

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06487

研究課題名（和文）ファンコニ貧血における脂肪族アルデヒド代謝の影響

研究課題名（英文）The impact of fatty aldehyde metabolism in Fanconi anemia

研究代表者

酒井 恒（Sakai, Wataru）

神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・助教

研究者番号：70526251

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：申請者が独自に単離したFANCD2タンパク質と相互作用を示す因子との解析では、遺伝子破壊細胞株を用いた遺伝学的解析により、これまで報告されていなかったアルデヒド分子のゲノム安定性における影響について明らかにした。また、脂質代謝にตอบสนองしたFANCD2の細胞内動態の解析として、脂質代謝制御に重要なオルガネラの形成に関連したFANCD2の局在変化を見出した。このようなFANCD2の細胞内動態はこれまで他に報告がなく、脂質代謝環境の変化にตอบสนองした新規の細胞応答である。これらの結果は、DNA損傷応答とは独立したFANCD2の機能を検証する上で、重要な研究成果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

稀な遺伝疾患であるファンコニ貧血は多種多様な病態を示すことが知られている。それらは責任遺伝子産物FAタンパク質の機能異常に起因するが、脂質代謝異常に関してはその病態発症機序は依然として明らかでなく、根本的な治療法や予防法の開発も進んでいない。本研究課題ではFAタンパク質のひとつであるFANCD2と協調して機能する因子の同定およびその解析から、FANCD2の脂質代謝制御における新たな細胞応答を明らかにした。これらの研究成果は、ファンコニ貧血の病態発症機序の解明、および分子メカニズムに基づいた病態緩和法の開発の基盤になると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this project, an interaction factor with FANCD2 protein was identified from mass spectrum-based proteome screening. Genetic analysis with knockout cell lines of the FANCD2 interacting factor revealed the impact of endogenous fatty aldehyde molecules on genome stability. In situ proximity ligation assay revealed co-localization of FANCD2 and the interacting factor in not only the nucleus but also cytoplasm. Moreover, live cell imaging of EGFP-FANCD2 expressing cell line recognized a novel intracellular dynamics of FANCD2 in response to formation of organelles that are important for the regulation of lipid metabolism. This intracellular dynamics of FANCD2 have not been reported previously, and this is a novel cellular response of FANCD2 upon the lipid metabolism. These results indicate a possible function of FANCD2 independent of the DNA damage response.

研究分野：分子生物学、細胞生物学、化学物質影響

キーワード：ファンコニ貧血 アルデヒド代謝

## 1. 研究開始当初の背景

稀な遺伝疾患の一つであるファンコニ貧血 (Fanconi anemia, FA) は、幼少期から造血不全に起因する重度の貧血を呈し、多くは急性骨髄性白血病を発症する。現在までのところ 22 種類の責任遺伝子が同定されており、これらの遺伝子産物 (FA タンパク質) は、「FA 経路」と呼ばれる細胞内シグナル伝達経路を構成し、主に DNA 上に発生した鎖間架橋 (interstrand crosslink, ICL) 損傷の修復および、その細胞応答に関与することが判明している。

しかし、FA タンパク質の DNA 損傷応答に関する解析が大きく進展する一方で、ファンコニ貧血において明らかにされていない課題が依然として複数存在している。ファンコニ貧血患者は上述の症状のみならず多様な病態を示すことが報告されている。その代表的な病態として、ファンコニ貧血患者の半数以上でみられる内分泌機能や脂質代謝の異常については、FA タンパク質の DNA 損傷応答の異常だけでは発症機序の説明が困難である。また、ファンコニ貧血の研究においてもっとも重要な課題の一つとして、FA 経路が標的とする ICL 損傷が何か、またそれらがどのような機序で発生しているのか判明していないことが挙げられる。このような状況の中、本研究課題が開始された頃に、代謝産物として生体内で生成されるホルムアルデヒドやアセトアルデヒドが内因性 ICL 損傷を発生させる原因物質の一つであることを示す論文が発表された。分子内にアルデヒド基 (-CHO) を有する化合物であるアルデヒドは、核酸やタンパク質などの生体分子に対する反応性が非常に高く、細胞毒性が強い。国際がん研究機構では、複数のアルデヒド分子が「最も発がんリスクの高い物質」として分類されている。しかし、生体内で生じるアルデヒドは多種多様に存在するため、FA 経路の標的となる ICL 損傷の実態やその発生メカニズムに関しては、依然として不明な点が多く残されていた。

