

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23114010

研究課題名（和文）複製フォークの安定化機構とその破綻による病態の解析

研究課題名（英文）Analysis of disorders defective in the mechanisms for fork stabilization

研究代表者

高田 穰（Minoru, Takata）

京都大学・放射線生物研究センター・教授

研究者番号：30281728

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 100,100,000円

研究成果の概要（和文）：高等真核細胞における染色体の様々な非コードDNA領域には、「脆弱部位」が進化上保存されており、生命維持に必須な何らかの機能が想定されている。本研究ではcommon fragile siteをはじめとした脆弱部位のクロマチン動態や、複製フォークの安定化機構について、ヒト疾患との関連に着目して解析を行った。具体的には、染色体ストレス高感受性部位のゲノムワイドな解析、複合体プロテオミクスによる複製フォーク安定化と崩壊機構、染色体ストレス下のチェックポイントキナーゼATRIP-ATR初期活性化機構などについて、重点的に解析した。

研究成果の概要（英文）：It has been known that there are chromosomal fragile sites such as common fragile sites (CFS) among non-coding DNA regions that are prone to break upon replication stress and are conserved throughout evolution. Therefore these fragile sites are supposed to have a critical function for sustaining life, but its exact role remains unknown. In this study, we focused on chromatin dynamics at the fragile sites and the mechanisms of checkpoint signaling that stabilizes stalled replication forks. In particular, we analyzed (1) genome wide distribution of a key Fanconi anemia factor FANCD2 upon replication stress, (2) mechanisms of fork stabilization and breakage by proteomics analysis, (3) activation mechanisms of ATR-ATRIP replication checkpoint kinase.

研究分野：分子生物学、放射線分子生物学

キーワード：複製ストレス ゲノム安定性 ファンコニ貧血経路 チェックポイント DNA複製

## 1. 研究開始当初の背景

高等真核細胞における染色体の様々な非コード DNA 領域には、「脆弱部位」が進化上保存されており、生命維持に必須な何らかの機能が想定されている。染色体は、内因性代謝産物、放射線、低線量紫外線、オンコジーン活性化、抗がん剤や複製阻害剤投与などにより DNA 損傷や複製ストレスを受ける。これらをまとめて本研究では「染色体ストレス」とよぶ。ヒト染色体には、こういったストレス下に断裂を示す common fragile site (CFS) と呼ばれる脆弱部位が数十カ所以上同定され、FRA3B (3 番染色体)、FRA16D (16 番染色体) などが代表的である。また複製と転写装置の衝突部位やテロメア、セントロメア、インターメア (非コード機能配列)、複製開始点、G-quadruplex (G4) など、ストレスを受けやすい高感受性部位であると予想される。

数百キロベースにおよぶ巨大ゲノム領域である CFS は、一般にイントロンに存在し、低用量の複製阻害剤アフィディコリン処理によって染色体断裂を来す。興味深いことに、CFS はがんにおけるゲノム再編成と変異のホットスポットでもある。CFS がなぜ染色体ストレスに高感受性なのかは、よくわかっていないが、最近の報告では、CFS では複製の開始がほとんど起こらず、ストレス下で複製が完了しないまま M 期に突入して染色体断裂を引き起こすというモデルが提唱されている (Nature 470:120-3, 2011)。

私はこの 10 年間、染色体ストレス応答欠損を示す特異な遺伝性疾患 ファンコニ貧血 (FA) の原因遺伝子群の機能と、その活性化分子機構の解析を行ってきた。FA はまれな小児遺伝性疾患で、白血病などの悪性疾患、骨髄幹細胞不全などを発症する。現在、20 種におよぶ FA 原因遺伝子産物が同定されており、FA コア複合体による FANCD2/FANCI 複合体のモノユビキチン化を中核としたシグナル

伝達経路を形成している。脆弱部位に染色体ストレスがかかると、複製フォークの停止に伴い、チェックポイントキナーゼの ATRIP-ATR が集積して活性化し、チェックポイント応答が開始され、DNA 修復機構、FA 経路などが発動する。これらの分子ネットワークがフォーク崩壊を防いで進行を再開し、染色体を安定に維持しており、この機構が破綻した場合には、反復配列間での組換えによる染色体再編成など、様々なゲノム不安定性が生じる。内外の研究動向は、染色体ストレス応答の分子機構と、悪性腫瘍、幹細胞不全、早期老化などの疾患がリンクすることを強く示唆している。しかし、CFS などの非コード DNA 領域におけるその分子機構の詳細や、初期の ATR 活性化機構と、具体的に複製フォークを崩壊から保護するメカニズムは十分に理解されていない。

