

1. 研究課題名：老化ストレス関連遺伝子 (WRN) の機能解析
2. 研究機関：長崎大学薬学部保健衛生薬学講座放射線生命科学教室

(s-kodama@net.nagasaki-u.ac.jp)

3. 研究者：児玉靖司

4. 研究協力者：鈴木啓司、渡邊正己

(長崎大学薬学部保健衛生薬学講座放射線生命科学教室)

5. 研究期間：平成9年～平成11年

6. 要約

ヒトの寿命は、主に遺伝的素因と環境ストレスという2つの要因によって左右される。もし、老化を促進するストレス(老化ストレス)に対する感受性を決定する機構が明らかになれば、老化ストレスを軽減することが可能になるはずである。そこで本研究では、最近単離された遺伝的早老症 Werner 症候群 (WS) の原因遺伝子である WRN 遺伝子の機能解析を試みた。WS 患者は、思春期以降、急速に老化症状が促進される劣性遺伝病であり、平均寿命は 50 歳未満である。従って、正常な WRN タンパク質は、老化ストレスに対抗して急激な老化促進を抑制する機能を持つものと推定されるが、現在、ヘリケース活性とエキソヌクレース活性を持つこと以外、その機能については不明な点が多い。我々は、WRN 遺伝子の機能を探るために、まず WS 細胞に特異的にみられる異常形質を調べ、次にその異常形質に対して外来性の正常 WRN 遺伝子の発現がどのような影響を及ぼすかを検討した。SV40 で不死化した WS 細胞 (WS780) について、細胞増殖率、4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) 感受性、自然突然変異率、及び突然変異のタイプについて解析したところ、細胞増殖率、及び自然突然変異率に関しては、対照細胞と WS780 細胞との間に差が見られなかった。しかし、WS780 細胞は、4NQO に高感受性であり、欠失型突然変異の出現率が非常に高いことが分かった。そこで、WRN 遺伝子が存在する 8 番染色体を WS780 細胞に移入して外来性の WRN 遺伝子の発現を確認後、4NQO 感受性、及び欠失型突然変異の出現頻度について調べたところ、WS780 細胞にみられるこれらの形質に関する異常は、全く正常化されないことが分かった。これらの結果は、4NQO 高感受性、欠失型突然変異の好発といった WS 細胞の異常形質が、WRN 遺伝子欠損により直接誘発されたものではないことを示唆している。おそらく、WRN 遺伝子機能の異常は、遺伝子安定性を制御する修復機構の二次的突然変異と強くリンクしており、この二次的突然変異が老化促進に大きく寄与しているのではないかと考えられる。

7. 研究目的

ヒトの寿命は、主に遺伝的素因と環境ストレスという2つの要因によって左右される。この2つの要因は、全く独立な存在ではなく、相互に関連し合ってヒトの老化過程に影響を与えるものと考えられる。もし、老化を促進するストレス(老化ストレス)に対する感受性を決定する遺伝的背景が明らかになれば、老化促進現象を制御することが可能になるかもしれない。この意味で、遺伝的早老症の研究は大変重要である。Werner 症候群 (WS) は、常染色体劣性を示す遺伝的早老症であり、患者は、若年期から壮年期にかけて様々な老化促進症

状を呈し、健常人に比べて老化速度が 1.5~2.0 倍速いことが知られている¹⁾。WS は、1904 年、ドイツの皮膚科医であった Otto Werner が、強皮症を併発した白内障の家系を発表したのが最初の報告例であり、その後現在まで約 1100 の報告例があるとされている。興味深いことにその報告例の大半は本邦のものであり、WS 研究の進展に日本人研究者は大きく貢献している。1992 年、Goto らは、日本の WS 患者の 21 家系をもとにした遺伝的リンケージ分析から、WS 遺伝子 (*WRN*) を 8 番染色体 p12 にマップした²⁾。これを契機として、世界の複数の WS 研究者の間で、熾烈な *WRN* 遺伝子のポジショナルクローニング競争が開始され、1996 年、Yu らによりついに *WRN* 遺伝子が単離された³⁾。その結果、この遺伝子は、1432 個のアミノ酸配列をコードしており、予想される蛋白質は、DNA ヘリケースに非常に高いホモロジーを示すものであることが明らかとなった。さらに最近になり、この *WRN* タンパク質が実際にヘリケース活性を持つことが証明された^{4,5)}。しかし、*WRN* タンパク質のヘリケース活性が、老化形質発現の促進現象にどのように関与しているのかについては明らかではない。

WS 細胞に関して、いくつかの異常形質がこれまでに報告されている。WS 細胞は、SV40DNA で不死化しても、健常人由来不死化細胞に比べて増殖率が低い⁶⁾。また、Fukuchi らは、WS 細胞の突然変異生成過程に注目し、(1) WS 細胞は自然突然変異頻度が高いこと、(2) WS 細胞では欠失型突然変異の生成比率が高いことを報告した⁷⁻⁹⁾。これらの結果から彼らは、WS 細胞におけるこの突然変異生成機構の特異性が老化現象促進の原因であろうと推論した。また、最近、Ogburn らは、WS 患者及び WS ヘテロ保因者の B リンパ球を用いて、WS 細胞が 4NQO に高感受性であり、ヘテロ保因者は WS 患者と健常人の中間の感受性を示すことを報告した¹⁰⁾。このことは、一般集団中に、1/150~1/200 の割合で存在すると言われる WS ヘテロ保因者のスクリーニングが可能であることを示唆しており、その意味で重要である。このような様々な異常形質が、*WRN* 遺伝子欠損によって生じているならば、外来性の正常 *WRN* 遺伝子の発現によって、これらの異常が正常化されるはずである。そこで、本研究は、この点を確認することを目的として、WS 細胞に 8 番染色体を移入して正常 *WRN* 遺伝子を発現させ、細胞増殖率、4NQO 感受性、自然突然変異率、及び突然変異のタイプに関する WS 異常形質が相補されるか否かを検討した。