## 2. 研究の目的

生体内で生じるアルデヒドの無毒化に寄与するアルデヒド脱水素酵素 (ALDH) は、ヒトでは 19 種類存在し、それぞれ細胞内での局在や基質とするアルデヒドが異なる。また、一部のアルコール脱水素酵素 (ADH) に関してもホルムアルデヒドなどの代謝に関与していることが判明している。ファンコニ貧血における影響が最も研究されているのは、主にアルコール代謝によって生じるアセトアルデヒドを基質とする ALDH2、およびホルムアルデヒドの代謝に関与する ADH5 である。ALDH2 または ADH5 の機能異常は、アセトアルデヒドやホルムアルデヒド代謝が顕著に阻害されるため、FA ノックアウトマウスでは病態の重篤化を引き起こす。また、ヒトにおいても不活性型 ALDH2 を発現しているファンコニ貧血患者では病態発症の早期化が報告されている。しかし、これらのアルデヒド以外に生体内で生じるアルデヒドは多数存在するにも関わらず、ファンコニ貧血における影響は ALDH2、ADH5 以外には、十分に解析されていなかった。

申請者は本研究課題の申請時において、脂質代謝の結果として生じるアルデヒドを基質として働く ALDH の一つを、FA タンパク質である FANCD2 の相互作用因子として同定していた。脂質過酸化反応等によって生じるアルデヒドがファンコニ貧血の病態発症に関与する可能性については以前から指摘されているが、それらに関する研究はきわめて少なかった。そこで、本研究課題は脂質代謝における FA タンパク質の機能的影響を解析することによって、ファンコニ貧血の病態における脂質代謝由来のアルデヒドの影響を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ゲノム編集技術を用いた遺伝子破壊細胞の樹立、および遺伝学的相互作用の解析

申請者が FANCD2 の相互作用因子として同定した因子の機能異常が及ぼす影響を解析するため、クリスパー・キャス 9 を利用したゲノム編集技術を用いて遺伝子破壊細胞株の樹立を試みた。さらに FANCD2 との遺伝学的相互作用を解析するため、FANCD2 との二重遺伝子破壊細胞株の樹立もあわせて実行した。

### (2) 細胞内共局在領域の解析

当該因子と FANCD2 の相互作用が細胞内のどこで見られるのか不明であったため、細胞内における共局在を検証する目的として、蛍光タンパク質 mCherry を融合した ALDH と EGFP-FANCD2 を共発現させた細胞を樹立し、両因子の局在を共焦点レーザー顕微鏡により詳細に観察した。さらに、細胞内における微弱なタンパク質間相互作用および共局在を高感度に検出することが可能な Proximity ligation assay (PLA) を利用した共局在解析もあわせて行った。

### (3) 相互作用に必要な機能領域の解析

申請者は予備検討の段階で、当該因子と FANCD2 は安定的に相互作用することを免疫沈降解析で明らかにしていたが、その相互作用に必要な機能領域は不明であった。そのため、FLAG タグを付加したさまざまな変異型 FANCD2 を安定的に発現する細胞を樹立し、免疫沈降解析を行うこ

とにより、機能領域の特定を試みた。

#### (4) 脂質代謝に応答した FANCD2 の細胞内動態の解析

申請者はこれまでの解析において FANCD2 の欠損が細胞の脂質代謝制御に変化を引き起こすことを明らかにしていたが、逆に脂質代謝環境の変化に応答した FANCD2 の細胞内動態については不明であった。そのため、EGFP-FANCD2 を安定に発現する細胞を樹立し、脂肪酸の一つであるオレイン酸を添加した培地で細胞培養した時の FANCD2 の細胞内局在の変化を共焦点レーザー顕微鏡で解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) ゲノム編集技術を用いた遺伝子破壊細胞の樹立、および遺伝学的相互作用の解析

相互作用因子として同定した当該因子の遺伝子破壊細胞株の樹立を、ヒト骨肉腫由来の U2OS 細胞を用いて試みた。当初、遺伝子破壊細胞の樹立は難航したが、ガイド RNA のターゲットとなるゲノム DNA 領域の再検討を行い、新たなガイド RNA を用いた遺伝子破壊を行った結果、当該因子の発現が消失したクローンを複数単離することに成功した。さらに、その原因となるゲノム DNA 上の変異もサンガーシーケンス解析によって特定した。次に、FANCD2 との二重遺伝子破壊細胞株の樹立に関しても、最終的に二株のクローンの樹立に成功し、ゲノム DNA 上の変異も特定し遺伝子破壊を確認した。当該 ALDH の遺伝子破壊によって細胞内のアルデヒド代謝が欠失し、ゲノム DNA の安定的な維持・継承に異常をきたすことが予想されたため、まず申請者は FANCD2 単独の遺伝子破壊細胞の樹立も行い、これらの一連の遺伝子破壊細胞株を用いて、通常培養条件下における内因性の DNA 損傷レベルの検証を行った。この解析のため、ヒストンバリエーションである H2AX の 139 番目のセリンのリン酸化状態 (gamma H2AX) を DNA 損傷の指標として解析を行った。その結果、親株の U2OS 細胞と比較して、それぞれの遺伝子破壊細胞株で有意に DNA 損傷レベルが増加する結果が得られた。特に、二重遺伝子破壊細胞において高い DNA 損傷レベルが検出された。これは当該因子によるアルデヒドの無毒化(代謝)と FANCD2 をはじめとする FA タンパク質が機能する FA 経路 (DNA 修復) が、アルデヒドに対するゲノム安定性の維持に重要であることを示唆している。また、近年提唱されているアルデヒドに対する代謝と DNA 修復 (FA 経路) による二段階防御モデルが、当該因子においても適応されることを意味する。