## 2. 研究の目的

高等真核細胞染色体の非コード DNA 領域には、複製を阻害する薬剤の影響を受けやすい「染色体ストレス」高感受性領域のいわゆる「脆弱部位」が存在する。脆弱部位には代表的な common fragile site (CFS) の他に、反復配列やヘテロクロマチン部位があり、進化上保存され、何らかの必須な役割が想定される。通常これらの部位で進行を止められた複製フォークは修復のネットワーク (チェックポイント、ファンコニ貧血経路、DNA 組換え修復など) により維持されているが、それらが破綻すると発がん、幹細胞不全、早期老化などの病態が出現する。本研究では、非コード DNA 領域における CFS をはじめとした脆弱部位のクロマチン動態を、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) や生細胞イメージングによって解析し、非コード DNA 上で展開される染色体ストレスの応答因子と各脆弱部位の位置関係を同定し、ゲノム配列の面からその実体を探る。さらに、非コード領域安定化のため

の分子機構の初期活性化とエフェクター機構を含めた全貌解明を行う。また、他班と連携した「病態解析チーム」を主導して領域の基礎的な知見を老化やがんなどのヒト疾患理解へと展開する。

### 3. 研究の方法

1) 染色体ストレス高感受性部位の網羅的解析: 染色体ストレス下における DNA 損傷応答タンパク質のクロマチン集積を指標に、ストレス高感受性部位を同定し、その性状を解析すし、脆弱部位機能の解明をめざす。

2) 複合体プロテオミクスによる複製フォーク安定化と崩壊機構の解析: ATRIP や FA 因子の複合体精製や、フォスフォプロテオミクスによって染色体ストレス応答のネットワークの同定を試み、複製フォーク崩壊を防いで非コード DNA 領域を安定化するエフェクター機構の解明を目指す。

3) 染色体ストレス下のチェックポイントキナーゼ ATRIP-ATR 初期活性化機構の解析: 染色体ストレスの初期応答においては、中心分子である ATR がクロマチンに集積し、さらに様々な因子が ATR を活性化するが、その分子機構はいまだに十分理解されていない。そこで、染色体ストレス後の初期応答における ATR 制御の分子メカニズムの解明を行う。

### 4. 研究成果

(1) 領域内共同研究により、遺伝病ファンコニ貧血の原因遺伝子 FANCD2 が複製ストレス下で染色体脆弱部位である巨大遺伝子の中央部分のイントロン領域に結合することが明らかとなった。またこの結合には、転写とそれに伴う R-loop 形成を必要としていた (論文準備中)。

(2) 国際共同研究で、新規ファンコニ貧血遺伝子としてリングフィンガー型ユビキチンリガーゼである RFWD3 を同定した。さらに RFWD3 のターゲットとして RPA と RAD51 を

同定し、そのユビキチン化が相同組換え後期における分解を引き起こし、シナプス形成後の DNA 修復合成が進むことを明らかにした (論文準備中)。

(3) 日本人患者の解析によってファンコニ貧血の新規原因遺伝子として FANCT を同定した (Hira et al. *Am J Hum Genet* 2015)。

(4) 日本人患者においてアルデヒド分解酵素 ALDH2 の遺伝子型を調べ、活性を失ったバリアント型遺伝子をホモに持つ患者が極度に重症で生後すぐに MDS 発症すること、ヘテロ型でも骨髄不全の進行が促進されていることを明らかにした (Hira et al. *Blood* 2013)。

(5) ファンコニ貧血のキー分子 FANCD2 の会合分子を探索し、DNA 二重鎖切断末端をプロセスするヌクレアーゼである CtIP を同定した。CtIP は FANCD2 によってその局在を調節されていることがわかった (Unno et al. *Cell Rep* 2014)。

(6) ATR 初期応答における FA 分子の役割を解明した (Tomida et al. *NAR* 2013)。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 37 件)

1. Mutations in the Gene Encoding the E2 Conjugating Enzyme UBE2T Cause Fanconi Anemia. Hira A, Yoshida K, Sato K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Shimamoto A, Tahara H, Ito E, Kojima S, Kurumizaka H, Ogawa S, \*Takata M, Yabe H, Yabe M. *Am J Hum Genet*. 2015 Jun 4;96(6):1001-7. doi: 10.1016/j.ajhg.2015.04.022. (査読あり)
2. Modularized functions of the Fanconi anemia core complex. Huang Y, Leung JW, Lowery M, Matsushita N, Wang Y, Shen X, Huang D, Takata M, Chen J, \*Li L. *Cell Rep*. 2014 Jun 26;7(6):1849-57. doi: 10.1016/j.celrep.2014.04.029. (査読あり)

