

## DNAヘリカーゼ原因遺伝子疾患と酵母相同遺伝子の機能解析

薬理部 宮島 敦子\*

## Functional analysis of yeast homologue gene associated with human DNA helicase causative syndromes

Atsuko Miyajima\*

Proteins having DNA helicase activity play very important roles in many processes involving DNA workings such as replication, repair, and recombination. In this decade, many DNA helicase genes have been cloned as the causative genes of human recessive heredity diseases. These are the causative genes for Xeroderma pigmentosum (*XPB* and *XPD*), Cockayne syndrome (*CSB*), diffuse collagen disease (*Ku80*),  $\alpha$ -thalassaemia (*ATR-X*), Bloom syndrome (*BLM*), Werner syndrome (*WRN*) and Rothmund-Thomson syndrome (*RTS*). The yeast homologue genes of these human DNA helicase genes exist. *S. cerevisiae* *RAD25/SSL2*, *RAD3*, *RAD26*, *YKU80/HDF2* and *RAD54* are the homologue for *XPB/ERCC3*, *XPD/ERCC2*, *CSB/ERCC6*, *Ku80/XRCC5* and *ATR-X/HX2*, respectively. *E. coli. recQ* gene and *S. cerevisiae* *SGS1* are the homologue for all *BLM*, *WRN* and *RTS*. A search of whole genome of *S. cerevisiae* revealed that *SGS1* is the sole homologue of *recQ* in *S. cerevisiae*. Thus it seems likely that *SGS1* is a functional homologue of one or several human RecQ family genes. Many basic or essential functions are well conserved in the cells from lower eukaryotic to higher mammalian. The functional analysis in yeast could make an useful insight for the human homologue.

To clarify the functions of *S. cerevisiae* Sgs1 and to get an insight into the functions of Blm, Wrn and Rts, in this study, we analyzed the phenotype of *sgs1* disruptant and in detail the cause of the poor sporulation phenotype of *sgs1* disruptants in relation to meiotic processes including meiotic recombination. The poor sporulation of *sgs1* disruptants was complemented with a mutated *SGS1* gene encoding a protein lacking DNA helicase activity; however, the mutated gene could suppress neither the sensitivity of *sgs1* disruptants to methyl methanesulfonate (MMS) and hydroxyurea nor the mitotic hyperrecombination phenotype of *sgs1* disruptants. The N-terminal 1-45 amino acid region and 698-1195 amino acid region of Sgs1, which including helicase domain and C-terminal RecQ conserved region with helicase activity, were required for complementation of MMS sensitivity and suppression of hyperrecombination of *sgs1* disruptants in mitotic growth. The 126-400 and 596-1195 amino acid regions of Sgs1 were required for complementation of poor sporulation and of reduced meiotic functions. These regions required for the mitotic or meiotic functions of Sgs1 were well overlapped with the interaction regions of Top3 and Top2. Some of these results might explain the mechanism of the symptom of RecQ-related syndromes.

Key word: DNA helicase, yeast homologue, *SGS1*, Bloom syndrome, Werner syndrome

## 1. はじめに

2000年6月26日、米、英の大統領、首相によりヒトのゲノム解析の終了宣言がなされた。この日から遺伝子研究は、ポストゲノム時代と位置付けられることとなった。そして、2001年、2月15日、2月16日付けの科学雑誌に、相次いでヒトのゲノム配列のドラフトに関する論

文が掲載され<sup>1,2)</sup>、ポストゲノム時代の到来が現実のものとなった。とはいえ、研究の上でその日を境に何かが大きく変わる訳ではなく、それまでの遺伝子研究における積み重ねの上に宣言、公表されたものであり、ヒトのゲノムに関する database は今後も蓄積を必要とする。しかしながら、ヒトにおける遺伝情報、生体機能、疾患、創薬等、分子生物学の分野において、ポストゲノム時代として、公表されているゲノム情報を最大限利用し、研究の認識、戦略の変更をしなければならなくなったことは確実である。

出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) においては、早期から全塩基配列を database 化する試みがなされていた

\* To whom correspondence should be addressed: Atsuko Miyajima; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan;  
Tel: 03-3700-1141 ext. 327; Fax: 03-3707-6950;  
E-mail: miyajima@nihs.go.jp

が、ゲノムプロジェクトが終了し出芽酵母の約12Mb、16本の全染色体の塩基配列が、Web siteにより検索可能になったのは1996年4月であった<sup>3)</sup>。真核生物の中で全塩基配列が明らかにされたのは、出芽酵母が最初で、その後、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、線虫 (*Caenorhabditis elegans*)<sup>4)</sup> をはじめとしてヒト (*Homo sapiens*) に至る数多くの種においてもゲノムプロジェクトが進行している。出芽酵母に次いで、2002年2月、分裂酵母 (*S. pombe*) の全塩基配列も明らかになった<sup>5)</sup>。

酵母細胞を用いた研究においてポストゲノム研究への移行は、確かに大きな変化があった。遺伝子クローニングの必要は無くなり、Web site上を検索すれば、目的とする遺伝子の配列、染色体map、相同遺伝子の存在等の情報を容易に得ることができるようになった。ポストゲノム時代に入った酵母細胞の研究は、機能解析、構造解析、他の蛋白質との複合体形成など、遺伝子から蛋白質へその中心が移ってきた。さらに、DNA chipの開発に伴って、出芽酵母の各遺伝子の細胞周期におけるmRNAの発現量の変化もプロファイル化された<sup>6)</sup>。しかしながら、出芽酵母の全ORF数6327個のうち、一定の機能が示唆されて遺伝子名が名付けられているものは、未だに半分程度にすぎない。

遺伝情報を担っているDNAは、放射線、紫外線、変異原物質、活性酸素等により、細胞の内外から種々の損傷を絶えず受けている。DNAに損傷が生じると、複製、転写が阻害されたり、突然変異、欠失等が引き起こされる。これらDNA損傷、突然変異は、細胞死、癌化、老化、その他様々な疾患を引き起こす。細胞が持つ遺伝情報が正確に維持されるためには、DNA複製が正確に行われ、DNAが損傷を受けた際には、速やかにそれを修復する機構が働く必要がある。

DNAの複製、修復、転写、組み換え、細胞周期、細胞死等のDNAの遺伝情報維持に関わる多数の遺伝子がクローニングされ、その機構について徐々に明らかにされてきた。その遺伝子産物の中にはDNA helicaseが幾つか含まれている。

Helicaseは、ATPの加水分解エネルギーを用いて、二本鎖のポリヌクレオチドを巻き戻し、一本鎖にする酵素の総称である。DNA鎖を巻き戻すか、RNA鎖を巻き戻すかにより、DNA helicaseまたはRNA helicaseに分類される。Helicaseには共通して、helicase domainと呼ばれる、7つの特徴的な配列 (motif) が保存されている。それらはI, Ia, II, III, IV, V, VIで、helicase活性の中心となるmotif IIのDEXH配列により、helicaseのtypeが分類される。Helicaseは、それぞれ2本鎖の巻き戻し方向が決まっており、使用可能なヌクレオチドの種類や、巻き戻すDNAの長さ、構造に特徴がある。二本鎖DNAが一本鎖に巻き戻される過程は、DNA複製における複製

フォークの二本鎖DNA巻き戻し、DNA修復におけるヌクレオチド切り出し除去、転写の伸長、組み換え等、DNAの遺伝情報維持に関わる多くの過程に必要とされる。出芽酵母においては、82個のhelicase motifを有する遺伝子が報告されているが、これらの遺伝子が実際にhelicase活性を持つか、また酵母細胞における機能について明らかにされているものは、ほんの一部の遺伝子に過ぎない。

近年、DNA helicase遺伝子が原因遺伝子である常染色体劣性遺伝疾患が相次いで報告されてきている (Table 1)。それらの遺伝子疾患は、高発癌を示し、日光過敏、免疫不全、早老、成長障害などの症状を示す疾患や、自己免疫疾患、異常ヘモグロビン症など様々な症状を示す疾患であった。

疾患原因DNA helicase遺伝子として、まず、色素性乾皮症 (Xeroderma pigmentosum : XP) において、2種の遺伝子が同定された。1990年に同定された、XP-B群の原因遺伝子XPBは、UV-sensitive CHO細胞変異株を相補するヒト遺伝子ERCC3と同一の遺伝子で、出芽酵母RAD25/SSL2の相同遺伝子であった<sup>7)-9)</sup>。1992年に同定されたXP-D群の原因遺伝子XPDは、同様にERCC2と同一で、酵母RAD3の相同遺伝子であった<sup>10)-12)</sup>。XPB, XPD蛋白質は、いずれも基本転写因子TFIIHに含まれていた<sup>13), 14)</sup>。1992年にコケイン症候群 (Cockayne syndrome) B群の原因遺伝子CSBが、同定された。CSB/ERCC6は、酵母のRAD26に相同性を有していた<sup>15)-17)</sup>。次いで1994年、自己免疫疾患である膠原病の自己抗原Ku (Ku70-Ku80) のサブユニットであるKu80もDNA helicase遺伝子であることが明らかにされた<sup>18), 19)</sup>。1995年、異常ヘモグロビン症の一つである、 $\alpha$ サラセミア ( $\alpha$ -thalassaemia, ATR-X syndrome) の原因遺伝子ATR-Xが同定された。ATR-Xは、染色体Xq13において同定されたX-linked helicase-2 (XH2) と同一で、この遺伝子は酵母のRAD54に相同性を有していた<sup>20), 21)</sup>。さらに、1995年から1999年にかけて、3つのDNA helicase遺伝子が、常染色体劣性遺伝子疾患の原因遺伝子として同定された。それらは、ブルーム症候群 (Bloom syndrome: BLM)<sup>22)</sup>、ウェルナー症候群 (Werner syndrome: WRN)<sup>23)</sup>、ロトムント・トムソン症候群遺伝子 (Rothmund-Thomson syndrome: RTS)<sup>24)</sup> である。これら3つの遺伝子は、どれも大腸菌のrecQ、出芽酵母のSGS1に相同性を有していた。以上の疾患の原因遺伝子となるヒトDNA helicase遺伝子は、いずれも酵母相同遺伝子を有していた。

酵母は、1940年代から遺伝学の研究が盛んにされてきた最も下等な真核生物である。単細胞で、倍加時間が2時間程度と短く、扱いが容易である。ゲノムプロジェクトが終了し、出芽酵母16本の全染色体の塩基配列が

Table 1 DNA helicase genes for human recessive heredity diseases

Human gene	Disease	Gene map locus	(Yeast homologue)	Function
<i>XPB/ERCC3</i>	Xeroderma pigmentosum	2q21	( <i>RAD25/SSL</i> )	3'→5' helicase, Subunit of THIIH
<i>XPD/ERCC2</i>	Xeroderma pigmentosum	19q13.2-q13.3	( <i>RAD3</i> )	5'→3' helicase, Subunit of THIIH
<i>CSB/ERCC6</i>	Cockayne syndrome	10q11	( <i>RAD26</i> )	DNA dependent ATPase, RNA Polymerase II complex
<i>Ku80/XRCC5</i>	Diffuse collagen disease	2q35	( <i>YKU80/HDF2</i> )	DNA helicase, Subunit of Ku autoantigen
<i>ATR-X/HX2</i>	α-Thalassemia	Xq13	( <i>RAD54</i> )	?
<i>BLM</i>	Bloom syndrome	15q26.1	( <i>SGS1</i> )	3'→5' helicase
<i>WRN</i>	Werner syndrome	8p12-p11.2	( <i>SGS1</i> )	3'→5' and or 5'→3' helicase
<i>RTS/RECQ4</i>	Rothmund-Thomson syndrome	8q24.3	( <i>SGS1</i> )	?

真核生物で最初に明らかになったのには、イントロンがわずかで、ゲノムの量が少ないこともあるが、酵母細胞の生活環の特異性により、遺伝学的な研究が盛んに進められたことが背景にある。

酵母は単核単細胞の真核生物で、Fig. 1に示すように、一倍体、二倍体をそれぞれ正規のライフサイクルとし、高次倍数体の生育も可能である。2Nの遺伝子を持つ二倍体酵母細胞は、窒素源および栄養性炭素源の枯渇により減数分裂が誘導され一倍体の胞子を形成する。形成されたaまたはα一倍体酵母細胞は、栄養条件下において、一倍体のまま安定に増殖を繰り返すことが可能である。さらに、a, α一倍体酵母細胞は、接合により二倍体を形成する。

この生活環の特性を利用することにより、分子遺伝学的解析を進める上で、以下のような利点がある。

- 1) 一倍体酵母細胞を用いて目的とする遺伝子を破壊することにより、容易に遺伝子破壊株を取得することができる。また、a, αの一倍体酵母株において、それぞれ、遺伝子を修飾した上で接合を行わせることにより、種々の研究上有用な二倍体株を得ることが可能である。
- 2) 遺伝子変異の入った一倍体と野生株を掛け合わせ、四分子解析 (tetrad analysis) により、目的の遺伝子の変異を有する一倍体を取得することができる。また、四分子解析により分離した四胞子の表現型を観察したり、二対の対立遺伝子についての解析が可能

である。

- 3) 二倍体酵母株は貧栄養条件により容易に減数分裂を誘導することができるため、減数分裂期における機能についての解析を容易に進めることができる。
- 4) 酵母細胞においては、DNA複製、修復、組み換えといったDNA代謝に関与する蛋白質群の多くのアミノ酸配列や細胞内機能が、高等真核生物と酵母で極めて高度に保存されており、酵母の実験系で得られた結果が、高等真核生物における機能解析に有用である。

本稿では、DNA helicaseが原因遺伝子となる疾患について、酵母相同遺伝子による機能解析の結果、特に、筆者らが進めた出芽酵母*SGS1*の機能解析に関する研究を中心に、疾患発症のメカニズムとの関連について紹介する。

## 2. 色素性乾皮症、コケイン症候群原因DNA helicase 遺伝子

色素性乾皮症 (Xeroderma pigmentosum : XP) は、常染色体性劣性遺伝子疾患で、約10万人に1人の割合で発症し、日光過敏症を示す。乳幼児期から短時間の日光照射で紅斑、水泡などの急性皮膚炎症を繰り返し、その皮膚病変部において、数千倍もの高頻度で皮膚癌が発生する<sup>25)</sup>。また他の臓器においても、10~20倍の頻度で癌を発生する。これらの皮膚症状に加えて、重篤なものは、精神神経症状 (進行性知能低下、小頭症、小脳性運