8. 材料と方法

(1) 細胞及び染色体の移入

細胞は、男性 (59 歳) WS 患者由来線維芽細胞を SV40DNA で不死化させた WS780 細胞、及び対照として WS 患者由来ではない SV40 不死化線維芽細胞を用いた。また、微小核融合法により 8 番染色体を WS780 細胞に移入した、#8-1、#8-3、#8-4 の 3 種類の細胞と、対照として 9 番染色体を移入した #9-4 細胞を用いた。染色体供与細胞としてヒト 8 番、及び 9 番染色体を 1 本ずつ含むマウス A9 (neo8)、及び A9 (neo9) 細胞を用いた。移入染色体の存在確認は、G-バンド法と染色体ペインティング法による細胞遺伝学的方法と、PCR 法を用いたマイクロサテライト多型性の分析を組み合わせで行った。

(2) WRN 遺伝子の発現

WRN 遺伝子の発現は、まず、転写レベルの発現をノーザンブロット法で調べた。WS780 細胞は、WRN 遺伝子のエクソン 9 にあるコドン 369 に C T の塩基置換 (CGA TGA) がみられる¹¹⁾。ノーザンブロット法では、正常型と変異型 WRN 遺伝子発現の区別がつかないので、次に、RT-PCR 法により WRNcDNA を作成し、エクソン 7 から 12 に相当する部分 (808 bp) を PCR 法で増幅してベクター上に単離後シークエンスし、コドン 369 が正常型か変異型かを調べた。また、タンパク質の発現レベルを、抗 WRN 抗血清を用いたウエスタンブロット法で調べた。

(3) 細胞増殖率

2×10^5 細胞を dish (60mm) にまき、10 日間培養した。1 日毎にエリスロシン B (終濃度 0.1%) 陽性細胞を血球計算盤で数えた。

(4) 4NQO 感受性

細胞を dish (100mm) にまき、12 時間培養後、異なる濃度の 4NQO で 1 時間処理した。その後 2 週間培養し、生じたコロニーを計測して生存率を求めた。

(5) 自然突然変異率

X 染色体上の hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) 遺伝子の自然突然変異率を、6-thioguanine (6-TG) 抵抗性を指標として fluctuation analysis によって調べた。突然変異率は、Luria and Delbruck らの式を用いて¹²⁾、P0 法により以下のようにして求めた。

$$a = [(\ln 2)(-\ln P_0)] / (N_t P E_2 - N_o P E_1)$$

ここで、P0 は突然変異の無い細胞集団 (culture) の割合、NtPE2 および NoPE1 は、それぞれ同一細胞集団中の最終細胞数と初期細胞数をコロニー形成率で補正した値を示している。

(6) 欠失型突然変異の多重 PCR 法による解析

新生突然変異細胞を得るために、まず、細胞を HAT (100 mM sodium hypoxanthine, 0.4 mM aminopterin, 16 mM thymidine) 培地中で 1 週間培養し、あらかじめ存在する 6-TG^r 細胞を除去した。次に、この細胞を 6-TG 培地中で 3 週間培養し、出現した 6-TG^r コロニーを分離して、さらに培養し、欠失型突然変異の解析に用いた。細胞からゲノム DNA を抽出した後、Kato らが開発した方法に従って、HPRT 遺伝子の exon 2~exon 9 をターゲットとする多重 PCR を行った¹³⁾。このうち、exon 7 と exon 8 は 1 組のプライマーにより、1 つの PCR 産物として増幅した。プライマーセットは 2 群に分け、一方は exon 2, 6, 7/8 の増幅に用い、もう一方は exon 3, 4, 5, 9 の増幅に用いて、それぞれ別のチューブで反応を行った。増幅後、5 μ l の PCR 産物を、1.8%のアガロースゲル中で電気泳動し、サイバークリーンで染色してバンドの有無を確認した。

9. 結果

(1) WS細胞への8番染色体及び9番染色体の移入

8番及び9番染色体を WS780 細胞に移入した微小核融合細胞について、染色体分析を G-バンド法及び染色体ペインティング法で行った。移入された染色体は、調べた微小核融合細胞の 90%以上で保持されていた(表1)。8番染色体を移入した5個のうち、3個の微小核融合細胞で、形態が正常な8番染色体が1本多く存在することが確認された(表1)。#8-3細胞は、短腕の一部(8p12-ter)が欠失した状態で存在していることが分かった。さらに、8番染色体短腕上の多型マーカー(D8S87, ANK1)を用いることにより、1本多い8番染色体は、ヒト8番染色体を含むマウス A9(neo8)細胞由来の外来性のものであることが確認された(data not shown)。また、対照として9番染色体を移入した微小核融合細胞も3個分離した(表1)。

Table 1 Chromosome Analysis of Microcell Hybrids Introduced with Chromosome 8 or Chromosome 9 by Whole Chromosome Painting

