

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005～2009
 課題番号：17013083
 研究課題名（和文）染色体安定性と発がん抑制に関わるファンconi貧血原因遺伝子群の
機能解析
 研究課題名（英文）Functional analysis of Fanconi anemia genes that are involved in
 chromosomal stability and tumor prevention
 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

研究成果の概要（和文）：ファンconi貧血は、代表的な染色体不安定性疾患で、小児期における白血病などの高発がんをその特徴とする。ファンconi貧血の原因遺伝子群の形成するファンconi貧血経路は、DNA 損傷によって活性化し、発がん抑制に機能していると思われる。我々は、ファンconi貧血経路の分子機能を、主にニワトリ DT40 細胞株による遺伝子破壊株の樹立によって解析し、ファンconi貧血経路の DNA 修復機能とその調整機構の一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Fanconi anemia is a hereditary disorder characterized by increased incidence of cancer and leukemia. FA is caused by a mutation in any one of the 14 FA genes. Their products form a nuclear biochemical network called FA pathway. We analyzed molecular function of the FA pathway by making knockout mutant cell line from chicken DT40 cells. We have partially clarified molecular details of the FA pathway and its regulatory mechanism in the DNA damage response.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	10,700,000	0	10,700,000
2006 年度	10,700,000	0	10,700,000
2007 年度	10,700,000	0	10,700,000
2008 年度	10,700,000	0	10,700,000
2009 年度	10,700,000	0	10,700,000
総計	53,500,000	0	53,500,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：ファンconi貧血、ゲノム不安定性、FANCD2、FANCI、ユビキチン化

1. 研究開始当初の背景

ファンconi貧血 (FA) は小児の劣性遺伝性疾患で、進行性骨髄不全と骨格異常を呈し、高発がん性を示す代表的ゲノム不安定性疾患

である。細胞レベルでは、染色体不安定性と、マイトマイシン C (MMC) などの DNA クロスリンカー剤に対する高感受性が特徴的である。これまでに 8 つの原因遺伝子

(A/C/D1/D2/E/F/G/L など) が同定されたが、その機能解明は遅れている (注: 2010 年現在、同定済みの FA 原因遺伝子は 14 個となった)。我々はニワトリ B 細胞株 DT40 において FA 遺伝子をノックアウトし、FA 遺伝子群が相同 DNA 組み換え (homologous recombination、HR) による DNA 二重鎖切断 (DSB) 修復に重要であることを見いだした。また、FancD1 が家族性乳がん遺伝子 BRCA 2 (HR 中心分子 Rad51 の調節因子でもある) に等しいことが報告され、FA が DNA 損傷応答に欠損をもつ病態であることが明らかとなった。しかし、FA 遺伝子の機能の本質はいまだに明らかではなく、その調節機能の解明も不十分である。

2. 研究の目的

本研究では、FA 遺伝子群の機能と、その調節機構の解明を通じて、染色体の維持安定化装置とその破綻による発がん機構の理解を深めることを目指す。

3. 研究の方法

主にニワトリ B 細胞株である DT40 細胞をモデル系として使用し、ノックアウト細胞の解析、さらにダブルノックアウトによるエピスタシス解析を行った。また、2hybrid 法などで同定した新規遺伝子の機能検討、D2 蛋白の精製、ユビキチン化 FANCD2 受容体の単離などを試みた。

4. 研究成果

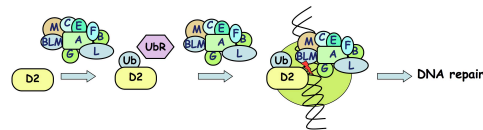
(1) FANCD2 モノユビキチン化の機能的意義について：

FANCD2 のモノユビキチン化サイトであるリジンをアルギニンに変換する (K563R) ようにデザインしたノックインベクターでジェンターゲットングを行い、変異型の FANCD2 のみを発現する細胞を作成したところ、

FANCD2 欠損細胞、E3 リガーゼである FANCL の欠損細胞などと同程度にシスプラチン感受性であり、FANCD2 のフォーカス形成もみられなかった。また、細胞を分画して、核の可溶性分画とクロマチン分画にわけて調べると、クロマチンに移行した FANCD2 のみモノユビキチン化されており、可溶性分画ではされていないという関係が見いだされた。したがって、フォーカス形成、クロマチン移行、そして DNA 修復機能はすべてモノユビキチン化に依存しているものと考えられた。