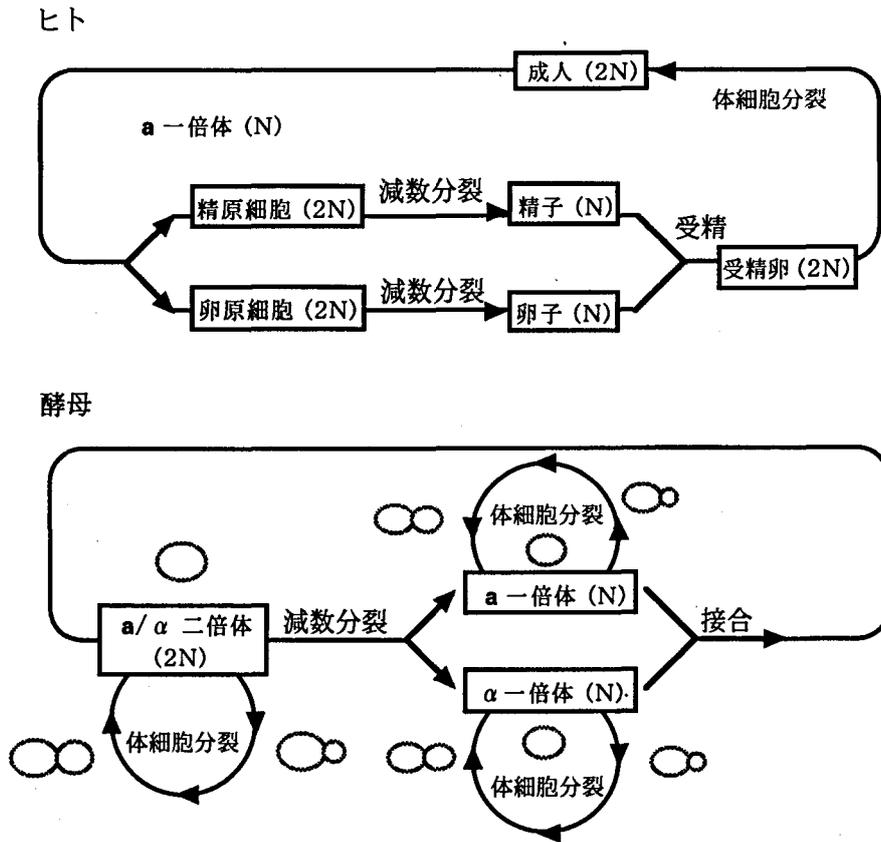


Fig. 1 Comparison of life cycle between human and yeast

動失調症, 神経原性の難聴や筋萎縮)を示す。相補性試験の結果, XPはA~GおよびV (variant) の8つの群に分類されている。XP-A~G群の原因遺伝子産物は, 紫外線によるピリミジン二量体 (pyrimidine dimer) や (6-4) 光産物, シスプラチンによるDNA鎖内架橋, アセチルアミノフルオレン (AFF) による塩基付加体などの様々なDNA損傷を修復するヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair: NER) 機構に関与することが知られている。XP-Vは, 損傷の乗り越え複製に機能する<sup>26)</sup>。コケイン症候群 (Cockayne syndrome: CS) も同様に, ヌクレオチド除去修復に欠損を示すヒト劣性遺伝子疾患で, 小人症, 精神発達遅延, 小頭症, 神経原性難聴, 運動失調, 網膜色素変性症などを示し, A, Bの2群に分類される<sup>27, 28)</sup>。

大腸菌においても, ヌクレオチド除去修復に関わる UvrA, UvrB, UvrC, UvrD の4種類の蛋白質が報告されており<sup>29, 30)</sup>, クレオチド除去修復機構は, 大腸菌からヒトまで保存されていると考えられる。ヌクレオチド除去修復に関する研究は, DNA修復に欠損を示す細胞株を用いて解析されてきた。出芽酵母細胞においては, 放射線, 紫外線に感受性を示す変異株に対する解析から, その原因となるRAD遺伝子が数多く報告された。それらの変異株の2重遺伝子変異株を作成し, それらの株の感

受性を比較することにより, 同じDNA修復経路に属するかどうかを検討 (epistasis test) した結果, RAD3, RAD6, RAD52の3つの epistasis group に分類された<sup>31)</sup>。これら3つの epistasis group のうち, RAD3 epistasis group 群に属する遺伝子群が, 酵母細胞において NER に関わっていた<sup>32)</sup>。RAD3 epistasis group 群に属する遺伝子の中には, DNA helicase の motif をもつ遺伝子が3つ (RAD3, RAD16, RAD25) 含まれていた。

また, げっ歯類細胞のCHO細胞においてUVに高感受性の突然変異株が単離され, 11種類の遺伝的相補群が存在した。これらの細胞に正常ヒト細胞のゲノムDNAをtransfectionし, UV感受性を回復する遺伝子 (excision repair cross complementing rodent repair deficiency: ERCC) が同定され<sup>33)</sup>, そのうちのERCC2, ERCC3, ERCC5, ERCC6, ERCC8は, それぞれ, XPまたはCSの原因遺伝子XPD, XPB, XPG, CSB, CSAであることが明らかになった<sup>34)~36)</sup>。

XPのA~GおよびV群の原因遺伝子は, 1990年代に相次いでクローニングされ, 既にすべての遺伝子が同定されている。コケイン症候群A, Bの原因遺伝子も同定された。それらの遺伝子は, いずれもNERの過程 (①DNA損傷の認識, ②損傷の両側におけるDNA鎖の切断, ③損傷を含むDNA鎖の除去, ④新しいDNA鎖の合成,

⑤新しいDNA鎖の結合)に関わるものであった。ヌレオチド除去修復は、ゲノム中のあらゆる場所で発生した損傷を対象とする修復機構(global genome repair: GGR)と、転写と共役して鋳型鎖上の損傷を特異的に修復する機構(transcriptional coupled repair: TCR)に分類される。XPAは損傷DNAに結合するZn finger蛋白質でRPA, ERCC1, TFIIHと結合し<sup>37)-39)</sup>, XPCはHR23Bとcomplexを形成しGGR特異的に損傷認識を行う<sup>40, 41)</sup>。XPEはp48のDDB因子(damaged DNA binding factor)が候補として有力である<sup>42)</sup>。XPFはERCC1とcomplexを形成し損傷の5'側特異的なエンドヌクレアーゼ、XPGは損傷の3'側特異的なエンドヌクレアーゼである<sup>43), 44)</sup>。XPVはDNA polymerase  $\eta$  (eta)で、損傷の乗り越え複製機能する<sup>26)</sup>。XP-CおよびXP-E群はGGR特異的に欠損を示す。コケイン症候群A, Bの原因遺伝子も同定されており、それらは転写共役型修復(TCR)に関わる遺伝子であった。CSAは、5個のWD-40リピートを持ち、CSBおよびTFIIHのp44に結合する<sup>45)</sup>。

## 2.1 ヒトXPB, XPD, CSB遺伝子および酵母相同遺伝子

XP-B群の原因遺伝子XPB/ERCC3は、出芽酵母RAD25/SSL2の相同遺伝子であった<sup>7)-9)</sup>。XP-D群の原因遺伝子XPD/ERCC2は、出芽酵母のRAD3の相同遺伝子であった<sup>10)-12)</sup>。XPB, XPD蛋白質は、いずれもヌレオチド除去修復に関与し、9個のサブユニット(XPB(p89), XPD(p80), p62, p52, p44, Cdk7(p38), p34,

Cycline H(p34), MAT1(p32))からなる基本転写因子TFIIHに含まれている<sup>13), 14)</sup>。XPB蛋白質は3'→5' DNA helicase, XPD蛋白質は5'→3' DNA helicaseである。NERにおいては両方のDNA helicase活性が必要とされるが<sup>8)</sup>, 転写の開始にはXPBが主要な役割を担っており、XPDのhelicase活性は必須ではなかった<sup>46), 47)</sup>。

XPBおよびXPDの出芽酵母相同遺伝子産物Rad25, Rad3はいずれもhelicaseで、酵母において、基本転写因子transcriptional factor b (TFIIHのyeast homologue)の9個のサブユニット(Ccl1, Kin28, Rad3, Ssl1, Ssl2/Rad25, Tfb1, Tfb2, Tfb3, Tfb4)に含まれている<sup>48)-50)</sup>(Table 2)。酵母において、RAD25およびRAD3のnull遺伝子破壊株はどちらも致死で、これらの遺伝子産物が、酵母の生存に関わる重要な機能を担っていることが示された<sup>51)</sup>。

CBSはhelicase motifをもつ168KのSWI/SF2 familyに属する蛋白質で、DNA依存性のATPase活性は有するが、helicase活性は有しない。CBSは、RNA polymerase complexに含まれる<sup>15)-17)</sup>。酵母におけるCSBの相同遺伝子産物Rad26は、同様にDNA依存性のATPase活性を有し、TCRに関与する<sup>52)</sup>。酵母細胞においてRAD26遺伝子破壊株は生存可能であったが、TCR欠損を示した<sup>53)</sup>。

ヒト色素性乾皮膚症、コケイン症候群原因遺伝子群の遺伝子には、何れも酵母の相同遺伝子が存在することから、NER機構が酵母からヒトに至る真核生物において、高度に保存された機構であることが予想される。酵母の

Table 2 Function of yeast DNA helicase genes for human recessive heredity diseases

Yeast helicase gene	Gene Chr. locus, Systematic name	ORF size	Mutant phenotype	Function
<i>RAD25/SSL2</i>	Chr. IX, YIL143C	2352 bp	inviable, radiation sens.	Nucleotide- excision repair, Subunit of transcription factor b
<i>RAD3</i>	Chr. V, YER171W	2337 bp	inviable, radiation sens.	Nucleotide- excision repair, Subunit of transcription factor b
<i>RAD26</i>	Chr. X, YJR035W	3258 bp	viable, radiation sens.	Nucleotide- excision repair, Transcription-coupled repair
<i>YKU80/HDF2</i>	Chr. XIII, YMR106C	1890 bp	viable, MMS sens.	DNA end-joining repair, Subunit of Ku autoantigen
<i>RAD54</i>	Chr. VII, YGL163C	2697 bp	viable, radiation sens.	X-ray damaged repair, Mitotic and meiotic DNA recombination
<i>SGS1</i>	Chr. XIII, YMR190C	4334 bp	viable, MMS sens.	DNA repair, Mitotic and meiotic DNA recombination

変異株を用いたNERに関する分子遺伝学的な研究は、高等動物細胞（哺乳類細胞）におけるNER機構の研究の発展に大いに寄与した。このように、酵母細胞は下等ではあるが真核細胞に属しており、下等から高等までよく保存された機能の解析において、良いモデル系となる実際的な例を、DNA helicase 遺伝子の機能解析研究は数多く示している。

### 3. 自己免疫疾患原因 DNA helicase 遺伝子と酵母相同遺伝子

膠原病 (diffuse collagen disease) は、広範性結合組織疾患で、全身のフィブリノイド変性を示す。発熱、関節痛、皮膚症状、腎障害、胸膜炎など血管結合組織において炎症症状が観察され、自己免疫現象を示す。Ku 蛋白質 (Ku70-Ku80) は、自己免疫疾患 (autoimmune disease) の強皮症 (scleroderma)・多発性筋炎重複症候群の自己抗原として発見された。Ku 蛋白質のサブユニットである *Ku80* も DNA helicase 遺伝子であることが、明らかにされた<sup>18), 19)</sup>。Ku 蛋白質は触媒サブユニット (p465) に結合し、DNA 依存性プロテインキナーゼの DNA 結合性調節成分として機能し、DNA 修復および V (D) J recombination に関与している。*Ku80* は、げっ歯類細胞の CHO 細胞において X-ray に高感受性を示す突然変異株の感受性を回復するヒト XRCC (X-ray repair cross complementing rodent repair deficiency) 遺伝子群の XRCC5 と同一の遺伝子で、酵母細胞の *YKU80/HDF2* の相同遺伝子であった。Ku 蛋白質は、DNA helicase 活性を有している<sup>54)</sup>。

酵母においても、*yKu80/Hdf2* は、*yKu70/Hdf1* と complex を形成し、non-homologous end-joining (NHEJ) 因子として機能する<sup>55)</sup>。DNA は内在的なストレスや紫外線、電磁放射線、環境変異原物質等により、DNA に 2 本鎖切断を生じる。真核生物においては、生じた 2 本鎖切断は通常相同組み換えにより修復されるが、生成した DNA 末端は、末端再結合機構 (NHEJ) により修復される。出芽酵母の NHEJ に関与する因子は、*yKu80-yKu70* complex, *Mre11-Rad50-Xrs2* complex, *Sir2-Sir3-Sir4* complex, *Lig4-Lif1* complex が報告されている。*yKu80-yKu70* complex は、切断された DNA 末端に結合し、DNA 末端同士を引き寄せる働きをする<sup>56)</sup>。

ヒトやマウス等の高等真核生物においては、2 本鎖切断修復だけでなく免疫グロブリンや T 細胞受容体の多様性獲得に必要な V (D) J recombination にも、NHEJ が関与する。その場合、*Ku70-Ku80-DNA-PK* complex と *XRCC4-DNA ligase IV* complex が関与することが報告された<sup>57), 58)</sup>。

### 4. $\alpha$ サラセミア原因 DNA helicase 遺伝子と酵母相同遺伝子

サラセミア (地中海貧血) は、異常ヘモグロビン症の一つで、1 つまたは複数のグロビンのポリペプチド鎖に産生欠損を生じ、正常ヘモグロビンの合成が障害される疾患である。異常を伴う鎖によって、サラセミアは  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  等に分類される。 $\alpha$ サラセミアの症状は、重症型では子宮内死亡または生後直後の胎児水腫により死亡する。軽症の場合は、小球性、低色素性、再生不良性貧血を示し、赤血球内にヘモグロビン H の封入体が観察される。 $\alpha$ サラセミアはアジア南東部に局在する。1995 年、 $\alpha$ サラセミアの原因遺伝子 X-linked  $\alpha$ -thalassemia / mental retardation (*ATR-X*) が、X-linked helicase-2 (*XH2*) 遺伝子と同一であることが示された。*ATR-X* 遺伝子は、酵母の *RAD54* に相同性を有していた<sup>20), 21)</sup>。*ATR-X* は  $\alpha$  グロビン発現の制御に関わっているのではないかと考えられているが、その機能については明かになっていない。

