

氏 名 (本籍) ^{かわ}川 ^べ辺 ^{よう}洋 ^{いち}一

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 薬 博 第 2 9 9 号

学位授与年月日 平 成 13 年 3 月 26 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

研 究 科、専 攻 東北大学大学院薬学研究科
(博士課程) 分子生命薬学専攻

学 位 論 文 題 目 早老症ウェルナー症候群原因遺伝子産物と相互作用
するタンパク質の解析

論文審査委員 (主 査)
教授 榎 本 武 美 教授 永 沼 章

教授 中 畑 則 道

論文内容要旨

DNAの二本鎖を一本鎖DNAに巻き戻すDNAヘリカーゼはDNAの複製、転写、修復、組換えの過程で重要な役割を果たしている。近年、DNAヘリカーゼの欠損により染色体不安定性を特徴とする高発癌性、発育不全症、早期老化などの症状を呈する多くの遺伝病が報告され生体内での重要性が明らかになっている。

ウェルナー症候群 [Werner's syndrome (WS)] は老化関連症状を若年期より発現する早老症の代表的疾患で、種々の成人病症状：早期白髪、白内障、皮膚症状、骨粗鬆症、糖尿病、動脈硬化症を示す。WS細胞においては細胞寿命の短縮、DNA複製開始点間距離の延長、テロメア短縮速度増大、染色体不安定性などの細胞生物学的特徴が報告されている。1996年に、WSの原因遺伝子 (WRN) がポジショナルクローニングによって単離、同定され、原因遺伝子は大腸菌RecQヘリカーゼに高い相同性を有するDNAヘリカーゼをコードしていることが明らかにされた。大腸菌RecQヘリカーゼ相同タンパク質は、出芽酵母ではSgs1、分裂酵母ではRqh1が、ヒトではWRNを含めこれまでに当研究室で単離同定された機能未知タンパク質のDNA helicase Q1/RecQL1、若年からの高発癌症で高頻度の姉妹染色分体交換を特徴とするBloom症候群原因遺伝子産物 (BLM)、癌を多発しWRNと同様に早老症を特徴とするRothmund-Thomson症候群原因遺伝子産物 (RTS)、機能未知タンパク質のRECQL5の少なくとも5種類が確認されている。WRNはRecQヘリカーゼ相同領域以外にも、大腸菌のDNA polymerase Iのエキソヌクレアーゼ領域と相同性を有する領域を持つことが明らかになっており、実際に試験管内でWRNがDNAヘリカーゼ活性とエキソヌクレアーゼ活性を持つことが報告されている。また、WS患者で見いだされる多くの変異はC末端側に存在する核移行シグナルの上流に存在するナンセンス・フレームシフト変異がほとんどであり、WS患者細胞ではWRNが核内に欠乏するために発症すると予想される。最近の研究では、WRNはDNA複製や修復に関与するreplication protein A (RPA)、proliferating cell nuclear antigen (PCNA)、topoisomerase I、DNA polymerase δ やDNA末端結合能を持つKu70/86複合体、アポトーシスに関与しているp53との相互作用が報告されている。さらにアフリカツメガエルの卵抽出液を用いたcell-free DNA複製系でWRNはpre-replicative fociと呼ばれる構造体にRPAと共局在することが報告されている。現在までに、WRNのヘリカーゼ活性やエキソヌクレアーゼ活性などのタンパク質機能や、多岐のプロセスに関わる核内タンパク質との相互作用が報告されているが、WRNの細胞内機能の本質や早老症との関連については未だ明らかになっていない。

本研究では、WRNが関わる細胞内機能の解明、さらにはWRNの欠損に起因するWSの早老症の発症の分子メカニズムの解明を目的にWRNと結合するタンパク質の検索を行った。

[結果・考察]

1. 3つのマウスWRN結合タンパク質の同定

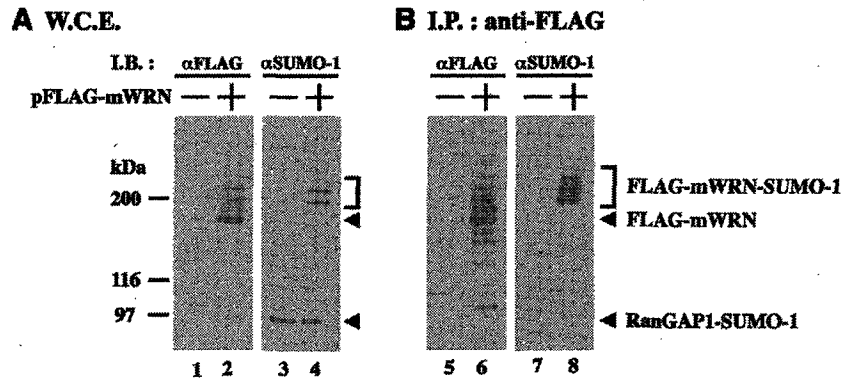
Two-hybrid系を用いてマウスWRNと相互作用する因子をマウス lymphoma cDNA library から検索した結

