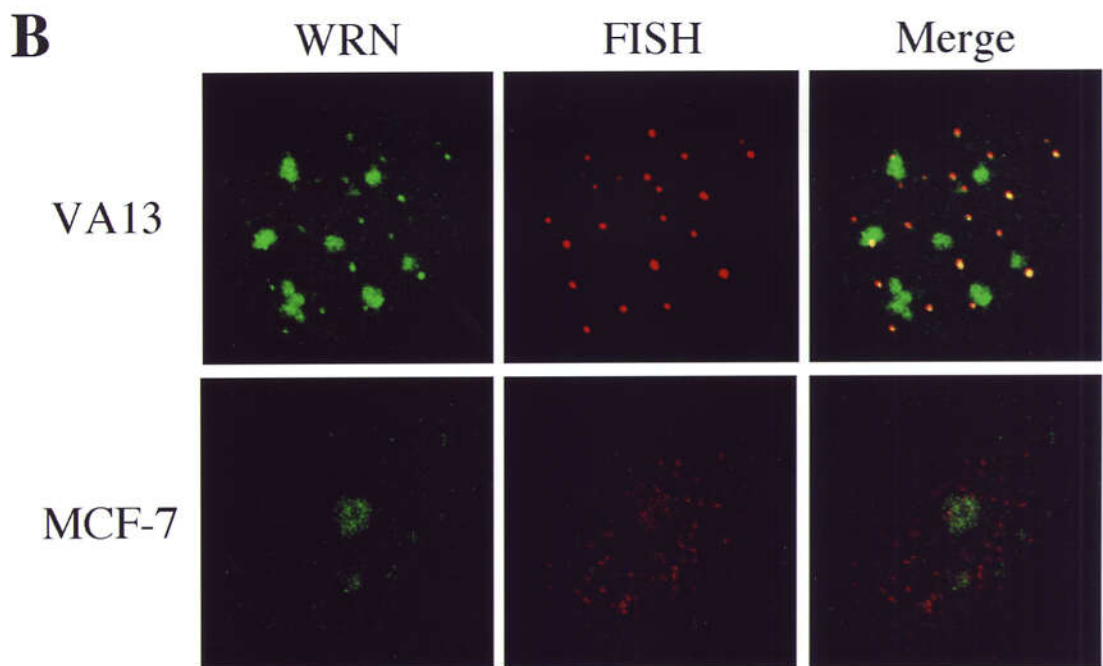
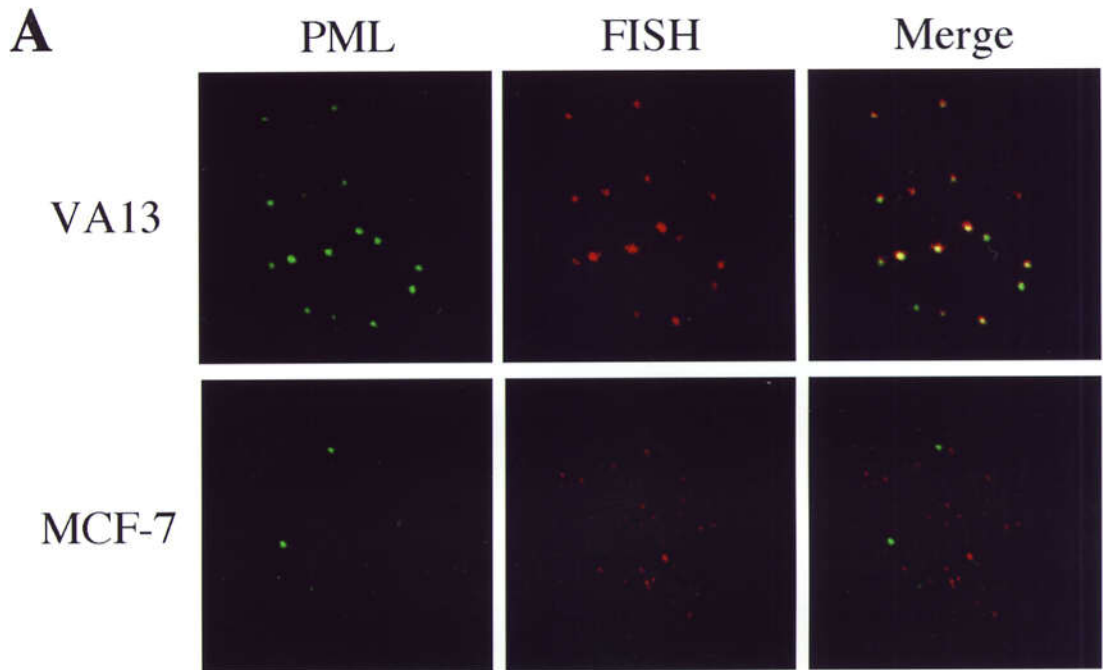
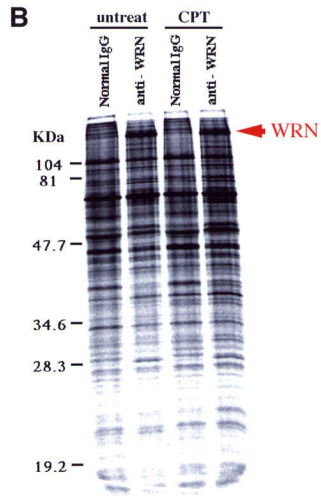
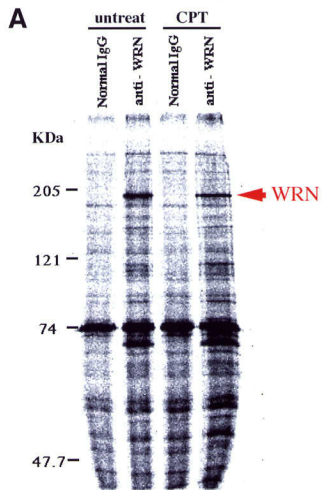