*Rad54* は、DNA 依存性 helicase 活性を有し、酵母において、X-ray による傷害の修復、体細胞分裂組み換え、減数分裂組み換えに関わっている<sup>59), 60)</sup>。酵母には、*RAD54* に相同性を有する、*RDH54/TID1* 遺伝子が存在し、この遺伝子も helicase motif を有している<sup>61)</sup>。*Rdh54* は DNA 修復および DNA の supercoiling に関与し、*DMC1* と相互作用する<sup>62)</sup>。また、ヒトにおいて、酵母 *RAD54* の相同遺伝子 *hRAD54* (Chr. 1p32) も報告されており<sup>63)</sup>、これらの遺伝子の機能との関連についても興味を持たれる。

*ATR-X* が、ヒトの  $\alpha$  グロビンを含む遺伝子の発現にどのように関わっているかについては、まだ明らかになっていないが、今後、*Rad54*, *Rdh54* 等の転写制御における機能が明らかになるに連れて、*ATR-X* の機能についての解析が進むことが期待される。

### 5. ブルーム症候群、ウェルナー症候群、ロトムント・トムソン症候群原因 DNA helicase 遺伝子と大腸菌、酵母相同遺伝子

1995 年から 1999 年にかけて、3 つの DNA helicase 遺伝子が、常染色体劣性遺伝子疾患の原因遺伝子として同定された。それらは、ブルーム症候群 (Bloom syndrome: *BLM*)<sup>20)</sup>、ウェルナー症候群 (Werner syndrome: *WRN*)<sup>21)</sup>、ロトムント・トムソン症候群遺伝子 (Rothmund-Thomson syndrome: *RTS*)<sup>22)</sup> である。これら 3 つの遺伝子は、何れも大腸菌の *recQ*、出芽酵母の *SGS1* に相同性を有していた。大腸菌の *RecQ* は、*recBC sbcB* background における thymineless death の抵抗性に関わる遺伝子として 1984 年に同定され、*RecF* の組み換えの経路に関与していることが明らかにされた<sup>64), 65)</sup>。*RecQ* 蛋白

質は、610 amino acids(aa), 分子量74 KDa, スクレオチドとしてATP, dATPを利用することができ、巻戻しの方向は3'→5'のDEAH typeのDNA helicaseである<sup>66)</sup>. *recF*変異株は、*recBCD sbcBC* backgroundにおいてUV抵抗性を消失し、また、*recQ*欠失変異株は*recBCsbcBC* backgroundにおいてUVおよびMMS感受性を示すことが報告されている<sup>67), 68)</sup>.

### 5.1 ヒト *recQ* 相同遺伝子

ヒトにおいては、現在までに5種類のRecQ相同遺伝子産物 (DNA helicase Q1/RecQL, Blm, Wrn, Rts/RecQ4, RecQ5) が報告されている (Fig. 2). 我々の研究グループおよびPuranam & BlackshearによりクローニングされたDNA helicase Q1/RecQLは、大腸菌の*recQ*相同遺伝子としてcDNAが同定された最初の哺乳類細胞遺伝子であった<sup>69), 70)</sup>. その後、1995年、1996年に相次いで、DNA helicase 遺伝子である*BLM*, *WRN*が、positional cloningにより同定された<sup>22), 23)</sup>. その後、ヒト*recQ*相同遺伝子が集中的に探索された結果、更に2つの*recQ*相同遺伝子 (*RECQ4*, *RECQ5*) がクローニングされた<sup>71)</sup>. *RECQ4*は、ロトムント・トムソン症候群遺伝子*RTS*であることが明らかとなった<sup>24)</sup>.

ブルーム症候群、ウェルナー症候群、ロトムント・トムソン症候群、これら3つの症候群はいずれも、癌多発性、DNA修復異常、染色体不安定性を示す、常染色体

劣性遺伝疾患である。ブルーム症候群は、高発癌の他に、成長遅延、免疫不全、男性患者の不妊 (有効な精子を持たない) が報告されている<sup>72)-74)</sup>. 発症例は、世界で200例ほどでウクライナのユダヤ人に多いが、日本人でも16例ほどが報告されている。ブルーム症候群患者の細胞においては、相同染色体間の組み換えや、姉妹染色分体交換 (sister chromatid exchange : SCE) の頻度の上昇が観察され、細胞がアルキル化剤であるEMSに感受性を示すことが報告されている<sup>75)</sup>.

ウェルナー症候群は、世界の症例1200例のうち、約70%が日本において報告されたものである。最も顕著な症状は、早老症で、20代から白髪、皮膚の硬化、白内障などの症状が始まり、患者平均的寿命は46-47才である<sup>76)-78)</sup>. ウェルナー症候群患者の細胞においては、細胞寿命の短縮、telomereの短縮、染色体の欠失、転座の亢進が観察され<sup>79), 80)</sup>, 細胞は、topoisomerase Iの阻害剤であるcamptothecin<sup>81)</sup> や4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO)<sup>82)</sup> に感受性を示すことが報告されている。

ロトムント・トムソン症候群は、高発癌の他に、発育不全や早老症を呈し、ブルーム症候群、ウェルナー症候群、両症候群を併せ持つような症状を呈する<sup>24), 83)</sup>. 世界で200例が報告されており、メキシコ人系で高い。日本人でも、数例の報告がある。ロトムント・トムソン症候群の患者細胞においては、染色体のモザイク化現象が観察され、細胞は、UV, 放射線に感受性を示す<sup>84)</sup>.

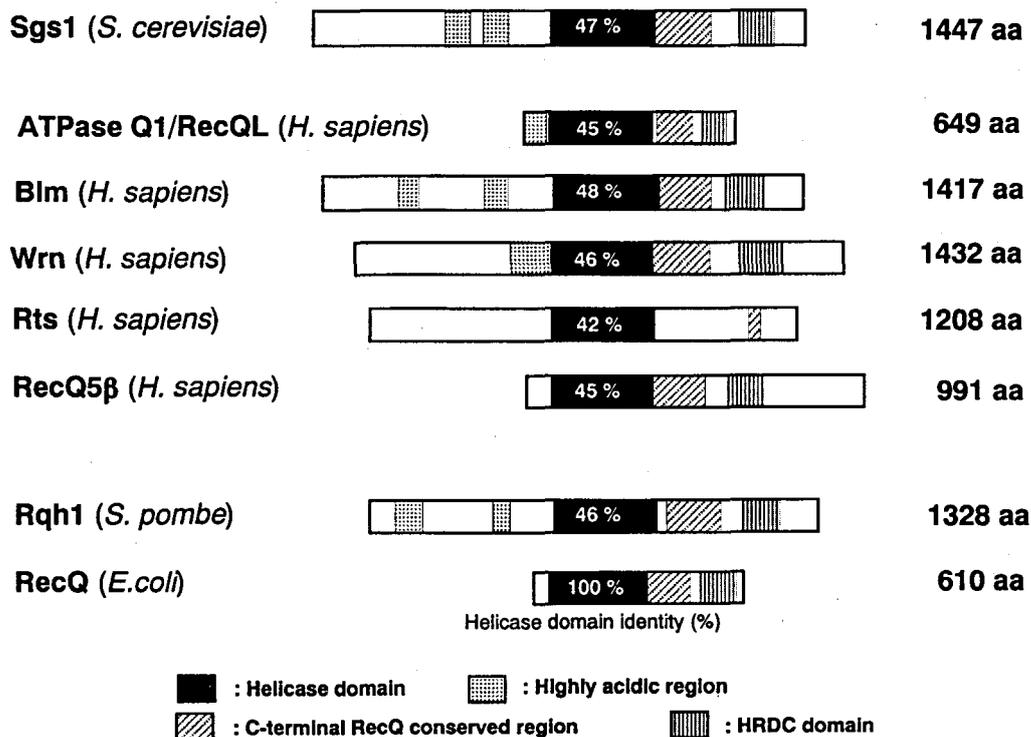


Fig. 2 Comparison of RecQ family protein

DNA helicase Q1/RecQL, RecQ5の変異に由来する、遺伝性疾患は現在までのところ報告されていない。RecQ5については、最近、Topo III  $\alpha$ および $\beta$ と相互作用することが報告された<sup>85)</sup>。

## 5.2 出芽酵母SGS1

SGS1は、出芽酵母においてDNA topoisomerase III (Top3)の遺伝子破壊株の増殖遅延を相補する変異遺伝子として1994年に同定され、slow growth suppressorの頭文字を取ってSGS1と名付けられた<sup>86)</sup>。出芽酵母において、top3変異株は、野生株に比べて細胞増殖が遅延し、細胞はlate S/G2に停止していた。また、DNA繰り返し配列間の遺伝子組み換え頻度の上昇が観察され、胞子形成が低下していた<sup>86)</sup>。top3変異株を継代して培養していると、増殖遅延が回復する株が高頻度で生じてくる。この増殖遅延を回復した変異株を解析したところ、更に別の遺伝子に変異が入っていることがわかり、その遺伝子を同定して得られたのがSGS1である。sgs1-top3二重遺伝子変異株においては増殖遅延が回復するが、sgs1単独の変異株においては、細胞増殖の速度は変化せず野生株と同様であった。また、sgs1-top3二重遺伝子変異株においては、top3変異株の高頻度組み換えも抑制された。Sgs1は、1447 aa、DEAH型のDNA helicaseで、大腸菌においてDNA修復および組み換えに関与しているRecQにhelicase domainにおいて高い相同性を有している。Two-hybrid systemによる実験の結果、Sgs1はDNA topoisomerase III (Top3)<sup>86)</sup>およびDNA topoisomerase II (Top2)<sup>87)</sup>と相互作用することが明らかにされた。SGS1遺伝子がコードする蛋白質は、ほぼ中央部分に大腸菌RecQに相同性を有するhelicase domainが存在し、helicase domainのRecQとの相同性は47%であった。SGS1遺伝子は、さらにhelicase domainの両側に長いN末、C末部分があり、N末側には、highly acidic region、C末側には、C-terminal RecQ conserved region, helicase and RNaseD C-terminal (HRDC) domainを有していた。Sgs1は実際にDNA helicase活性を有することが明らかにされた<sup>88), 89)</sup>。また、Sgs1は、G-G pairの4重鎖DNAを巻き戻す活性も有していた<sup>90)</sup>。

これまでに、sgs1変異株においては、体細胞分裂期および減数分裂期における染色体分配の正確さの低下<sup>87)</sup>、体細胞分裂期の相同染色体間のDNA組み換え頻度の上昇、非相同組み換えの頻度の上昇が報告されている<sup>91), 92)</sup>。また、我々の研究グループにおいても、sgs1変異株において姉妹染色分体交換 (SCE) が亢進することを報告した<sup>93)</sup>。

またsgs1変異株において母細胞のみの分裂を観察すると、細胞の分裂寿命が40%にまで低下し、Sgs1が老化の抑制に関与していることが示された<sup>94)</sup>。出芽酵母に

おいては、細胞の継代に伴って核小体機能が低下すると同時に、染色体から組み換えにより生じるrDNAのリング (extrachromosomal rDNA circle : ERCs) の増加が観察されるが、sgs1変異株においては、この反応が野生株より早く進行し、母細胞の老化の進行が早く進んでいると考えられた<sup>95)</sup>。

現在までに報告されているRecQ family蛋白質は、その大きさにより、大きく2つに分類される。大腸菌RecQ, マウスmRecQL, mRecQ5, ヒトDNA helicase Q1/RecQL, RecQ5は、600~900 aaでhelicase domainの後ろのC末側にのみ長い配列を持つものである。もう1つのグループは、出芽酵母Sgs1, 分裂酵母Hus2/Rqh1/Rad12, マウスBlm, Wrm, ヒトBlm, Wrm, Rts/RecQ4で、約1400 aaからなるものである。後者のグループは、helicase domainの両側に様々なN末、C末領域を有している<sup>24)</sup>。

出芽酵母においてはゲノムプロジェクトが終了し、全ゲノム配列の情報がdatabaseを用いて検索可能になった。RecQ相同遺伝子間で高く保存されているhelicase domainをプローブとして、出芽酵母のゲノムライブラリーを検索した結果、SGS1以外の遺伝子は得られなかった。ヒトにおいては既に、5つのRecQ family蛋白質が報告されていることから、進化の過程で分かれ、機能を別にしてきたことが推測され、酵母細胞においてSgs1蛋白質はヒトにおけるRecQ family蛋白質の機能をオーバーラップして担っていると考えられる。

## 5.3 出芽酵母Sgs1の機能とヒトRecQ相同遺伝子産物の機能

我々のグループにおいて、Sgs1の酵母細胞における機能について検討した結果、

1) 出芽酵母においてSgs1は、体細胞分裂期のDNA修復、DNA組み換えにおいて機能を果たしていることを明らかにした<sup>65)</sup>。

sgs1遺伝子破壊株は、アルキル化剤 (MMS, EMS, MNNG), およびHUに感受性を示し (Table 3), interchromosomal recombinationが亢進していることを見いだした (Table 4)。これらの結果より、出芽酵母においてSgs1は、体細胞分裂期のDNA修復、DNA組み換えにおいて機能を果たしていることを明らかにした。sgs1遺伝子破壊株は、アルキル化剤 (MMS, EMS, MNNG) に感受性を示すという結果は、ブルーム症候群患者の細胞がアルキル化剤 (EMS) に感受性を示すという報告と一致していた<sup>97)</sup>。MMS, EMS, MNNG等のアルキル化剤は、DNAの塩基部分のアルキル化<sup>98)</sup>、塩基の変異および欠失、single-strand DNA, double-strand DNAの切断を生じること<sup>99)</sup>が知られている。また、アルキル化剤によるDNA傷害がS期通過後dsDNAの切断を引き起こす

ことも報告されている<sup>100)</sup>。そのため、これらのアルキル化剤により引き起こされるDNA傷害に対して、様々なDNA修復機構が働いていると考えられる。我々の研究グループにおいて、MMSによるDNA傷害に対するSgs1によるDNA修復機構について、詳細な検討を進めた。出芽酵母においては、既にDNA傷害に対する修復経路とそれに関わる因子が同定されていることからこれらの既存のDNA修復経路にSgs1が関与するか、epistasis testによる解析を行った結果、SGS1は、RAD51, RAD52と同じepistasis groupに属することが示され、Sgs1が関与するDNA修復経路に相同組み換え修復機構があることが明らかになった<sup>101)</sup>。

