

真核細胞 RecQ 関連遺伝子群によるゲノム安定維持機構

● 関 政幸

東北大学大学院薬学研究科

〈研究の目的と進め方〉

ヒトには5つの RECQ 遺伝子； RECQL1, BLM, WRN, RTS, RECQL5 が存在し、一方 出芽酵母では一つの RECQ 遺伝子, SGS1 が存在している。BLM, WRN, RTS がヒト劣性ゲノム不安定性症候群の原因遺伝子であることから、真核細胞の RECQ の機能を総合的に研究することでゲノム安定維持機構の解明を目的とした。また、ヒト RECQL1, BLM, RECQL5 のいずれも Top3 α と相互作用し、酵母 Sgs1 も Top3 と結合することから、RECQ と Top3 の機能の連関の解明も研究の目的のひとつとした。研究の進め方は、1) 出芽酵母 *sgs1* 株と遺伝学的に相互作用する遺伝子群を単離し、さらにプロテオミクス的手法を用いて、RECQ 関連遺伝子群を網羅的に同定する。2) 重要そうな遺伝子から順番に、詳細な解析を行う。3) 最後に、ニワトリ DT40 細胞を用い、酵母で得られた情報が高等動物にまであてはまるか、遺伝子破壊株を作製して検証する。以上の3つを平行して進めることにしていた。

〈研究開始時の研究計画〉

- A) 研究開始時に得ていた *sgs1* と合成致死性を示す 1 株に、酵母ゲノムを導入し、合成致死性の原因遺伝子を同定する。
- B) 原因が1) よりハッキリした合成致死株に、その致死性を相補できる多コピー抑制遺伝子のスクリーニングを行う。
- C) 原因遺伝子 Xが1) で特定できたものについて、x 単独変異株を作製し、その性状解析を行う。
- D) X 遺伝子産物にタグを導入し、X タンパク質に結合するタンパク質をプロテオミクス的な方法で同定する。
- E) 高等動物の RecQs と相互作用するタンパク質の機能を出芽酵母の遺伝学を用いて解析する。
- F) ニワトリ DT40 細胞を用いた RECQ, TOP3 関連遺伝子群の解析を進める。
以上の研究を平行して行い、それぞれの項目で得られた情報を互いにフィードバックし、効率良く研究を進めようと考えた。

〈研究期間の成果〉

- A) *sgs1* と合成致死性を示す 2 株について、その原因遺伝子の取得に成功し、MMS4, SRS2 の 2 つの遺伝子を同定した。
- B) *sgs1-srs2* の合成致死性を多コピーで抑制できる新規遺伝子 COH1 を同定した。
- C) 特定した原因遺伝子のうち SRS2 は、これまで多くの解析がなされていたので、ほとんど未解析だった MMS4 の機能の解明に特化することにした。具体的には *mms4* 遺伝子破壊株を作製し、*sgs1* 株と比較しながら解析した。ところが、その解析を進めている丁度同時期に、本研究とは全く独立に海外のグループにより、MUS81 と MMS4 の欠損が *sgs1* 株に死をもたらすこと、さらには *Mms4* と *Mus81* は細胞内で複合体

を形成することが報告されてしまった。そこで、*mus81* 株の解析も同時にやることにした。その結果、*mus81* 株は *mms4* 株とともに DNA 傷害剤に感受性を示すこと、その感受性が大腸菌 *RusA* タンパク質の過剰発現によって相補されることを見いだした。*RusA* は DNA 組換え中間体である Holliday junction (HJ) を試験管内で解消する活性が有り、*Mms4/Mus81* が細胞内で組換え中間体の解消に関わる可能性を示した1。

