

総 説

RecQ ヘリカーゼとゲノム安定性維持機構

関 政幸

RecQ helicases and maintenance of genome stability

Masayuki SEKI

(Received November 20, 2013)

はじめに

地球上のすべての生物の細胞に遺伝情報としてのDNAが含まれている。細胞内のDNA配列を限りなく正確に複製し、突発的に生じるDNA損傷を限りなく正確に修復して子孫の細胞に伝えようとしても、ある頻度で必ず突然変異が生じてしまう。¹⁻²⁾ ヒトを例に短期的な視点から“変異”について考えると、i) 体細胞で起こる突然変異はがんの発症につながり、ii) 生殖系列細胞への突然変異は遺伝病の起点となり、さらに、iii) 胎児の段階で生じる突然変異がまれな疾病を引き起こす。i~iii)の原因となる変異の事例は、次世代シーケンシング技術の発達により指数関数的に増加している。³⁻⁶⁾ 一方、突然変異は進化の駆動力として働き、地球上に多彩な生物を満ちあふれさせる。長期的な視点をヒトにあてはめれば、連綿と続く突然変異の蓄積が、脊索動物(ナメクジウオなど)、

魚類、両生類、爬虫類、哺乳類、霊長類、類人猿(ゴリラ・チンパンジー・オラウータンなど)、猿人(アウストラロピテクスなど)、原人(北京原人など)、旧人(ネアンデルタール人など)、新人(クロマニヨン人など)から現代人へとつながる進化を可能にした。ヒトゲノムのDNA配列⁷⁾は、“ヒトの設計図”であるとともに、過去の変異のすべてが書き込まれた“ヒト進化の歴史書”としての側面も有している。

不可避である突然変異の出現頻度を可能な限り低く抑える様々な仕組みが細胞に備わっており、それらすべてをひっくるめて「ゲノム安定性維持機構」と総称される。ゲノム安定性維持機構には、DNA複製・DNA修復(多数ある)・染色体分配・細胞周期・チェックポイント・アポトーシスなどの多くの異なる反応が含まれる。本稿では、筆者が20年近く研究に携わった「RecQヘリカーゼが司るゲノ

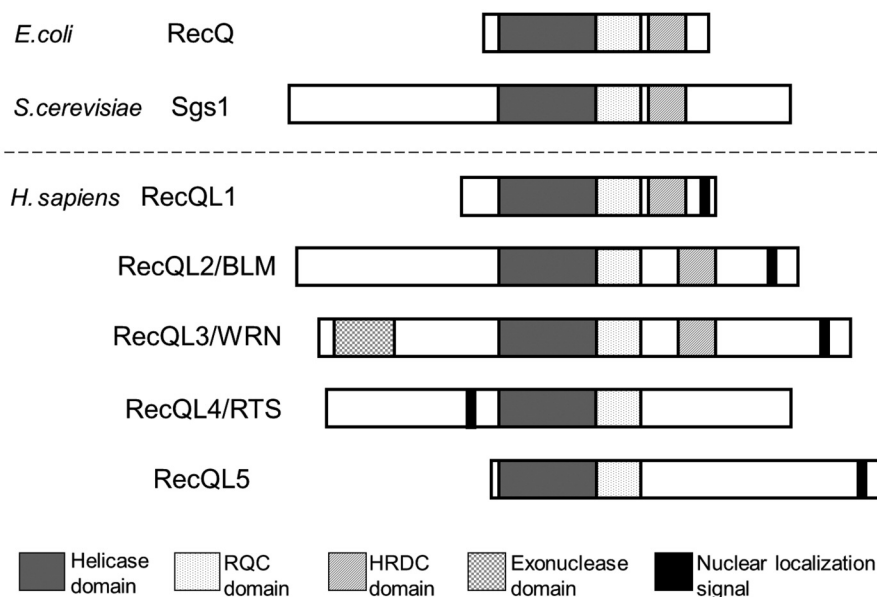


Fig. 1. RecQ helicase family

Table 1. Comparison between BS, WS, and RTS.

	BS	WS	RTS
Cancer predisposition	○	○	○
Progeria symptom	–	○	○
Skin manifestation	○	○	○
Immunodeficiency	○	–	–
Skeletal abnormalities	–	–	○
Sun sensitivity	○	–	○
Short stature	○	○	○

Circle (○) indicates that the symptom is typical. BS; Bloom syndrome, WS; Werner syndrome, RTS; Rothmund-Thomson syndrome.

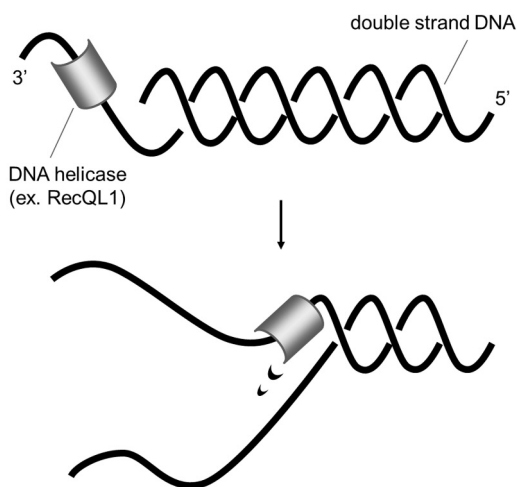


Fig. 2. DNA helicase activity

RecQL1 functions as a 3' to 5' DNA helicase.

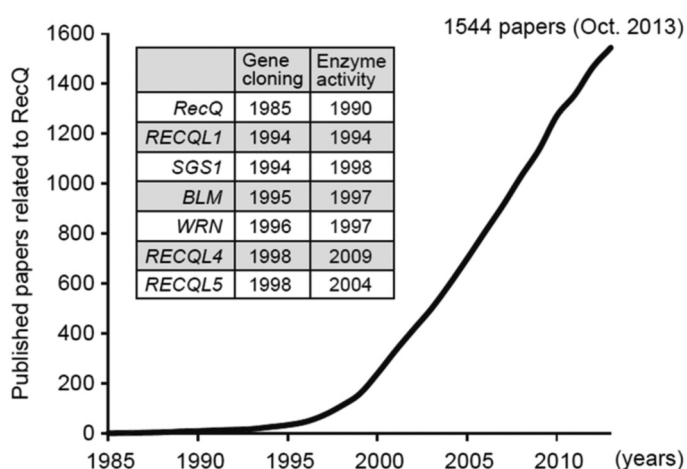


Fig. 3. Cumulative papers regarding to RecQ

The research about RecQ helicases started in 1985, and 1,544 papers have been published to date (October, 2013). The table shows the year of gene cloning of individual RecQ and of first detection of corresponding helicase activity.