SGS1のDNA修復における機能を考える上で、重要な役割を果たしている因子として、注目される遺伝子がSRS2である。Srs2は、Sgs1と同様に3'→5' helicase活性をもつことが知られている<sup>102)</sup>。srs2とsgs1の二重遺伝子破壊株は、致死になる株と致死にならないまでも強い増殖阻害が起きる株があることが報告されている<sup>103)</sup>、<sup>104)</sup>。我々の研究グループにおいても、srs2遺伝子破壊株

は、僅かにMMS, HU感受性を示したが、srs2-sgs1二重遺伝子破壊株は、非常に強いMMS, HU感受性を示した。また、srs2破壊株をbackgroundとしたsgs1温度感受性株 (srs2-sgs1-ts) を制限温度下で培養すると、DNA合成, RNA polymerase I transcriptionが阻害された<sup>102)</sup>。したがって、Sgs1とSrs2は別々の経路で機能しているが、DNA修復, DNA合成, RNA polymerase I transcriptionにおいてその経路は一部が重複していると考えられる。

sgs1遺伝子破壊株は、体細胞分裂期においてinterchromosomal homologous recombinationが亢進していた。これまでに、sgs1変異株においては、体細胞分裂期および減数分裂期における染色体分配の正確さの低下<sup>87)</sup>、体細胞分裂期の相同染色体間のDNA組み換え頻度の上昇、非相同組み換えの頻度の上昇が報告されている<sup>91), 92)</sup>。また、我々の研究グループにおいても、sgs1変異株において姉妹染色分体交換 (SCE) が亢進することを報告した<sup>93)</sup>。組み換えにおける頻度の上昇は、ブルーム症候群患者の細胞におけるSCE頻度上昇<sup>72)</sup>、ウ

Table 3 Sensitivity of *sgs1* disruptants to various DNA damaging agents

Strain background		W303	YPH	MR
Genotype		<i>sgs1::URA3</i>	<i>sgs1::URA3</i>	<i>sgs1::URA3</i>
UV	200 J / m <sup>2</sup>	+	+	+
X-ray	8 Krad	+	+	N.D
MMS	0.01%	-	-	-
EMS	0.2%	-	-	N.D
MNNG	0.001%	-	-	N.D
Mitomycin C	100 µg/ ml	+	+	N.D
Bleomycin	100 µg/ ml	+	+	N.D
Hydroxyurea	100 mM	-	-	-

+ : same degree as wild type, - : sensitive, N.D : not determined, MMS : methylmethanesulfonate, EMS : ethylmethanesulfonate, MNNG : N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

Table 4 Effect of *sgs1* disruption on interchromosomal homologous recombination in mitosis

Strain	Genotype	Plasmid	Mitotic recomb. (His <sup>+</sup> frequency)
MR101	SGS1 / SGS1	vector	5.8 x 10 <sup>-5</sup>
MR301	<i>sgs1::AUR / sgs1::AUR</i>	vector	42.1 x 10 <sup>-5</sup>
		SGS1	7.0 x 10 <sup>-5</sup>

エルナー症候群患者の細胞における、染色体の欠失、転座の亢進が<sup>79), 80)</sup> ロトムント・トムソン症候群における染色体モザイク現象<sup>84)</sup> と関連していると考えられる。また、ウェルナー症候群、ロトムント・トムソン症候群において観察される早期老化の症状とも深い関連があると考えられる。

Sgs1の機能のユニーク (特徴的) な点は、体細胞分

裂期と減数分裂期の組み換えに対する作用が、一見、全く逆なところである。体細胞分裂期では抑制的に作用しており、遺伝子破壊株はhyper recombinationとなる。これに対して、減数分裂期においては、促進的に働いており、遺伝子破壊株においては組み換えの頻度が低下する。しかしながら、これらは、生体の本質的な機能を考えると、大変合理的といえる。つまり体細胞分裂期にお

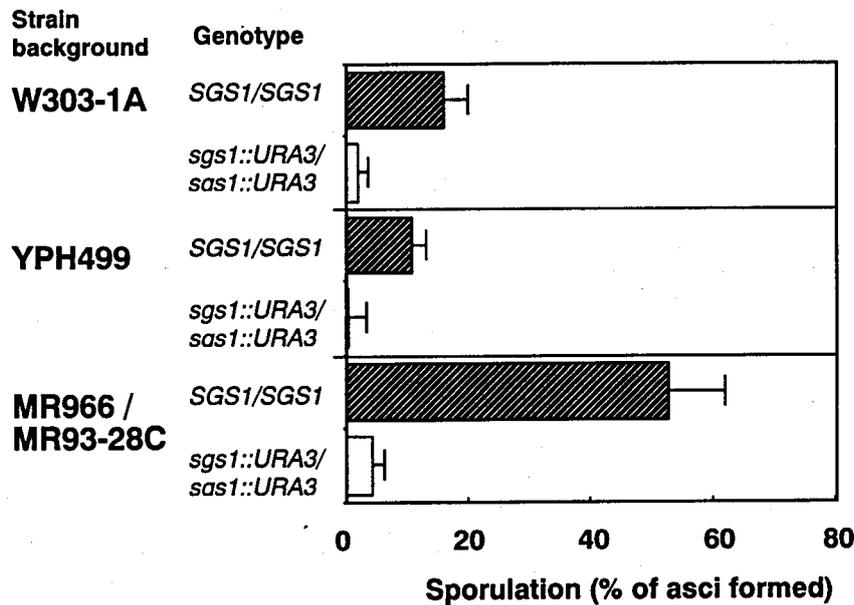


Fig. 3 Poor sporulation of *sgs1* disruptants

Diploid cells incubated on YPD plates for 2 days were transferred onto 1% KAC plates and incubated for 5 days to allow sporulation. Sporulation was monitored with a phase-contrast microscope and the percentage the cell number which formed asci was measured.

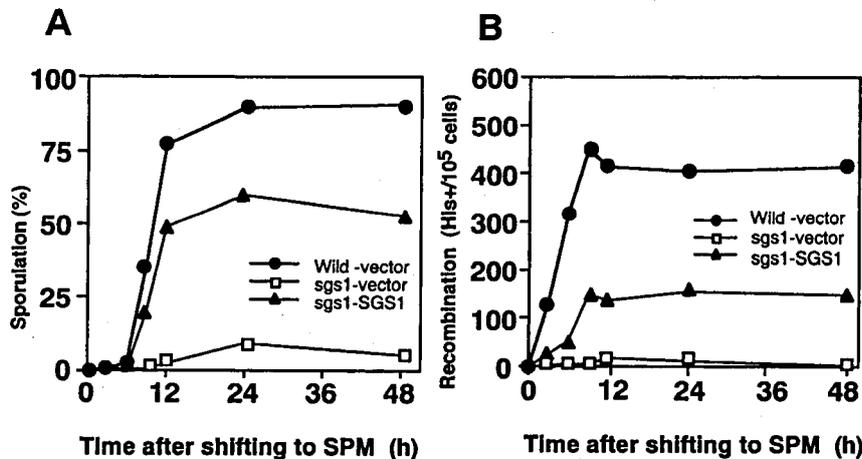


Fig. 4 Poor sporulation and reduction in the level of intergenic recombination of *sgs1* disruptant

Cells were removed at various times after shifting to SPM. Aliquots of 1 ml were taken at the various time points after shifting to SPM, and the sporulation, recombination and cell viability were examined. MR101 (wild type) tvector (●), MR202 (*sgs1::URA3*)+vector (pRS314) (□), MR202+SGS1 (pYCP1305) (▲). (A) Sporulation was monitored with a phase-contrast microscope and the percentage of the cell number which formed asci was measured. (B) The frequency of recombination between the *his1-1* and *his1-7* alleles was measured by return to-growth-assay. The frequency was examined by the number of forming colonies on SC-His(-) plates versus the number of forming colonies on SC plates after incubation for 3 days at 28 °C.

いては、DNA修復も含めて、よりミスが少なく遺伝情報を複製、維持することが必要である。一方、減数分裂期においては、より多彩な組み換えにより、環境に順応、進化できることが必要とされる。この両過程における作用を、Sgs1は、共に作用する蛋白質（相手となる役者）を変えることで、制御していると考えられる。

2) Sgs1は減数分裂期において機能を果たしていることを明らかにした。

*sgs1* 遺伝子破壊株は、胞子形成の低下、減数分裂組み

換え頻度の低下を示した (Fig. 3, 4)。また、*SGS1* mRNAの誘導が胞子形成の進行時に観察された (Fig. 5)。

ヒトの臓器・組織における mRNA の発現は、*BLM* は胸腺と精巣、*WRN* は脾臓、精巣、卵巣、*RTS* は胸腺と精巣で高い<sup>71)</sup>。*BLM*、*WRN*、*RTS* の mRNA が高発現する臓器・組織は、臨床症状の現れる部位と関連していると考えられる。さらにブルーム症候群患者において、男性患者の精子形成不全が報告されている<sup>105)</sup>。

マウスにおいては、精巣において特に高い発現が観察され、精子形成の各ステージを追って *BLM* の発現につ

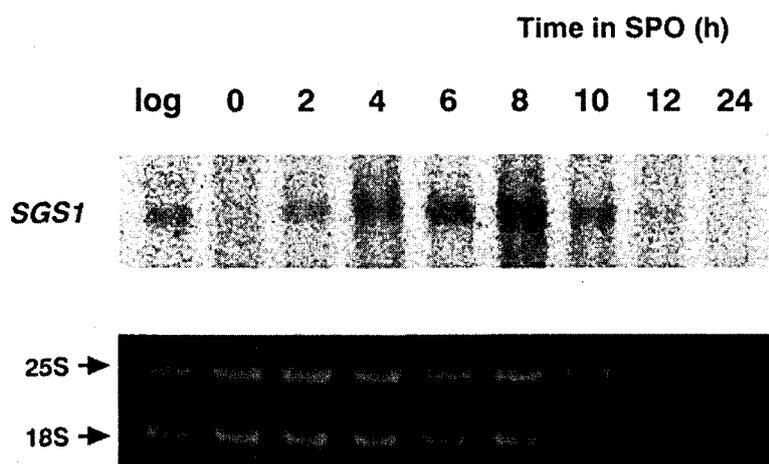


Fig. 5 Fluctuation in the level of *SGS1* mRNA after shifting to SPO

Wild-type cells were removed at various times after shifting to SPO. Total RNA was isolated from the cells, and aliquots (30  $\mu$ g) of the RNA were analyzed by Northern blotting.

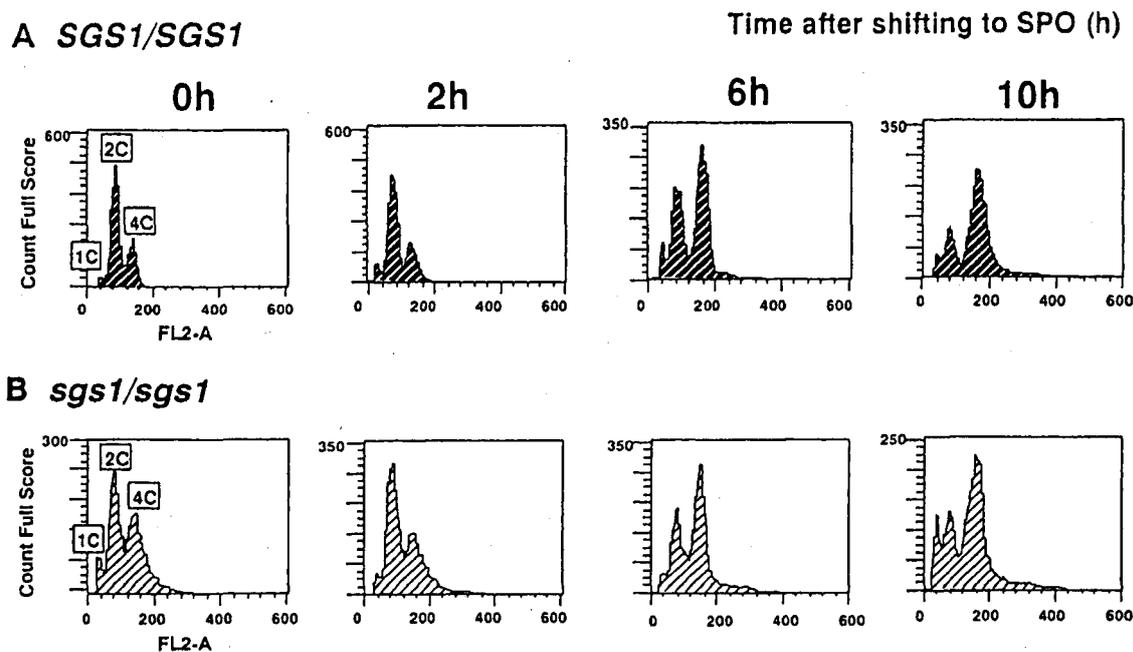


Fig. 6 Flow cytometrical analysis of DNA content

MR101 (*SGS1*) and MR202 (*sgs1::URA3*) cells were removed at various times after shifting to SPO and fixed with 70% ethanol. DNA content of the samples was analyzed with a FACScan/CellFIT System.

