

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22681006

研究課題名（和文）DNA 損傷時における細胞死誘導に関わる新たな分子機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of a novel molecular mechanism for decision of cell fate in response to DNA damage

研究代表者

酒井 恒（SAKAI WATARU）

神戸大学・自然科学系先端融合研究環バイオシグナル研究センター・助教

研究者番号：70526251

研究成果の概要（和文）： 稀な劣性遺伝疾患であるファンconi貧血の原因遺伝子産物の一つである FANCD2 は、DNA 損傷（特に DNA 鎖間架橋）の細胞応答及び修復に重要な機能を持つことが以前より報告されていた。本研究課題では、アポトーシスを誘導するような重度の DNA 損傷に応答して、FANCD2 がカスパーゼ 3 依存的に複数個所で切断されることを新たに見出した。また、それら切断部位の全てを特定し、それらの部位の全てに変異を導入することでカスパーゼによる切断に対して耐性を示す非切断型 FANCD2 を安定に発現する細胞を、FANCD2 欠損細胞を親株として樹立した。非切断型 FANCD2 は 4 ヶ所に変異が導入されているにも関わらず、DNA 架橋剤に対して野生型 FANCD2 発現細胞と同等の耐性を示した。一方、外因性 DNA 損傷非存在下でのアポトーシス誘導においては、野生型 FANCD2 発現細胞のみが耐性を示し、非切断型 FANCD2 発現細胞は、親株である FANCD2 欠損細胞と同程度の高い感受性を示すことを見出した。これらの研究成果は、FANCD2 がこれまで報告されているような DNA 損傷応答とは独立した機構として、アポトーシスを負に制御している可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）： FANCD2 is one of the responsible genes for a rare genetic disorder, Fanconi anemia syndrome. Many researchers reported that FANCD2 protein is a key factor for DNA interstrand crosslink repair. In the pilot study, I found a novel phenomenon that the FANCD2 protein was cleaved into at least four smaller fragments when cells were treated with relatively high doses of genotoxic agents. In vitro and in vivo analyses showed that the DNA damage-induced cleavage of FANCD2 was dependent on caspase-3. All the cleavage sites were identified and the mutant FANCD2 protein lacking those cleavage sites was generated. When the non-cleavable mutant FANCD2 protein was stably expressed in a FANCD2-deficient cell line, the cells showed resistance to genotoxic agents compared with the cell line expressed wild-type FANCD2 protein. In the absence of exogenous genotoxic stress, however, only cell line expressed wild-type FANCD2 showed significant resistance to apoptosis induction by caspase-8 activation. All these results implied the possibility that FANCD2 contributes to regulate apoptosis induction negatively independent of DNA repair response.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2011 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2012 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
総計	9,000,000	2,700,000	11,700,000

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、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

(1) DNA 損傷に応答した DNA 修復とアポト

一シス誘導とを結ぶ細胞内シグナル伝達経路は、抗がん剤や放射線によるがん治療の効果を左右し、細胞のがん化抑制機構の理解においても重要であるにも関わらず、それに関する知見は少なく未だに不明な点が多いままであった。

(2) ファンconi貧血症 (FA) は先天性遺伝疾患の一つで、臨床症状として骨髄機能不全の他、多指症等の奇形、知能低下など多岐にわたる。それまで FA には 13 の原因遺伝子が同定されていたが、原因遺伝子が同定されていない相補性群も依然として存在していた。FA 遺伝子産物の一つである FANCD2 は、DNA 損傷に反応してモノユビキチン化されることによって、核内の DNA 損傷部位に移行し、更に下流の DNA 修復経路に損傷シグナルを伝達することが知られていた。しかし、細胞内において具体的にどのような役割を果たしているのか、その本質的な機能の詳細については明らかにされていなかった。

(3) 研究代表者は、FANCD2 タンパク質がアポトーシスを引き起こすような重度の DNA 損傷に反応してそれまで知られていなかった新たな翻訳後制御を受ける可能性を独自に見出した。

## 2. 研究の目的

DNA 損傷応答に関わる重要な機構である DNA 修復とアポトーシスは、それぞれ細胞に全く異なる運命をもたらす。これら二つの機構の研究は各分野で盛んに行われているが、両者の間をつなぐものは非常に少ない。本研究は、研究代表者が独自に見出した FANCD2 における翻訳後制御を手がかりとして、この両者の間をつなぐ機能的相互作用を見出すことによって、未だに不明な点が多い FA 諸症状の原因解明、新たな治療法開発の糸口を見出すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) カスパーゼ 3 による FANCD2 切断部位の同定: FANCD2 タンパク質のカスパーゼ依存切断の部位を特定するため、予想される切断部位に突然変異を導入した変異型 FANCD2 を発現する細胞を、FANCD2 欠損細胞を用いて樹立した。

(2) 樹立した細胞株を用いて DNA 損傷を引き起こす薬剤やアポトーシス誘導に対する感受性について解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) FANCD2 タンパク質は、DNA 修復可能な程度の DNA 損傷を受けた場合にモノユビキチン化されることが以前より知られていた (図 1, D2-L)。研究代表者は、アポトーシスを引き起こすような重度の DNA 損傷を細胞に与えた場合には、FANCD2 が細胞内で切断されることを見出した (図 1)。

