

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21710057

研究課題名 (和文) DNA 損傷応答を制御する FANCI 蛋白質の脱リン酸化酵素の同定

研究課題名 (英文) Identification of phosphatase involved in regulation of FANCI

研究代表者

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

研究成果の概要 (和文) : 我々は、最近、小児の遺伝病であるファンconi貧血の遺伝子 FANCI が、放射線などによる DNA 損傷ないし複製ストレスを受けた細胞においてリン酸化され、さらにモノユビキチン化された後すみやかに脱リン酸化されることを見いだした。FANCI リン酸化は FANCD2 のモノユビキチン化の引き金をひくスイッチとして働いており、その脱リン酸化は、ファンconi貧血 (FA) 経路による DNA 修復を制御する重要なイベントと考えられる。本研究においては、FANCI 脱リン酸化に関わる脱リン酸化酵素の分子種を同定し、その脱リン酸化の制御がどのように行われているか、明らかにすることをめざした。リン酸化セリンスレオンをターゲットとする脱リン酸化酵素 40 種類を、ひとつずつノックダウンして検討したところ、FANCD2 モノユビキチン化を上昇させるものと低下させるものがいくつか同定された。今後、さらに検討を行う必要がある。

研究成果の概要 (英文) : We have recently found out that novel Fanconi anemia (FA) protein FANCI is phosphorylated and functions as a switch to trigger FANCD2 monoubiquitination upon DNA damage or replication stress. FANCI itself is also monoubiquitinated, and we found that FANCI is de-phosphorylated immediately after the monoubiquitination. Thus, FANCI phosphorylation and de-phosphorylation must be important events in regulating the FA pathway. In this study, we wished to identify which phosphatase is involved in the regulation of FANCI phosphorylation levels. We tested every phosphatase genes encoded in the genome targeting phospho-serine or threonine using siRNA, and found at least several of them are involved in FA pathway activation. Further study will be needed to clarify how these phosphatases functions in the FA pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学 放射線・化学物質影響科学

キーワード：ファンconi貧血、FANCI、FANCD2、脱リン酸化酵素

1. 研究開始当初の背景

我々は、最近ファンコニ貧血遺伝子 FANCI が、放射線などによる DNA 損傷ないし複製ストレスを受けた細胞においてリン酸化され、モノユビキチン化された後すみやかに脱リン酸化されることを見いだした。FANCI リン酸化は FANCD2 のモノユビキチン化の分子スイッチであり、その脱リン酸化は、ファンコニ貧血経路による DNA 損傷チェックポイントと DNA 修復を制御する重要なイベントと考えられる。本研究においては、FA 経路活性化に関わる脱リン酸化酵素の分子種を同定し、その脱リン酸化の制御がどのように行われているか、明らかにする。

(1) ファンコニ貧血 (FA) 原因遺伝子群は FA 経路を形成する：FA は小児のまれな遺伝性疾患で、進行性骨髄幹細胞不全、急性白血病、骨格異常を特徴とする。現在その原因遺伝子は 13 種が同定され、DNA 損傷後に活性化される FA 経路で機能すると考えられている。FANCA、B、C 等の 8 種の FA 蛋白質と 2 種の関連蛋白質 (FAAP24 と FAAP100) は相互作用して「FA コア複合体」と呼ばれる核内巨大ユビキチンリガーゼ複合体を形成し、下流因子である FANCD2 と FANCI をモノユビキチン化する (図 1)。FA 経路は、「相同組換え(HR)」、「損傷乗り越え複製(TLS)」の

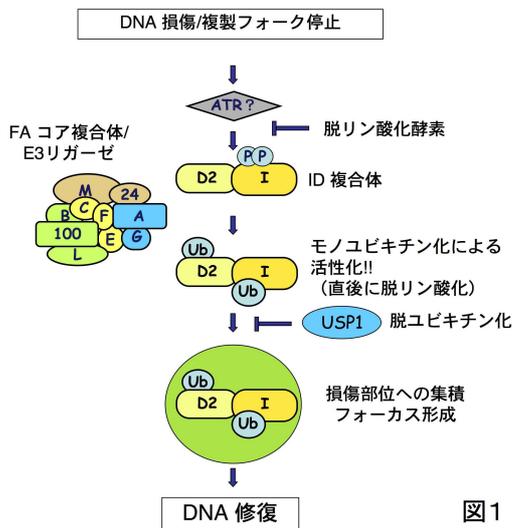


図 1

二つの DNA 修復経路と「S 期チェックポイント」に重要な役割を果たす。実際、FA 患者の細胞は、放射線に軽度の、マイトマイシン C やシスプラチンなどの DNA クロスリンク剤処理には極度の感受性を示す。