今後は、本解析の条件下で細胞内に生じている DNA 損傷がどのようなものかを同定を進めると共に、当該因子と FANCD2 の相互作用の機能的な側面に関しても明らかにする予定である。ALDH はヒトにおいて 19 種類存在するが、一部の ALDH を除いてゲノム安定性への影響については十分に理解されていない。本研究課題で得られた結果は、これまで明らかにされていない ALDH の機能解析の重要性を示唆するデータと言える。

#### (2) 細胞内共局在領域の解析

FANCD2 の相互作用因子として同定された当該因子との細胞内局在を解析するため、それぞれの因子に蛍光タンパク質 (mCherry または EGFP) を付加したものを共発現した細胞を用いた生細胞イメージング解析を共焦点レーザー顕微鏡により行った。さまざまな条件下における観察を行ったが、両因子の明確な細胞内共局在は観察されなかった。そこで Proximity ligation assay (PLA) による *in situ* 共局在解析を検討したが、当該因子を特異的に認識する抗体が得られなかったため、PLA による細胞内共局在の解析は当初想定した条件では検出できなかった。そのため HA タグを付加した当該因子を安定発現する細胞を樹立し、抗 FANCD2 抗体と抗 HA 抗体を用いた PLA を試みた。その結果、両因子の共局在を示す PLA シグナルが、核内のみならず細胞質中においても有意なレベルで検出された。今回は抗 HA 抗体を用いた間接的な PLA による検出であったが、HA による非特異的なシグナルはほぼ検出されなかったため、本解析結果は両因子の特異的な細胞内共局在を検出できていると判断した。当該因子は細胞質中の脂質代謝に関与するオルガネラ領域に存在することが報告されているが、核内での機能は報告されていない。そのため、今後は核内における脂質代謝の可能性を含めて、より詳細な解析が必要になると考えられる。一方、FANCD2 は核内における DNA 損傷応答における機能解析は知られているが、細胞質中における他の因子との相互作用および機能については不明な点が多い。FA タンパク質の DNA 損傷応答とは独立した細胞質中の機能解析において、これらの結果は重要な手がかりとなる可能性が考えられる。

#### (3) 相互作用に必要な機能領域の解析

さまざまな変異型 FANCD2 を安定発現する細胞を樹立し、当該因子との相互作用を免疫沈降により解析した。その結果、FANCD2 の DNA 損傷応答に必須な翻訳後修飾である 561 番目のリジンのモノユビキチン化部位に変異を導入した変異型 FANCD2 (K561R) では、野生型 FANCD2 と同程度の共沈降を示し、当該因子との相互作用に影響がみられなかった。この結果は、両因子の相互作用は FANCD2 の DNA 損傷応答に必須の翻訳後修飾に依存しないことを示唆しており、これまでに知られている DNA 損傷に応答した FANCD2 の機能とは独立した相互作用である可能性が考えられる。さらに、FANCD2 の C 末端領域を欠失した変異型 FANCD2 を安定に発現する細胞を用いた免疫沈降解析では、両因子の相互作用が著しく減弱した。これらの結果から、当該因子との相互作

用には FANCD2 の C 末端領域が必要であると考えられる。今後はより詳細な FANCD2 の機能領域の特定を進めると共に、当該因子における相互作用領域の特定についても同様に解析を進める予定である。