果, WRN 相互作用因子として 50 個のポジティブクローンを得た。50 クローン中 21 クローンを占める cDNA クローンは未知遺伝子 *WHIP* (Werner helicase interacting protein) で, 1 クローンと 29 クローンはそれぞれ既知遺伝子 *SUMO-1* (small ubiquitin-related modifier-1), *UBC9* (SUMO-1 conjugating enzyme 9) であることが明らかになった。

2. WRN は細胞内で SUMO-1 化修飾を受ける

相互作用が検出された Ubc9, SUMO-1 タンパク質について two-hybrid system でマウス WRN ヘリカーゼ側の結合部位の検討を行い, N 末端側 272-514 アミノ酸残基 (全長 1401 アミノ酸残基) のほぼ同一の領域と強く結合することを明らかにした。

さらに, 他の 2 つの異なるマウス RecQ ヘリカーゼ (RECQL1, BLM) との相互作用を検討した結果, マウス RECQL1 とは結合しないがマウス BLM タンパク質と結合することが明らかになった。最近, Ubc9, SUMO-1 は同一の生化学的経路に属する核内タンパク質修飾機構に関わっていることが明らかになっている。そこで WRN が SUMO-1 化修飾の標的となるか否か, WRN をヒト細胞に一過性に発現させて解析し, WRN タンパク質が SUMO-1 化修飾を受け, さらに WRN と SUMO-1 分子の細胞内局在が一致することを世界で初めて証明した。本研究により, 「SUMO-1 化修飾による WRN の機能の制御」の可能性が示唆され, WRN の機能制御を解明するための重要な手がかりを提示することができた。



細胞内での WRN の SUMO-1 化修飾

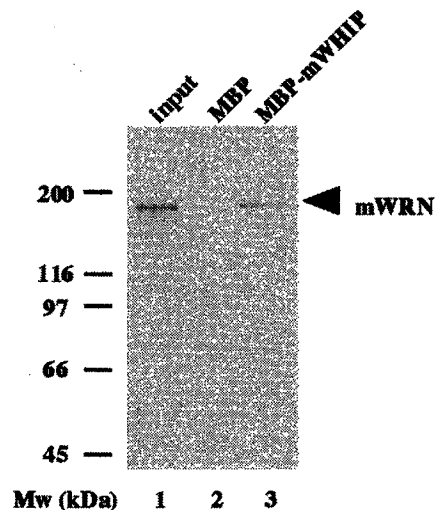
3. 未知遺伝子産物 WHIP と WRN は細胞内で相互作用する

WHIP cDNA クローニングの結果, 未知遺伝子産物 *WHIP* は大腸菌からヒトまで高度に保存され RF-C (replication factor-C) に類似したアミノ酸配列をコードしていることが明らかになった。*WHIP* と WRN を一過性に発現した細胞内で WRN と *WHIP* は複合体を形成し, さらに *WHIP* と WRN は試験管内で直接結合できることを証明した。また, *WHIP* は WRN のエキソヌクレアーゼ領域に結合した。さらに, 一過性に発現した *WHIP* と WRN が核内で同一の dot 状の構造体に共局在することを明らかにした。以上, 本研究により WRN に結合する新規タンパク質として *WHIP* が見いだされた。*WHIP* は大腸菌からヒトにまで保存され,

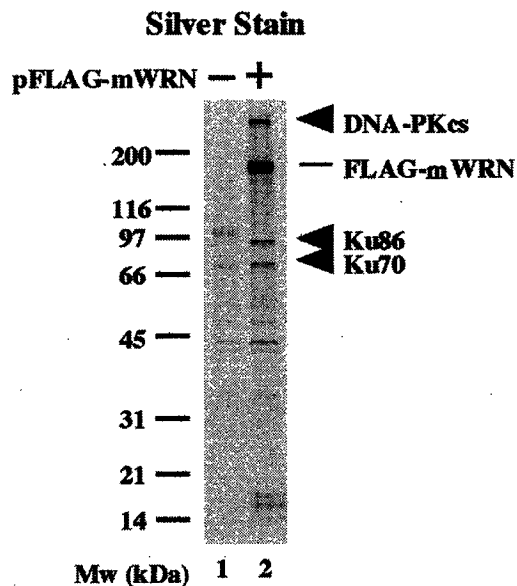
複製必須因子RF-Cに類似したタンパク質で機能未知である。従って、今後のWHIP研究の進展により、老化現象という多細胞生物に特有と思われた問題を、WHIP及びWRNというタンパク質を切り口にして、全生物に普遍的な問題として分子レベルで解明できる可能性がある。