Cell Line	Introduced Chromosome	No. of Cells Scored	Presence of the Introduced Chromosome (%)	Karyotype of the Introduced Chromosome
#8-1	8	25	92	Intact
#8-2	8	25	96	Intact
#8-3	8	18	89	8p-
#8-4	8	25	96	Intact
#8-6	8	12	ND ^a	Fragmented
#9-1	9	15	87	Rearranged
#9-3	9	15	100	9p-
#9-4	9	10	100	9p-

^aND, not determined

(2) WRN 遺伝子の発現

ノーザンブロット法で WRN 遺伝子の mRNA レベルの発現を調べたところ、WS780 細胞、及び微小核融合細胞(#8-1, #8-4)で、対照細胞と同じサイズの mRNA が、ほぼ同程度の強さで発現していることが分かった(data not shown)。そこで、それぞれの細胞から WRNcDNA を作成し、ベクターにクローニング後、個々のクローンについて、コドン 369 の DNA 配列を調べた。WS780 細胞では、エクソン 9 のコドン 369 に CGA TGA(停止コドン)という突然変異が存在する。そのために、欠失型 WRN タンパク質が生じていると推定されている。#8-3、及び#9-4 細胞では、調べた全てのクローンが変異型であった。それに対して、#8-1、及び#8-4 細胞では、それぞれ6個中6個(100%)、8個中7個(88%)のクローンが正常型であった。さらに、ウェスタンブロット法で、タンパク質レベルの発現を調べたところ、#8-1、及び#8-4 細胞では、対照細胞と同サイズ(160 kDa)の WRN タンパク質が、ほぼ同じ発現量で確認された(図1)。これに対し、WS780 細胞、#8-3 細胞、#9-4 細胞では、WRN タンパク質は検出されなかった。以上の結果は、移入された8番染色体上の WRN 遺伝子は、#8-1、及び#8-4 細胞では発現していること、また、#8-3 細胞では、WRN 遺伝子部位が欠損していることを意味している。

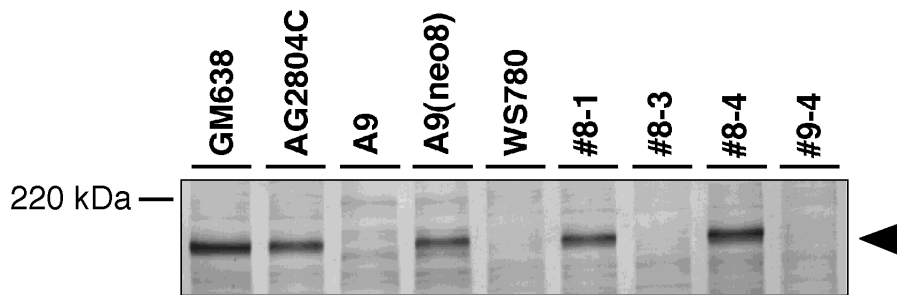


図1 ウェスタンブロット法による WRN 蛋白質の検出。用いた細胞は以下の通りである。GM638, AG2804C, 対照ヒト不死化細胞；A9, ソウス不死化細胞；A9(neo8), ヒト8番染色体の供与 A9 ソウス細胞；WS780, 不死化 WS 細胞；#8-1, #8-3, #8-4, ヒト8番染色体が移入された WS780 細胞；#9-4, ヒト9番染色体が移入された WS780 細胞。矢印は、WRN 蛋白質の位置を示す。

(3) 細胞増殖率

WS780 細胞は対照細胞に比べて増殖率が低いことがすでに報告されている⁶⁾。そこで WS780 細胞と4個の微小核融合細胞(#8-1, #8-3, #8-4, #9-4)について、増殖率を調べ、SV40 不死化対照細胞(N90)と比較した(図2)。その結果、WS780 細胞と4個の微小核融合細胞の増殖率は、対照細胞と差が見られないことが分かった。

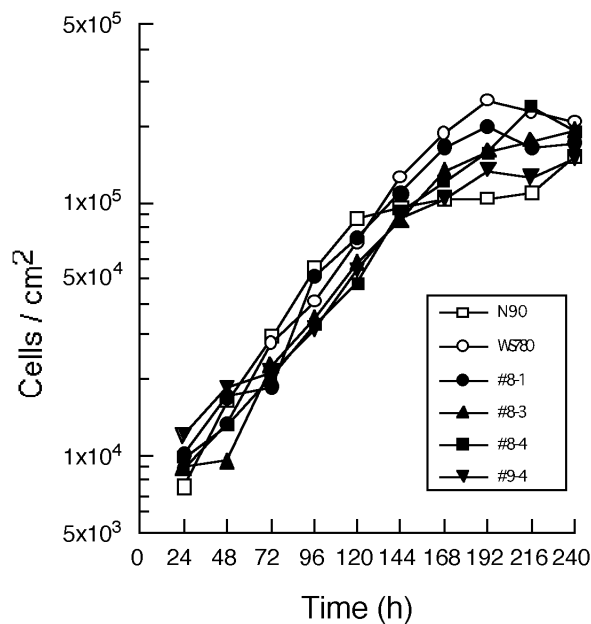


図2 N90, WS780, 及び4個の微小核融合細胞の増殖曲線。60 mm ディッシュ中の細胞数を10日間(240時間)計測した。

(4) 4NQO 感受性

WS780 細胞は、対照の GM638 細胞に比べて、4NQO 処理に対する致死感受性が高かった(図3)。この結果は、以前の WS 患者由来 T リンパ球及び B リンパ球を用いて得られた結果を支持するものである^{10,14)}。そこで、さらに2種類の SV40 不死化 WS 細胞、PSV811、及び W-V についても 4NQO 処理による致死感受性を調べてみたところ、この2種類の WS 細胞の 4NQO 感受性は、対照細胞と同じであることが分かった(図3)。このことは、4NQO 高感受性は、SV40 不死化 WS 細胞では共通の特徴ではないことを示している。さら