ム安定性維持機構」に焦点を絞って解説する。

RecQ ヘリカーゼは、大腸菌からヒトまで進化上保存されている。^{8,9)} “原核細胞である大腸菌”や“単細胞の真核生物である出芽酵母・分裂酵母”には、RecQ ヘリカーゼが1つ存在している。一方、多細胞真核生物である動物や植物の細胞には複数のRecQ ヘリカーゼが存在し、ヒトにおいては5つのRecQ ヘリカーゼ (RecQL1, BLM, WRN, RecQL4/RTS, RecQL5) が存在している (Fig. 1)。^{8,9)} 5つのRecQのうち3つは、ヒトにおいて常染色体劣性の様式で遺伝するブルーム症候群、ウェルナー症候群、ロスムンドートムソン症候群の原因遺伝子産物 (それぞれ BLM, WRN, RecQL4/RTS) である。⁸⁻¹⁰⁾

3つの遺伝病に共通して高発がん性が見いだされている (Table 1)。⁸⁻¹⁰⁾ また、RecQL5のノックアウトマウスが高発がん性を示すことから、¹¹⁾ 少な

くともヒト (脊椎動物) の4つのRecQヘリカーゼ (BLM, WRN, RecQL4/RTS, RecQL5) は、発がんの原因となるゲノムの突然変異を直接あるいは間接的に抑制することが確定的である。本稿では、5つの脊椎動物RecQヘリカーゼのゲノム安定性維持における分子機構について、最新の知見ならびに著者らによるこれまでの発見を交えて概説する。

I. RecQL1

1994年に著者は、ヒトRecQL1ヘリカーゼ遺伝子をクローニングし、¹²⁾ その遺伝子産物が結合した一本鎖DNA上を3'から5'方向に移動しながら二本鎖DNAを巻き戻す活性 (DNAヘリカーゼ活性) を有することを示した (Fig. 2)。¹³⁾ ヒト*RECQL1*は真核細胞から初めて得られた大腸菌RecQの相同遺伝子であり (Fig. 3)、同じ年に発芽酵母のRecQ遺伝

子 Sgs1 も単離された。¹⁴⁾ このようにヒト RecQL1 の遺伝子クローニングおよび生化学的解析は、他の RecQ ヘリカーゼに先行した。以後に明らかにされた Sgs1, BLM, WRN, RecQL4, RecQL5 の DNA ヘリカーゼの生化学的性質は RecQL1 とほぼ同じであった (Fig. 3)。

RecQL1 の機能の探索は、*RECQL1* 遺伝子の様々な動物種の細胞を用いたノックアウト (KO; 遺伝子破壊) あるいはノックダウン (KD; RNA 干渉を用いた方法) 実験によってなされてきた。ニワトリ DT40 *RECQL1* 単独 KO 細胞の場合、KO 細胞に何の表現型も見いだせない。¹⁵⁾ しかし、*RECQL1/BLM (RECQL2)* 二重 KO 細胞において、ある条件下で相同組換えの指標である姉妹染色分体交換 (SCE: sister chromatid exchange) の相乗的な増加が起こる (Fig. 4)。¹⁵⁾ *RECQL1* KO マウスは個体レベルで顕著な表現型を示さない。しかし、KO マウスの胚由来の細胞において、自発的な SCE の増加が観察された。¹⁶⁾ さらに、ヒト *RECQL1* 単独 KD 細胞においても自発的な SCE 頻度が上昇することから、¹⁷⁾ RecQL1 は相同組換えの抑制 (SCE の抑制) に関わることが示唆される。KO マウス胚由来細胞では、 γ 線への感受性や自発的な染色体異常の増加も観察された。¹⁶⁾ ヒト *RECQL1* KD 細胞において DNA 傷害剤への感受性が見いだされることから、¹⁸⁾ RecQL1 のゲノム安定性維持機構への関与が示唆される。

上記に加え、ヒト *RECQL1* KD 細胞では細胞増殖能の低下が観察された。¹⁹⁾ ヒト RecQL1 による DNA 複製の開始と DNA 鎖の伸長反応への促進機能が、*RECQL1* KD により損なわれたのが増殖能の低下の原因とされる。¹⁹⁾ 一方、ニワトリやマウスの *RECQL1* KO 細胞の増殖能は野生株と同等である。^{15,16)} この矛盾は動物種による RecQL1 タン

パク質の発現量の多寡から生じている可能性が高い。ニワトリの B 細胞やマウス由来の細胞 (精巢を除く) では *RECQL1* の mRNA の発現量が低いのにに対し、^{15,20)} ヒト細胞では RecQL1 の発現量が高い。²¹⁾ このことは、ヒト細胞は RecQL1 の機能に強く依存するように進化したのかもしれない。

ヒトのがん細胞では RecQL1 の発現量はさらに亢進する。近年、ヒトがん細胞で RecQL1 の発現をノックダウンするとことで、がん細胞の増殖を抑制し死滅させるとする報告がなされた。^{22,23)} RecQL1 を標的とした「がんを抑制する新規治療法」への応用も提唱されている。^{22,23)}

II. BLM (RecQL2)

1954 年に皮膚科医 Bloom は、低身長・日光過敏、免疫不全、毛細血管拡張、男性における不稔、悪性腫瘍の頻発の症状を呈するブルーム症候群を報告した。²⁴⁾ ブルーム症候群の患者の悪性腫瘍の特徴は、多様な臓器から、あらゆる種類のがんが健常人の 100 倍以上の頻度で、若年に発症する点にある。また、ブルーム症候群の患者の細胞で最も特徴的なのは健常人の細胞の 10 倍の頻度で起こる SCE (Fig. 4) であり、それはブルーム症候群の診断にも用いられる (Table 1)。²⁴⁾

1995 年の *BLM* 遺伝子の単離を契機に、²⁵⁾ *BLM* の機能の解析は著者を含めて世界中で盛んに行われた。また、出芽酵母の RecQ である *sgs1* 欠損株の表現型がヒト *BLM* 遺伝子の導入により部分的に相補されたことから、²⁶⁾ *BLM* の代わりとして Sgs1 の解析も多くなされた。その多くの研究を総括した結果 (Fig. 5), (A) DNA 二重鎖切断からの一本鎖 DNA 部分の削り込み、²⁷⁾ (B) Double Holliday junction (DNA 相同組換え中間体) の解消による SCE の抑制、^{28,29)} Mitotic chiasmata および meiotic chiasmata の形成抑制、^{29,30)} (C) DNA 複製終結時の絡まった DNA の分離、³¹⁾ (D) DNA 複製時に生じた新生鎖同士の相補鎖形成 (chicken foot structure) の解消、³²⁾ (E) 染色体分配時における ultra-fine DNA bridge の解消、³³⁾ などの反応に BLM (Sgs1) が機能するとされた。