4. WRNはDNA-PK複合体と相互作用する

WRNを一過性に発現した細胞抽出液を用い、免疫沈降法によりWRNとDNA-PK複合体（DNA-PKcsとKu70/86 heterodimer）が共沈することを明らかにした。DNA-PK複合体はdouble strand breaks (DSBs) 修復における非相同組換え経路に与与することが報告されている。また、WRNはヘリカーゼ活性とエキソヌクレアーゼ活性を持つことが明らかになっているが、Ku70/86 heterodimerはエキソヌクレアーゼ活性を活性化することが明らかになった。これはKu70/86 heterodimerがWRNをDSBsで生じたDNA末端にリクルートしてWRNのエキソヌクレアーゼ活性を発揮させているものと考えられる。DSBs修復においてDSBs末端を消化する非相同組換えの開始のヌクレアーゼは現在までに明らかになっていないが、WRNとDNA-PK複合体との機能的な相互作用よりWRNがこの過程のヌクレアーゼの候補となることが示唆された。



試験管内での WRN と WHIP の結合



WRN と DNA-PK との相互作用

審査結果の要旨

ウェルナー症候群 (Werner's syndrome, WS) は種々の老化症状を若年期より発症する代表的な遺伝性疾患で、患者由来の細胞では、分裂寿命が短縮し、染色体が不安定になっている。1996年に、WSの原因遺伝子 (WRN) がポジショナルクローニングによって単離、同定され、この遺伝子は大腸菌 RecQ ヘリカーゼに高い相同性をもつ DNA ヘリカーゼをコードしていることが明らかにされた。これまでに、WSの原因遺伝子産物 (WRN) がヘリカーゼ活性やエキソヌクレアーゼ活性をもち、複数のタンパク質と相互作用することが報告されているが、WRNがどのような過程に機能し、その機能の欠損がどのようにしてWSの種々の症状の出現と結びつくのかは不明のままである。

本研究は、WRNの機能の解明、さらにWRNの欠損に起因するWSの発症の分子メカニズムの解明を目的にしてWRNと結合するタンパク質の検索を行い、その機能の解明を試みたものである。

まず初めに、酵母のtwo-hybrid系を用いてマウスWRNと相互作用するタンパク質をコードする遺伝子を検索し、ユビキチンに似たSUMO-1 (small ubiquitin-related modifier-1) 及び、SUMO-1を標的タンパク質に結合させる活性をもつタンパク質、Ubc9と未知のタンパク質、WHIP (Werner helicase interacting protein) をコードする遺伝子を単離した。WHIPは大腸菌からヒトまで高度に保存されたタンパク質で、RF-C (replication factor-C) に類似したアミノ酸配列をもっていた。

次に、WRNのUbc9, SUMO-1との結合部位の検討を行い、N末端側272-514アミノ酸残基がこれらのタンパク質との結合領域であることを明らかにした。また、WRNがSUMO-1化修飾を受け、WRNとSUMO-1分子の細胞内局在が一致することを初めて証明した。

さらに、免疫沈降によりWRNとWHIPが複合体を形成すること、及び、WHIPがWRNのエキソヌクレアーゼ領域に結合することを明らかにした。また、一過性に発現したWHIPとWRNが核内で同一のdot状の構造体に共局在することを示した。さらに、WRNが二本鎖DNA切断の修復に関与するKu70/86複合体と結合することを確認した。

以上、本研究により、WRNがSUMO-1化修飾を受けることが明らかになり、SUMO-1化修飾によるWRNの機能の制御の可能性が示唆され、WRNの機能制御を解明するための重要な手がかりが得られた。また、WRNに結合するタンパク質として、生物種間で広く保存されているWHIPの発見は、WRNの機能を分子レベルで解析するための突破口を与えるものであり、この分野の研究に与える影響は非常に大きい。

よって、本論文は博士 (薬学) の学位論文として合格と認める。