に、8番染色体を移入した#8-1細胞は、WS780細胞と同様に4NQOに高い感受性を示した(図3)。この結果は、8番染色体の移入が、WS780細胞の4NQO高感受性を相補しないことを意味している。

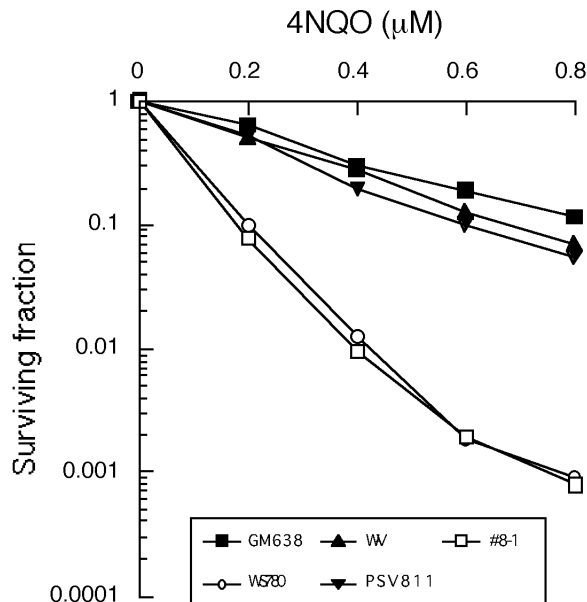


図3 4NQO感受性試験。用いた細胞は以下の通りである。GM638, 対照ヒト不死化細胞; WS780, W-V, PSV811, 不死化WS細胞; #8-1, ヒト8番染色体を移入された不死化WS細胞。

(5) 自然突然変異率

Fluctuation analysis に基づく P0 法により 2 種の対照細胞、GM638、AG2804 細胞、及び WS780 細胞の *HPRT* 部位における自然突然変異率を調べたところ、それぞれ、 0.43×10^{-6} , 0.65×10^{-6} , 1.6×10^{-6} / 細胞 / 世代であった(表2)。この結果に基づき、突然変異細胞を含まない細胞集団(culture)の数が、2項分布に従うことを利用して統計処理すると、これらの値の間には有意な差は無いことが分かった。また、WS780細胞の突然変異率と4個の微小核融合細胞の突然変異率の間にも統計学的に有意な差は見られなかった。

PCR産物のバンド解析より、突然変異のタイプを3群に分類した(図4)。調べたエクソンに対応するバンドに全く変化のないものを正常型、いくつかのエクソンが欠失しているものを部分欠失型、調べた全てのエクソンが欠失しているものを全欠失型とした。全欠失型の場合には、別に16番染色体上の *APRT* 遺伝子を増幅し、全ての例でそのPCR産物の存在を確認した。このような分類で欠失型突然変異を解析したところ、対照のGM638細胞では全欠失型が全体の4%であるのに対して、WS780細胞では27%と多くなっており、WSでは欠失型突然変異が生じやすいというFukuchiらの報告を支持する結果が得られた(表3)。部分欠失型まで含めるとその差はさらに大きくなり、GM638細胞で12%に対し、WS780細胞では73%となり、2つの細胞間で欠失型突然変異の出現率に明らかな相違があることが分かった。8番染色体を移入した3種のWS780細胞についても同様に欠失型突然変異を解析したところ、#8-1、及び#8-4細胞では、欠失型突然変異がそれぞれ98%と89%であり、非

Table 2 Spontaneous Mutation Rates at the *HPRT* Locus in SV40-Transformed Control Cells, WS780 Cells and Microcell Hybrids with Chromosome 8 or Chromosome 9

Cell Line	GM638	AG2804C	WS780	#8-1	#8-3	#8-4	#9-4
No. of Cultures	26	30	36	16	32	16	32
Mean Initial Cell No./ Culture	85	120	42	105	55	110	55
Mean Final Cell No./ Culture ($\times 10^5$)	2.6	2.0	0.50	2.4	1.2	3.2	1.7
No. of Cultures with the Following No. of 6-TG ^r Colonies							
0	22	25	32	9	22	12	27
1	1	0	1	4	4	2	1
2	0	2	1	1	3	0	0
3	0	1	0	1	2	0	2
4	0	1	0	0	0	1	1
5	0	0	1	0	1	0	0
6-10	0	1	0	0	0	0	1
11-15	1		1	0	0	0	
16-20	1			0	0	0	
21-25	0			0	0	0	
26-30	1			1		0	
>30						1 ^a	
No. of 6-TG ^r Colonies per Dish							
Range	0-28	0-6	0-15	0-27	0-5	0-147	0-8
Mean	2.2	0.57	0.64	2.3	0.66	9.6	0.59
Variance	41.7	2.0	6.9	44.3	1.5	1344.3	2.8
Variance/Mean	19.0	3.5	10.8	19.3	2.3	140.0	4.7
Po	0.85	0.83	0.89	0.56	0.69	0.75	0.84
PE1 ^b	0.17	0.12	0.083	0.21	0.11	0.22	0.11
PE2 ^c	0.14	0.093	0.095	0.14	0.15	0.17	0.26
Mutation Rate ($\times 10^{-6}$)	0.43	0.65	1.6	1.7	2.1	0.63	0.71

^a147 colonies were observed.