D) この実験は行わなかった。

E&F) 酵母および ニワトリ DT40 細胞を用いて RecQ 関連

遺伝子群の機能を個別に調べ以下の 1)-11) の成果を上げた。

- 1) 酵母 *Sgs1* がユビキチン類似タンパク質(SUMO) によって修飾を受けることを見いだした。ヒト WRN も SUMO 化されることから、SUMO 化と RecQ の関連性を調べることにした。真核細胞では Ubc9 が SUMO を標的タンパク質のリジン残基にイソペプチド結合させる活性を有していることから、出芽酵母 *ubc9* 温度感受性変異株を作製し、解析した。その結果、Ubc9 が DNA 傷害によって誘導される相同染色体間の組換えに必要なことをはじめて実証した2。
- 2) *ubc9* 株は、これまで G2/M 期で必須な機能を果たすと報告されていたが、実際には DNA 複製の起こる S 期にも必要であることをはじめて実証した。さらに *ubc9* 株では *Sgs1*, *Mus81*, *Rrm3*, に依存して効率の良い細胞の増殖能を得ていた。これらは停止した複製フォークの再生に必要とされ、言い換えれば *ubc9* 株では複製フォークがしばしば停止することを示した。そこで複製フォークの構造を二次元アガロース電気泳動法を用いて調べたところ、DNA 傷害剤メチルメタンスルホン酸 (MMS) により *ubc9* 株および *sgs1* 株の両方に全く同じ Holliday junction 様の構造の蓄積が観察された。このことは *Sgs1* の SUMO 化を介する複製フォーク再生機構の存在を示唆している。
- 3) ニワトリ DT40 細胞で UBC9 遺伝子条件致死株を作製した。UBC9 は必須遺伝子であり、Ubc9 枯渇細胞はアポトーシスを起こして死に至った3。また、この株を用いて TopoII 阻害剤によって誘導される TopoII の分解に先立ち、TopoII が SUMO 修飾されることの重要性を見いだした4。
- 4) ヒト WRN と相互作用する WRNIP1 の酵母ホモログ MGS1 の解析を行った。その結果、酵母における *sgs1* と *mgs1* の同時欠損は細胞増殖の著しい低下をまねくことを報告した5。この結果をふまえ、ニワトリ DT40 細胞を用いて WRN/WRNIP1 二重遺伝子破壊株を作製した。この二重変異株は、DNA Topoisomerase I の阻害剤カンプトテシンに対し、それぞれ単独破壊株よりも感受性が強かった。また自発的に生じる姉妹染色分体間の組換え (SCE) が WRN/WRNIP1 二重変異株では相乗的に亢進しており、WRN と WRNIP1 は必ずしも同一の経路でゲノムの安定性を維持しているのではな

いことを実証した。

- 5) 酵母 Mgs1 を解析している過程で、Mgs1 の過剰発現が DNA polymerase δ の変異株を死に至らしめること、その逆に pol δ 変異株の温度感受性が MGS1 遺伝子破壊により抑制されることを見いだした6。さらに、RAD18 遺伝子破壊が pol δ 変異株の温度感受性を抑制することを発見し、Mgs1 と Rad18 は複製フォーク上で DNA pol δ の制御を行っているモデルを提唱した6。
- 6) 上記の酵母の遺伝学的なデータが高等動物細胞にもあてはまるか、主に生化学的手法を用いて検証した。その結果、精製した組換えヒト WRNIP1 (MGS1) タンパク質がヒト DNA polymerase δ に直接結合し、しかもその活性を促進できることを試験管内で実証した7。
- 7) Rad18 は複製フォークが停止した際、PCNA をモノユビキチン修飾する機能を有し、モノユビキチン-PCNA はさらに Mms2/Ubc13/Rad5 に依存してポリユビキチン化され、template-switching 型の損傷乗り越え修復が起こると考えられている。ここで pol δ 変異株を用いた解析から、DNA 損傷がない場合でも複製因子の変異によって停止した複製の再開には、Pol η や ζ ではなく、Mms2/Ubc13/Rad5 経路が必須であることをはじめて示唆した8。
- 8) 酵母細胞の TOP3 と SGS1 との機能の連関について解析し、Top3 は DNA 組換え修復経路に属すること。Sgs1 に依存しない Top3 の機能が存在することなどを報告した9。さらに、MMS によって誘導される相同染色体間の組換えには Sgs1 のもつ DNA ヘリカーゼ活性よりもむしろ Sgs1 と Top3 の間の相互作用が重要であることを示した10。
- 9) 出芽酵母において、Sgs1 がチェックポイントと関連すると他のグループから報告された。そこで DT40 細胞を用いて BLM/ATM, BLM/RAD17 のそれぞれ二重変異株を作製した。BLM は ATM とほとんど機能のオーバーラップがないのに対し、複製チェックポイントタンパク質 Rad17 の機能に依存して、BLM が複製フォーク上で働いていることを示唆する知見を得た。前者の発見については既に発表した11。
- 10) DT40 を用いて機能未知であった2つの RECQ; RECQL1 と RECQL5 が BLM のバックアップ機能を果たしていることをはじめて証明した12。また、BLM とファンコニー症候群原因遺伝子産物 FANCC との相互作用が報告されたので、その相互作用の意義を調べ両者に機能の連関があることを報告した13。
- 11) DT40 を用いて、RecQ タンパク質群と相互作用する TOP3 の遺伝子破壊株を作製・解析した。Top3 α が枯渇すると姉妹染色分体の両方の同じ部分に切断が入るタイプの染色体異常が多発し、それが BLM 遺伝子の欠損により、ほぼ完全に抑制された。このことから、BLM/Top3 α が DNA 複製の終結時において、姉妹染色分体の効率の良い分離に機能する可能性をはじめて示した(投稿中)。

〈国内外での成果の位置づけ〉

出芽酵母の mms4, mus81 株の解析は、海外のグループとの競争の中で、少なくとも論文1として評価された。一方、DT40 を用いた RECQ 関連遺伝子の解析は内外で唯一であり、論文3, 4, 11, 12, 13として評価を得た。特に RECQL1 や RECQL5は、本研究の発表後それぞれヒト RECQL1およびマウス RECQL5 に関する論文が発表され、論文12の成果が他の種でも確認された。一方、