注目すべきは、BLM (Sgs1) は I 型 DNA トポイソメラーゼ (二本鎖 DNA のうち片方の一本鎖 DNA に切れ目を入れ、DNA のゆがみを解消し、再び切れ目を塞ぐ酵素) に属する DNA トポイソメラーゼ III (Top3) と物理的および機能的に相互作用する点

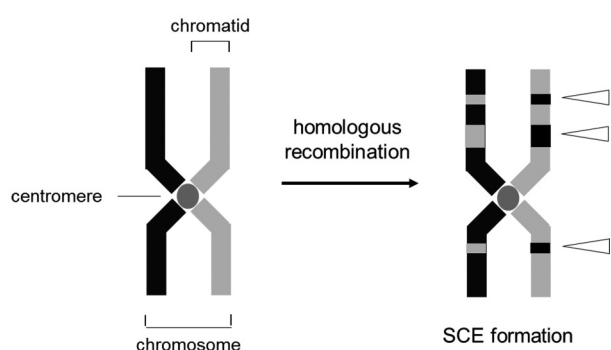


Fig. 4. Sister chromatid exchange (SCE).

Open arrow head indicates SCE-generated locus.

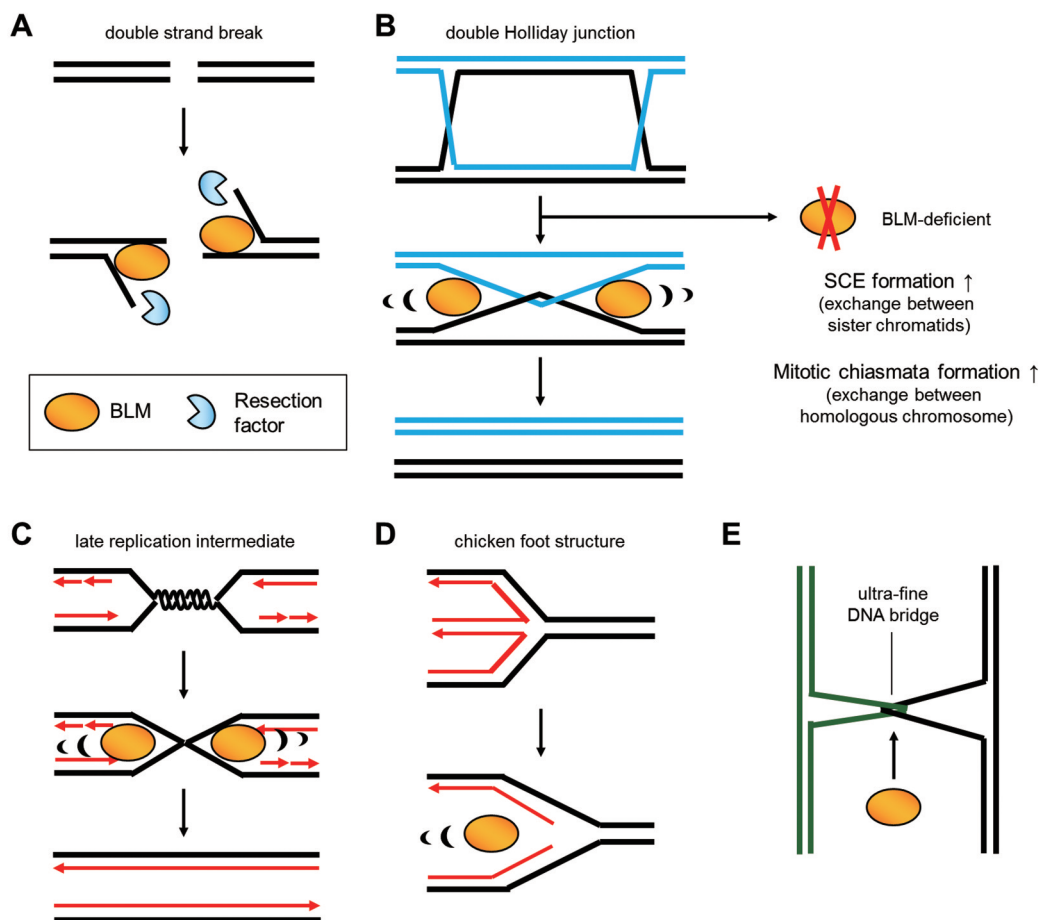


Fig. 5. A variety roles of BLM in the cells

(A) Resection of DNA double strand break ends. (B) Dissociation of double Holliday junctions. (C) Disruption of late replication intermediates. (D) Dissociation of annealed nascent DNA strands (chicken foot structures). (E) Dissociation of ultra-fine DNA bridges.

である。¹⁴⁾ Top3は、BLM (Sgs1) のDNAヘリカーゼ活性とカップルして複雑に絡み合ったDNAのもつれを解消すると考えられる (Figs. 5B-E)。二本鎖DNA上で様々な反応が起こればDNAの絡まりやゆがみの発生は必然である。従って、BLM-Top3の機能不全によりDNAに生じた問題の一部が解消されないと、副次的な結果としてDNA二重鎖切断などのDNA傷害につながり、³¹⁾それが突然変異の上昇に結びつくと考えれば、若年で多発がんを頻発するのは当然の帰結となる。

III. WRN (RecQL3)

1904年に内科医Wernerは若年であるのに老人のような症状を呈するウェルナー症候群を見いだした。本症候群では、白髪、脱毛、白内障、皮膚萎縮、関節炎、動脈硬化、性腺機能低下、骨粗鬆症、糖尿病などの老化過程が思春期後に加速し、30歳頃には上記症状が現れる。50歳前後が平均寿

命であり、その際の主な死因は悪性腫瘍(肉腫が比較的多い)・動脈硬化性疾患・感染症である (Table 1)。³⁴⁾

1996年のWRN遺伝子の単離に伴い、³⁵⁾WRNの機能の解析はヒトの老化の理解に結びつくものとして多くの研究者の関心を集め、精力的に研究がなされた。しかしながら、それらの研究群を総括することによりWRNの機能が一つに集約することはなかった。³⁶⁾むしろ、各々の研究者の主張がいずれも正しければ、「WRNはあらゆる反応(DNA複製・各種DNA修復・転写・テロメア維持・アポトーシス・核小体での機能・核膜での機能など他にも多数)に関与する」という結論になる。WRNがあらゆる反応に関わるため、WRN欠損があらゆる反応に少しずつ影響を与えた結果、老化が加速するのかもしれない。一方、早老症に直結するWRNが関わる反応がまだ見いだされていない、あるいは見いだされているが多くの研究

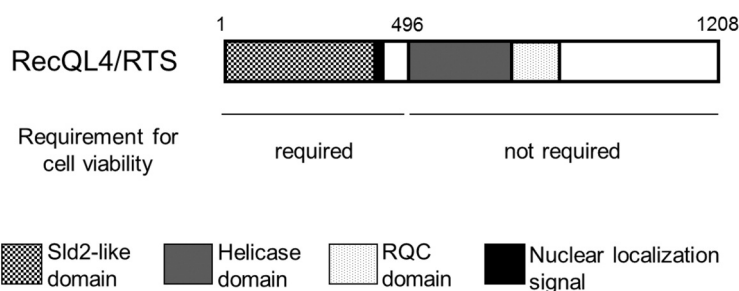


Fig. 6. The domain of RecQL4 helicase

Sld2-like domain has a homology to the sequence of yeast Sld2 protein, a replication factor. Amino acid numbers of RecQL4 are indicated. The N-termini of RecQL4 (1-496 amino acid region) is required for cell viability.