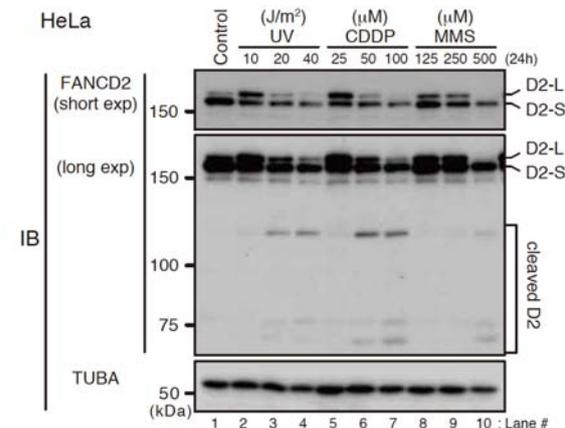


図 1. 重度の DNA 損傷によって FANCD2 が切断される

この切断はプロテアソーム阻害剤 (Lac) による影響はほとんど受けないが、カスパーゼ阻害剤 (zVAD) を処理することによってほぼ完全に抑制され、またアポトーシス誘導剤 (STS) で処理することによって外因性の DNA 損傷がない条件下でも観察されたことから、カスパーゼ依存性の反応であることが推察された (図 2)。様々な組換えカスパーゼと野生型ヒト線維芽細胞の抽出液を反応させることによって FANCD2 の切断を無細胞系での再現実験をしたところ、カスパーゼ 3 及び 7 によって FANCD2 が切断される結果が得られた (図 3)。それぞれの shRNA を細胞内で発現させカスパーゼ 3 または 7 の発現をノックダウンしたところ、カスパーゼ 3 ノックダウン時のみ FANCD2 切断が抑制された (図 4, data not shown)。またカスパーゼ 3 が欠損している乳がん細胞株 MCF7 では、FANCD2 の切断が全く検出されなかった (data not shown)。

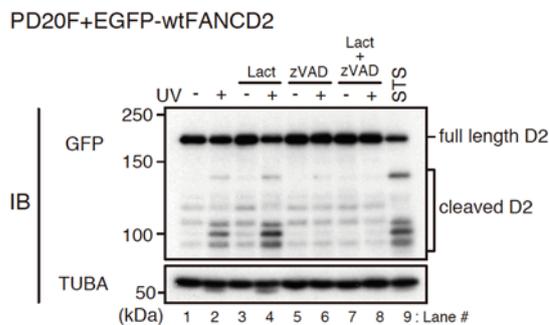


図 2. カスパーゼ阻害剤による FANCD2 切断への影響

WI-38 VA13 cell line

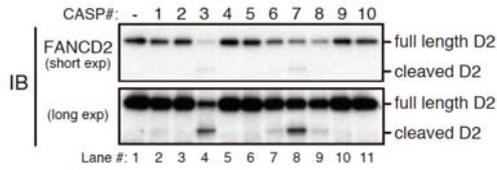


図3. 組換え型カスパーゼを用いた FANCD2 切断解析

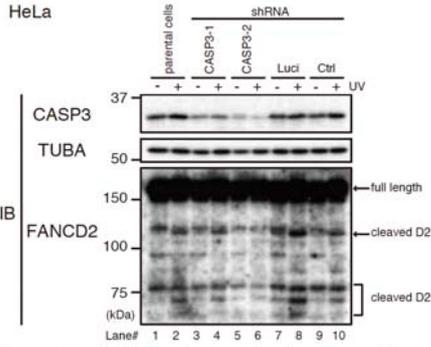


図4. FANCD2 切断におけるカスパーゼ3 ノックダウンの影響

以上の解析結果から、FANCD2 切断はアポトーシス誘導時に活性化したカスパーゼ3 依存的であることが示された。

更に、予想される切断部位に突然変異を導入することによって合計4箇所切断部位を同定した(図5)。また4箇所全てに変異を導入したカスパーゼ非切断型 FANCD2 を発現する細胞株を FANCD2 の欠損した細胞株を用いて樹立した。

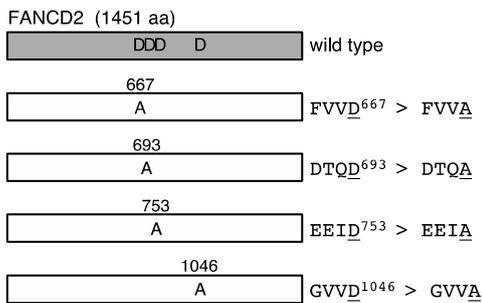


図5. FANCD2切断部位の特定

(2) カスパーゼによる FANCD2 の切断が DNA 損傷修復にどのような影響を及ぼすかを検証するため、(1)で特定した全ての切断部位に変異を導入した非切断型 FANCD2 発現細胞株を樹立し、マイトマイシンC に対する感受性を調べたところ、非切断型 FANCD2 を発現する細胞は、FANCD2 内に4箇所の突然変異が存在するにも関わらず、野生型 FANCD2 を発現する細胞と同程度の抵抗性を示した(図6)。