Mgs1 に関しては国内の研究室から、Mgs1 と Rad18 の同時欠損が酵母細胞に死をもたらすことが報告された。停止した複製フォークがどのように再開するかは、まだ解明されていない分野でもあり、本研究において Sgs1, Ubc9, Mgs1, Rad18, Pol δ などが連携してそれにあたるという概念の提唱(論文6, 8)は、国外からも評価を得ている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

海外のグループによる酵母細胞を用いた「網羅的な合成致死スクリーニング、網羅的なタンパク質複合体の同定」などの研究のスピードが早く、当初の目的は他者によって達成され、本研究の目的 A と Dはその意義を失った。そこで、研究の中心をRecQ 関連遺伝子の機能の追求 (E と F) に切り替えた。後者の研究については極めて順調に成果を上げることができた。

〈今後の課題〉

高等動物細胞における RecQs とチェックポイントとの関連の解明。高等動物細胞で解析が進んでいない RTS の機能の解明。出芽酵母で sgs1 と合成致死になる遺伝子群のうち、酸化ストレス遺伝子群との関連の解明などが今後の課題である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Odagiri, N., Seki, M., Onoda, F., Yoshimura, A., Watanabe, S., and Enomoto, T. Budding yeast mms4 is epistatic with rad52 and the function of Mms4 can be replaced by a bacterial Holliday junction resolvase DNA Repair 2, 347-358 (2003)
2. Maeda, D, Seki, M., Onoda, F., Branzei, D., Kawabe, Y., and Enomoto, T. Ubc9 is required for damage-tolerance and damage-induced interchromosomal homologous recombination in *S.cerevisiae*. DNA Repair 3, 335-341(2004)
3. Hayashi, T., Seki, M., Maeda, D., Wang, W., Kawabe, Y., Seki, T., Saitoh, H., Fukagawa, T., Yagi, H., and Enomoto, T. Ubc9 is essential for viability of higher eukaryotic cells. Exp Cell Res.280, 212-221 (2002)
4. Isik, S., Sano, K., Tsutsui, M., Seki, M., Enomoto, T., Saitoh, H., and Tsutsui, K. The SUMO pathway is required for selective degradation of DNA topoisomerase II β induced by a catalytic inhibitor ICRF-193(1). FEBS Lett. 546, 374-378 (2003)
5. Branzei, D, Seki, M., Onoda, F., Yagi, H., Kawabe, Y., and Enomoto, T. Characterization of the slow-growth phenotype of *S. cerevisiae* whip/mgs1 sgs1 double deletion mutants DNA Repair 1, 671-682 (2002)
6. Branzei, D, Seki, M., Onoda, F., and Enomoto, T. The product of *Saccharomyces cerevisiae* WHIP/MGS1, a gene related to replication factor C genes, interacts functionally with DNA polymerase δ Mol Genet Genomics.268, 371-386 (2002)
7. Tsurimoto, T, Shinozaki, A., Yano, M., Seki, M, and Enomoto, T. Human Werner helicase interacting protein 1 (WRNIP1) functions as a novel modulator for DNA polymerase δ Genes to Cells, 10, 13-22 (2005)
8. Branzei D., Seki, M., and Enomoto, T. Rad18/Rad5/Mms2-mediated polyubiquitination of PCNA is implicated in replication completion during replication stress. Genes to Cell, 9, 1031-1042 (2004)

9. Onodera, R., Seki, M., Ui, A., Satoh, Y., Miyajima, A., Onoda, F., and Enomoto, T. Functional and physical interaction between Sgs1 and Top3 and Sgs1-independent function of Top3 in DNA recombination repair. *Gen. Genet. Syst* 77, 11-21 (2002)
10. Ui, A., Seki, M., Ogiwara, H., Onodera, R., Fukushige, S., Onoda, F., and Enomoto, T. The ability of Sgs1 to interact with DNA topoisomerase III is essential for damage-induced recombination. *DNA Repair*, 4, 191-201 (2005)
11. Wang, W., Seki, M., Otsuki, M., Tada, S., Takao, N, Yamamoto, K, Hasyashi, M., Honma, M., and Enomoto, T. The absence of a functional relationship between ATM and BLM, the components of BASC, in DT40 cells. *Biochim Biophys Acta*. 1688, 137-144 (2004)
12. Wang, W., Seki, M., Narita, Y., Nakagawa, T., Yoshimura, A., Otsuki, M., Kawabe, Y., Tada, S., Yagi, H., Ishii, Y., and Enomoto, T. Functional relation among RecQ family helicases, RecQL1, RecQL5, and BLM in cell growth and SCE formation *Mol. Cell. Biol.* 23, 3527-3535 (2003)
13. Hirano, S., Yamamoto, K., Ishiai, M., Yamazoe, M., Seki, M., Matsushita N, Ohzeki M, Yamashita YM, Arakawa H, Buerstedde JM, Enomoto T, Takeda S, Thompson LH, Takata M. Functional relationships of FANCC to homologous recombination, translesion synthesis, and BLM. *EMBO J.*, 24, 418-427 (2005)