者のコンセンサスを得て「ある特定の生化学反応を個体レベルの老化に1:1で対応させること」ができていない。

これまでのWRNに関する研究を網羅的（あらゆる反応の個々の事例をすべて説明する）に挙げることは他の総説に譲り、³⁶⁾ 本稿では、早老症に直結する可能性が高いと著者が考えている報告を紹介する。WRN遺伝子ノックアウト（KO）マウスは、ヒトのウェルナー症候群と異なり顕著な早老症を引き起こさなかった。しかしながら、テロメアの維持に関わる *TERC* と *WRN* の二重ノックアウトマウスは、テロメアの維持機能の破綻が亢進し、早老症を呈した。³⁷⁾ さらに、WRN欠損により「テロメア複製の際に、ラギング鎖合成の特異的な低下」が見いだされた。³⁸⁾ これらの報告から、WRNはテロメアの複製に関与しテロメアの安定性維持に寄与することで細胞の老化を緩和しているとの仮説が成立する。

IV. RTS (RecQL4)

1868年に眼科医 Rothmund、さらに後年の1936年に皮膚科医 Thomsonにより、幼少期から眼や皮膚に症状を呈する疾病が報告された。その疾病は遺伝病であり、今日、ロスムンドートムソン症候群と呼ばれるようになっている。本症候群では、乳児期の皮膚に浮腫性紅斑、皮膚萎縮、色素沈着などが現れ、日光への暴露による水疱形成が起こる。さらに、幼児期に白内障、低身長、骨格異常、性腺機能低下などの早老症状を呈する。また、悪性腫瘍（骨肉腫・皮膚扁平上皮がん・白血病・胃がんなど）が高い頻度で生じる（Table 1）。³⁹⁾

1998年にヒト *RECQL4* 遺伝子が単離され、⁴⁰⁾ その翌年の1999年にロスムンドートムソン症候群の

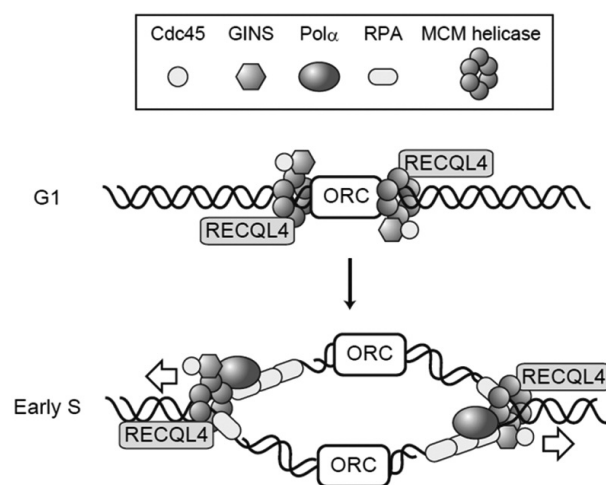


Fig. 7. Possible role of RecQL4 in DNA replication initiation

RecQL4 is recruited at origins in G₁ phase as pre-replication complex and facilitates the loading of replication factors. RecQL4 associates with MCM helicase and this interaction would contribute to unwind origins to initiate replication.

原因遺伝子が *RECQL4* であると特定され、⁴¹⁾ *RECQL4/RTS* と表記されるようになった。本症状はブルーム症候群やウェルナー症候群と比べ、乳児期・幼少期の早い時期から症状が現れるのが特徴的である。^{10,39)} RecQL4はN末部分とDNAヘリカーゼ活性を担うC末部分から構成され、N末部分を含んで欠損した *RECQL4* KOマウスは胎生致死となる。⁴²⁾ 著者らの行ったニワトリ細胞を用いた *RECQL4* KO実験により、RecQL4のN末部分は細胞の生存に必須であることが判明した（Fig. 6）。⁴³⁾ ロスムンドートムソン症候群の *RECQL4/RTS* への突然変異は、N末ではなくC末側に集中している。³⁹⁾ 以上より、RecQL4のN末部分に細胞の増殖に必須な機能の存在が予想された。実際にRecQL4がアフリカツメガエルの卵やヒト細胞にお

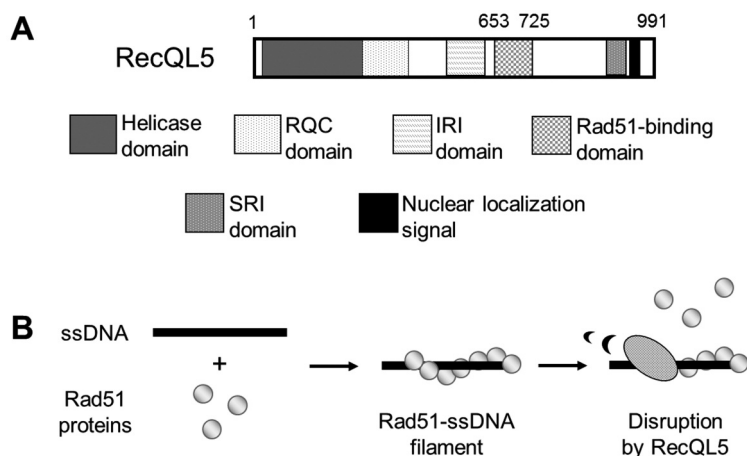


Fig. 8. RecQL5 displaces Rad51 from Rad51-ssDNA filament

(A) The domain of RecQL5 protein. Amino acid numbers of RecQL5 are indicated. IRI; internal RNA polymerase II-interacting, SRI; Set2-Rpb1-interacting. (B) Function of RecQL5 in Rad51-filament disruption.