いて調べた結果、サイゴテン期の細胞が増加する生後17日目に顕著に増加していることが示された<sup>106)</sup>。さらに、Blm蛋白質は、精巣で減数分裂が起こる前のサイゴテン期の初期から後期に掛けてシナプトネマ複合体が形成されていく過程で、シナプトネマ複合体上にRPAと共にdot状に存在する<sup>107)</sup>。BLM遺伝子のノックアウトマウスの作製が試みられた結果、BLMのノックアウトマウスは胎生致死で、発生の遅れが観察された<sup>108)</sup>。胎生13.5日までにほとんどの胚が死滅し、その理由はapoptosisによるものと考えられた。

酵母細胞の減数分裂の過程を追いながら、SGS1の減数分裂における機能について検討を行った結果、sgs1遺伝子破壊株においては、減数分裂前DNA合成は野生株と同程度に進行していた (Fig. 6)。次に減数分裂期における、二本鎖切断産物、遺伝子組み換え産物について解析した。減数分裂組み換えの過程は、Fig. 7のように進行する。減数分裂組み換えの最初のステップは、染色体にDNA double strand break (二本鎖切断, DSB) が入る過程である<sup>109)–113)</sup>。まず最初に、Mre11, Spo11により

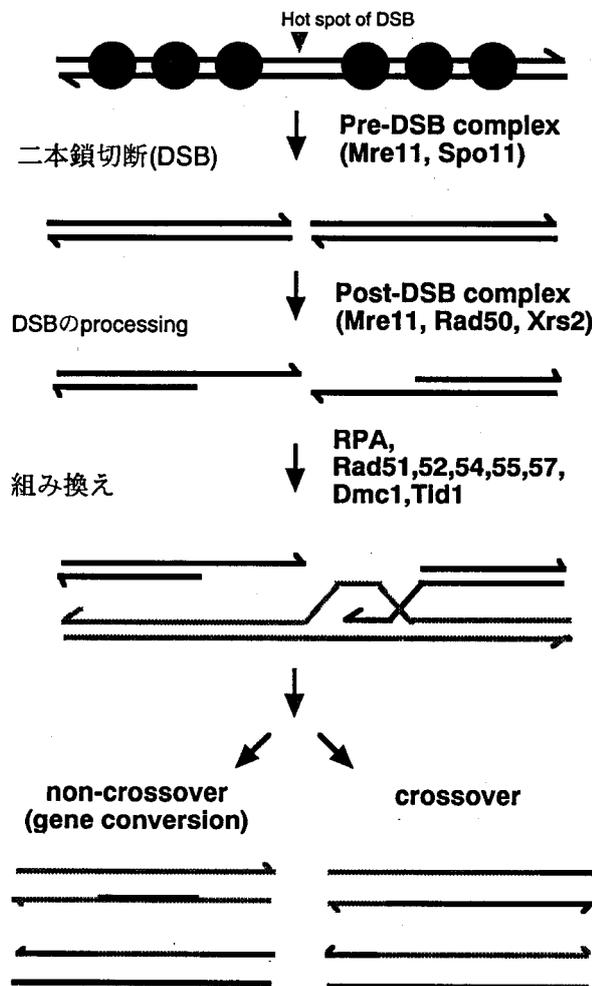
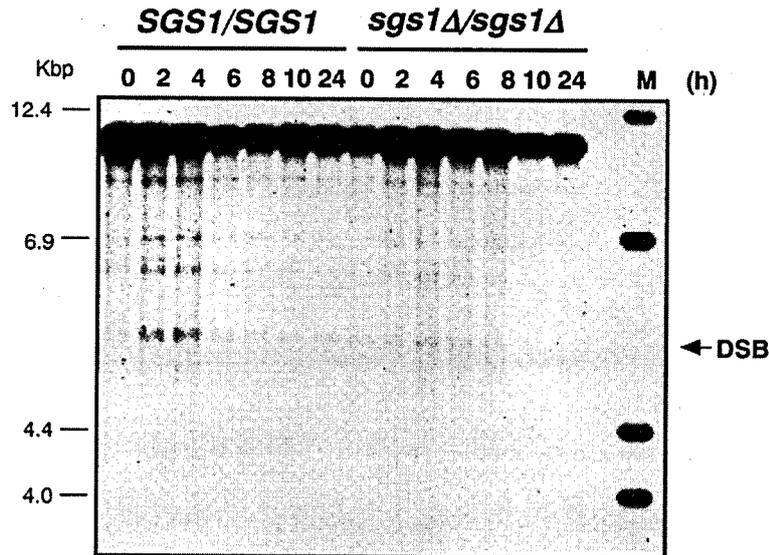


Fig. 7 Meiotic recombination process in yeast

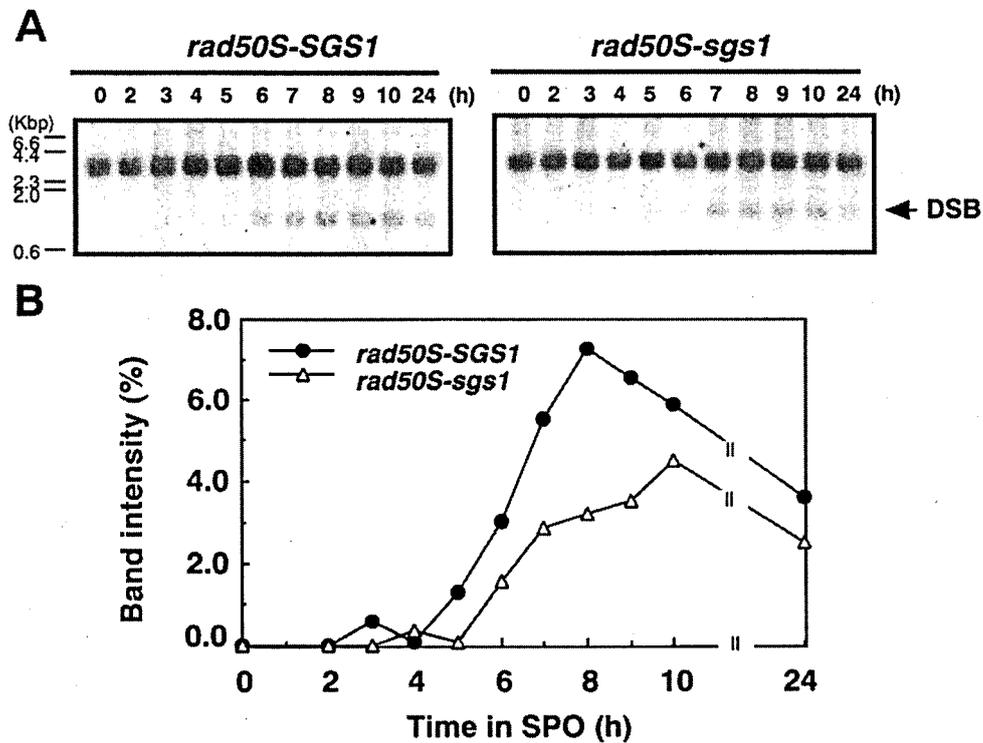
能動的にDSBが導入される。次に、Rad50, Xrs2が導入されMre11と複合体を形成し、Spo11の除去と exonuclease活性によりDSB末端からのDNA鎖の消化 (DSBのprocessing) を行う<sup>114)–119)</sup>。Mre11複合体によるDSBのprocessingにより露出された1本鎖DNAにRPA (replication protein A) が結合し、そこにRad51, 52, 54, 55, 57等が結合し組み換え反応が開始する<sup>120), 121)</sup>。1本鎖DNAに結合しているRPAに、まずRad52が結合し<sup>122)</sup>、Rad55, 57存在下で、Rad52にRad51が結合すると、Rad51同士で重合し、フィラメント構造を形成する<sup>123)</sup>。さらにRad51にRad54が結合し、相同染色体の検索、鎖交換反応が進行する<sup>124)–127)</sup>。修復DNA合成とHolliday構造の解離により、crossover型もしくはnon-crossover (gene conversion) 型の組み換え産物が生じる<sup>109)</sup>。non-crossover型の組み換え産物の場合には、DNAの連結とミスマッチ修復が行われる<sup>128)</sup>。二倍体酵母株を用いて、減数分裂組み換えにおけるDSB産物について制限酵素切断断片多型法 (RFLP: restriction fragment length polymorphism)-Southern hybridization法により<sup>129), 130)</sup>解析を行った結果、DSB量の減少と進行の遅れが観察された (Fig. 8)。DSBのprocessingが進行せず、DSBが蓄積していくことが知られているrad50S株をbackgroundとした場合には<sup>111), 117), 119), 131)</sup>、DSBの進行は少し遅れているが、rad50S-sgs1株においても、DSBがある程度導入されていた (Fig. 9)。同様の報告は、red1およびmek1/mre4変異株においても報告されている<sup>130)</sup>。red1およびmek1変異株において、DSBの減少が観察されるが、red1-rad50S, mek1-rad50Sの全体のDSB量はrad50Sとほぼ同程度のレベルであった。この理由としてDSB formationのkineticsが、red1およびmek1変異株においては、DSBからdouble Holliday junctionsに向かうrecombination checkpointにより抑制される方向に制御されていると推測される。

sgs1遺伝子破壊株においても、同様に、DSBの形成機構自身よりもDSB形成のkineticsが影響を受けている可能性が考えられる。遺伝子組み換え産物について解析した結果、crossover型、non-crossover型共に野生株と同程度観察された (Fig. 10)。

減数分裂に機能する遺伝子群では、ある遺伝子に欠損がある場合、以降のプログラムは進行しないが、別の経路は独立に進行することが知られている。SPO13は、第一減数分裂 (meiosis I) に必須な遺伝子で、spo13遺伝子破壊株は、第一減数分裂をbypassして第二減数分裂に進み、生育可能な2胞子ができる。そのため、組み換え初期に関与する遺伝子の破壊による胞子の致死性は、spo13遺伝子の破壊によりrescueすることが可能である<sup>132)–135)</sup>。MRE11は、減数組み換えの初期の過程に関与する遺伝子で、DSBの形成に関与する。そのため、

Fig. 8 Detection of DSB in *sgs1* disruptants

MR101 (*SGS1*) and MR301 (*sgs1Δ::AUR*) cells were harvested at various times after shifting to SPO. DNA samples were isolated from the cells, and aliquots (5 μg) of the DNA were digested with *Xho* I and separated in agarose gel. DSB was analyzed by Southern blotting in the YCR47C-YCR48W region.

Fig. 9 Accumulation of DSB in *rad50S-sgs1* mutants

Wild-type cells and *sgs1* disruptants of *rad50S* background, S1510 (*SGS1*) and RKH 221 (*sgs1::AUR*), were harvested at various times after shifting to SPO. DNA was isolated from the cells, and aliquots (5 μg) of the DNA were separated in agarose gel. DSB was analyzed by Southern blotting in the YCR47C-YCR48W region. (B) The intensity of the band corresponding to DSB was quantified and expressed as a percentage of the intensity of all bands in the lane. *rad50S-SGS1* (●), *rad50S-sgs1* (△).

*mre11* 遺伝子破壊株は、DSB形成が正常に進行せず、胞子は致死となる<sup>114), 136), 137)</sup>。そこで *SPO13*, *MRE11* と *SGS1* の二重遺伝子破壊株を作製し、胞子形成能、胞子

の生存率について tetrad analysis, 減数分裂組み換えについて検討した。その結果、大部分の *sgs1-spo13* 破壊株は、*spo13* 破壊株と異なり第一減数分裂 bypass する事が

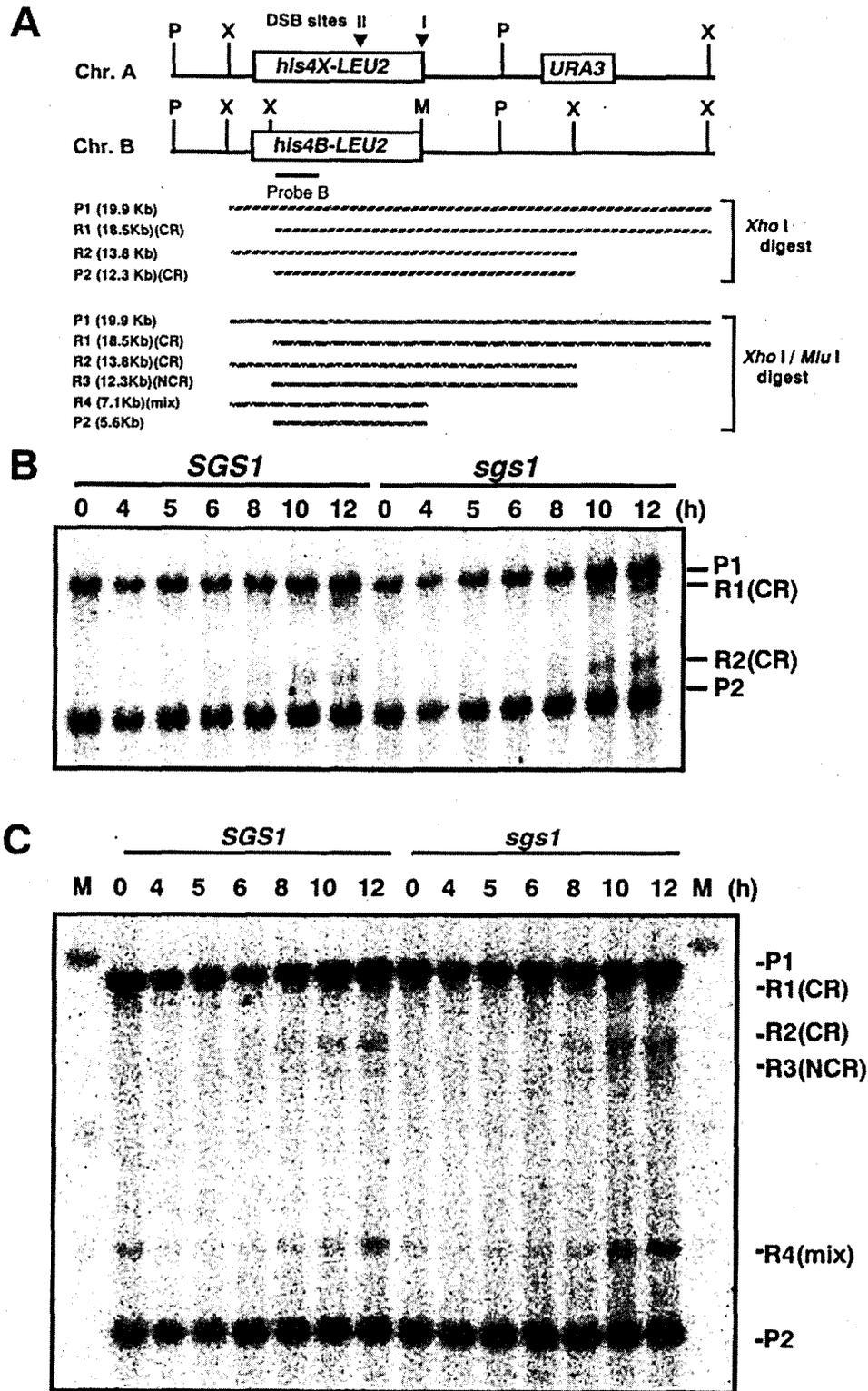


Fig. 10 Detection of physical recombinants *sgs1* disruptants

(A) A map of the *his4-LEU2* locus on Chromosome III. P, X, and M indicate the restriction sites of *Pst* I, *Xho* I and *Mlu* I, respectively. P1 and P2 indicate the fragments derived from the parental DNAs after digestion with *Xho* I or *Xho* I/*Mlu* I. R1 and R2 indicate the fragments derived from crossover products. R3 indicate the fragments derived from non-crossover product. (B)(C) NKY2846 (*SGS1*) and RKH225 (*sgs1::AUR*) cells were harvested at various times after shifting to SPO. DNA was isolated from the cells, and aliquots (5  $\mu$ g) of DNA digested with *Xho* I (B) or *Xho* I/*Mlu* I (C) were analyzed by Southern blotting. Probe B was derived from pNKY155.

