

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 B  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19390087  
 研究課題名（和文）複製フォーク停止に応答するチェックポイントキナーゼによるユビキチンシステム制御  
 研究課題名（英文） Regulation of the ubiquitin system by checkpoint kinases in response to stalled replication forks  
 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：

ファンconi貧血は骨髄不全，高発がん性，DNA クロスリンク修復欠損を特徴とする遺伝性疾患である．本研究では DNA 損傷後誘導される FANCI 蛋白質のリン酸化が，DNA 修復に重要な FANCD2 蛋白質モノユビキチン化の分子スイッチとして機能することを明らかにした．現在，FANCI リン酸化が上流のコア複合体（ユビキチン E3 リガーゼ）の活性をいかなるメカニズムで制御するのか，検討を進めている．

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
20 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
年度			
総計	10,600,000	3,180,000	13,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：ファンconi貧血、チェックポイントキナーゼ、リン酸化、モノユビキチン化

## 1. 研究開始当初の背景

ファンconi貧血 (FA) はまれな小児の遺伝病で、DNA 損傷応答に欠損を持つ代表的な疾患である。臨床的には進行性骨髄不全、骨格異常、さらに白血病などの高発がん性を示す。細胞レベルでは、特異な染色体異常と、mitomycin C (MMC) などの DNA クロスリンク剤に対する高感受性が特徴的である。現在その本質は、DNA 損傷による複製フォーク停止に対する応答メカニズムの欠損と考えられている。

FA には現在 13 の相補群/原因遺伝子が同定されている<sup>1)</sup>。A 群、B 群・・・の原因遺伝子はそれぞれ FANCA, FANCB・・・と呼ばれる。新規 FA 遺伝子の探索は今も続いており、その数は、今後さらに増える見込みである (私信)。D1 (=BRCA2), J (=Brip1), N (=PALB2) の 3 つの遺伝子は健常人における乳がんの 5% を占める家族性乳がんの原因にもなっている。一方、患者が見つからない FA 関連遺伝子が二つ同定されている (FAAP24, FAAP100)。

いずれの FA 遺伝子の欠損においても、共通する生化学経路である FA 経路の機能が障害され、結果としてほぼ同一の症状を呈する疾患が出現すると考えられている。現在知られている FA 遺伝子のうち、8 つの産物は FAAP24 および FAAP100 とともに核内で会合し FA コア複合体を形成する。FA コア複合体は複製フォーク停止後に活性化される複合体型ユビキチン E3 リガーゼであり、下流因子である FANCD2 と FANCI をモノユビキチン化する。両者は会合し、I-D2 複合体を形成している。FANCD2 のユビキチン化は、I-D2 複合体をクロマチンに移行させる局在シグナルであり、損傷部位への集積 (フォーカス形成) と、相同組換えと損傷乗り越え複製による

DNA 修復活性に必須である。

ATM と ATR は、ゲノム傷害を検知し下流のエフェクター群を活性化する最上流のチェックポイントキナーゼと考えられている。前者はおもに DNA 二重鎖切断に応答し、後者は複製フォークの進行を阻害する DNA 傷害 (UV 損傷やクロスリンク損傷) によって活性化される。FA 経路を活性化する薬剤は、共通して複製フォーク停止と ATR 活性化を引き起こすし、ATR 変異細胞 (Seckel 症候群細胞) や ATR ノックダウンで D2 モノユビキチン化が低下するため、FA 経路の上流にあるのはおそらく ATR キナーゼであると考えられている。しかし、実際にどの FA 分子が FA 経路活性化において ATR でリン酸化される基質分子なのかは不明であった。

## 2. 研究の目的

我々は、新規に同定された FANCI 遺伝子に着目して、DNA 損傷による複製フォーク停止後、FA 原因遺伝子の形成する FA 経路がどのように活性化されるのか検討した。

## 3. 研究の方法

ニワトリ DT40 細胞において、FANCI 遺伝子をノックアウトし、FANCI 欠損細胞を作成した。さらにニワトリ FANCI の cDNA をクローニングし、GFP との融合蛋白質として発現ベクターを構築した。FANCI の複数のリン酸化候補部位のセリンないしスレオニンを、単独ないし同時にアラニンないしアスパラギン酸に置換した変異体や、モノユビキチン化部位の変異体発現ベクターを作成し、FANCI 欠損細胞に発現させた。発現の確認はフローサイトメトリと抗 GFP 抗体によるウェスタンブロットで行った。