そこで、我々はニワトリ FANCD2 のモノユビキチン化サイト変異体 (D2KR) の C 末端にユビキチンを一つだけ融合させ、FANCD2 欠損細胞に発現させることを試みた。この蛋白 (D2KR-Ub) はクロマチン移行し、シスプラチン感受性を野生型に近いレベルにまで相補した。また、D2KR-Ub がコア複合体欠損細胞を相補できるかどうか調べたところ、FANCG、FANCC、FANCL のいずれの細胞も全く相補されず、しかもクロマチンへの移行がみられなかった。ヒストン H2B-GFP との融合により D2KR を強制的にクロマチンに移行させたところ (D2KR-H2B-GFP) 機能相補ができたのは FANCD2 欠損細胞のみで、FANCC、FANCG、FANCL 欠損細胞では全く相補がみられなかった。以上の結果から我々は、FA コア複合体は以下の 3 つの機能を持つと結論した (図)

Our proposed model:



The core complex functions in 3 steps:

1. Mono-ubiquitination of FancD2
2. Chromatin targeting of FancD2
3. DNA repair

(Matsuhista et al. Mol Cell 2005)。まずコア複合体は FANCL サブユニットによって

FANCD2 をモノユビキチン化する。さらに、コア複合体はモノユビキチン化された FANCD2 のクロマチン移行に関与する。このステップでモノユビキチン受容体 (UbR) が働くはずである。最後に、コア複合体は DNA 損傷局所で FANCD2 とともに DNA 修復機能を担っていると考えられた。

(2) FANCD2 会合因子の同定と解析：

上記のモノユビキチン受容体 (UbR) を同定し、さらに FANCD2 の機能に迫るため、FANCD2 の会合分子の同定を試みた。まず、ユビキチンを融合させた FANCD2 をベイトとして、酵母 2 ハイブリッド法によりスクリーニングを行ったところ、陽性クローンの中に FANCE が見つかった。しかし、その後の解析で FANCE は FANCD2 自体とは結合できるが、ユビキチン結合能がないことが判明し、UbR ではないと考えられた。そこで、TAP タグを用いて FANCD2 をプルダウンし、銀染色して会合分子の同定をマススペック解析したところ、KIAA1794 が同定された。なお、現在ひきつづき FANCD2, FANCI, FANCL の複合体調整と、マススペクトロメトリによる会合因子の同定を進めている。

(3) FANCI 分子の機能解析

2006 年 1 月ハーバード大の Elledge 博士から、彼らが同定した新規分子 FANCI についての共同研究の申し込みがあり、驚いたことに (あるいは残念なことに)、これが KIAA1794 と同一の分子であった (Cell. 2007 Apr 20; 129 (2): 289-301.)。彼らは、FANCI が FANCD2 のパラログで FANCD2 に会合して I-D2 複合体を形成し、コア複合体によってモノユビキチン化され、クロマチンに移行してフォーカスを形成すること、また、FANCI と FANCD2 はモノユビキチン化に関して相互依存の関係にあると報告している。したがって、この時点で、我々

が提唱したコア複合体の新規機能は、FANCI のモノユビキチン化を通じた機能である可能性が指摘された。一方、一次構造からみて、FANCI にはユビキチン結合ドメインが存在せず、FANCI がユビキチン受容体であることは否定的である。

我々は、FANCI の欠損細胞を作成し、FANCI の各種変異体をノックアウト株に発現させ検討した。FANCI 欠損細胞における FANCD2 のモノユビキチン化はモノユビキチン化サイト変異体 (K525R) 発現でも正常化し、少なくとも DT40 において、FANCI のモノユビキチン化は FANCD2 モノユビキチン化と機能に必須とは言えなかった。実際、Elledge らの Cell 論文においても、モノユビキチン化サイト変異型 FANCI の発現で、変異細胞の感受性、染色体断裂ともかなり正常化している。また、上記の D2KR-Ub、D2KR-H2B を発現させた FANCD2 欠損細胞は、シスプラチン感受性はかなり正常化しているが、FANCD2、FANCI ともモノユビキチン化は検出されず、やはり FANCI はモノユビキチン化されなくてもある程度機能すると思われる。したがって、我々の提唱したコア複合体の新規機能が実は FANCI のモノユビキチン化酵素としての役割とは考えにくい。