图3-3



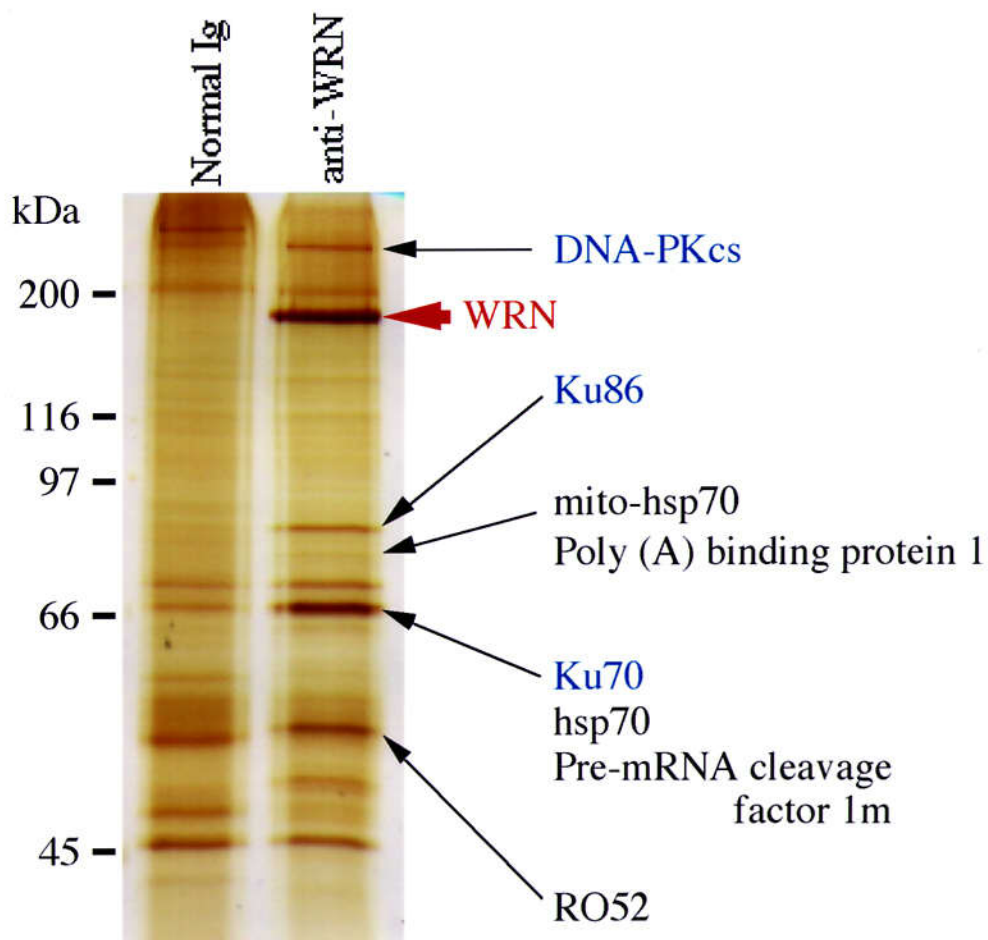