(2) FA 経路は放射線などによる DNA 損傷と複製ストレスにตอบสนองして活性化される：

FANCD2 と FANCI は緩やかに会合しており、ID 複合体を形成する (図 1)。FA 経路活性化後モノユビキチン化された ID 複合体は、クロマチン分画に移行し、DNA 損傷部位に集合してフォーカスを形成する。モノユビキチン化、クロマチン移行とフォーカス形成は ID 複合体の機能発現に必須である (図 1)。

(3) FA 経路活性化の分子スイッチは FANCI 蛋白質のリン酸化である：

DNA 損傷後の FA 経路の活性化がどのような分子機構で起こるのか理解するため、私が現在所属する高田研究室は、ニワトリ B 細胞株 DT40 において FANCI 欠損細胞を作成し、FANCI のモノユビキチン化部位近傍にある進化上保存された 6 つの S/TQ モチーフを AQ に置換して導入したところ (Ax6 変異体)、FA 経路活性化がほとんど起こらなくなることを見いだした。さらに、同じ 6 つのサイトを、リン酸化をミミックする酸性アミノ酸であるアスパラギン酸に置換したところ (DQ、Dx6 変異体)、構成的な FANCD2 と FANCI のモノユビキチン化とフォーカス形成を認め、FANCI リン酸化こそが FA 経路活性化の分子スイッチであると結論した。

4) FANCI 蛋白質のリン酸化レベルはタイトに制御されている：

DNA 損傷により活性化される 3 種のキナーゼのうち、二重鎖切断にตอบสนองする ATM キナーゼ、二重鎖切断修復に関与する DNA-PK の関与は考えにくく、二重鎖切断のみならず複製ストレスにตอบสนองする ATR キナーゼがおそらく FANCI を直接リン酸化しているはずである。私は、上記論文において、実際に FANCI がリン酸化されていることを、フォスタグ-ウェスタン法により証明した (図 2)。フォスタグは、リン酸化されたアミノ酸特異的に結合するので、フォスタグを重合させたゲルを用いれば、リン酸化分子種を上方へシフトしたバンドとして同定可能である。驚いたことに、DNA 傷害後、実際にリン酸化されている FANCI はほんの一部 (〜13%) 程度にすぎなかった。バンドが 2 本認められるのは、片方がモノユビキチン化されているためと考えられる。実際、モノユビキチン化サイト変異体 (K525R) ではシフトしたバンドは 1 本しかみられない。同一のデータを内在性の FANCI についても得た。これらの結果から、モノユビキチン化された FANCI は何

らかの脱リン酸化酵素によりすみやかに脱リン酸化されるものと推定される。

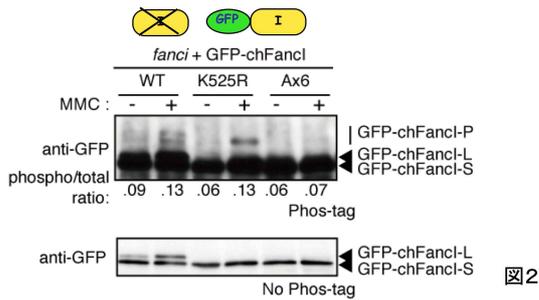


図2

2. 研究の目的

ヒトゲノムにコードされたセリン/スレオニン脱リン酸化酵素は、およそ 40 種を数える。この数年の間にいくつかの脱リン酸化酵素が DNA 損傷応答を抑制的に調節することが報告されており、本研究において同定しようとする FANCI 脱リン酸化酵素のよい候補である。本研究では、FANCI の脱リン酸化を行う酵素を同定し、その制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。もし FANCI 脱リン酸化酵素の抑制剤が開発できれば、FANCI をリン酸化誘導し FA 患者、家族性乳がん患者においても FA 経路の活性化ができる可能性があると考えた。

3. 研究の方法

FANCI 脱リン酸化酵素の候補遺伝子について、siRNA を用いて DNA 傷害後の FANCI のリン酸化状態を検討し、脱リン酸化酵素の同定を行うことを計画した。

4. 研究成果

(1) 抗リン酸化 FANCI 抗体の作成

我々の従来の検討によって、ニワトリとヒトの FANCI について、モノユビキチン化サイト近傍の二つの SQ モチーフが機能的に最も重要であると考えられた。そこで、この部分をカバーするようにリン酸化ペプチドを合成し、シグマ社に依頼してウサギに免疫して抗体作成を試みた。しかし、二回試みたが、どちらでもウェスタンブロットで特異的にリン酸化型 FANCI を認識する抗体を得ることができなかった。したがって、以下の siRNA を用いたスクリーニングは、リードアウトとして FANCD2 モノユビキチン化に頼ることになった。