いて DNA 複製開始反応に関与することが示されている (Fig. 7).^{19,44)} RecQL4 の N 末部分には、出芽酵母において DNA 複製開始に必須な Sld2 と相同性が高い部分が存在する (Fig. 6).³⁹⁾ RecQL4 の “Sld 様ドメイン” の構造解析の結果、このドメインはホメオボックスに類似し、生化学的には一本鎖 DNA や複製フォーク様の Y 字型 DNA に結合できることが示された。⁴⁵⁾ このような “Sld 様ドメイン” の性質が RecQL4 の DNA 複製における機能を担っているのかもしれない。

RecQL4 の N 末側 (細胞の生存に必須) の解析と並行して、DNA ヘリカーゼ活性を担う C 末側の機能解析も進んでいる。ロスムンドートムソン症候群で見つかるのと同じ変異をもつ RecQL4 タンパク質において DNA ヘリカーゼ活性が低下することから、⁴⁶⁾ ロスムンドートムソン症候群の症状は RecQL4 の N 末側の機能よりはむしろ、C 末側に由来すると考えられる。ロスムンドートムソン症候群患者細胞やヒト *RECQL4* KD 細胞では、塩基除去修復、⁴⁷⁾ ヌクレオチド除去修復、⁴⁸⁾ DNA 二本鎖切断の修復⁴⁹⁾ が影響を受けている。また、RecQL4 はテロメアのタンパク質 TRF1 や TRF2 と相互作用することでテロメアに局在し、テロメア特有の DNA 構造の解消に寄与する可能性も指摘されている。^{50,51)} RecQL4 はミトコンドリアにも局在でき、ミトコンドリアゲノムの保護⁵²⁾ や p53 のミトコンドリアへの輸送⁵³⁾ に関わることも報告されている。以上のように RecQL4 に関する研究は急速かつ多面的に進展している。しかしながら、

WRN (Ⅲ参照) でなされた議論と同様に、報告された RecQL4 の機能のすべての総和としてロスムンドートムソン症候群の症状が現れるのか、あるいはある特定の RecQL4 の機能が症状と深く関連するののかについては、いまだ解答はない。

V. RecQL5

1998 年に *RECQL5* 遺伝子は *RECQL4* 遺伝子とともに単離された。⁴⁰⁾ これまでに *RECQL5* の欠損によるヒト遺伝病は報告されていない。*RECQL5* ノックアウトマウスが高発がん性を呈することから、¹¹⁾ RecQL5 がゲノム安定性維持機構で機能していることは確実である。

RecQL5 タンパク質の機能ドメインが同定され、大まかに DNA ヘリカーゼ活性を担う領域、相同組換えに関わる Rad51 タンパク質との結合に必要な領域、^{54,55)} 転写の中心酵素 RNA ポリメラーゼ II との結合に必要な領域^{56,57)} が RecQL5 に見いだされている (Fig. 8A)。その中でも Rad51 と相互作用する領域は、RecQL5 の有する Rad51 filament から Rad51 をはがす試験管内での活性 (Fig. 8B)^{54,55)} に必要であることが示されている。Rad51 filament の形成は相同組換え反応の律速段階の一つであり、Rad51 が Rad51 filament よりはがれることは、相同組換え頻度の低下に結びつくと予想される。著者らを含めた幾つかの研究から、RecQL5 が実際に細胞内で相同組換え反応を抑制していることが見いだされている。⁵⁵⁾ 特に、著者らによるニワトリ DT40 細胞を用いた *RECQL5* ノックアウト細胞の

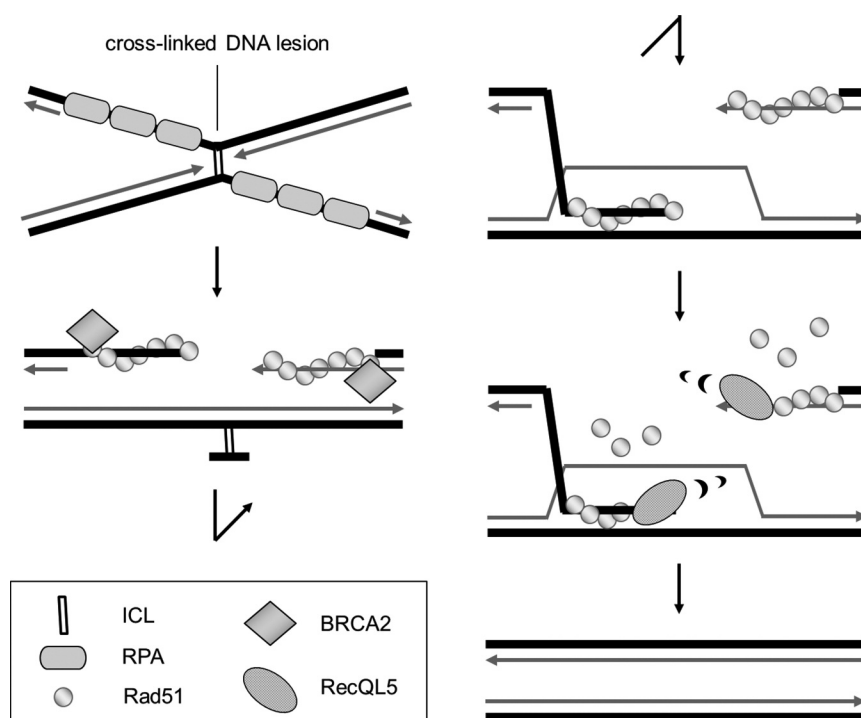


Fig. 9. Possible role of RecQL5 in repair of cross-linked DNA lesions

Cross-linked DNA lesions induce replication fork arrest. Several DNA nucleases cleave DNA, and remove cross-linked DNA locus. DNA double strand break is formed, and repaired by Rad51-mediated homologous recombination. BRCA2, a Rad51 mediator protein, promotes the formation of Rad51-ssDNA filaments. Rad51-filament invades other sister chromatid. After the invasion, unnecessary Rad51-filaments are disrupted by RecQL5. DNA is synthesized, and the repair is completed.

解析から、「DNA 架橋剤による DNA 傷害の修復反応 (Cross link repair; CLR と呼ぶ) 過程において, RecQL5 は 余分な Rad51 filament を解消することで, CLR の後期過程の反応を円滑に進行させる」可能性を見いだした (Fig. 9). ちなみに, RecQL5 が RNA ポリメラーゼ II と相互作用することから,^{56,57)} 転写反応中に生じる余分な Rad51 filament の除去に関与することが予測される. しかし, その直接的な証明はいまだなされていない.

RecQL5 あるいは BLM (II 参照) の欠損は, 過剰な相同組換えを誘発しゲノム不安定性が増す.¹⁵⁾ 一方, 相同組換えの欠損によりゲノム不安定性が増加して発がん頻度が高まる遺伝病群 (BRCA1, BRCA2, NBS1 など) も存在する.⁵⁸⁾ つまり細胞内で相同組換えの反応量のバランスが崩れると, どちらにしてもゲノム不安定性が増加し, ひいては発がんにつながるものと考えられる.