Table 5 Sporulation, spore viability and recombination in *sgs1-spo13* and *sgs1-mre11* double gene disruptants

Strain	Genotype	Mitotic recomb <sup>a</sup>	Sporulation <sup>b</sup>		Spore viability <sup>c</sup>	Meiotic recomb <sup>d</sup>
		(His+ frequency)	(%) 24 h	(%) 96 h	(%)	(His+ frequency) 24 h
MR101	<i>SGS1 SPO13 MRE11</i>	$5.8 \times 10^{-4}$	81	88	75/84 (89.3)	$37.9 \times 10^{-3}$
ds1	<i>sgs1</i>	$57.6 \times 10^{-4}$	8	10	72/124 (58.1)	$3.9 \times 10^{-3}$
ds13*	<i>spo13</i>	$9.5 \times 10^{-4}$	52*	79*	48/120 (40.0)	$6.5 \times 10^{-3}$
ds1s13*	<i>sgs1 spo13</i>	$56.3 \times 10^{-4}$	10*	15*	15/128 (11.7)	$3.9 \times 10^{-3}$
ds1m11	<i>sgs1 mre11</i>	$38.8 \times 10^{-4}$	0.6	0.1	0/120 (0.0)	$0.2 \times 10^{-3}$
ds13m11*	<i>spo13 mre11</i>	$44.6 \times 10^{-4}$	33*	55*	86/136 (63.2)	$0.1 \times 10^{-3}$

<sup>a</sup>The frequency of mitotic recombination between the *his1-1* and *his1-7* alleles was examined by measuring the number of colonies on SC-His(-) plates versus the number of colonies on SC plates.

<sup>b</sup>Diploid cells were pre-cultured in SPS and inoculated into SPO at a density of  $2 \times 10^7$  cells/ml with vigorous shaking. Aliquots of 1 ml were taken at the time points, and the sporulation was monitored at the time of 24 or 96 h after shifting to SPO with a phase-contrast microscope and the percentage of tetrads (or dyads (\*) for *spo13* disruptants) versus total cell number was examined.

<sup>c</sup>Spore viability was determined for after dissection, by dividing the number of spores forming colonies by the total number dissected.

<sup>d</sup>The frequency of meiotic recombination between the *his1-1* and *his1-7* alleles was examined at time of 24 h after shifting to SPO by the number of forming colonies on SC-His(-) plates versus the number of forming colonies on SC plates.

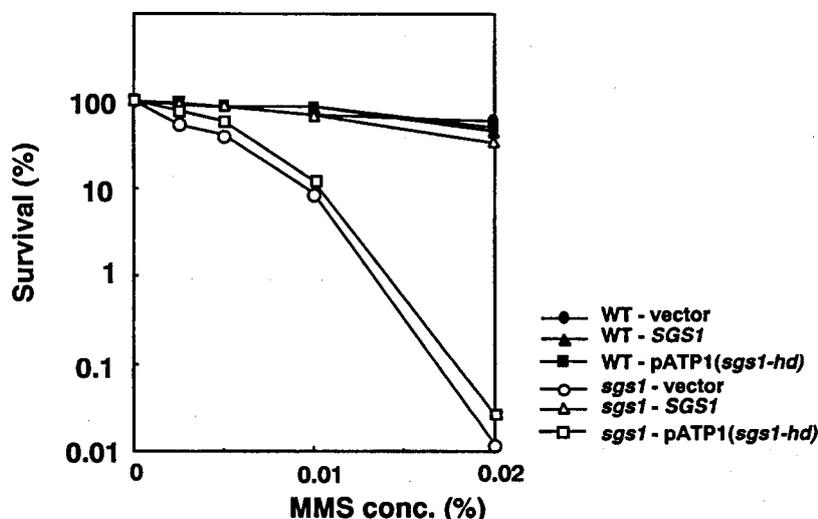
できなかった。*sgs1-mre11*破壊株では、*mre11*株と同様、胞子は致死であった (Table 5)。

以上の結果から、Sgs1はHolliday junctionsの解離に必須では無いと考えられ、check pointも含めて、減数分裂前DNA合成の終了からDSB形成の間の過程に、DSB形成のkineticsを制御するかたちでSgs1は機能していると考えられた。しかしながら、いったん、DSBが入ることができた細胞株については、その後のDSBのprocessing等の過程は通常に進行し、組み換えの過程が

野生株と同様に進行すると考えられた。

3) 部位特異的変異導入、N末、C末の欠失vectorを用いた解析の結果、Sgs1の機能の発現に重要な部位を明らかにした<sup>138), 139)</sup>。

Sgs1の機能において、体細胞分裂期と減数分裂期の機能において、helicase活性の要求性が異なることを初めて明らかにした。疾患と対応した変異vectorを使用した酵母細胞実験系は、患者の持つ変異を評価する上で有

Fig. 11 Effect of pATP1(*sgs1-hd*) on MMS sensitivity of *sgs1* disruptant

Wild type cell(MR101) was transformed with vector (pRS314) (●), full length of *SGS1* (▲), and pATP1(*sgs1-hd*) (■). *sgs1* disruptant(MR301) was transformed with vector (pRS314) (○), full length of *SGS1* (△), and pATP1(*sgs1-hd*) (□). Transformed cells were cultured in SC medium lacking Trp at 28 °C, diluted and inoculated on SC plate lacking Trp, with indicated concentration of MMS.

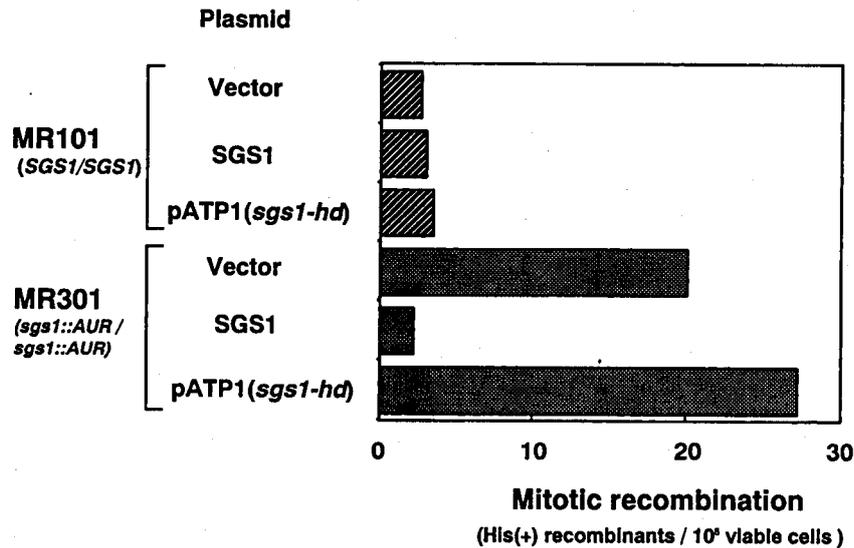


Fig. 12 Effect of pATP1 (*sgs1-hd*) on mitotic interchromosomal homologous recombination of *sgs1* disruptant

用なモデル系であると考えられた。Sgs1は、生化学的解析により、3'→5' helicase 活性を持つことが示されている<sup>88)</sup>。そこで、RecQ helicaseにおいて高度に保存されている helicase motif I に変異を入れた pATP1 (*sgs1-hd*) を作製した。pATP1 はこの変異により helicase 活性が消失することが、既に報告されている<sup>89)</sup>。pATP1 を、*sgs1* 遺伝子破壊株に発現させ、MMS, HU 感受性、体細胞分裂期の組み換えに及ぼす影響について検討した。pATP1 は *sgs1* 遺伝子破壊株において、MMS 感受性、HU 感受性、体細胞分裂組み換えの亢進を相補することができなかつたのに対して、pATP1 は孢子形成率および減数分裂組み換えの低下をある程度まで回復した。以上の結果から、減数分裂期の Sgs1 の機能には helicase 活性が要求されないと考えられ、体細胞分裂期および減数分

裂期の Sgs1 の機能における helicase 活性の要求性が異なることを初めて明らかにした。

我々の研究グループにおいて、MMS, HU による DNA 傷害に対する DNA 修復の他、SCE の亢進の相補においても、pATP1 では相補することができず、helicase 活性が必要であることを見いだした<sup>93)</sup>。また、*top1-sgs1* 破壊株の増殖遅延の回復に、helicase 活性は必要でないことが報告されている<sup>140)</sup>。一方、*top3-sgs1* 破壊株の増殖の抑制には、helicase 活性は必要であった<sup>141)</sup>。

以上の結果をまとめると Fig. 13 のようになる。MMS, HU による傷害に対する DNA 修復、体細胞分裂期の組み換え、*top3* 破壊株による増殖抑制の回復には、Sgs1 の helicase 活性を必要とした。孢子形成、減数分裂組み換えおよび、*top1* 破壊株の増殖抑制においては、Sgs1 の

Table 6 Dissection of Sgs1 functions

Strain	plasmid	<sup>a</sup> Sporulation		<sup>b</sup> Meiotic recomb.
		(% of asci formed)		(His+ frequency)
		12 h	24 h	24 h
MR101 (WT)	+ vector	82	89	27.8 × 10 <sup>-3</sup>
	+ pSGS1	82	89	26.1 × 10 <sup>-3</sup>
	+pATP1 ( <i>sgs1-hd</i> )	81	89	24.1 × 10 <sup>-3</sup>
MR301 ( <i>sgs1</i> Δ)	+ vector	7.0	9.2	5.5 × 10 <sup>-3</sup>
	+ pSGS1	25	58	24.8 × 10 <sup>-3</sup>
	+pATP1 ( <i>sgs1-hd</i> )	28	51	17.3 × 10 <sup>-3</sup>

<sup>a</sup>Wild-type cells (MR101) and *sgs1* null deletion disruptants (MR301) were transformed with pRS314 (vector only), pYCp1305 (containing the full length of *SGS1*), and pYCp1309 (pATP1; *sgs1-hd*). Sporulation was monitored with a phase-contrast microscope at 12 and 24 h after shifting to SPO.

<sup>b</sup>The recombination frequency between the *his1-1* and *his1-7* alleles was examined at 24 h (for RTG assay) after shifting to SPO.

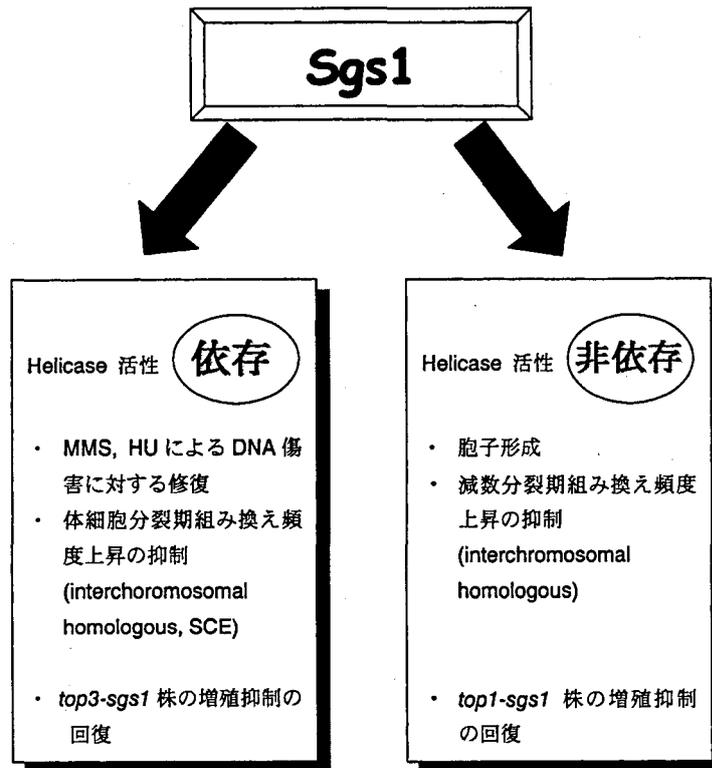


Fig. 13 Function of Sgs1 helicase

helicase 活性はを必要とされず、蛋白質の構造や、他の蛋白質との相互作用が重要であることが考えられた。

Sgs1 の N 末、C 末の部分の機能について解析を進めるため、N 末、C 末欠失および、Sgs1 の helicase domain より上流部位の highly acidic region など幾つかの領域を欠失させた *SGS1* vector を作製した。これらの改変 *SGS1* vector を用いて、*sgs1* 遺伝子破壊株の DNA 修復 (MMS, HU 感受性)、体細胞分裂期組み換え、胞子形成、減数分裂期組み換えに及ぼす作用について検討した。その結果、DNA 修復および体細胞分裂期組み換えについては、helicase 活性が必須で、N 末 1-45 aa および 698-1195 aa の helicase domain, RecQ conserved region が必要であり、減数分裂における機能については、helicase 活性は必須ではなかったが、126-400 aa, 596-1195 aa 部分が必要であることを示した (Fig. 14)。酵母 Two-hybrid system を用いた解析の結果、Sgs1 の N 末 1-283 aa は Top3 と、446-746 aa は Top2 と相互作用する事が示されており、両機能において、これらの蛋白質との相互作用が大きく関与していることが示唆された。

これら結果を、ヒト RecQ family 蛋白質と比較、適応することにより、Blm, Wrn, Rts 蛋白質の機能において重要な部位および、他の蛋白質との相互作用に重要な部位を推測するのに、有益な知見となることが期待できる。蛋白質の高次構造、他の蛋白質との相互作用を含めた解析を進めることにより、*SGS1* の機能および、ヒト RecQ

相同遺伝子の機能、疾患発症のメカニズムについて、さらに詳細な解析が進められることが期待される。また、今後、新しい疾患に関わる遺伝子の検索に発展することが期待される。