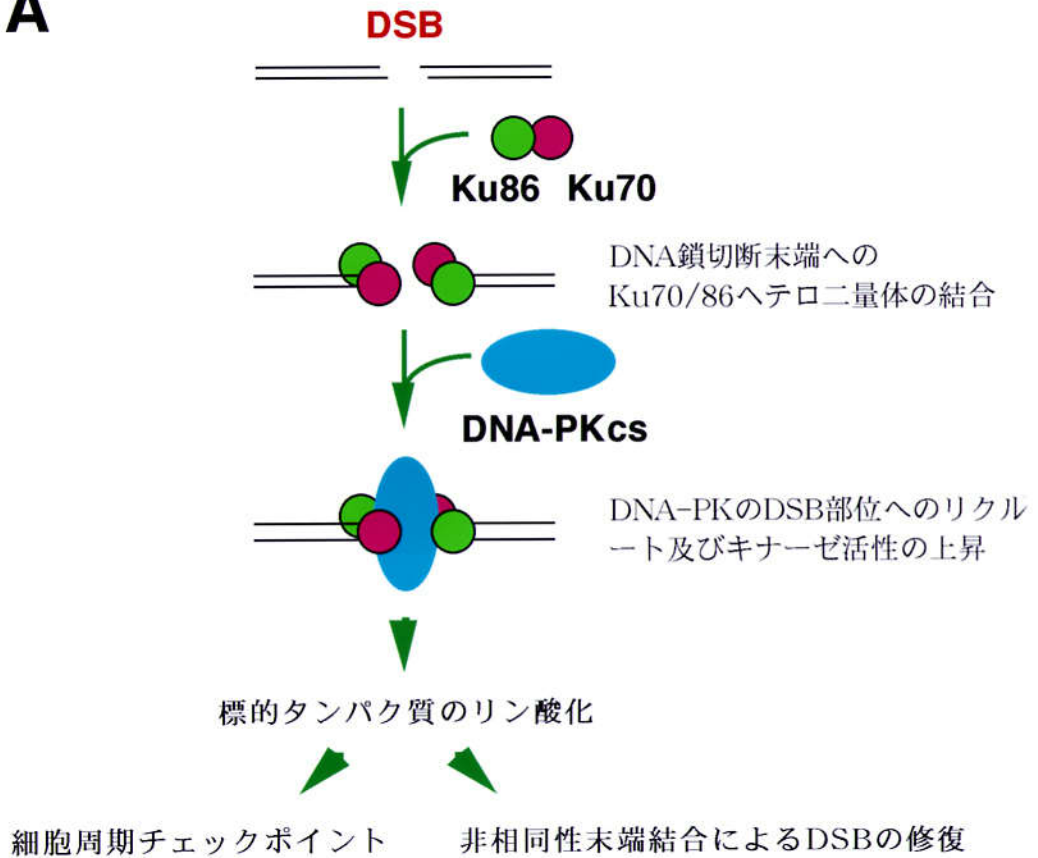