3. FANCD2 binds CtIP and regulates DNA-end resection during DNA interstrand crosslink repair. Unno J, Itaya A, Taoka M, Sato K, Tomida J, Sakai W, Sugasawa K, Ishiai M, Ikura T, Isobe T, Kurumizaka H, \*Takata M. *Cell Rep.* 2014 May 22;7(4):1039-47. doi: 10.1016/j.celrep.2014.04.005. ( 査読あり )
4. A novel interplay between the Fanconi anemia core complex and ATR-ATRIP kinase during DNA cross-link repair. Tomida J, Itaya A, Shigechi T, Unno J, Uchida E, Ikura M, Masuda Y, Matsuda S, Adachi J, Kobayashi M, Meetei AR, Maehara Y, Yamamoto KI, Kamiya K, Matsuura A, Matsuda T, Ikura T, Ishiai M, \*Takata M. *Nucleic Acids Res.* 2013 Aug 1;41(14):6930-6941. doi: 10.1093/nar/gkt467 ( 査読あり )
5. Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients. Hira A, Yabe H, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Nakamura J, Kojima S, Ogawa S, Matsuo K, Takata M, Yabe M. *Blood.* 2013 Oct 31;122(18):3206-9. doi: 10.1182/blood-2013-06-507962. ( 査読あり )
6. Sato K, Toda K, Ishiai M, Takata M, \*Kurumizaka H. DNA robustly stimulates FANCD2 monoubiquitylation in the complex with FANCI. *Nucleic Acids Res.* 2012 May 1;40(10):4553-61. doi: 10.1093/nar/gks053. ( 査読あり )
7. Histone chaperone activity of Fanconi anemia proteins, FANCD2 and FANCI, is required for DNA crosslink repair. Sato K, Ishiai M, Toda K, Furukoshi S, Osakabe A, Tachiwana H, Takizawa Y, Kagawa W, Kitao H, Dohmae N, Obuse C, Kimura H, Takata M, \*Kurumizaka H. *EMBO J.* 2012 Jul 24;31(17):3524-36. doi: 10.1093/nar/gks053 ( 査読あり )
8. Mcm8 and Mcm9 Form a Complex that Functions in Homologous Recombination Repair Induced by DNA Interstrand Crosslinks. Nishimura K, Ishiai M, Horikawa K, Fukagawa T, Takata M, Takisawa H, \*Kanemaki MT. *Mol Cell.* 2012 Aug 24;47(4):511-22. doi: 10.1016/j.molcel.2012.05.047. ( 査読あり )
9. A ubiquitin-binding protein, FAAP20, links RNF8-mediated ubiquitination to the Fanconi anemia DNA repair network. Yan Z, Guo R, Paramasivam M, Shen W, Ling C, Fox D 3rd, Wang Y, Oostra AB, Kuehl J, Lee DY, Takata M, Hoatlin ME, Schindler D, Joenje H, de Winter JP, Li L, Seidman MM, \*Wang W. *Mol Cell.* 2012 Jul 13;47(1):61-75. doi: 10.1016/j.molcel.2012.05.026. ( 査読あり )
10. Kitao H, Nanda I, Sugino RP, Kinomura A, Yamazoe M, Arakawa H, Schmid M, Innan H, Hiom K, \*Takata M. FancJ/Brip1 helicase protects against genomic losses and gains in vertebrate cells. *Genes to Cells* 2011 Jun;16(6):714-27. doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01523.x. ( 査読あり )
11. Direct Inhibition of TNF- Promoter Activity by Fanconi Anemia Protein FANCD2. Matsushita N, Endo Y, Sato K, Kurumizaka H, Yamashita T, Takata M, \*Yanagi S. *PLoS One.* 2011;6(8):e23324. doi: 10.1371/journal.pone.0023324. ( 査読あり )
12. Formaldehyde catabolism is essential in cells deficient for the Fanconi anemia DNA-repair pathway. Rosado IV, Langevin F, Crossan GP, Takata M, \*Patel KJ. *Nat Struct Mol Biol.* 2011 Nov 13;18(12):1432-4. doi: 10.1038/nsmb.2173. ( 査読あり )
13. Shigechi T, Tomida J, Sato K, Kobayashi M, Eykelboom JK, Pessina F, Zhang Y, Uchida E, Ishiai M, Lowndes NF, Yamamoto K, Kurumizaka H, Maehara Y, \*Takata M. ATR-ATRIP kinase complex triggers activation of the Fanconi anemia DNA repair pathway. *Cancer Res.* 2012 Mar 1;72(5):1149-1156. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2904. ( 査読あり )
14. Kitao H, \*Takata M. Fanconi anemia: a disorder defective in the DNA damage response. *Int J Hematol.* 2011 Apr;93(4):417-24. doi: 10.1007/s12185-011-0777-z. ( 査読あり )
15. \*Takata M. Guest editorial: fanconi anemia and the DNA damage response. *Int J Hematol.* 2011 Apr;93(4):415-6. doi: 10.1007/s12185-011-0832-9. ( 査読あり )