## 6. おわりに

酵母でなされた変異株を用いた分子遺伝学的な研究は、高等動物細胞 (哺乳類細胞) における相同遺伝子の機能解析の研究の発展に大いに寄与した。酵母細胞は下等ではあるが真核細胞に属しており、その機能が下等から高等生物に至るまで良く保存されている場合には、高等な真核生物における機能の解析において良いモデル系となる実際的な例を、DNA helicase 遺伝子の機能解析研究は数多く示している。酵母において特定の機能を持った遺伝子が、進化の過程で分化する際に、保存される生体機能と新たに獲得する生体機能とが存在する。RecQ family 蛋白質においては、大腸菌 RecQ は、出芽酵母 Sgs1 に進化する過程で、長い N 末、C 末を獲得し、他の蛋白質との相互作用を可能にし、DNA helicase 活性を必要としない機能もあった。更にその N 末、C 末が、それぞれの必要に応じて進化しそれぞれが保存されて、最終的にヒトにおいては 5 種類の RecQ family 蛋白質として機能するに至っている。

疾患において臨床症状として現れてくる症状は、個々の細胞における機能の変化がもとであったとしても、組

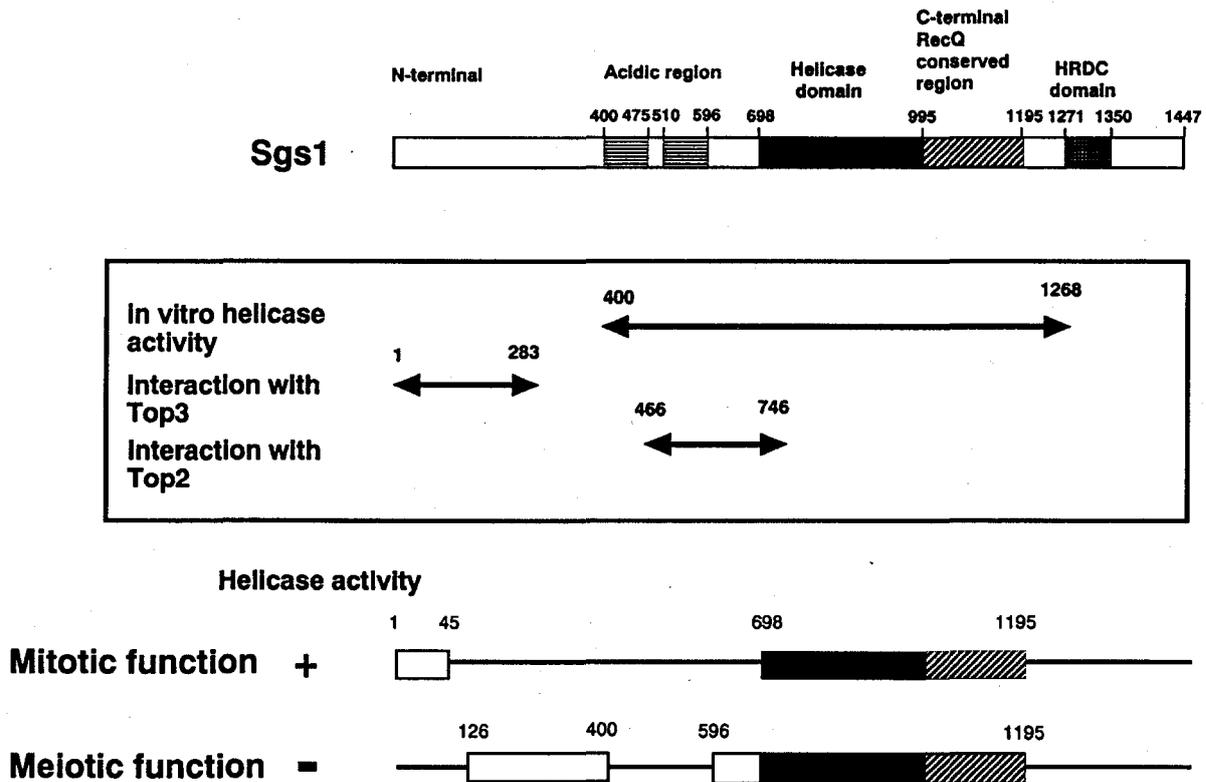


Fig. 14 Schematic diagrams of domains of Sgs1 for mitotic and meiotic functions

The symbols + and - indicate to require and not require helicase activity for the functions, respectively.

織, 全身症状として現れ, 最終的には個体全体の表現型や寿命などに影響をする. これらの結果は, 1つの遺伝子の欠損により, 複合的に生じてくる結果である. 分化した各組織 (臓器) における表現型の差は, 疾患遺伝子の発現量の差, 疾患遺伝子と相互作用する遺伝子産物の差が各細胞におけるその遺伝子の機能を修飾し, 病変となって現れると推測される. 近年, 高等真核生物における機能解析として, 全身症状を観察するためノックアウト マウスを作成し, その表現型を観察されることが多い. しかしながら, 得られたノックアウト マウスの表現型が, ヒトにおける表現型から予想されたものとはかなり異なることがある. 実際, *BLM* 遺伝子のノックアウト マウスは胎生致死で, *WRN* 遺伝子のノックアウト マウスは早老症を呈さなかった. この結果は, マウスとヒトにおける *Blm*, *Wrn* の機能の違いによるもの, およびマウスとヒトの発生の過程, テロメアの構造の違い等によるものと考えられるが, この相違がヒトにおける *RecQ* family 蛋白質の機能解析において, その過程が遺伝子のターゲットとなることが示され, さらにヒトにおける疾患発症のメカニズム解析に役立つことが期待される.

謝辞

本研究の遂行にあたり, ご支援いただきました大野泰雄部長に深く感謝いたします. また, 数々のご協力, ご助言をいただきました薬理部の皆様にも心より感謝いたします. 本研究の遂行にあたり, ご指導, ご助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科遺伝子薬学分野, 榎本武美教授, 関政幸助教授に深く感謝いたします. そして, 本研究の総括に際し, 適切にご指導, ご鞭撻を賜りました, 東京大学大学院薬学系研究科生理化学教室, 堅田利明教授に謹んで感謝いたします.

本総説は, 学位論文「ブルーム症候群原因遺伝子の酵母相同遺伝子 *SGS1* の機能解析」より一部抜粋したものです.

#### 参考文献

- 1) Inter National Human Genome : *Nature*, **409**, 860-921 (2001)
- 2) Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., *et al.* : *Science*, **291**, 1304-1351 (2001)
- 3) <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/> Goffeau, A., Aert, R., Agostini-Carbone, M.L., *et al.* : *Nature*, **387**, 1-105 (1997)
- 4) [http://genome.wustl.edu/gsc/C\\_elegans/](http://genome.wustl.edu/gsc/C_elegans/), [http://www.sanger.ac.uk/Projects/C\\_elegans/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_elegans/)

- The C. elegans Sequencing Consortium : *Science*, **282**, 2012-2018 (1998)
- 5) [http://www.sanger.ac.uk/Projects/S\\_pombe/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pombe/)  
Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A. : *Nature*, **415**, 871-880 (2002)
- 6) Cho, R.J., Campbell, M.J., Winzler, E.A., Steinmetz, L., Conway, A., Wodicka, L., Wolfsberg, T.G., Gabrielian, A.E., Landsman, D., Lockhart, D.J., Davis, R.W. : *Mol. Cell*, **2**, 65-73 (1998)
- 7) Weeda, G., van Ham, R.C.A., Vermeulen, W., Bootsma, D., van der Eb, A.J., Hoeijmakers, J.H.J. : *Cell*, **62**, 777-791 (1990)
- 8) Weeda, G., Wiegant, J., van der Ploeg, M., Geurts van Kessel, A.H.M., van der Eb, A.J., Hoeijmakers, J.H.J. : *Genomics*, **10**, 1035-1040 (1991)
- 9) Park, E., Guzder, S.N., Koken, M.H.M., Jaspers-Dekker, I., Weeda, G., Hoeijmakers, J.H.J., Prakash, S., Prakash, L. : *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **89**, 11416-11420 (1992)
- 10) Flejter, W.L., McDaniel, L.D., Johns, D., Friedberg, E.C., Schultz, R.A. : *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **89**, 261-265 (1992)
- 11) Friedberg, E.C. : *Cell*, **71**, 887-889 (1992)
- 12) Sung, P., Bailly, V., Weber, C., Thompson, L.H., Prakash, L., Prakash, S. : *Nature*, **365**, 852-855 (1993)
- 13) Hwang, J.R., Moncollin, V., Vermeulen, W., Seroz, T., van Vuuren, H., Hoeijmakers, J.H.J., Egly, J.M. : *J. Biol. Chem.*, **271**, 15898-15904 (1996)
- 14) Coin, F., Marinoni, J.-C., Rodolfo, C., Fribourg, S., Pedrini, A.M., Egly, J.-M. : *Nature Genet.*, **20**, 184-188 (1998)
- 15) Troelstra, C., van Gool, A., de Wit, J., Vermeulen, W., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H.J. : *Cell*, **71**, 939-953 (1992)
- 16) Guzder, S.N., Habraken, Y., Sung, P., Prakash, L., Prakash, S. : *J. Biol. Chem.*, **271**, 18314-18317 (1996)
- 17) Selby, C.P., Sancar, A. : *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **94**, 11205-11209 (1997)
- 18) Taccioli, G.E., Gottlieb, T.M., Blunt, T., Priestley, A., Demengeot, J., Mizuta, R., Lehmann, A.R., Alt, F.W., Jackson, S.P., Jeggo, P.A. : *Science*, **265**, 1442-1445 (1994)
- 19) Tuteja, N., Tuteja, R., Ochem, A., Taneja, P., Huang, N.W., Simoncsits, A., Susic, S., Rahman, K., Marusic, L., Chen, J., Zhang, J., Wang, S., Pongor, S., Falaschi, A. : *EMBO J.*, **13**, 4991-5001 (1994)
- 20) Stayton, C.L., Dabovic, B., Gulisano, M., Gecz, J., Broccoli, V., Giovanazzi, S., Bossolasco, M., Monaco, L., Rastan, S., Boncinelli, E., Bianchi, M.E., Consalez, G.G. : *Hum. Mol. Genet.*, **3**, 1957-1964 (1994)
- 21) Gibbons, R.J., Picketts, D.J., Villard, L., Higgs, D.R. : *Cell*, **80**, 837-845 (1995)
- 22) Ellis, N. A., Groden, J., Ye, T.Z., Straughen, J., Lennon, D. J., Ciocchi, S., Proytcheva, M., German, J. : *Cell*, **83**, 655-666 (1995)
- 23) 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., Schellenberg G.D. : *Science*, **272**, 258-262 (1996)
- 24) Kitao, S., Shimamoto, A., Goto, M., Miller, R.W., Smithson, W.A., Lindor, N.M., Furuichi, Y. : *Nat. Genet.*, **22**, 82-84 (1999)
- 25) van Steeg, H., Kraemer, K.H. : *Mol. Med. Today*, **5**, 86-94 (1999)
- 26) Masutani, C., Kusumoto, R., Yamada, A., Dohmae, N., Yokoi, M., Yuasa, M., Araki, M., Iwai, S., Takio, K., Hanaoka, F. : *Nature*, **399**, 700-704 (1999)
- 27) Squires, S., Oates, D.J., Bouffler, S.D., Johnson, R.T. : *Somat. Cell Mol. Genet.*, **18**, 387-401 (1992)
- 28) Bregman, D.B., Halaban, R., van Gool, A.J., Henning, K.A., Friedberg, E.C., Warren, S.L. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **93**, 11586-11590 (1996)
- 29) Lin, C.G., Kovalsky, O., Grossman, L. : *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3151-3158 (1997)
- 30) Moolenaar, G.F., Moorman, C., Goosen, N. : *J. Bacteriol.*, **182**, 5706-5714 (2000)
- 31) Henriques, J.A., Moustacchi, E. : *J. Bacteriol.*, **148**, 248-256 (1981)
- 32) Prakash, S., Prakash, L. : *Mutat. Res.*, **451**, 13-24. (2000)
- 33) Hoeijmakers, J.H. : *J. Cell Sci. Suppl.*, **6**, 111-125 (1987)
- 34) Drapkin, R., Reardon, J.T., Ansari, A., Huang, J.C., Zawel, L., Ahn, K., Sancar, A., Reinberg, D. : *Nature*, **368**, 769-772 (1994)
- 35) Nospikel, T., Clarkson, S.G. : *Hum. Mol. Genet.*, **3**, 963-967 (1994)
- 36) Itoh, T., Shiomi, T., Shiomi, N., Harada, Y., Wakasugi, M., Matsunaga, T., Nikaido, O., Friedberg, E.C., Yamaizumi, M. : *Mutat. Res.*, **362**, 167-174 (1996)
- 37) Tanaka, K., Miura, N., Satokata, I., Miyamoto, I., Yoshida, M.C., Satoh, Y., Kondo, S., Yasui, A., Okayama, H., Okada, Y. : *Nature*, **348**, 73-76 (1990)
- 38) Asahina, H., Kuraoka, I., Shirakawa, M., Morita, E.H., Miura, N., Miyamoto, I., Ohtsuka, E., Okada, Y., Tanaka, K. : *Mutat. Res.*, **315**, 229-237 (1994)
- 39) Kobayashi, T., Takeuchi, S., Saijo, M., Nakatsu, Y., Morioka, H., Otsuka, E., Wakasugi, M., Nikaido, O., Tanaka, K. : *Nucleic Acids Res.*, **26**, 4662-4668 (1998)
- 40) Venema, J., van Hoffen, A., Natarajan, A.T., van

