

氏 名 坂 本 修 一

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第530号

学位授与の日付 平成13年3月23日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 遺伝性早老症ウエルナー症候群原因遺伝子産物WRNヘリカーゼ
の機能解析

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 城石 俊彦
教授 小川 智子
教授 廣瀬 進
部長 池田 日出男（（社）北里研究所）
室長 太田 力（国立がんセンター）

論文内容の要旨

ウェルナー症候群 (WS) は常染色体劣性の遺伝性早老症である (Martin 1985)。患者由来の繊維芽細胞は、健常人由来のものと比較して分裂寿命が短い (Salk *et al.* 1985)。更に、転座や大きな欠失、細胞周期のS期における異常やある種のDNA損傷剤に対する感受性を示すことが知られている (Shen & Loeb 2000)。

原因遺伝子 WRN は大腸菌 *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 (Yu *et al.* 1996)。*RecQ* 型ヘリカーゼの変異はゲノム不安定性の原因となる。特にヒト *RecQ* ファミリーの *BLM*、*RTS* は、それぞれゲノム不安定性が要因と考えられる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 (Ellis *et al.* 1995, Kitao *et al.* 1999)。原因遺伝子産物 WRN は 3'-5' 方向の DNA ヘリカーゼ活性 (Suzuki *et al.* 1997) とエクソヌクレアーゼ活性 (Huang *et al.* 1998, Suzuki *et al.* 1999) を持ち、RPA、PCNA、トポイソメラーゼ I、p53 といった DNA 代謝に関わるタンパク質と結合することが知られている (Brosh *et al.* 1999, Lebel *et al.* 1999, Shen & Loeb 2000)。これらの知見は WRN が DNA 代謝に関与してゲノム安定性の維持に寄与することを想像させるが、その機能の詳細は不明であった。私は WRN の機能を明らかにするために、細胞内局在の解析及び結合タンパク質の探索を行った。

DNA 修復に関与する核タンパク質の一部は、DNA 損傷が生じると局在を変化させ、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。このような核内フォーカス形成は DNA 修復における重要な過程であると考えられている (Maser *et al.* 1997, Liu *et al.* 1999)。例えば、大腸菌 *RecA* の真核生物ホモログである Rad51 も、DNA 損傷剤処理に反応してフォーカスを形成する (Haaf *et al.* 1995) 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という事実は、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ことを示唆している (Golub *et al.* 1998, Raderschall *et al.* 1999)。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が、その詳細については明らかにならなかった。私は免疫細胞化学的手法を用いた解析により、カンプトテシン (CPT)、エトポシド、4NQO といった WS 細胞が感受性を示す薬剤で処理した細胞で、WRN が核内フォーカスを形成することを見出した。この WRN のフォーカス形成は、少なくとも部分的に DNA 複製に依存していた。また、X 線や DNA 合成阻害剤である HU、アフィジコリンによっても、小さいながらも WRN はフォーカスを形成した。更に、WRN フォーカスはほぼ完全に RPA フォーカスと一致し、Rad51 フォーカスや BrdU の取り込み部位とも部分的に一致した。これらの結果から、WRN が相同組換えによる DNA 修復及び停

止した複製フォークの処理過程に関与する可能性が考えられた。

次に、WRNとテロメラーゼ陰性不死化細胞に特徴的な核内構造体ECTR (Extrachromosomal telomere repeat) との関連性を検討した。テロメラーゼ陰性不死化細胞はALT (alternative lengthening of telomere) と呼ばれる機構によってそのテロメア長を維持していると考えられている (Bryan *et al.* 1995)。ALT細胞は染色体外テロメアDNAならびにDNA代謝関連タンパク質 (RPA、Rad51/52、PML、NBS1及びTRF1/2) からなる核内構造体ECTRを持つ (Yeager *et al.* 1995、Wu *et al.* 2000)。これまでに、RPAがWRNと物理的に結合してヘリカーゼ活性を上昇させること (Shen *et al.* 1998、Brosh *et al.* 1999) や、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 (Ohsugi *et al.* 2000) が報告されている。これらの知見から、WRNがECTRに何らかの形で関与している可能性を考えた。そこで、通常培地中で培養したALT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とWRNに対する免疫染色の二重染色を行ったところ、WRNはテロメアFISHの強いシグナル部位に特に凝集していることが判った。この強いテロメアFISHのシグナル部位には、非テロメアタンパク質であるRPAやPMLも局在したことから、ECTRであると考えられた。この様なECTRへの局在から、WRNがALT機構に関与する可能性が示唆された。また、ECTRへ局在する因子の一部は染色体テロメアに存在することや、WS細胞がテロメアに関連する異常形質を示すことから、WRNの通常の染色体テロメア維持機構への関与も考えられた。