^bRepresents the plating efficiencies when the cells were initially inoculated.

^cRepresents the plating efficiencies when the cells were reinoculated for the 6-TG selection.

常に高い割合であることが分かった。また、#8-3、及び#9-4細胞においても欠失型突然変異は55%と52%であり、親細胞のWS780細胞と同様の高い割合であった。以上の結果は、8番染色体の移入によりWRN遺伝子を発現させても、WS780細胞の持つ大きな欠失型突然変異を起こしやすいという異常形質は相補されないことを示している。

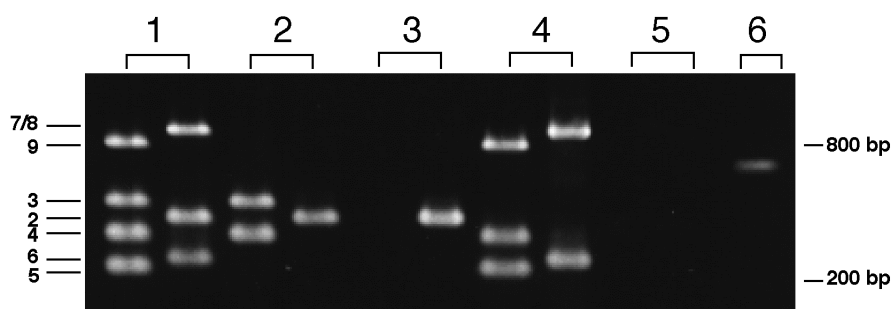


図4 多重PCR法による *HPRT* 遺伝子座の自然突然変異の解析。
 1, 正常バンドパターン (点突然変異、または微小突然変異) ; 2, エクソン5-9の欠失; 3, エクソン3-9の欠失; 4, エクソン2-3の欠失; 5, 全欠失; 6, 試料5のDNAを用いた *APRT* 遺伝子のPCR産物。左側の数字は、対応するエクソン番号、右側の数字は、塩基数を示す。

Table 3 Analysis of Spontaneous *HPRT* Mutants by Multiplex PCR

Cell Line	Introduced Chromosome	Expression of WRN Protein ^a	Total No. of Mutants Analyzed	Normal Pattern (%)	No. of Mutants		Partial and Total Deletion Mutants (%) ^b
					Partial Deletion (%)	Total Deletion (%)	
GM638	NI ^c	+	24	21 (88)	2 (8)	1 (4)	3 (12)
WS780	NI ^c	-	55	15 (27)	25 (46)	15 (27)	40 (73)
#8-1	8	+	48	1 (2)	9 (19)	38 (79)	47 (98)
#8-3	8	-	47	21 (45)	7 (15)	19 (40)	26 (55)
#8-4	8	+	27	3 (11)	1 (4)	23 (85)	24 (89)
#9-4	9	-	24	14 (58)	4 (17)	6 (25)	10 (52)

^aDetermined by Western blot analysis.

^bRepresents number of partial and total deletion mutants.

^cNI, not introduced.

10. 考察

WS780 細胞は対照細胞に比べて増殖率が低いと報告されていたが⁶⁾、本研究ではそのような結果は得られなかった。その理由は不明であるが、SV40 DNA による不死化に伴う長期培養の結果、増殖能が低いという形質が改善されたか、もしくは、増殖能の高い細胞が選択された可能性がある。また、WS 細胞は、自然突然変異率が高いという以前の報告⁷⁻⁹⁾とは異なり、我々の結果では、WS780 細胞は必ずしも高い突然変異率を示さず、また、*WRN* 遺伝子の発現がこの突然変異率を変化させる効果も見られなかった。以前の Fukuchi らの報告と本研究で得られた結果との違いは、WS 細胞ではなく対照細胞の突然変異率の相違に起因している。*HPRT* 部位の突然変異率は、染色体の倍数性によって大きく影響を受けることが知られている^{15,16)}。本研究では、用いた細胞が全て近2倍体であることを確認後実験に用いている (data not shown)。しかし、Fukuchi らの用いた対照細胞は、本研究で用いたものとは異なっており、多倍体を示すために突然変異率が過小評価されている可能性が高い。それが、本研究との相違の原因の一つであろうと考えられる。我々の結果は、高突然変異率という異常形質が、全ての WS 細胞に共通にみられる特徴というわけではないことを示唆している。

一方で WS780 細胞は、2つの際立った特徴、すなわち、4NQO 高感受性と欠失型突然変

異の好発を示した。4NQO による DNA 損傷は、DNA 付加体の形成であり、これは除去修復機構によって効率よく修復されることが知られている。事実、除去修復能を欠損する色素性乾皮症 (XP) 患者由来の細胞は、紫外線だけでなく、4NQO にも高感受性を示す¹⁷⁾。しかしながら、WS780 細胞は紫外線に対する感受性は正常であることから⁶⁾、除去修復能の欠損が、WS780 細胞が 4NQO に感受性が高い原因とは考え難い。興味深いことに、WS 患者のリンパ球では、4NQO に高感受性であるという報告が 2 例ある^{10,14)}。そのうち最新の報告では、WS 患者だけでなく、WS 突然変異のヘテロ保因者の 4NQO 感受性が、WS 患者と健常人の間を示すことが初めて明らかにされた¹⁰⁾。しかし、この現象は、本研究結果が示すように、SV40 不死化 WS 細胞では必ずしも共通の特徴ではない (図 3)。この矛盾は、今後解決されなければならない大きな課題である。我々は、さらに、8 番染色体の移入による WRN 遺伝子の発現が、WS780 細胞の 4NQO 高感受性を正常化しないことを示した (図 3)。このことは、単なる WRN 遺伝子の機能欠損が 4NQO に対する感受性を高めているのではないことを示している。むしろ、WRN 遺伝子欠損に伴う二次的な突然変異によって生じる形質であることを示唆するものである。