VI. RecQ ヘリカーゼファミリー間での機能の重複

I ~ V で示したように, それぞれの RecQ の機能欠損の表現型 (個体レベルおよび細胞レベル) が異なることから, それぞれの RecQ は細胞内で

固有の反応を制御していると考えられる. 一方, DT40 細胞において BLM と RECQL5 の同時欠損の際に観察されるように, 表現型が相乗的に現れる場合がある.¹⁵⁾ 例えば, BLM (II を参照) も RecQL5 (V を参照) も作用機序が異なるが, 過剰な相同組換えを抑制する機能がある. BLM と RECQL5 の二重ノックアウトにより相同組換えがそれぞれの単独ノックアウトに比べ相乗的に上昇することを実証した著者らの報告は,¹⁵⁾ 異なる RecQ ヘリカーゼ同士が連携して特定の細胞内の反応を制御していることを示唆する. “いまだ機能が未確定である RECQL1” と BLM とを同時欠損させた DT40 二重ノックアウト細胞では, 顕著な細胞増殖能の低下および相同組換え (SCE; Fig. 4) の相乗的な増加が起こった.¹⁵⁾ このことは, RecQL1 には BLM が司る反応系を補助する役割があることを示唆する.

同様に, BLM と WRN を同時欠損した DT40 ノックアウト細胞は, 様々な DNA 傷害剤への感受性が増すとともに, 細胞増殖能が著しく低下する.^{29,59)} さらに BLM と WRN を同時に欠いたノックアウトマウスにおいては, 老化が加速し, テロメアの不

安定性も相乗的に増す。⁶⁰⁾以上の知見を総合すると、ヒトを含めた脊椎動物門において、「進化上保存されている RecQ ヘリカーゼファミリーのそれぞれのメンバー」は、お互いに自身に課せられた反応を遂行するとともに、他のメンバーの機能を直接あるいは間接的に補っているものと推察される。つまり、「体細胞のゲノム情報を正確に娘細胞に引き継ぐ」および「子孫に限りなく誤りの少ないゲノムを継承する」という点において、ヒトの5つの RecQ ヘリカーゼのすべてが、進化の上でヒトという種の存続に必須であることを示唆している。

おわりに

本稿では、ヒト（脊椎動物）の5つの RecQ ヘリカーゼについて概説した。一方、RecQ 以外の DNA ヘリカーゼの欠損によるゲノム不安定性遺伝病（発がんにつながる）も数多く知られている。⁶¹⁾ヘリカーゼをコードする遺伝子は、原核細胞、真核細胞を問わず、およそコード DNA の1%弱を占めている。^{62,63)}つまり、膨大な数のヘリカーゼ様タンパク質が DNA を含む核酸に対し何らかの機能を担っていることになる。おそらく、地球上に現れた原始細胞は、「DNA 二重らせんを巻き戻すたった一つの万能な DNA ヘリカーゼを使い回して、DNA 上で起こる諸問題のすべてを解決する」のではなく、「DNA 上の諸問題に対し、必要ならば幾つでも特殊な DNA ヘリカーゼを創造する」方策をとったと考えられる。大腸菌や酵母のようなゲノムサイズが小さい単細胞生物でも多種類の DNA ヘリカーゼを使いこなしてゲノムを守っている。⁶³⁾ただし、RecQ 型のヘリカーゼは1つで十分だった (Fig. 1)。一方、多細胞生物となりゲノムサイズが増大し、さらに脊椎動物が出現して進化していく過程で、脊椎動物の祖先は自身のゲノムを個体レベルだけでなく子々孫々のレベルで十分に守る必要が生じた。その際に、たまたま5つに重複していた RecQ ヘリカーゼファミリーのそれぞれに独自のゲノム安定性維持の役目を与えたものと推測される。それ故にヒトは5つの RecQ をゲノムを守るために有しているのであろう。

REFERENCES

- 1) Kornberg A., Baker T. A. *DNA Replication*, W. H. Freeman & Company, 1991.
- 2) Friedberg E. C., Walker G. C., Siede W., Wood R. D., Schultz R. A., Tom Ellenberger T. *DNA Repair and Mutagenesis 2nd ed.*, John Wiley and Sons Ltd., 2006.
- 3) Dumanski J. P., Piotrowski A. Structural genetic variation in the context of somatic mosaicism. *Methods Mol. Biol.*, **838**, 249–272 (2012).
- 4) Veltman J. A., Brunner H. G. *De novo* mutations in human genetic disease. *Nat. Rev. Genet.*, **13**, 565–575 (2012).
- 5) Campbell C. D., Eichler E. E. Properties and rates of germline mutations in humans. *Trends Genet.*, **29**, 575–584 (2013).
- 6) de Ligt J., Veltman J. A., Vissers L. E. Point mutations as a source of *de novo* genetic disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **23**, 257–263 (2013).
- 7) International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, **431**, 931–945 (2004).
- 8) Enomoto T. Functions of RecQ family helicases: possible involvement of Bloom's and Werner's syndrome gene products in guarding genome integrity during DNA replication. *J. Biochem.*, **129**, 501–517 (2001).
- 9) Seki M., Otsuki M., Ishii Y., Tada S., Enomoto T. RecQ family helicases in genome stability: lessons from gene disruption studies in DT40 cells. *Cell Cycle*, **7**, 2472–2478 (2008).
- 10) Lindor N. M., Furuichi Y., Kitao S., Shimamoto A., Arndt C., Jalal S. Rothmund-Thomson syndrome due to RECQ4 helicase mutations: report and clinical and molecular comparisons with Bloom syndrome and Werner syndrome. *Am. J. Med. Genet.*, **90**, 223–228 (2000).
- 11) Hu Y., Raynard S., Sehorn M. G., Lu X., Bussen W., Zheng L., Stark J. M., Barnes E. L., Chi P., Janscak P., Jasin M., Vogel H., Sung P., Luo G. RECQL5/Recql5 helicase regulates homologous recombination and suppresses tumor formation via disruption of Rad51 presynaptic filaments. *Genes Dev.*, **21**, 3073–3084 (2007).
- 12) 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. Molecular cloning of cDNA encoding human DNA helicase Q1 which has homology to *Escherichia coli*