[学会発表](計 115 件)

1 . Identification of UBE2T as a novel

- Fanconi anemia gene. Asuka Hira, Kenichi Yoshida, Koichi Sato, Akita Shimamoto, Hidetoshi Tahara, Hitoshi Kurumizaka, Seishi Ogawa, Minoru Takata, Hiromasa Yabe, Miharuru Yabe. ICRR2015, Kyoto Japan May 25-29, 2015
- 2 . Mutations in the gene encoding the E2 conjugating enzyme UBE2T cause Fanconi anemia. A. Hira, K. Yoshida, K.Sato, Y. Shiraishi, K. Chiba, H. Tanaka, S. Miyano, A. Shimamoto, H.Tahara, E.Ito, S.Kojima, H. Kurumizaka, S.Ogawa, M.Takata, H.Yabe, M. Yabe. 27<sup>th</sup> Annual Fanconi anemia research fund Scientific Symposium. Toronto, Canada. September 17-20, 2015
  - 3 . UBE2T/FANCT is a novel FA gene identified in Japanese Fanconi anemia patients. Minoru Takata, Asuka Hira, Kenichi Yoshida, Koichi Sato, Akira Shimamoto, Hitoshi Kurumizaka, Seishi Ogawa, Hiromasa Yabe, and Miharuru Yabe. 16<sup>th</sup> Ataxia-Teleangiectasia Workshop. Beijing, China, October 11-14<sup>th</sup>, 2015
  - 4 . Genetic subtyping of Fanconi anemia in Japanese patients. Miharuru Yabe, Hiromasa Yabe, Kenichi Yoshida, Seishi Ogawa, Etsuro Ito, Yusuke Okuno, Hideki Muramatsu, Seiji Kojima, Asuka Hira, Minoru Takata. 27<sup>th</sup> Annual Fanconi anemia research fund Scientific Symposium. Toronto, Canada. September 17-20, 2015
  - 5 . Minoru Takata, Asuka Hira, Kenichi Yoshida, Koichi Sato, Akira Shimamoto, Hidetoshi Tahara, Hitoshi Kurumizaka, Seishi Ogawa, Hiromasa Yabe, and Miharuru Yabe 「UBE2T is a novel FA gene identified in Japanese Fanconi anemia patients」 The 9<sup>th</sup> 3R Symposium, 17-21, November, 2014 Gotemba Kogen Hotel 静岡県御殿場市
  - 6 . Minoru Takata. Comprehensive analysis of Japanese Fanconi anemia (FA) patients has led to the identification of an E2 enzyme UBE2T as a novel FA gene. 日米修復会議 エクシブ鳴門 10月29日 徳島県鳴門市 (招待講演)
  - 7 . FANCD2 in chromatin anchors CtIP and regulates DNA end resection during crosslink repair. J. Unno, A. Itaya, M. Taoka, K. Sato, J. Tomida, W. Sakai, T. Ikura, T. Isobe, H. Kurumizaka, M. Takata 25<sup>th</sup> Annual Fanconi anemia research fund Scientific Symposium October 24-27, 2013 Houston, Texas, USA
  - 8 . Asuka Hira, Hiromasa Yabe, Keitaro Matsuo, Minoru Takata, Miharuru Yabe : “ Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients ” 24<sup>th</sup> ANNUAL Fanconi Anemia Research Fund SCIENTIFIC SYMPOSIUM September 27-30 2012 Denver, Colorado, USA
  - 9 . Minoru Takata, Asuka Hira, Naoya Suzuki, Akira Niwa, Tatsutoshi Nakahata, Hiromasa Yabe, Megumu K. Saito, Keitaro Matsuo, Miharuru Yabe : “ Genetic interplay between the Fanconi anemia pathway and aldehyde metabolism in humans ” The 8<sup>th</sup> 3R Symposium Nov 2012 兵庫県淡路市
  - 10 . Minoru Takata : “ Molecular pathogenesis of Fanconi anemia ” 第54回日本小児血液・がん学会学術集会 2012年11月 神奈川県横浜市
  - 11 . Masamichi Ishiai, Koichi Sato, Kazue Toda, Satoshi Furukoshi, Akihisa Osakabe Hiroaki Tachiwana, Yoshimasa Takizawa, Wataru Kagawa, Hiroyuki Kitao, Naoshi Dohmae, Chikashi Obuse, Hiroshi Kimura, Minoru Takata, and Hitoshi Kurumizaka : “ Histone chaperon activity of Fanconi anemia proteins, FANCD2 and FANCI, is required for DNA crosslink repair ” The 8<sup>th</sup> 3R Symposium Nov 2012 兵庫県淡路市
  - 12 . Naoya Suzuki, Asuka Hira, Akira Niwa, Keitaro Matsuo, Minoru Takata, Miharuru Yabe, Tatsutoshi Nakahata, Megumu Saito: “ Mesodermal progenitors from reprogrammed FA cells were affected by ALDH2 enzymatic activity ” ASH highlights in Asia 2013, March 23-24 2013, Shanghai, China
  - 13 . Minoru Takata : The Sugahara Memorial International Symposium on" Prospective Topics and Charm of Radiation Biology". “ Fanconi anemia and the DNA damage response ” Jan 25-26, 2012 Kyoto
  - 14 . Junya Unno, Akiko Itaya, Junya Tomida, Tsuyoshi Ikura, Minoru Takata: “ Mass spectrometric analysis identifies factors