我々の結果は、WS 細胞が大きな欠失型突然変異を起こしやすいことを明確に示している (表 3)。この結果は、以前の Fukuchi らの結果を支持するものである⁸⁾。なぜ、WS 細胞で欠失型突然変異が起きやすいのか、その理由は現在のところ不明である。最近の研究で、WRN タンパク質が実際にヘリケース活性を示すことが明らかにされている^{4,5)}。しかし、8 番染色体移入により WRN 遺伝子を発現させた WS780 細胞でも、欠失型突然変異が起きやすいことから、WRN ヘリケース活性の欠損が直接欠失型突然変異を起こしているとは考え難い。むしろ、この場合も、二次的な突然変異が生じていることを想起させる。興味深いことに、いくつかの WS 細胞ではミスマッチ修復の欠損が見つまっている¹⁸⁾。例えば、WS780 細胞では、hPMS2, hMLH1, あるいは hMSH3 が、欠損している。しかし、こうした修復欠損の種類も、細胞や由来組織により少しずつ異なる。このことも、こうした変異が二次的なものであることを示唆している。

WS 細胞に見られる欠失型突然変異の好発のような遺伝的不安定性が、WS にみられる老化症状の促進や高発癌性に大きく寄与している可能性は高い。しかし、本研究の結果が示唆するように、4NQO 高感受性や欠失型突然変異の好発という WS 細胞の異常形質は、WRN 遺伝子欠損が直接引き起こしているものではないと考えられる。以上の本研究の結果を踏まえての我々の仮説を図 5 に示す。WRN 遺伝子の欠損は、ある種の発癌剤に対する高感受性や欠失型突然変異などの様な遺伝子安定性喪失現象を抑制している修復機構の二次的な突然変異と強くリンクしていると考えられる。結果として全ての WS 細胞は、何らかの遺伝的に不安定な形質を示すことになり、そのことが老化促進に寄与しているのではないだろうか (図 5)。

WRN 遺伝子の突然変異がどのように二次的な突然変異を起こすのか、その機構については現在のところ全く不明である。WRN ヘリケースの欠損がなぜ老化促進につながるのかを知るためには、さらなる研究が必要である。

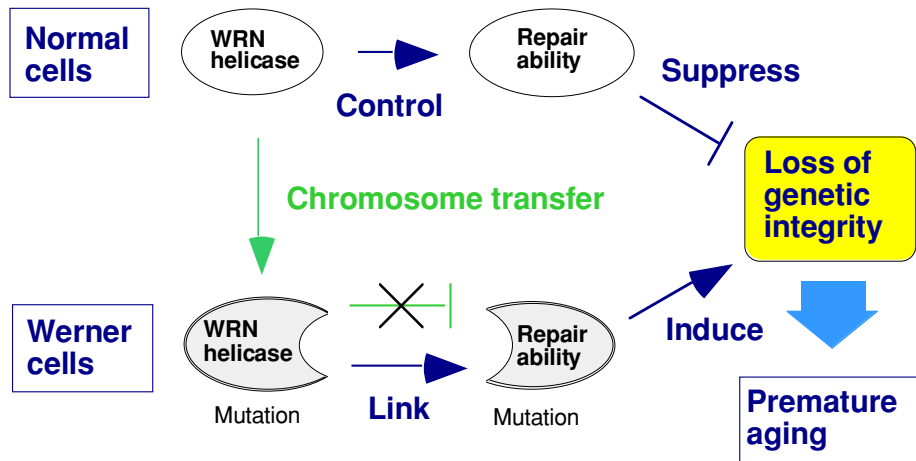


図5 Werner 症候群細胞における 2 次的変異による遺伝的恒常性の喪失。
(詳細は本文参照)

11. 今後の展開

生体にとってゲノム恒常性維持機構の破綻は、発がんの危険性を飛躍的に高める現象であり、そのメカニズム解明は、発がん機構を理解する上で極めて重要な課題である。RecQ ファミリーに属する DNA ヘリケースは、これまでに調べられた全ての生物において、そのゲノム恒常性維持に重要な働きをしていることが明らかにされている酵素である。ヒトでは、現在までに 5 種の RecQ 型 DNA ヘリケースが同定されており、そのうち WRN、BLM、及び RTS ヘリケースは、それぞれ Werner 症候群 (WS)、Bloom 症候群 (BS)、および Rothmund-Thomson 症候群 (RTS) の原因遺伝子がコードしている。これら 3 種の症候群に共通している特徴は、ゲノム不安定性と高発がん性である。このことは、それぞれの RecQ 型 DNA ヘリケースがゲノム恒常性の維持に必須の役割を果たしており、したがってその機能欠損が発がん感受性を高める原因になっていることを示している。したがって今後は、細胞老化と発がん過程にはどちらもゲノム恒常性の破綻が深く関与しているとの視点から、遺伝的早老症の一つである Werner 症候群 (WS) に着目し、WRN ヘリケースの機能欠損によりどのようにしてゲノム不安定性が生ずるのかを解明することを目指す予定である。本研究から得られるゲノム恒常性調節機構に関する知見は、発がん機構解明の手がかりを与えるだけでなく、発がん防御のための新しい概念の確立にも貢献するものである。これまでの研究で我々は、WS 細胞に見られるゲノム不安定性が、単純なる WRN 遺伝子の欠損だけでは説明できないことを示した。これは、これまでの WS 細胞におけるゲノム不安定性に関する解釈を覆す結果であり、今後の進展が期待される。

12. 参考文献

- 1) Epstein, C. J., Martin, G. M., Schultz, A. L., and Motulsky, A. G. Werner's syndrome. A review of its symptomatology, natural history, pathologic features, genetics and relationship to the natural aging process. *Medicine*, 45: 177-221, 1966.