- Rec Q helicase and localization of the gene at chromosome 12p12. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4566–4573 (1994).
- 13) Seki M., Yanagisawa J., Kohda T., Sonoyama T., Ui M., Enomoto T. Purification of two DNA-dependent adenosinetriphosphatases having DNA helicase activity from HeLa cells and comparison of the properties of the two enzymes. *J. Biochem.*, **115**, 523–531 (1994).
- 14) Gangloff S., McDonald J. P., Bendixen C., Arthur L., Rothstein R. The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 8391–8398 (1994).
- 15) Wang W., Seki M., Narita Y., Nakagawa T., Yoshimura A., Otsuki M., Kawabe Y., Tada S., Yagi H., Ishii Y., Enomoto T. Functional relation among RecQ family helicases RecQL1, RecQL5, and BLM in cell growth and sister chromatid exchange formation. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 3527–3535 (2003).
- 16) Sharma S., Stumpo D. J., Balajee A. S., Bock C. B., Lansdorp P. M., Brosh R. M. Jr., Blackshear P. J. RECQL, a member of the RecQ family of DNA helicases, suppresses chromosomal instability. *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 1784–1794 (2006).
- 17) LeRoy G., Carroll R., Kyin S., Seki M., Cole M. D. Identification of RecQL1 as a Holliday junction processing enzyme in human cell lines. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 6251–6257 (2005).
- 18) Parvathaneni S., Stortchevoi A., Sommers J. A., Brosh R. M. Jr., Sharma S. Human RECQ1 interacts with Ku70/80 and modulates DNA end-joining of double-strand breaks. *PLoS One*, **8**, e62481. doi: 10.1371 (2013).
- 19) Thangavel S., Mendoza-Maldonado R., Tissino E., Sidorova J. M., Yin J., Wang W., Monnat R. J. Jr., Falaschi A., Vindigni A. Human RECQ1 and RECQ4 helicases play distinct roles in DNA replication initiation. *Mol. Cell. Biol.*, **30**, 1382–1396 (2010).
- 20) Wang W. S., Seki M., Yamaoka T., Seki T., Tada S., Katada T., Fujimoto H., Enomoto T. Cloning of two isoforms of mouse DNA helicase Q1/RecQL cDNA; α form is expressed ubiquitously and β form specifically in the testis. *Biochim. Biophys. Acta*, **1443**, 198–202 (1998).
- 21) Kawabe T., Tsuyama N., Kitao S., Nishikawa K., Shimamoto A., Shiratori M., Matsumoto T., Anno K., Sato T., Mitsui Y., Seki M., Enomoto T., Goto M., Ellis N. A., Ide T., Furuichi Y., Sugimoto M. Differential regulation of human RecQ family helicases in cell transformation and cell cycle. *Oncogene*, **19**, 4764–4772 (2000).
- 22) Arai A., Chano T., Futami K., Furuichi Y., Ikebuchi K., Inui T., Tameno H., Ochi Y., Shimada T., Hisa Y., Okabe H. RECQL1 and WRN proteins are potential therapeutic targets in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.*, **71**, 4598–4607 (2011).
- 23) Sanada S., Futami K., Terada A., Yonemoto K., Ogasawara S., Akiba J., Yasumoto M., Sumi A., Ushijima K., Kamura T., Furuichi Y., Yano H. RECQL1 DNA repair helicase: a potential therapeutic target and a proliferative marker against ovarian cancer. *PLoS One*, **8**, e72820, doi: 10.1371 (2013).
- 24) Ellis N. A., German J. Molecular genetics of Bloom's syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, **5**, 1457–1463 (1996).
- 25) German J., Ellis N. A., Groden J., Ye T. Z., Straughen J., Lennon D. J., Ciocci S., Proytcheva M. The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell*, **83**, 655–666 (1995).
- 26) Yamagata K., Kato J., Shimamoto A., Goto M., Furuichi Y., Ikeda H. Bloom's and Werner's syndrome genes suppress hyperrecombination in yeast sgs1 mutant: implication for genomic instability in human diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95**, 8733–8738 (1998).
- 27) Nimonkar A. V., Genschel J., Kinoshita E., Polaczek P., Campbell J. L., Wyman C., Modrich P., Kowalczykowski S. C. BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev.*, **25**, 350–362 (2011).
- 28) Wu L., Hickson I. D. The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature*, **426**, 870–874 (2003).
- 29) Otsuki M., Seki M., Inoue E., Yoshimura A., Kato G., Yamanouchi S., Kawabe Y., Tada S., Shinohara A., Komura J., Ono T., Takeda S., Ishii Y., Enomoto T. Functional interactions between BLM and XRCC3 in the cell. *J. Cell Biol.*, **179**, 53–63 (2007).

- 30) Yusa K., Horie K., Kondoh G., Kouno M., Maeda Y., Kinoshita T., Takeda J. Genome-wide phenotype analysis in ES cells by regulated disruption of Bloom's syndrome gene. *Nature*, **429**, 896–899 (2004).
- 31) Seki M., Nakagawa T., Seki T., Kato G., Tada S., Takahashi Y., Yoshimura A., Kobayashi T., Aoki A., Otsuki M., Habermann F. A., Tanabe H., Ishii Y., Enomoto T. Bloom helicase and DNA topoisomerase IIIa are involved in the dissolution of sister chromatids. *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 6299–6307 (2006).
- 32) Branzei D., Sollier J., Liberi G., Zhao X., Maeda D., Seki M., Enomoto T., Ohta K., Foiani M. Ubc9- and mms21-mediated sumoylation counteracts recombinogenic events at damaged replication forks. *Cell*, **127**, 509–522 (2006).
- 33) Biebricher A., Hirano S., Enzlin J. H., Wiechens N., Streicher W. W., Huttner D., Wang L. H., Nigg E. A., Owen-Hughes T., Liu Y., Peterman E., Wuite G. J., Hickson I. D. PICH: a DNA translocase specifically adapted for processing anaphase bridge DNA. *Mol. Cell*, **51**, 691–701 (2013).
- 34) Martin G. M. Genetic modulation of senescent phenotypes in *Homo sapiens*. *Cell*, **120**, 523–532 (2005).
- 35) 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. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science*, **272**, 258–262 (1996).
- 36) Brosh R. M. Jr., Opreko P. L., Bohr V. A. Enzymatic mechanism of the WRN helicase/nuclease. *Methods Enzymol.*, **409**, 52–85 (2006).
- 37) Chang S., Multani A. S., Cabrera N. G., Naylor M. L., Laud P., Lombard D., Pathak S., Guarente L., DePinho R. A. Essential role of limiting telomeres in the pathogenesis of Werner syndrome. *Nat. Genet.*, **36**, 877–882 (2004).
- 38) Crabbe L., Verdun R. E., Haggblom C. I., Karlseder J. Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity. *Science*, **306**, 1951–1953 (2004).
- 39) Croteau D. L., Singh D. K., Hoh Ferrarelli L., Lu H., Bohr V. A. RECQL4 in genomic instability and aging. *Trends Genet.*, **28**, 624–631 (2012).
- 40) Kitao S., Ohsugi I., Ichikawa K., Goto M., Furuichi Y., Shimamoto A. Cloning of two new human helicase genes of the RecQ family: biological significance of multiple species in higher eukaryotes. *Genomics*, **54**, 443–452 (1998).
- 41) Kitao S., Shimamoto A., Goto M., Miller R. W., Smithson W. A., Lindor N. M., Furuichi Y. Mutations in *RECQL4* cause a subset of cases of Rothmund-Thomson syndrome. *Nat. Genet.*, **22**, 82–84 (1999).
- 42) Hoki Y., Araki R., Fujimori A., Ohhata T., Koseki H., Fukumura R., Nakamura M., Takahashi H., Noda Y., Kito S., Abe M. Growth retardation and skin abnormalities of the Recql4-deficient mouse. *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 2293–2299 (2003).
- 43) Abe T., Yoshimura A., Hosono Y., Tada S., Seki M., Enomoto T. The N-terminal region of RECQL4 lacking the helicase domain is both essential and sufficient for the viability of vertebrate cells. Role of the N-terminal region of RECQL4 in cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1813**, 473–479 (2011).
- 44) Sangrithi M. N., Bernal J. A., Madine M., Philpott A., Lee J., Dunphy W. G., Venkitaraman A. R. Initiation of DNA replication requires the RECQL4 protein mutated in Rothmund-Thomson syndrome. *Cell*, **121**, 887–898 (2005).
- 45) Ohlenschläger O., Kuhnert A., Schneider A., Haumann S., Bellstedt P., Keller H., Saluz H. P., Hortschansky P., Hänel F., Grosse F., Görlach M., Pospiech H. The N-terminus of the human RecQL4 helicase is a homeodomain-like DNA interaction motif. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 8309–8324 (2012).
- 46) Jensen M. B., Dunn C. A., Keijzers G., Kulikowicz T., Rasmussen L. J., Croteau D. L., Bohr V. A. The helicase and ATPase activities of RECQL4 are compromised by mutations reported in three human patients. *Aging*, **4**, 790–802 (2012).
- 47) Schurman S. H., Hedayati M., Wang Z., Singh D. K., Speina E., Zhang Y., Becker K., Macris M., Sung P., Wilson D. M. 3rd, Croteau D. L., Bohr V. A. Direct and indirect roles of RECQL4 in modulating base excision repair capacity. *Hum. Mol. Genet.*, **15**, 3470–3483 (2009).
- 48) Fan W., Luo J. RecQ4 facilitates UV light-induced DNA damage repair through interaction with nucleotide excision repair factor xeroderma pigmentosum group A (XPA). *J. Biol. Chem.*, **283**,