また、我々は、FANCI と FANCD2 の複雑な依存関係を明らかにするため、そのダブル欠損細胞を作成した。FANCI は FANCD2 のモノユビキチン化に必須であるが、クロマチン移行と DNA 修復にも必要なかどうか、ダブル欠損細胞に D2KR-Ub と D2KR-H2B 融合蛋白を発現させて検討した。両者とも FANCI 欠損を相補できず、FANCI は、ユビキチン化 FANCD2 のクロマチン移行と、クロマチン上の FANCD2 による DNA 修復そのものにも必須であると考えられた (未発表)。

(4) FANCI リン酸化の意義

FANCI は DNA 障害により活性化される ATM/ATR キナーゼの基質の候補として同定され、そのリン酸化も報告されている。我々は、リン酸化候補部位の変異体のシリーズと、リン酸化セリン、スレオニン、チロシン残基に結合するフォスタグを含んだ SDS-PAGE (広大薬学部小池教授、木下准教授との共同研究)での泳動度の変化により FANCI のリン酸化を検出した。モノユビキチン化サイト (K525R) 変異体はリン酸化されること、6つのリン酸化候補部位をすべて変異させた FANCI (Ax6型)においてリン酸化とモノユビキチン化がどちらも検出不能になることを見いだした。

さらに Ax6型 FANCI は FANCI 欠損細胞における FANCD2 モノユビキチン化欠損とシスプラチン感受性を相補できなかった。したがって、FANCI リン酸化は、FANCD2 と FANCI の両者のモノユビキチン化に必須であり、FA 経路の「スイッチ」として働くと考えられる。このスイッチを人為的に操作できれば、FA 自体の治療、家族性乳がんにおける発がん予防、FA 経路の抑制を利用した抗がん剤効果の飛躍的増強等への応用の可能性があり、さらにその分子機構を明らかにする必要がある。現在引き続き、FANCI のリン酸化酵素の同定、その分子機構等について、解析を進めている。

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 14 件)

1. Ohashi K., Takigawa N., Osawa M., Ichihara E., Takeda H., Kubo T., Hirano S., Yoshino T., Takata M., Tanimoto M., and Kiura K. Chemopreventive effects of gefitinib on nonsmoking-related lung tumorigenesis in activating epidermal growth factor receptor transgenic mice. *Cancer Res.* 69:7088-7095 (2009) 査読有
2. Takata M., Ishiai M., and Kitao H. The Fanconi anemia pathway: Insights from somatic cell genetics using DT40 cell line. Invited review. *Mutat. Res.* 668:92-102 (2009) 査読有
3. Ishiai M., Kitao H., Smogorzewska A., Tomida J., Kinomura A., Uchida E., Saberi A., Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta E., Koike T., Tashiro S., Elledge S.J., and Takata M. FANCI phosphorylation functions as a molecular switch to turn on the Fanconi anemia pathway. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15: 1138-1146 (2008) 査読有
4. Tomida J., Kitao H., Kinoshita E., and Takata M. Detection of phosphorylation on large proteins by western blotting using Phos-tag containing gel. *Nature Protocols* doi:10.1038/nprot. 232 (2008) 査読有
5. Wilson J.B., Yamamoto K., Marriott A.S., Hussain S., Sung P., Hoatlin M.E., Mathew C.G., Takata M., Thompson L.H., Kupfer G.M., and Jones N.J. FANCG promotes formation of a newly identified protein complex containing BRCA2, FANCD2 and XRCC3. *Oncogene* 27:3641-3652 (2008) 査読有
6. Kitao H., Kimura M., Yamamoto K., Seo H., Namikoshi K., Agata Y., Ohta K., and Takata M. Regulation of histone H4 acetylation by transcription factor E2A in Ig gene conversion. *Int. Immunol.* 20: 277-284 (2008) 査読有
7. Oestergaard V.H., Langevin F., Kuiken H.J., Pace P., Niedzwiedz W., Simpson L.J., Ohzeki M., Takata M., Sale J.E., and Patel K.J. Deubiquitination of FANCD2 Is Required for DNA Crosslink Repair. *Mol. Cell* 28: 798-809 (2007) 査読有
8. Ridpath J.R., Nakamura A., Tano K., Luke A.M., Sonoda E., Arakawa H., Buerstedde J.M., Gillespie D.A., Sale J.E., Yamazoe M., Bishop D.K., Takata M., Takeda S., Watanabe M., Swenberg J.A., and Nakamura J. Cells deficient in the FANCD2/BRCA pathway are hypersensitive to plasma levels of formaldehyde. *Cancer Res.* 67: 11117-11122 (2007) 査読有
9. Ling C., Ishiai M., Ali A.M., Medhurst A.L., Neveling K., Kalb R., Yan Z., Xue Y., Oostra A.B., Auerbach A.D., Hoatlin M.E., Schindler D., Joenje H., de Winter J.P., Takata M., Meetei A.R., and Wang W. FAAP100 is essential for activation of the Fanconi anemia-associated DNA damage response pathway. *EMBO J.* 26:2104-2114 (2007) 査読有
10. Takata M., Kitao H. and Ishiai M. Fanconianemia: genetic analysis of a