野生型や変異型の FANCI を発現した細胞をシスプラチン含有培地で培養し、24 時間後の

生存率を propidium iodide 染色とフローサイトメトリによって測定した。またメチルセルロース培地におけるコロニー形成率を測定した。

細胞を MMC 処理し、ライセート調整後、ウェスタンブロッティングで FANCD2, GFP-FANCI のモノユビキチン化を検討した。また、フォスタグ試薬を含んだゲルによるウェスタンブロッティングで、リン酸化 FANCI の検出を行った。

GFP-FANCI, FANCD2,  $\gamma$ H2AX, Rad51 の細胞内分布を蛍光顕微鏡により観察し、フォーカス形成を検討した。

#### 4. 研究成果

ニワトリ DT40 細胞株由来の FANCI 欠損細胞は、FANCI 欠損ヒト細胞と同様に、FANCD2 のモノユビキチン化とフォーカス形成ができず、高度なシスプラチン感受性を示した。したがって、FANCI 欠損 DT40 細胞は、FANCI 遺伝子の機能を解析するのに適切なモデル系と思われた。

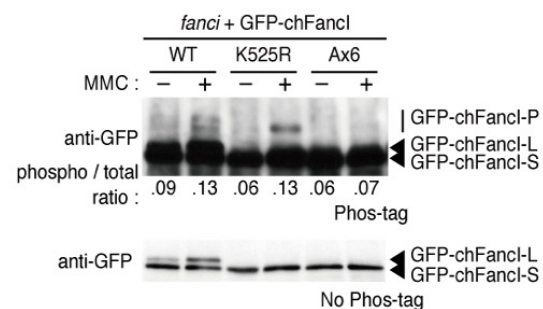
ニワトリ FANCI cDNA をクローニングし、ヒト FANCI とアミノ酸配列レベルで比較したところ、モノユビキチン化部位 (K525) の近傍に、6 つの S/TQ モチーフがクラスターを形成して保存されていることを見いだした (S/TQ クラスタードメイン)。これらのリン酸化候補部位を様々な組み合わせでアラニンに置換した変異体を作成し、GFP 融合蛋白質として FANCI 欠損細胞に発現させた。また K525 をアルギニンに置換した変異体 (K525R) も用意した。

まず、FANCI モノユビキチン化の機能的意義を探るため、GFP-FANCI K525R 発現細胞の表現型を調べたところ、野生型の FANCI (GFP-FANCI WT) とほぼ同様にシスプラチン感受性を相補した。また、DNA 損傷後

の FANCI と FANCD2 のモノユビキチン化とフォーカス形成も正常に起こっており、FANCI のモノユビキチン化は機能的上それほど重要ではないことが判明した。

次に、FANCI リン酸化が FA 経路活性化に果たす役割を調べるため、アラニン置換体発現細胞を解析した。S/TQ クラスタードメイン中の 6 カ所のリン酸化候補部位をアラニンに置換すると (GFP-FANCI Ax6) は、FANCI 欠損細胞とほぼ同等のシスプラチン感受性を示した。予想通り FANCI と FANCD2 のモノユビキチン化とフォーカス形成は、Ax6 変異体発現細胞では強く抑制されていた。

これらの変異体において実際に FANCI がリン酸化されているかどうかを検討するため、フォスタグ試薬を用いてウェスタンブロッティングを行った (図)。フォスタグは広



島大学薬学部の小池教授、木下准教授により開発された試薬で、リン酸化アミノ酸に特異的に結合する。そのためフォスタグを含んだゲルを用いれば、リン酸化ペプチドを電気泳動度がシフトしたバンドとして検出可能である。MMC 刺激後、野生型の FANCI においては、2 本のシフトしたバンドを認め、それぞれリン酸化 FANCI と、リン酸化され、かつモノユビキチン化された FANCI に相当すると思われた。実際、GFP-FANCI K525R 発現細胞では、上方にシフトしたバンドが消失していた。したがって、FANCI はリン酸化されるためモノユビキチン化される必要はないと結論できる。反対に、Ax6 発現細胞

では、リン酸化された FANCI に相当するバンドを認めず、リン酸化がモノユビキチン化の必須条件であるが、逆は真ではないことを示している。また、このデータにより DNA 損傷後の FANCI リン酸化は、6 カ所の S/TQ 部位に主に起こることも明らかとなった (図)。