- 2) Goto, M., Rubenstein, M., Weber, J., Woods, K., and Drayna, D. Genetic linkage of Werner's syndrome to five markers on chromosome 8. *Nature*, 355: 735-738, 1992.
- 3) 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. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science*, 272: 258-262, 1996.
- 4) Suzuki, N., Shimamoto, A., Imamura, O., Kuromitsu, J., Kitao, S., Goto, M., and Furuichi, Y. DNA helicase activity in Werner's syndrome gene product synthesized in a baculovirus system. *Nucleic Acids Res.*, 25: 2973-2978, 1997.
- 5) Gray, M. D., Shen, J. C., Kamath-Loeb, A. S., Blank, A., Sopher, B. L., Martin, G. M., Oshima, J., and Loeb, L. A. The Werner syndrome protein is a DNA helicase. *Nature Genet.*, 17: 100-103, 1997.
- 6) Saito, H., and Moses, R. E. immortalization of Werner syndrome and progeria fibroblasts. *Exp. Cell Res.*, 192: 373-379, 1991.
- 7) Fukuchi, K., Tanaka, K., Nakura, J., Kumahara, Y., Uchida, T., and Okada, Y. Elevated spontaneous mutation rate in SV40-transformed Werner syndrome fibroblast cell lines. *Somat. Cell Mol. Genet.*, 11: 303-308, 1985.
- 8) Fukuchi, K., Martin, G. M., and Monnat, R. J. Jr. Mutator phenotype of Werner syndrome is characterized by extensive deletions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 5893-5897, 1989.
- 9) Fukuchi, K., Tanaka, K., Kumahara, Y., Marumo, K., Pride, M. B., Martin, G. M., and Monnat, R. J. Jr. Increased frequency of 6-thioguanine-resistant peripheral blood lymphocytes in Werner syndrome patients. *Hum. Genet.*, 84: 249-252, 1990.
- 10) Ogburn, C. E., Oshima, J., Poot, M., Chen, R., Hunt, K. E., Gollahon, K. A., Rabinovitch, P. S., and Martin, G. M. An apoptosis-inducing genotoxin differentiates heterozygotic carriers for Werner helicase mutations from wild-type and homozygous mutants. *Hum. Genet.* 101: 121-125, 1997.
- 11) Bennett, S. E., Umar, A., Oshima, J., Monnat, R. J. Jr., and Kunkel, T. A. Mismatch repair in extracts of Werner syndrome cell lines. *Cancer Res.*, 57: 2956-2960, 1997.
- 12) Luria, S. E., and Delbruck, M. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* 28: 491-511, 1943.
- 13) Shimahara, H., Kato, T., Hirai, Y., and Akiyama, M. Spectrum of in vivo hprt mutation in T lymphocytes from atomic bomb survivors. I. Sequence alterations in cDNA. *Carcinog.*, 16: 583-591, 1995.
- 14) Gebhart, E., Bauer, R., Raub, U., Schinzel, M., Ruprecht, K. W., and Jonas, J. B. Spontaneous and induced chromosomal instability in Werner syndrome. *Hum. Genet.*, 80: 135-139, 1988.
- 15) Chasin, L. A. The effect of ploidy on chemical mutagenesis in cultured Chinese hamster cells. *J. Cell. Physiol.* 82: 299-308, 1973.

- 16) Morrow, J., Stocco, P., and Barron, E. Spontaneous mutation rate to thioguanine resistance is decreased in polyploid hamster cells. *J. Cell. Physiol.*, 96: 81-86, 1978.
- 17) Takebe, H., Furuyama, J., Miki, Y., and Kondo, S. High sensitivity of xeroderma pigmentosum cells to the carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide. *Mutat. Res.*, 15: 98-100, 1972.
- 18) Bennett, S. E., Umar, A., Oshima, J., Monnat, R. J. Jr., and Kunkel, T. A. Mismatch repair in extracts of Werner syndrome cell lines. *Cancer Res.*, 57: 2956-2960, 1997.