- 29037–29044 (2008).
- 49) Kohzaki M., Chiourea M., Versini G., Adachi N., Takeda S., Gagos S., Halazonetis T. D. The helicase domain and C-terminus of human RecQL4 facilitate replication elongation on DNA templates damaged by ionizing radiation. *Carcinogenesis*, **33**, 1203–1210 (2012).
- 50) Ghosh A. K., Rossi M. L., Singh D. K., Dunn C., Ramamoorthy M., Croteau D. L., Liu Y., Bohr V. A. RECQL4, the protein mutated in Rothmund-Thomson syndrome, functions in telomere maintenance. *J. Biol. Chem.*, **287**, 196–209 (2012).
- 51) Ferrarelli L. K., Popuri V., Ghosh A. K., Tadokoro T., Canugovi C., Hsu J. K., Croteau D. L., Bohr V. A. The RECQL4 protein, deficient in Rothmund-Thomson syndrome is active on telomeric D-loops containing DNA metabolism blocking lesions. *DNA Repair*, **12**, 518–528 (2013).
- 52) Croteau D. L., Rossi M. L., Canugovi C., Tian J., Sykora P., Ramamoorthy M., Wang Z. M., Singh D. K., Akbari M., Kasiviswanathan R., Copeland W. C., Bohr V. A. RECQL4 localizes to mitochondria and preserves mitochondrial DNA integrity. *Aging Cell*, **11**, 456–466 (2012).
- 53) De S., Kumari J., Mudgal R., Modi P., Gupta S., Futami K., Goto H., Lindor N. M., Furuichi Y., Mohanty D., Sengupta S. RECQL4 is essential for the transport of p53 to mitochondria in normal human cells in the absence of exogenous stress. *J. Cell Sci.*, **125**, 2509–2522 (2012).
- 54) Schwendener S., Raynard S., Paliwal S., Cheng A., Kanagaraj R., Shevelev I., Stark J. M., Sung P., Janscak P. Physical interaction of RECQ5 helicase with RAD51 facilitates its anti-recombinase activity. *J. Biol. Chem.*, **285**, 15739–15745 (2010).
- 55) Islam M. N., Paquet N., Fox D. 3rd., Dray E., Zheng X. F., Klein H., Sung P., Wang W. A variant of the breast cancer type 2 susceptibility protein (BRC) repeat is essential for the RECQL5 helicase to interact with RAD51 recombinase for genome stabilization. *J. Biol. Chem.*, **287**, 23808–23818 (2012).
- 56) Islam M. N., Fox D. 3rd., Guo R., Enomoto T., Wang W. RecQL5 promotes genome stabilization through two parallel mechanisms--interacting with RNA polymerase II and acting as a helicase. *Mol. Cell. Biol.*, **30**, 2460–2472 (2010).
- 57) Kassube S. A., Jinek M., Fang J., Tsutakawa S., Nogales E. Structural mimicry in transcription regulation of human RNA polymerase II by the DNA helicase RECQL5. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 892–899 (2013).
- 58) Thompson L. H. Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: the molecular choreography. *Mutat. Res.*, **751**, 158–246 (2012).
- 59) Imamura O., Fujita K., Itoh C., Takeda S., Furuichi Y., Matsumoto T. Werner and Bloom helicases are involved in DNA repair in a complementary fashion. *Oncogene*, **21**, 954–963 (2002).
- 60) Du X., Shen J., Kugan N., Furth E. E., Lombard D. B., Cheung C., Pak S., Luo G., Pignolo R. J., DePinho R. A., Guarente L., Johnson F. B. Telomere shortening exposes functions for the mouse Werner and Bloom syndrome genes. *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 8437–8446 (2004).
- 61) van Brabant A. J., Stan R., Ellis N. A. DNA helicases, genomic instability, and human genetic disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **1**, 409–459 (2000).
- 62) Eki T., Ishihara T., Katsura I., Hanaoka F. A genome-wide survey and systematic RNAi-based characterization of helicase-like genes in *Caenorhabditis elegans*. *DNA Res.*, **14**, 183–199 (2007).
- 63) Shiratori A., Shibata T., Arisawa M., Hanaoka F., Murakami Y., Eki T. Systematic identification, classification, and characterization of the open reading frames which encode novel helicase-related proteins in *Saccharomyces cerevisiae* by gene disruption and Northern analysis. *Yeast*, **15**, 219–253 (1999).