

早老症原因遺伝子 WRN による新規転写調節機構の解明

微生物化学研究会 微生物化学研究所
基盤生物研究部
石坂 彩

1. はじめに

Werner 症候群 (WS) は老化症状が若年期から現れる難治性の先天性疾患である。原因遺伝子として RecQ 型 DNA ヘリカーゼ WRN が同定されており¹、その病因のひとつとして WRN のホモ接合変異に起因するゲノムの不安定化が挙げられる²。しかし、WS 患者で多発する癌、動脈硬化、骨粗鬆症、2 型糖尿病などの多様な合併症が WRN の欠損により引き起こされる具体的な分子機構は未解明である。

本研究の開始以前までに報告者は、細胞増殖や炎症反応において重要な働きを担う NF-κB の p50 サブユニットと WRN が *in vivo* で相互作用することを見出していた。仮に WRN-p50 複合体が NF-κB 標的遺伝子の転写を協調的に制御する機構があるとする、WRN の欠損は NF-κB の恒常的な制御機構の破綻をもたらし、その影響は NF-κB の制御下にある多くの遺伝子に及ぶと考えられる。この仮説は、WS 患者に現れる合併症が NF-κB の活性制御の不良によって生ずる疾患と酷似しているという事実により支持される。本研究では、WRN と p50 が共局在するゲノム上の領域を解析することで WRN-p50 複合体の標的遺伝子候補を同定し、WRN に NF-κB との協調的な転写調節という新規の機能があるか否かを明らかにすることを目的として行った。

2. 方法

本研究では、WRN の NF-κB との相互作用を介した新規の転写制御機能の解明を目指し、以下の 2 項目について研究を進めた。

1. WRN と p50 の結合様式の解析

in vitro 翻訳系を用い、³⁵S ラベルした p50 と、大腸菌から精製した GST-WRN を用いて、WRN と p50 の結合様式を明らかにする。直接結合性が認められる場合は、GST-WRN の欠失変異体を用いてさらに検証を進め、p50 と結合性を示す責任領域を同定する。これまでに多数の核内因子が WRN と結合すると報告されていることから、WRN-p50 は複数種類の因子との複合体を形成している可能性がある。そこで、プロテオーム解析 (LC-MS/MS) により、その構成因子の同定を進める。

2. WRN と NF-κB による協調的な転写制御機構の有無の解析

2-1. レポーターベクターを用いた解析

HIV-1 LTR は NF-κB 応答性の代表的なプロモーターである。申請者は HIV-1 LTR に Firefly Luciferase をつないだ鋭敏なアッセイ系を樹立しており、研究開始当時までの進捗として WRN が NF-κB 結合部位を介して LTR へ動員されることまで明らかにしている。このベクターを、WRN と NF-κB による協調的な転写制御機構の有無を調べるための評価系とする。特に TNF-α 刺激有無に

におけるWRN およびNF- κ B のプロモーター上への動員、離脱や、siRNA を用いた内在性WRN の発現抑制によるNF- κ B の応答性を、レポーターベクターのRNA 定量及び、Luciferase 活性を指標に解析し、WRN とNF- κ B による転写制御の基礎的なデータを得る。

2-2. 内在性標的遺伝子の探索と同定

WRN とp50 による制御を受ける標的遺伝子候補を同定することを目的として、re-ChIP sequence を行う。具体的にはJurkat 細胞の核抽出物から、 α -WRN 抗体と α -p50 抗体で連続的にクロマチン免疫沈降を行い、沈降してくる核酸を次世代シーケンサーで解析することで標的遺伝子候補を同定する。n=2 以上の独立の試行を行い、標的候補遺伝子を精査、選定する。同定した標的候補遺伝子が実際にWRN およびNF- κ B の制御下にあるか否かの検証は、候補遺伝子のプロモーター解析を通して進める。

3. 結果

1. WRN とp50 の結合様式の解析

165 kDa を超える大きさを持つ完全長のWRN はGST 融合タンパク質として大腸菌から精製することが難しく、実際にはGST-WRN の欠失変異体と、*in vitro* 翻訳系を用い³⁵S ラベルしたRelA (p65) およびp50 との結合から解析を開始した。その結果、WRN のRQC ドメインがRelA およびp50 との結合責任領域であることが明らかとなった。一方、*in vitro* 翻訳系により合成した完全長のWRN と結合するRelA およびp50 の責任領域を解析した結果、RelA、p50 間で相同性の高いRHDドメインが結合責任領域であることが分かった。さらに細胞抽出液を用いた免疫沈降実験の結果から、WRNとRelA/p50 の相互作用は、常時核内に局在するWRN と刺激特異的に核移行したRelA/p50 が核内で出会うことで起こることが分かった。WRN-p50 と複合体を形成している他の因子を同定するプロテオーム解析 (LC-MS/MS) は、予想以上に*in vitro* の結合解析に時間が掛かったため行うことができなかった。

2. WRN とNF- κ B による協調的な転写制御機構の有無の解析

2-1. レポーターベクターを用いた解析

NF- κ B 応答性の代表的なプロモーターであるHIV-1 LTR にFirefly Luciferase をつないだアッセイ系を用いてWRN とNF- κ B による協調的な転写制御機構についての評価を行った。RelA/p50 を外来から導入して上昇されたルシフェラーゼの活性は、内在性のWRN をsiRNA でノックダウンすることで抑制され、また、外来からWRN を導入することでさらに強く活性化された。

2-2. 内在性標的遺伝子の探索と同定

WRN とp50 による制御を受ける標的遺伝子候補を同定することを目的としたre-ChIP sequence の解析は、予想以上に*in vitro* の結合解析に時間が掛かったため行うことができなかった。

4. 考察

本研究では、WRN にこれまでに知られているヘリカーゼ活性によるゲノム維持の機能だけでなくNF- κ B との相互作用を介して標的遺伝子の転写を制御するという新規の機能があることが明らかとした。残念ながら本研究期間中の解析ではWRN とNF- κ B の標的遺伝子の同定までは至らな

かったが、RelA のノックダウンがマウスの繊維芽細胞のゲノムを不安定化させるという報告³ や、NF-κB が老化に関連する遺伝子を多数制御しているというマイクロアレイによる解析の報告⁴ があることから、本研究で見出した転写制御機構の破綻が早老症状や発癌、代謝性疾患の発症にかかわっている可能性があると考えられる。

5. 参考文献

1. 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., and Schellenberg G.D. (1996) Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science*, **272**, 258-262.
2. Shimamoto A., Sugimoto M., and Furuichi Y. (2004) Molecular biology of Werner syndrome. *International Journal of Clinical Oncology*, **9**, 288-298.
3. Wang J., Jacob N.K., Ladner K.J., Beg A., Perko J.D., Tanner S.M., Liyanarachchi S., Fishel R., and Guttridge D.C. (2009) RelA/p65 functions to maintain cellular senescence by regulating genomic stability and DNA repair. *EMBO reports*, **10**, 1272-1278.
4. Adler A. S., Sinha S., Kawahara T.L., Zhang J.Y., Segal E., and Chang H.Y. (2007) Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF-κB activity. *Genes & Development*, **21**, 3244-3257.