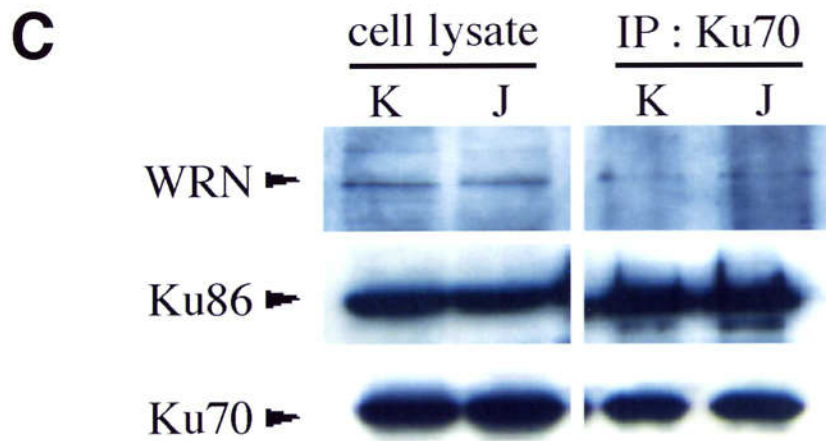
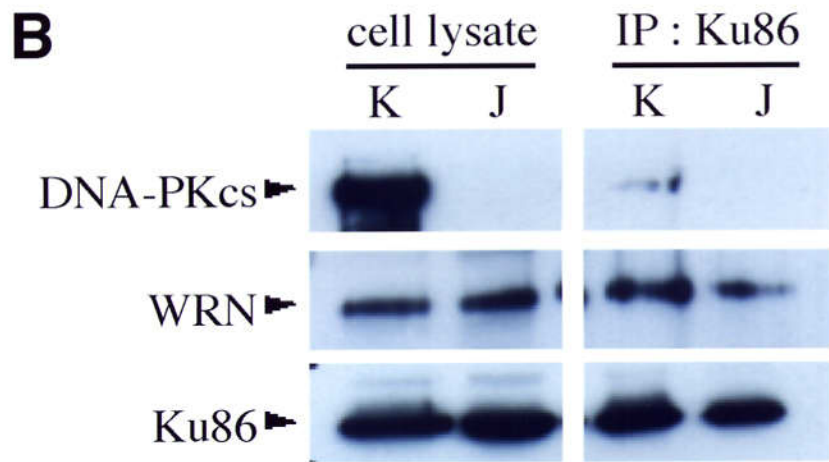
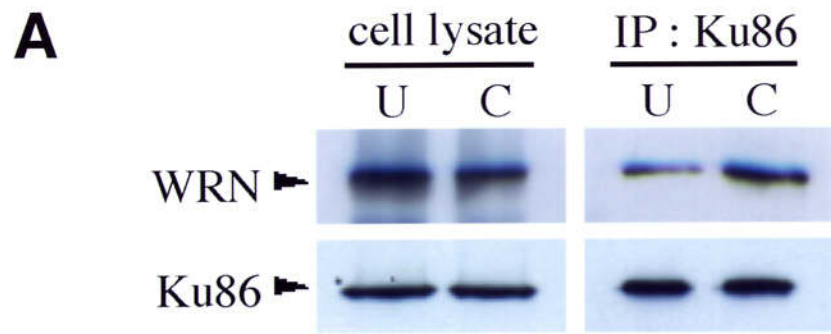
图4-2

A



B

欠損マウスの形質	Ku86	Ku70	SCID / DNA-PKcs
電離放射線高感受性	+	+	+
免疫不全	+	+	+
細胞分裂寿命の短縮	+	+	-
早老様症状	+	-	-