- Zeeland, A.A., Mullenders, L.H. : *Nucleic Acids Res.*, **18**, 443-448 (1990)
- 41) Sugasawa, K., Ng, J.M., Masutani, C., Iwai, S., van der Spek, P.J., Eker, A.P., Hanaoka, F., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H. : *Mol. Cell*, **2**, 223-232 (1998)
- 42) Nichols, A.F., Itoh, T., Graham, J.A., Liu, W., Yamaizumi, M., Linn, S. : *Biol. Chem.*, **275**, 21422-21428 (2000)
- 43) Park, C.H., Bessho, T., Matsunaga, T., Sancar, A. : *J. Biol. Chem.*, **270**, 22657-22660 (1995)
- 44) Matsunaga, T., Mu, D., Park, C.H., Reardon, J.T., Sancar, A. : *J. Biol. Chem.*, **270**, 20862-20869 (1995)
- 45) Henning, K.A., Li, L., Iyer, N., McDaniel, L.D., Reagan, M.S., Legerski, R., Schultz, R.A., Stefanini, M., Lehmann, A.R., Mayne, L.V., *et al.* : *Cell*, **82**, 555-564 (1995)
- 46) Sung, P., Guzder, S.N., Prakash, L., Prakash, S. : *J. Biol. Chem.*, **271**, 10821-10826 (1996)
- 47) Winkler, G.S., Araujo, S.J., Fiedler, U., Vermeulen, W., Coin, F., Egly, J.M., Hoeijmakers, J.H., Wood, R.D., Timmers, H.T., Weeda, G. : *J. Biol. Chem.*, **275**, 4258-4266 (2000)
- 48) Feaver, W.J., Svejstrup, J.Q., Bardwell, L., Bardwell, A.J., Buratowski, S., Gulyas, K.D., Donahue, T.F., Friedberg, E.C., Kornberg, R.D. : *Cell*, **75**, 1379-1387 (1993)
- 49) Svejstrup, J.Q., Wang, Z., Feaver, W.J., Wu, X., Bushnell, D.A., Donahue, T.F., Friedberg, E.C., Kornberg, R.D. : *Cell*, **80**, 21-28 (1995)
- 50) Myer, V.E., Young, R.A. : *J. Biol. Chem.*, **273**, 27757-27760 (1998)
- 51) Winzler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H., Chu, A.M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S.W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S.H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J.H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Davis, R.W., *et al.* : *Science*, **285**, 901-906 (1999)
- 52) van Gool, A.J., Verhage, R., Swagemakers, S.M., van de Putte, P., Brouwer, J., Troelstra, C., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H. : *EMBO J.*, **13**, 5361-5369 (1994)
- 53) Tijsterman, M., Brouwer, J. : *J. Biol. Chem.*, **274**, 1199-1202 (1999)
- 54) Tuteja, R., Tuteja, N. : *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **35**, 1-33 (2000)
- 55) Cervelli, T., Galli, A. : *Mol. Gen. Genet.*, **264**, 56-63 (2000)
- 56) Chen, L., Trujillo, K., Ramos, W., Sung, P., Tomkinson, A.E. : *Mol. Cell*, **8**, 1105-1115 (2001)
- 57) Frank, K.M., Sekiguchi, J.M., Seidl, K.J., Swat, W., Rathbun, G.A., Cheng, H.L., Davidson, L., Kangaloo, L., Alt, F.W. : *Nature*, **396**, 173-177 (1998)
- 58) d'Adda di Fagagna, F., Hande, M.P., Tong, W.M., Roth, D., Lansdorp, P.M., Wang, Z.Q., Jackson, S.P. : *Curr. Biol.*, **11**, 1192-1196 (2001)
- 59) Cole, G.M., Mortimer, R.K. : *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 3314-3322 (1989)
- 60) Emery, H.S., Schild, D., Kellogg, D.E., Mortimer, R.K. : *Gene*, **104**, 103-106 (1991)
- 61) Shinohara, M., Shita-Yamaguchi, E., Buerstedde, J.M., Shinagawa, H., Ogawa, H., Shinohara, A. : *Genetics*, **147**, 1545-1556 (1997)
- 62) Shinohara, M., Gasior, S.L., Bishop, D.K., Shinohara, A. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **97**, 10814-10819 (2000)
- 63) Miyagawa, K., Tsuruga, T., Kinomura, A., Usui, K., Katsura, M., Tashiro, S., Mishima, H., Tanaka, K. : *EMBO J.*, **15**, 175-180 (2002)
- 64) Nakayama, K., Irino, N., Nakayama, H. : *Mol. Gen. Genet.*, **200**, 266-271 (1985)
- 65) Nakayama, K., Shiota, S., Nakayama, H. : *Can. J. Microbiol.*, **34**, 905-907 (1988)
- 66) Urmez, K., Nakayama, K., Nakayama, H. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **87**, 5363-5367.
- 67) Kowalczykowski, S.C., Dixon, D.A., Eggeleston, A.K., Lauder, S.D., Rehrauer, W.M. : *Microbiol. Rev.*, **58**, 401-465 (1994)
- 68) Mendonca, V.M., Klepin, H.D., Matson, S.W. : *J. Bacteriol.*, **177**, 1326-1335 (1995)
- 69) Seki, M., Miyazawa, H., Tada, S., Yanagisawa, J., Yamaoka, T., Hoshino, S., Ozawa, K., Eki, T., Nogami, M., Okumura, K., Taguchi, H., Hanaoka, F., Enomoto, T. : *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4566-4573 (1994)
- 70) Puranam, K.L., Blackshear, P.J. : *J. Biol. Chem.*, **269**, 29838-29845 (1994)
- 71) Kitao, S., Ohsugi, I., Ichikawa, K., Goto, M., Furuich, Y., Shimamoto, A. : *Genomics*, **54**, 443-452 (1998)
- 72) German, J. : *Medicine*, **72**, 393-406 (1993)
- 73) Kauli, R., Prager-lewin, R., Kaufman, H., Laron, Z. : *Clin. Endocrinol.*, **6**, 285-289 (1977)
- 74) Online Menelian Inheritance in Man (OMIM), (BLOOM-SYNDROME; BLM, #210900)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/entrez/dispomim.cgi?cmd=entry&id=210900>
- 75) Hashimoto, T., Sukenaga, T., Lopetegui, P., Furuyama, J. : *Basic Life Sci.*, **29**, 765-774 (1984)
- 76) Epstein, C.J., Martin, G.M., Schultz, A.L., Motulsky

- A.G. : *Medicine*, **45**, 177-221 (1966)
- 77) 坂本修一, 嶋本顕, 古市泰宏. : 蛋白質核酸酵素, **46**, 1073-1081 (2001)
- 78) OMIM (WERNER SYNDROME; WRN, #277700)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/entrez/dispomim.cgi?id=277700>
- 79) Martin, G.M. : *Am. J. Pathol.*, **89**, 484-511 (1977)
- 80) Schulz, V.P., Zakian, V.A., Ogburn, C.E., McKay, J., Jarzbowicz, A.A., Edland, S.D., Martin, G.M. : *Hum. Genet.*, **97**, 750-754 (1996)
- 81) Okada, M., Goto, M., Furuichi, Y., Sugimoto, M. : *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 235-239 (1998)
- 82) Gebhart, E., Bauer, R., Raub, U., Schinzel, M., Ruprecht, K.W., Jonas, J.B. : *Hum. Genet.*, **80**, 135-139 (1988)
- 83) OMIM (ROTHMUND-THOMSON SYNDROME; RTS, #268400)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/entrez/dispomim.cgi?id=268400>
- 84) van Brabant, A.J., Stan, R., Ellis, N.A. : *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **1**, 409-459 (2000)
- 85) Shimamoto, A., Nishikawa, K., Kitao, S., Furuichi, Y. : *Nucleic Acids Res.*, **28**, 1647-1655 (2000)
- 86) Gangloff, S., McDonald, J. P., Bendixen, C., Arthur, L., Rothstein, R. : *Mol. Cell Biol.*, **14**, 8391-8398 (1994)
- 87) Watt, P.M., Louis, E.J., Borts, R.H., Hickson, I.D. : *Cell*, **81**, 253-260 (1995)
- 88) Bennett, R.J., Sharp, J.A., Wang, J.C. : *J. Biol. Chem.*, **273**, 9644-9650 (1998)
- 89) Lu, J., Mullen, J.R., Brill, S.J., Kleff, S., Romeo, A.M., Sternglanz, R. : *Nature*, **383**, 678-679 (1996)
- 90) Sun, H., Bennett, R.J., Maizels, N. : *Nucleic Acids Res.*, **27**, 1978-1984 (1999)
- 91) Watt, P.M., Hickson, I.D., Borts, R.H., Louis, E.J. : *Genetics*, **144**, 935-945 (1996)
- 92) Yamagata, K., Kato, J., Shimamoto, A., Goto, M., Furuichi, Y., Ikeda, H. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95**, 8733-8738 (1998)
- 93) Onoda, F., Seki, M., Miyajima, A., Enomoto, T. : *Mutat. Res.*, **459**, 203-209 (2000)
- 94) Sinclair, D.A., Mills, K., Guarente, L. : *Science*, **277**, 1313-1316. (1997)
- 95) Sinclair, D.A., Guarente, L. : *Cell*, **91**, 1033-1042 (1997)
- 96) Miyajima, A., Seki, M., Onoda, F., Shiratori, M., Odagiri, N., Ohta, K., Kikuchi, Y., Ohno, Y., Enomoto, T. : *Mol. Cell Biol.*, **20**, 6399-6409 (2000)
- 97) Bennett, R.J., Noiro-Gros, M.F., Wang, J.C. : *J. Biol. Chem.*, **275**, 26898-26905 (2000)
- 98) Lee, G.S., Blonsky, K.S., Van On, D.L., Savage, E.A., Morgan, A.R., von Borstel, R.C. : *J. Mol. Biol.*, **223**, 617-626 (1992)
- 99) Schwartz, J.L. : *Mutat. Res.*, **216**, 111-118 (1989)
- 100) Game, J.C., Kaufman, P.D. : *Genetics*, **151**, 485-497 (1999)
- 101) Onoda, F., Seki, M., Miyajima, A., Enomoto, T. : *Mol. Gen. Genet.*, **264**, 702-708 (2001)
- 102) Rong, L., Klein, H.L. : *J. Biol. Chem.*, **268**, 1252-1259 (1993)
- 103) Lee, S.K., Johnson, R.E., Yu, S.L., Prakash, L., Prakash, S. : *Science*, **286**, 2339-2342 (1999)
- 104) Gangloff, S., Soustelle, C., Fabre, F. : *Nat. Genet.*, **25**, 192-194 (2000)
- 105) Online Menelian Inheritance in Man (OMIM), (BLOOMSYNDROME; BLM, #210900)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/entrez/dispomim.cgi?cmd=entry&id=210900>
- 106) Seki, T., Wang, W.S., Okumura, N., Seki, M., Katada, T., Enomoto, T. : *Biochim. Biophys. Acta.*, **1398**, 377-381 (1998)
- 107) Sikorski, R.S., Hieter, P. : *Genetics*, **122**, 19-27 (1989)
- 108) Chester, N., Kuo, F., Kozak, C., O'Hara, C.D., Leder, P. : *Genes Dev.*, **12**, 3382-3393 (1998)
- 109) Roeder, G.S. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**, 10450-10456 (1995)
- 110) Nicolas, A., Treco, D., Schlatters, N.P., Szostak, J.W. : *Nature*, **338**, 35-39 (1989)
- 111) Alani, N., Padmore, R., Kleckner, N. : *Cell*, **62**, 419-436 (1990)
- 112) Sun, H., Treco, D., Schultes, N.P., Szostak, J.W. : *Nature*, **338**, 87-90 (1989)
- 113) 山下一郎. : 蛋白質核酸酵素, **39**, 447-457 (1994)
- 114) Ogawa, H., Johzuka, K., Nakagawa, T., Leem, S.H., Hagihara, A.H. : *Adv. Biophys.*, **31**, 67-76 (1995)
- 115) Tsubouchi, H., Ogawa, H. : *Mol. Cell Biol.*, **18**, 260-268 (1998)
- 116) Haber, J.E. : *Annu. Rev. Genet.*, **32**, 561-599 (1998)
- 117) Keeney, S., Giroux, C.N., Kleckner, N. : *Cell*, **88**, 375-384 (1997)
- 118) Celerin, M., Merino, S.T., Stone, J.E., Menzie, A.M., Zolan, M.E. : *EMBO J.*, **19**, 2739-2750 (2000)
- 119) Cao, L., Alani, E., Kleckner, N. : *Cell*, **61**, 1089-1101 (1990)
- 120) Benson F.E., Baumann P., West S.C. : *Nature*, **91**, 401-404 (1998)
- 121) New, J.H., Sugiyama, T., Zaitseva, E., Kowalczykowski, S.C. : *Nature*, **391**, 407-410 (1998)
- 122) Gasior, S.L., Wong, A.K., Korá, Y., Shinohara, A.,

- Bishop, D.K. : *Genes Dev.*, **12**, 2208-2221 (1998)
- 123) Sung, P. : *Genes Dev.*, **11**, 1111-1121 (1997)
- 124) Petukhova, G., Stratton, S., Sung, P. : *Nature*, **393**, 91-94 (1998)
- 125) Clever, B., Interthal, H., Schmuckli-Maurer, J., King, J., Sigrist, M., Heyer, W.D. : *EMBO J.*, **16**, 2535-2544 (1997)
- 126) Shinohara, A., Ogawa, H., Matsuda, Y., Ushio, N., Ikeo, K., Ogawa, T. : *Nat. Genet.*, **4**, 239-243 (1993)
- 127) Baumann, P., West, S.C. : *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 247-251 (1998)
- 128) Storlazzi, A., Xu, L., Cao, L., Kleckner, N. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**, 8512-8516 (1995)
- 129) Goldway, M., Sherman, A., Zenvirth, D., Arbel, T., Simchen, G. : *Genetics*, **133**, 159-169 (1993)
- 130) Xu, L., Weiner, B.M., Kleckner, N. : *Genes Dev.*, **11**, 106-118 (1997)
- 131) Bishop, D.K., Park, D., Xu, L., Kleckner, N. : *Cell*, **69**, 439-456 (1992)
- 132) Klapholz, S., Esposito, R.E. : *Genetics*, **96**, 567-588 (1980)
- 133) Klapholz, S., Esposito, R.E. : *Genetics*, **96**, 589-621 (1980)
- 134) Klapholz, S., Waddell, C.S., Esposito, R.E. : *Genetics*, **110**, 187-216 (1985)
- 135) McCarroll, R.M., Esposito, R.E. : *Genetics*, **138**, 47-60 (1994)
- 136) Ajimura, M., Leem, S.H., Ogawa, H. : *Genetics*, **133**, 51-66 (1993)
- 137) Johzuka, K., Ogawa, H. : *Genetics*, **139**, 1521-32 (1995)
- 138) Miyajima, A., Seki, M., Onoda, F., Ui, A., Satoh, Y., Ohno, Y., Enomoto, T. : *Genes Genet. Syst.*, **75**, 319-326 (2000)
- 139) Ui, A., Satoh, Y., Onoda, F., Miyajima, A., Seki, M., Enomoto, T. : *Mol. Genet. Genomics*, **265**, 837-850 (2001)
- 140) Mullen, J.R., Kaliraman, V., Brill, S.J. : *Genetics*, **154**, 1101-1114 (2000)
- 141) Onodera, R., Seki, M., Ui, A., Satoh, U., Miyajima, A., Onoda, F., Enomoto, T. : *Genes Genet. Syst.*, **77**, 11-21 (2002)