FANCI リン酸化の FANCD2 のモノユビキチン化における役割をさらに検討するため、様々な組み合わせで Ax6 変異体のアラニンをアスパラギン酸と置換する変異体を作成した。アスパラギン酸は酸性アミノ酸でありリン酸化をミミックする可能性がある。6 カ所のアラニンをすべてアスパラギン酸に置換した変異体 (Dx6) ではシスプラチン感受性が野生型に近いレベルにまで回復し、FANCD2 と FANCI のモノユビキチン化が DNA 損傷を与えなくても恒常的に起こっていた。さらに、GFP-FANCI Dx6 は恒常的にフォーカスを形成し、DNA 損傷を与えてもそれほどフォーカスの増加は見られなかった。面白いことに、これらのフォーカスは、DNA 二重鎖切断マーカーである  $\gamma$ H2AX や相同組換え蛋白質である Rad51 とは共局在しなかった。Dx6 蛋白質は、複製中に自然に形成される DNA 損傷 (一本鎖 DNA が考えやすい) に集積している可能性がある。

以上の結果は、FANCI リン酸化が FANCD2 モノユビキチン化の分子スイッチとして機能していることを強く示唆している。我々は、FANCD2 欠損細胞において、ATR によるリン酸化候補部位 (S/TQ モチーフ) のすべて (10 カ所) をアラニンに置換し、この変異体が野生型 FANCD2 とほぼ同等のシスプラチン感受性を相補できることを観察しており、FANCD2 自体のリン酸化はそれほど重要ではなさそうである。またこの結果は、ある蛋白質のリン酸化がパートナー蛋白

質のモノユビキチン化の引き金となるといういまままでに知られていないユニークな現象を明らかにした。FANCI リン酸化により他の FA 蛋白質との相互作用が変化しコア複合体の活性化につながるものと予想される。強制発現系で FANCD2 と Dx6 変異体の免疫沈降法で調べたが FANCI リン酸化は FANCD2 との会合には影響しなかった。いかに FANCI が FANCD2 のモノユビキチン化の引き金を引くのか、今後明らかにしていく必要がある。

#### 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 10 件)

- ① Ogino A, Kitao H, Hirano S, Uchida A, Ishiai M, Kozuki T, Takigawa N, Takata M, Kiura K, 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.* 2007 Aug 15;67(16):7807-14.
- ② Suehisa H, Toyooka S, Hotta K, Uchida A, Soh J, Fujiwara Y, Matsuo K, Ouchida M, Takata M, Kiura K, Date H. Epidermal growth factor receptor mutation status and adjuvant chemotherapy with uracil-tegafur for adenocarcinoma of the lung. *J Clin Oncol.* 2007 Sep 1;25(25):3952-7.
- ③ Messaoudi L, Yang YG, Kinomura A, Stavreva DA, Yan G, Bortolin-Cavaille ML, Arakawa H, Buerstedde JM, Hainaut P, Cavaille J, Takata M, Van Dyck E. Subcellular distribution of human RDM1 protein isoforms and their nucleolar accumulation in response to heat shock and proteotoxic stress. *Nucleic Acids Res.* 2007 Oct 1;35(19):6571-6587.

④ Ridpath JR, Nakamura A, Tano K, Luke AM, Sonoda E, Arakawa H, Buerstedde JM, Gillespie DA, Sale JE, Yamazoe M, Bishop DK, Takata M, Takeda S, Watanabe M, Swenberg JA, Nakamura J. Cells deficient in the FANC/BRCA pathway are hypersensitive to plasma levels of formaldehyde. *Cancer Res.* 2007 Dec 1;67(23):11117-22.

⑤ Oestergaard VH, Langevin F, Kuiken HJ, Pace P, Niedzwiedz W, Simpson LJ, Ohzeki M, Takata M, Sale JE, Patel KJ. Deubiquitination of FANCD2 Is Required for DNA Crosslink Repair. *Mol Cell.* 2007 Dec 14;28(5):798-809.

⑥ Kitao H, Kimura M, Yamamoto K, Seo H, Namikoshi K, Agata Y, Ohta K, Takata M. Regulation of histone H4 acetylation by transcription factor E2A in Ig gene conversion. *Int Immunol.* 2008 Feb;20(2):277-84.

⑦ Wilson JB, Yamamoto K, Marriott AS, Hussain S, Sung P, Hoatlin ME, Mathew CG, Takata M, Thompson LH, Kupfer GM, Jones NJ. FANCG promotes formation of a newly identified protein complex containing BRCA2, FANCD2 and XRCC3. *Oncogene.* 2008 Jun 12;27(26):3641-52.