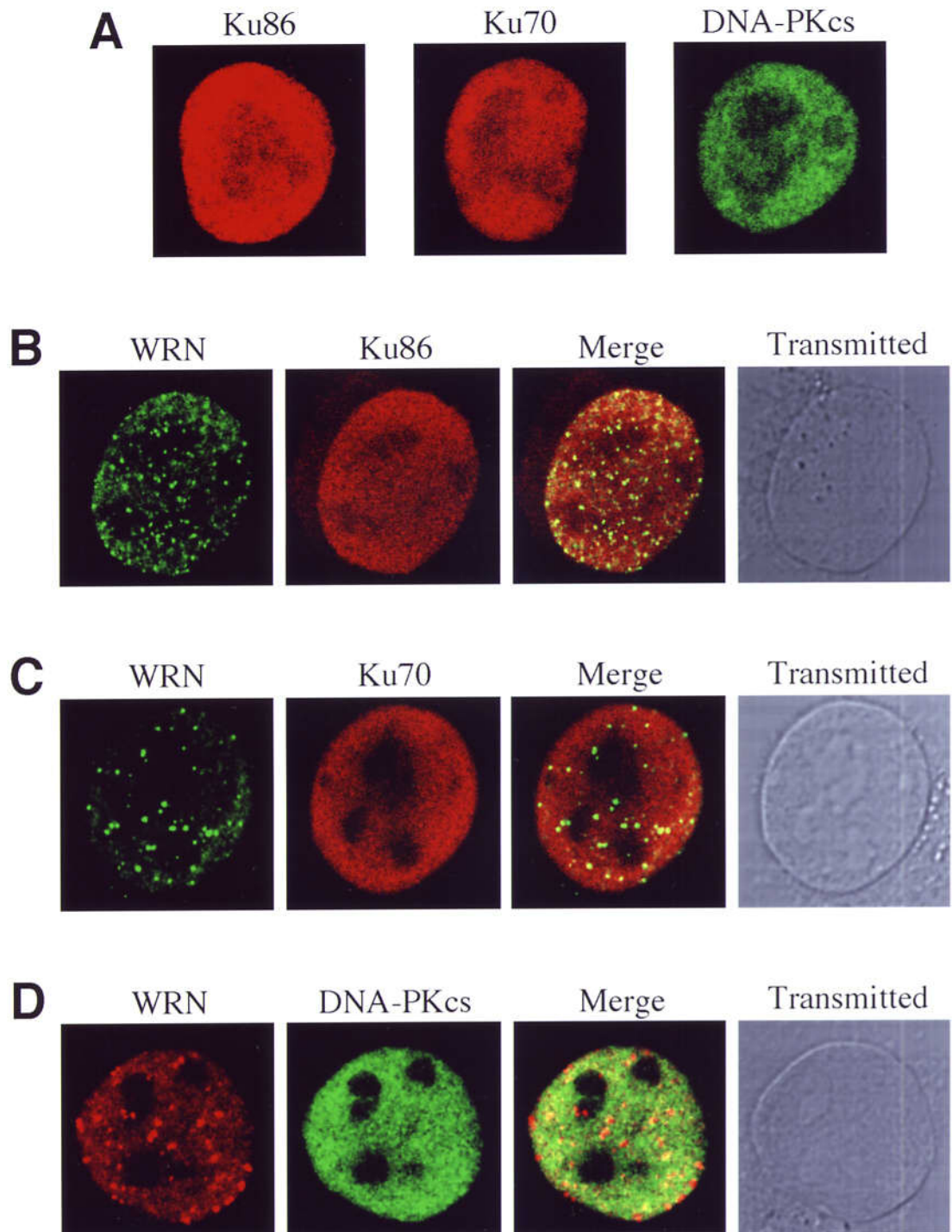


図4-5

謝辞

本研究の機会を与えて下さり、かつ終始御指導頂きました株式会社エイジーン研究所・古市泰宏所長ならびに嶋本顕博士に心より御礼申し上げます。多くの貴重な御助言・御指導を賜りました本専攻の広海健先生、城石俊彦先生、小川智子先生、広瀬進先生、太田力先生、細谷俊彦先生に深く感謝致します。本研究を遂行する上で御協力頂いた東京農工大・高橋信弘、柳田光昭両先生、創価大学・安藤俊夫先生、京都大学・武田俊一先生に感謝致します。また、中辻憲夫先生、斉藤哲一郎先生をはじめとする遺伝研旧発生工学研究室の皆様、ならびにエイジーン研究所の方々の御指導・御支援に感謝致します。

最後に、物心両面において私の研究生生活を支えてくれた両親と弟妹に感謝します。