13 . 研究業績

13-1 . 原著論文

- 1) T. Tsutsui, Y. Tanaka, Y. Mitsudo, K. Hasegawa, A. Komine, T. Fujino, S. Kodama, and J. C. Barrett: Extended lifespan and immortalization of human fibroblasts induced by X-ray irradiation. *Mol. Carcinogenesis.*, 18, 7-18 (1997)
- 2) T. Matsumoto, T. Miyazaki, Y. Kosugi, T. Kumada, S. Koyama, S. Kodama, and M. Watanabe: Reaction of long-lived radicals and vitamin C in γ -irradiated mammalian cells and their model system at 295 K. Tunneling reaction in biological system. *Radiat. Phys. Chem.*, 49, 547-551 (1997)
- 3) S. Kodama, G. Kashino, K. Suzuki, T. Takatsuji, Y. Okumura, M. Oshimura, M. Watanabe and J. C. Barrett: Failure to complement abnormal phenotypes of SV40-transformed Werner syndrome cells by introduction of a normal chromosome 8, *Cancer Res.*, 58, 5188-5195 (1998)
- 4) H. Utsumi, S. Kodama, S., K. Tano, M. W. Hashimoto, H. Watanabe: Establishment and characterization of a hypocatalasemic mouse cell strain. *J. Radiat. Res.*, 39, 165-174 (1998)
- 5) M. Suzuki, Z. Yang, K. Nakano, F. Yatagai, K. Suzuki, S. Kodama and M. Watanabe: Extension of in vitro life-span of γ -irradiated human embryo cells accompanied by chromosome instability, *J. Radiat. Res.*, 39, 203-213 (1998)
- 6) Z. Yang, S. Kodama, K. Suzuki and M. Watanabe: Telomerase activity, telomere length, and chromosome aberrations in the extension of life span of human embryo cells induced by low-dose X-rays, *J. Radiat. Res.*, 39, 35-51 (1998)

13-2 . 著書、総説等 なし

13-3 . 国際学会発表 なし

13-4 . 国内学会発表

- 1) 児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：Werner 症候群細胞における自然突然変異のスペクトラム解析、第 5 6 回日本癌学会総会、平成 9 年、京都。

- 2) 渡邊正己、児玉靖司、鈴木啓司：細胞がん化過程におけるテロメア不安定性の関与、第 56 回日本癌学会総会、平成 9 年、京都。
- 3) 鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：X 線照射正常ヒト細胞における ATM-p53 経路及び IRF-1 経路活性化機構、第 56 回日本癌学会総会、平成 9 年、京都。
- 4) 児玉靖司、鈴木啓司、M. F. Lavin、渡邊正己：c-Abl と ATM および DNA-PK とのタンパク質間相互作用の解析、日本放射線影響学会第 40 回大会、平成 9 年 11 月 5 日-7 日、京都。
- 5) 鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：X 線照射正常ヒト細胞における多重情報伝達経路による p53 蛋白質の活性化、日本放射線影響学会第 40 回大会、平成 9 年 11 月 5 日-7 日、京都。
- 6) ゴーシュ JC、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：ヒトの正常細胞における放射線による p53 蛋白質への情報伝達、日本放射線影響学会第 40 回大会、平成 9 年 11 月 5 日-7 日、京都。
- 7) 渡邊正己、鈴木啓司、児玉靖司：PLDR 修復能と p53 機能、日本放射線影響学会第 40 回大会、平成 9 年 11 月 5 日-7 日、京都。
- 8) 都田真奈、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：熱に対するヒト正常細胞の細胞応答と p53 蛋白質の蓄積との関係、日本放射線影響学会第 40 回大会、平成 9 年 11 月 5 日-7 日、京都。
- 9) 中畑圭二、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：非アポトーシスである温熱処理の細胞傷害、日本放射線影響学会第 40 回大会、平成 9 年 11 月 5 日-7 日、京都。
- 10) 菓子野元郎、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：Werner 症候群由来細胞への正常 8 番染色体移入効果、日本放射線影響学会第 40 回大会、平成 9 年 11 月 5 日-7 日、京都。
- 11) 楊 治、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：長期培養ヒト胎児由来細胞の染色体に対する低線量放射線の影響、日本放射線影響学会第 40 回大会、平成 9 年 11 月 5 日-7 日、京都。

13-5 . 新聞等 なし

13-6 . 特許 なし

14 .

- (1) Function of the *WRN* gene that controls senescent stress-associated phenotypes
- (2) Laboratory of Radiation and Life Science, Department of Health Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852, Japan. (s-kodama@net.nagasaki-u.ac.jp)
- (3) Seiji Kodama
- (4) Keiji Suzuki and Masami Watanabe (Laboratory of Radiation and Life Science, Department of Health Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki

University, 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852, Japan.)

(5) 1997 - 1999

(6) Abstract

Major factors that can influence human lifespan are genetic background and environmental stress. Werner syndrome (WS) is a rare autosomal recessive disease characterized by multiple progeroid features similar to changes that occur during normal aging. The Werner syndrome gene (*WRN*) was isolated by positional cloning based on mapping to chromosome 8p12 and the *WRN* protein was recently shown to encode an active helicase. Although the *WRN* protein is postulated to be a key molecule to prevent cells from accelerated senescence, the functional role during aging remains unknown. To examine functional complementation of Werner syndrome (WS) phenotypes by expression of the *WRN* gene, we introduced a normal human chromosome 8 into a SV40-transformed WS fibroblastoid cell line (WS780) by microcell fusion and studied several cellular phenotypes associated previously with WS cell lines, including cell growth rate, 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) sensitivity, and spontaneous mutation rate and type of mutation at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (*HPRT*) locus. The *WRN* gene was expressed in two out of three microcell hybrids introduced with chromosome 8. We failed to observe a difference between normal and WS cell lines in terms of growth rates and spontaneous mutation rates. However, we found that the WS cell line was highly sensitive to 4NQO-induced cytotoxicity and showed an unusually high proportion of deletion mutations at the *HPRT* locus as compared to a control cell line as previously shown. Here, we report that these phenotypes were not corrected by introduction of the *WRN* gene, even though the *WRN* protein was expressed. Our results suggest that the hypersensitivity to 4NQO and the extensive deletion mutations observed in the WS cell line are caused by a defect secondary to the *WRN* gene mutation, possibly a repair gene defect that controls the phenotypes of hypersensitivity to carcinogen(s) and/or the extensive deletion mutations.