(2) FANCI 脱リン酸化酵素候補の siRNA によるノックダウンによる検討

まず、PP1、PP2A、PP2Cdelta、PP4、PP5 等の遺伝子を FANCI 脱リン酸化酵素の候補として、ヒト細胞株で siRNA によるノックダウン法をおこない、DNA 損傷処理後、FA 経路活性化の抑制を検証したところ、PP2A において顕著な FANCD2 活性化の抑制がみられ、PP2A が FA 経路において重要な役割を行っていることが明らかとなった。また、より広範に脱リン酸化酵素の役割を探るため、30 種類を超える siRNA により各種セリン/スレオニン特異的脱リン酸化酵素のノックダウンを行い、スクリーニングしたところ、PP2A については FA 経路の抑制に大きな効果を再現性よく認めた。また、PP2A の regulatory subunit である PPP2R5D のノックダウンで FA 経路活性化に顕著な抑制効果が見られた。FANCD2 モノユビキチン化を増強させる効果は得られたのは、ILKAP と PSPH、であった。面白いことに、PP2A の catalytic subunit α 型 (PP2A α) のノックダウンにより、FANCD2 モノユビキチン化がはっきりと抑制された。さらに PP2A の regulatory subunit であると PPP2R5D (PP2A/B56 δ) のノックダウンにても同様に FANCD2 モノユビキチン化がはっきりと抑制されていた。

(3) DT40 細胞株における検討

FANCI の脱リン酸化酵素遺伝子 (PP4CR3 β 、Wip1、PP2C γ) について、ニワトリ B 細胞株 DT40 細胞を用いてノックアウト細胞を作製し、表現型を検討した。放射線感受性、マイトマイシン C 刺激による FANCD2 モノユビキチン化に対する効果を検証したが、明らかな放射線感受性は認めず、明確に FANCD2 モノユビキチン化を増強させる効果は得られなかった。

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 2 件)

富田純也、高田 穰 「DNA クロスリンク損傷修復の分子機構」細胞工学 特集「癌治療・発癌・老化の鍵を握る DNA 修復経路」2010 年 29:36-41

Hanafusa T, Habu T, Tomida J, Ohashi E, Murakumo Y, Ohmori H: Overlapping in short motif sequences for binding to human REV7

and MAD2 proteins. Genes to Cells. 2010; 15:281-296

日本学術振興会 特別研究員
研究者番号：50535812

〔学会発表〕（計7件）

①富田純也、板谷亜希子、茂地智子、石合正道、高田穰：「Interaction between Phospho-mimic FANCI and FANCL E3 ligase in the activation of Fanconi anemia pathway」第68回日本癌学会学術総会 2009年10月1日パシフィコ横浜

②富田純也、板谷亜希子、茂地智子、石合正道、高田穰：「FANCIリン酸化によるファンconi貧血コア複合体ユビキチンリガーゼの活性化」第32回日本分子生物学会年会 2009年12月9日パシフィコ横浜

③花房 朋、土生敏行、村雲芳樹、富田純也、原幸大、橋本博、大橋英治、大森治夫：「ヒト及び酵母におけるREV7とMAD2の結合モチーフ配列の部分的オーバーラッピング」第32回日本分子生物学会年会 2009年12月10日パシフィコ横浜

④富田純也、板谷亜希子、茂地智子、石合正道、高田穰：「Interaction between Phospho-mimic FANCI and FANCL E3 ligase in the activation of Fanconi anemia pathway」International Conference on Radiation and Cancer Biology at Nagasaki 2010年2月19日長崎大学医学部良順会館

⑤富田純也、板谷亜希子、内田恵美、茂地智子、井倉正枝、胡桃坂仁志、井倉毅、石合正道、高田穰：「DNA損傷応答におけるファンconi貧血経路の活性化メカニズム」放射線影響学会 2010年10月20日京都テルサ

⑥富田純也、板谷亜希子、内田恵美、茂地智子、小林昌彦、山本健一、井倉正枝、井倉毅、Agata Smogorzewska、石合正道、高田穰：「Rad17/TopBP1非依存的なATRの活性化によるFANCIリン酸化」分子生物学会 2010年12月7日神戸ポートアイランド

⑦板谷亜希子、富田純也、内田恵美、伊東涼香、大沢洗司、茂地智子、石合正道、高田穰：「DNA損傷応答におけるファンconi貧血蛋白質FANCD2とFANCIの相互作用解析」分子生物学会 2010年12月9日神戸ポートアイランド

〔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

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

(2) 研究協力者

板谷亜希子 (ITAYA AKIKO)