WRNに結合するタンパク質を探索するために、抗WRN抗体を用いた免疫沈降を行った。免疫沈降物の質量分析法を用いた解析によって、それらにKu86及びKu70が含まれることが明らかになった。抗Ku86抗体もしくは抗Ku70を用いた免疫沈降によってWRNpが共沈してきたことから、これらのタンパク質は、細胞内で真に結合しているものと考えられた。DNA二本鎖切断 (DSB) が生じた際にKuタンパク質はDNA-PKcsと結合し、そのキナーゼ活性を上昇させることが知られている。この複合体形成及びキナーゼ活性の上昇は、非相同性末端結合反応において重要な過程である (Smith & Jackson 1999)。そこで、DNA-PKcs欠損細胞M059JにおけるKu-WRN結合の有無を調べた。この細胞の粗抽出液においても、抗Ku86抗体もしくは抗Ku70を用いた免疫沈降によってWRNが共沈してきたことから、Ku-WRN結合に関してDNA-PKcsは必須の因子では無いことが判った。次に、DSBを誘発するCPT処理によってWRNが核内フォーカスを形成することから、この薬剤で処理した細胞におけるKuならびにDNA-PKcsの局在を免疫染色によって検討した。しかし、これらのタンパク質はWRNがフォーカスを形成している核においても、フォーカスを形成しなかった。これまでに、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)。Ku-WRN結合の生物学的意義は今後の研究課題であるが、WRNの機能の内、Kuと協調して作用するイベントが早老症発症に重要である可能性が考えられた。

本研究で得られた結果は、WRNのゲノム維持機構における役割についての新たな知見を与えるものであり、WSの呈する早老様症状がゲノム不安定性によってもたらされるという仮説を支持するものであった。

論文の審査結果の要旨

ウェルナー症候群 (WS) は、常染色体劣性の遺伝性早老症である。患者由来の繊維芽細胞は、分裂寿命が短く、ゲノム安定性の低下を示す。その原因遺伝子 WRN は、RecQ ヘリカーゼファミリーに属する。一般に、RecQ 変異はゲノム不安定性の原因となることが報告されている。

本博士論文では、ゲノム安定性に寄与すると考えられる WRN の機能を明らかにするため、以下の3点につき行った研究の結果について論じている。

1. WRN タンパク質の核内局在

DNA 修復に関与する核タンパクの一部は、DNA 損傷が生じると、焦点状に集合して核内フォーカスを形成する。核内フォーカス形成は DNA 修復における重要な過程と考えられている。本論文では、カンプトテシン (CPT)、エトポシド、4NQO、ブレオマイシン等の DNA 損傷剤で細胞を処理すると、WRN が核内フォーカスを形成することを見出した。WRN が DSB に反応してフォーカスを形成することや 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という新たな知見から、WRN が相同組換えによる DSB 等の DNA 損傷修復や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機能するという新たなモデルを提案した。

2. WRN とテロメラーゼ陰性不死化細胞に特徴的な核内構造体 ECTR との関連

テロメラーゼ陰性不死化細胞は、ALT (alternative lengthening of telomere) と呼ばれる機構によってそのテロメア長を維持していると考えられている。ALT 細胞は、染色体外テロメア DNA と DNA 代謝関連タンパクからなる核内構造体 ECTR を持つ。本論文では、WRN が ECTR に局在することを見いだした。この結果と、ECTR 局在因子の一部が染色体テロメアに存在すること、WS 細胞がテロメア不安定性を示すことから、WRN が通常の染色体テロメア維持機構へ関与することが示唆された。

3. WRN と協調して機能する新規の結合タンパク質の探索

免疫化学的手法により、DNA 損傷の有無に関わらず、DNA-PK 関連の DSB 結合タンパクである Ku と WRN が結合していることを見いだした。さらに、この結合に DNA-PKcs が介在していないこと、CPT 処理によっても Ku タンパク質は核内に分散しフォーカスを形成しないことを明らかにした。Ku 欠損マウスは早老様症状を呈することが報告されている。以上の結果は、WRN の機能の内、Ku と協調して作用するイベントが早老症発症に重要である可能性を示唆している。

以上、本論文で得られた結果は、WRN のゲノム安定性の維持機構における役割についての新たな知見を与えるものであり、WS の呈する早老様症状がゲノム不安定性によってもたらされるという仮説を支持している。

本論文の公開発表の後、論文の研究内容、研究の背景となった分野を中心に学力に関する質疑応答を行った。いずれの質問に対しても的確な応答がなされ、申請者が、主体的にこの研究に取り組み、また、研究論文をまとめる能力を有するものと判定した。また、本論文の一部は、申請者を筆頭著者として、すでに Genes to Cells に印刷中であり、英語に関する能力も充分であると判断した。

以上の審査の結果、審査委員全員一致で、本論文は博士論文としての水準に達していると判定した。