⑧ Ohashi K, Rai K, Fujiwara Y, Osawa M, Hirano S, Takata K, Kondo E, Yoshino T, Takata M, Tanimoto M, Kiura K. Induction of lung adenocarcinoma in transgenic mice expressing activated EGFR driven by the SP-C promoter. *Cancer Sci.* 2008 Sep;99(9):1747-53.

⑨ Abe T, Ishiai M, Hosono Y, Yoshimura A, Tada S, Adachi N, Koyama H, Takata M, Takeda S, Enomoto T, Seki M. KU70/80, DNA-PKcs, and Artemis are essential for the rapid induction of apoptosis after massive DSB formation. *Cell Signal.* 2008 Nov;20(11):1978-85.

⑩ Ishiai M, Kitao H, Smogorzewska A, Tomida J, Kinomura A, Uchida E, Saberi A, Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T, Tashiro S, Elledge SJ, and Takata M. FANCI phosphorylation functions as a molecular switch to turn on the Fanconi anemia pathway. *Nat Struct Mol Biol.* 2008 Nov;15(11):1138-46.

[学会発表] (計 12 件)

①高田穰、北尾洋之、木野村愛子、石合正道 ; 「ファンconi貧血コア複合体によるモノユビキチン化と DNA クロスリンク修復制御」第 6 6 回日本癌学会学術総会、2007 年 10 月 3 日～5 日、横浜市

②H. Kitao, I. Nada, A. Kinomura, M. Takata. ; “Frequent Loss of the Immunoglobulin Heavy Chain Gene Occurs in FANCD2-deficient DT40 Cell Line.” Nineteenth Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium. Oct 8-11. Chicago.

③ M. Takata, H. Kitao, A. Kinomura, A. Smogorzewska, S. J. Elledge, M. Ishiai. ; “Role of FANCI protein and its phosphorylation for the Fanconi anemia pathway function.” Nineteenth Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium. Oct 8-11. Chicago.

④ M. Takata ; FANCD2/FANCI complex regulates crosslink repair in the Fanconi anemia pathway. “Chromosome and Genome Stability and Instability”. Chromosome Cycle International Symposium. Nov 7-8, 2007. Osaka.

⑤ 高田 穰、北尾洋之、木野村愛子、石合正道 ; 「ファンconi貧血コア複合体による FANCD2/FANCI複合体のモノユビキチン化と相同組換え修復。ワークショップ 放射線DNA 損傷修復機構研究の最前線 放射線影響学会

第50回大会 幕張メッセ 2007年11月14日～17日

⑥ 北尾洋之、ナンダインドラジット、木野村愛子、シュミットマイケル、高田穰；

「FANCI遺伝子欠損DT40細胞株で起こる免疫グロブリン重鎖遺伝子でのゲノム欠失」ワークショップ 第30回分子生物学会第80回日本生化学会合同大会、2007年12月11日～15日、横浜市

⑦ Ishiai M, Kitao H, 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 2008年10月28日～30日 名古屋市 2008年12月9日～12日 神戸

⑧ 富田純也、内田亜希子、北尾洋之、木下英司、内田恵美、小林昌彦、山本健一、小池透、石合正道、高田穰: 「ファンconi貧血経路の制御とFANCIタンパク質のリン酸化メカニズム」第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会 2008年12月9日～12日 神戸市

⑨ 富田純也、内田亜希子、北尾洋之、木下英司、内田恵美、小林昌彦、山本健一、小池透、石合正道、高田穰: 「ファンconi貧血経路の活性化制御とFANCIタンパク質のリン酸化メカニズム」日本放射線影響学会第51回大会 2008年11月19日～21日 北九州市

⑩ 高田 穰: 「ゲノムの安定性維持メカニズムとファンconi貧血」第101回 小児血液腫瘍懇話会 2008年7月18日 東京都

⑪ 高田 穰 (招待講演): 「ファンconi貧血経路によるゲノム安定化メカニズム」第3回放射線防護研究センターシンポジウム「生き物はどのようにして放射線に立ち向かうかーDNA 損傷応答と適応応答ー」 放射線総合

医学研究所 平成20年12月16日 千葉県

⑫ Minoru Takata. “Monoubiquitination- and phosphorylation-dependent activation of the Fanconi anemia pathway”. The 3rd International Open Laboratory Workshop “Recent Development in DNA Repair Studies”. February 27, 2009. 放射線総合医学研究所 千葉県

## 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

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  
富田純也 (Tomida Junya)  
京都大学 放射線生物研究センター 研究員  
研究者番号: 50511367