associated with the Fanconi anemia proteins FANCD2 and FANCI” 日本分子生物学会第 34 回年会 2011 年 12 月 神奈川県横浜市

- 15 . J.B.Wilson, Y.Xiao, G.M.Kupfer, M.Takata, N.J.Jones: Hypersensitivity to PARP-1 inhibitors and Reduced Homologous Recombination Repair in Mutant FANCD2 Cell Line. 23<sup>rd</sup> ANNUAL Fanconi Anemia Research Fund SCIENTIFIC SYMPOSIUM October 2011, Barcelona, Spain
- 16 . T.Shigechi, J.Tomida, K.Sato, Y.Zhang, E.Uchida, J.Eykelenbo, N.Lowndes, H.Kurumizaka, Y.Maehara, M.Takata: “An Absolute Requirement of ATRIP-ATR Kinase in Replication Stress-induced Triggering of the FA Pathway Activation” 23<sup>rd</sup> ANNUAL Fanconi Anemia Research Fund SCIENTIFIC SYMPOSIUM October 2011 Barcelona, Spain
- 17 . H. Kitao, R. Nakanishi, M. Iimori, Y. Fujinaka, M. Tuul, N. Yamashita, M. Takata, Y. Kakeji, Y. Maehara: “Involvement of FancJ and Msh2 in the Cellular Response to 5-FU-Induced DNA Damages” 23<sup>rd</sup> ANNUAL Fanconi Anemia Research Fund SCIENTIFIC SYMPOSIUM October 2011, Barcelona, Spain
- 18 . J. Tomida, A. itaya, T. Shigechi, J. Unno, E. Uchida, R. Meetei, Y. Maehara, M. Ishiai, M. Takata: “The Fancni Anemia Core Complex Promotes ATR Signaling” 23<sup>rd</sup> ANNUAL Fanconi Anemia Research Fund SCIENTIFIC SYMPOSIUM October 2011, Barcelona, Spain

〔図書〕(計 5 件)

ゲノムを司るインターメア 非コードDNAの新たな展開 小林武彦編 化学同人 11章 「ゲノム脆弱部位の維持と機能」 高田 穰 2015年

The Fanconi Anemia Pathway and Interstrand Cross-Link Repair. Masamichi Ishiai, Junya Tomida, Akiko Itaya, James Hejna, \*Minoru Takata. *DNA Replication, Recombination, and Repair*. pp 175-210. Edited by Fumio Hanaoka and Kaoru Sugawara. Springer Japan.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホ ム ペ ー ジ 等  
<http://house.rbc.kyoto-u.ac.jp/late-effect>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高田 穰 (Takata Minoru)  
京都大学・放射線生物研究センター・教授  
研究者番号: 30281728

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 終了時、3名。

石合正道 (Ishiai Masamichi)  
京都大学・放射線生物研究センター・准教授  
研究者番号: 90298844

勝木陽子  
京都大学・放射線生物研究センター・研究員  
研究者番号: 00645377

平明日香

京都大学・放射線生物研究センター・研究員  
研究者番号: 30772777