#### (4) 脂質代謝環境の変化に応答した FANCD2 の細胞内動態の解析

脂肪酸の一つであるオレイン酸を培地に添加した培養条件下では、細胞の脂質代謝環境の変化によりさまざまな細胞応答が見られることが既に知られている。このような条件下における EGFP-FANCD2 の細胞内局在の解析を行った結果、脂質代謝制御に重要なオルガネラの一つである脂肪滴の形成に関連した FANCD2 の局在変化が観察された。FANCD2 は DNA 損傷に応答して核内で点局在を示すことがひろく知られているが、その DNA 損傷応答が欠損している変異型 FANCD2 (K561R) においても脂肪滴形成に関連した同様の細胞内動態が観察された。また、本解析を行ったオレイン酸を添加した培養条件下では、DNA 損傷レベル ( $\gamma$ -H2AX) が上昇しないこと、および内在性 FANCD2 も同様の局在変化を示すことも免疫染色解析により明らかにした。このような FANCD2 の細胞内動態はこれまで他に報告がなく、脂質代謝環境の変化に応答した新規の細胞応答である。これらの結果は、DNA 損傷応答とは独立した FANCD2 の機能を検証する上で、重要な細胞応答であると考えられる。

本研究課題で得られた以上の研究成果は、脂質代謝制御における FA タンパク質の新たな機能的側面を明らかにするものである。今後はさらに詳細にこれらの解析を進めることにより、ファンコニ貧血に見られる発症機序の不明な脂質代謝異常の分子メカニズムの解明、さらにそれらの病態の予防法・緩和法の開発の基盤になると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hiroataka Kobayashi, Franklin Mayca Pozo, Wataru Sakai, Kenji Sato, Kaoru Sugasawa	4. 巻 50
2. 論文標題 Identification of novel mutations and reassignment of archival xeroderma pigmentosum group C cell strains from Japanese patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of dermatology	6. 最初と最後の頁 407-408
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.16623	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Masayuki Kusakabe, Erina Kakumu, Fumika Kurihara, Kazuki Tsuchida, Takumi Maeda, Haruto Tada, Kanako Kusao, Akari Kato, Takeshi Yasuda, Tomonari Matsuda, Mitsuyoshi Nakao, Masayuki Yokoi, Wataru Sakai, Kaoru Sugasawa	4. 巻 25
2. 論文標題 Histone deacetylation regulates nucleotide excision repair through an interaction with the XPC protein	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2022.104040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sakai, W., Yuasa-Sunagawa, M., Kusakabe, M., Kishimoto, A., Matsui, T., Kaneko, Y., Akagi, JI., Huyghe, N., Ikura, M., Ikura, T., Hanaoka, F., Yokoi, M., Sugasawa, K.	4. 巻 10:19704
2. 論文標題 Functional impacts of the ubiquitin-proteasome system on DNA damage recognition in global genome nucleotide excision repair.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-76898-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 槌田千輝, 日下部将之, 各務恵理菜, 栗原文佳, 草尾佳那子, 前田拓海, 横井雅幸, 酒井 恒, 菅澤 薫
2. 発表標題 ヌクレオチド除去修復におけるDNA損傷認識を制御するクロマチン構造変換因子複合体
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（ポスター発表）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井 恒, ほ谷智也, 大槻侑恵, 後藤元成, 乾 愛実, 松田 俊, 松田知成, 横井雅幸, 菅澤 薫
2. 発表標題 脂質代謝制御におけるファンコニ貧血タンパク質の機能解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 (ポスター発表)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井 恒, ほ谷智也, 大槻侑恵, 後藤元成, 乾 愛実, 松田 俊, 松田知成, 横井雅幸, 菅澤 薫
2. 発表標題 脂質代謝制御におけるファンコニ貧血タンパク質の機能解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 (ワークショップ発表)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日下部将之, 前田拓海, 各務恵理菜, 綿田瑞希, 酒井 恒, 横井雅幸, 菅澤 薫
2. 発表標題 ヌクレオチド除去修復における紫外線誘発DNA損傷の効率的な認識に寄与するヒストン修飾
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 (ポスター発表)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ほ谷智也, 大槻侑恵, 後藤元成, 乾 愛実, 横井雅幸, 菅澤 薫, 酒井 恒
2. 発表標題 ファンコニ貧血タンパク質の脂質代謝における機能解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 (ポスター発表)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 酒井 恒、大槻侑恵、後藤元成、乾 愛実、ほ谷智也、横井雅幸、菅澤 薫
2. 発表標題 脂質代謝におけるファンコニ貧血タンパク質の機能解析
3. 学会等名 日本環境変異原学会第49回大会（口頭発表）
4. 発表年 2020年～2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>申請者が所属する研究室のウェブサイト  <a href="http://www.research.kobe-u.ac.jp/brce-sugasawa/index.html">http://www.research.kobe-u.ac.jp/brce-sugasawa/index.html</a></p> <p>申請者が関与した研究成果に関するプレスリリース  <a href="https://www.kobe-u.ac.jp/research_at_kobe/NEWS/news/2020_11_17_03.html">https://www.kobe-u.ac.jp/research_at_kobe/NEWS/news/2020_11_17_03.html</a></p>
--

6. 研究組織			
	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------