human disease using chicken system.
Cytogenet Genome Res.
117: 346-351 (2007) 査読有

11. Ogino A., Kitao H., Hirano S., Uchida A., Ishiai M., Kozuki T., Takigawa N., Takata M., Kiura K., and Tanimoto M. Emergence of Epidermal Growth Factor Receptor T790M Mutation during Chronic Exposure to Gefitinib in a Non Small Cell Lung Cancer Cell Line. *Cancer Res.* 67:7807-7014 (2007) 査読有
12. Seki S., Ohzeki M., Uchida A., Hirano S., Matsushita N., Kitao H., Oda T., Yamashita T., Kashihara N., Tsubahara A., Takata M., and Ishiai M. A requirement of FancL and FancD2 monoubiquitination in DNA repair. *Genes Cells* 12: 299-310 (2007) 査読有
13. Kitao H., Yamamoto K., Matsushita N., Ohzeki M., Ishiai M., and Takata M. Functional interplay between BRCA2/FANCD1 and FANCC in DNA repair. *J. Biol. Chem.* 281: 21312-21320 (2006) 査読有
14. Matsushita N., Kitao H., Ishiai M., Nagashima N., Hirano S., Okawa K., Ohta T., Yu D.S., McHugh P.J., Hickson I.D., Venkitaraman A.R., Kurumizaka H., and Takata M. A FancD2-Monoubiquitin Fusion Reveals Hidden Functions of Fanconi Anemia Core Complex in DNA Repair. *Mol. Cell* 19: 841-847 (2005) 査読有

[学会発表] (計 7 件)

1. Takata M., Tomida J., Itaya A., Shigechi T., Ishiai M. Regulation Of Cross-Link Repair Through The Fanconi Anemia Pathway. 高松宮がん研究基金シンポジウム(東京, 11月10-12日, 2009) 招待講演 (査読なし)
2. 高田 穰 「高発がん遺伝病ファンコニ貧血の分子メカニズム」 第 71 回 日本血液学会学術集会 シンポジウム「小児血液腫瘍の発症リスクと先天異常」(京都, 10月23-25日, 2009) 招待講演
3. Takata M. 「DNA damage signaling in the Fanconi anemia pathogenesis」

第 51 回小児血液学会シンポジウム
「DNA damage response and hematological disorder」(千葉, 11月27-29日, 2009) 招待講演

4. Ishiai M., Kitao H., and Takata M. FANCI phosphorylation functions as a molecular switch to turn on the Fanconi anemia pathway. Symposium “DNA repair network deficiency and carcinogenesis”. 第 67 回日本癌学会学術総会 (名古屋, 10月29日, 2008) (査読なし)
5. 高田 穰 特別講演 「ゲノムの安定性維持メカニズムとファンコニ貧血」 第 101 回小児血液腫瘍懇話会 (東京・経団連会館, 7月18日, 2008)
6. Takata M. FancD2/FancI complex regulates crosslink repair in the Fanconi anemia pathway. “Chromosome and Genome Stability and Instability”. **Chromosome Cycle International Symposium** (大阪, 11月7-8日, 2007). 招待講演
7. Takata M. Functional Pathways in Recombinational Repair. **Keystone Symposia** “Genome Instability and Repair” Breckenridge, CO, USA. Jan 17-22, 2007 招待講演

[その他]
ホームページ等
http://www.rbc.kyoto-u.ac.jp/Late_Effect/Site_1/Welcome.html

6. 研究組織
(1)研究代表者

高田 穰
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

松下 暢子
川崎医科大学・医学研究科・助手
研究者番号：30333222

平野 世紀
川崎医科大学・医学研究科・助手
研究者番号：20368616

北尾 洋之
京都大学・放射線生物研究センター・研究員
研究者番号 30368617

富田 純也
京都大学・放射線生物研究センター・研究員
研究者番号：50511367