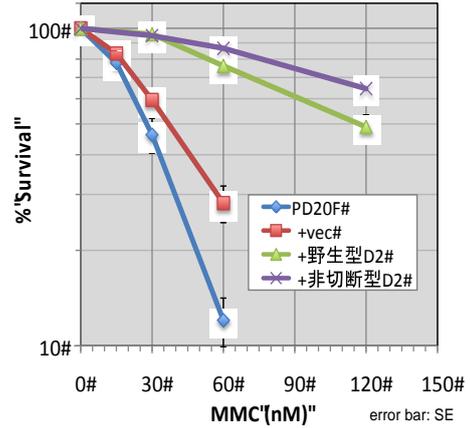


図6. マイトマイシンC 感受性試験

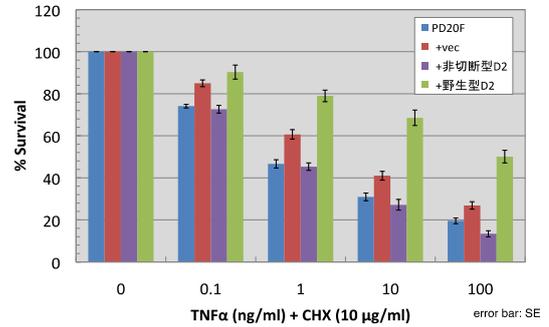


図7. TNFα処理によるアポトーシス感受性試験

このことから、アポトーシスの下流で機能するカスパーゼ3 による FANCD2 切断を阻害しても、DNA 損傷修復に関しては大きな影響を及ぼさないと考えられる。一方、外因性 DNA 損傷ストレス非存在下でのアポトーシス誘導に対する応答を解析するため、TNF α とシクロヘキシミド処理によりアポトーシスの上流で機能するカスパーゼ8 を活性化させアポトーシス誘導を行ったところ、野生型 FANCD2 を発現する細胞のみが有意に抵抗性を示した(図7)。今回用いたアポトーシス誘導系がカスパーゼ8 の活性化であることから、非切断型 FANCD2 発現細胞が親株の FANCD2 欠損細胞と同程度の高いアポトーシス感受性を示したのは、導入された変異によって野生型 FANCD2 が有するアポトーシス誘導の上流において働く何らかの機能が失われたためと推察される。

研究代表者によって行われた以上の解析結果より、新たに FANCD2 がカスパーゼ3 の標的であることが明らかとなった。この FANCD2 の切断はDNA 修復不可能な重度の損傷によって誘導され、またカスパーゼ3 が活性化した結果であることから、アポトーシス後期の現象であると考えられる。アポトーシス誘導によってカスパーゼ依存的にタンパク質が切断される現象は、他の DNA 修復タンパ

ク質においても見られる(BRCA1, RAD51等)。これは修復不可能なDNA損傷時に効率良くアポトーシスを実行するためと考えられており、FANCD2の機能を考慮すれば、この切断も同様と考えられる。しかし図6,7の解析結果から、FANCD2がDNA損傷修復の機能とは独立してアポトーシスを負に制御する可能性が見出され、FANCD2の未知の機能的側面が明らかとなった。非切断型FANCD2を発現している細胞がマイトマイシンCに対して抵抗性を示すにも関わらず、アポトーシス誘導に関しては、依然として高い感受性を示していることが、その可能性を強く示唆している。現在までのところこの詳細な機構は不明であるが、アポトーシス誘導に関わるシグナル経路でFANCD2が負の制御機能を有していることを示す報告は他になく、今後のより詳細な解析が期待される。

## 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)

[学会発表] (計7件) 全て研究代表者が発表

①第30回染色体ワークショップ・第11回核ダイナミクス研究会(淡路)2012年12月19-21日

口頭発表「FANCD2タンパク質はアポトーシスを抑制的に制御する」

②第35回日本分子生物学会年会(福岡)2012年12月11-14日

ポスター「A novel function of FANCD2 protein in apoptosis signaling」

W. Sakai, K. Sugasawa

③第8回国際3Rシンポジウム(淡路)2012年11月25-28日

ポスター「Genotoxic stress induces caspase-mediated cleavage of the FANCD2 protein」

W. Sakai, K. Sugasawa

④第30回染色体ワークショップ(仙台)2012年1月25-27日

口頭発表「Genotoxic stress induces caspase-mediated cleavage of the FANCD2 protein」

W. Sakai, K. Sugasawa

⑤第34回日本分子生物学会年会(横浜)2011年12月14-16日

口頭発表及びポスター「Genotoxic stress induces caspase-mediated cleavage of the

FANCD2 protein」

W. Sakai, K. Sugasawa

⑥BMB2010(神戸)2010年12月7-10日  
口頭発表「DNA損傷ストレスに伴うFANCD2タンパク質のカスパーゼ依存的切断」

酒井 恒、菅澤 薫

⑦第7回国際3Rシンポジウム(富山)2010年10月26-30日

ポスター「Genotoxic stress induces caspase-mediated cleavage of the FANCD2 protein」

W. Sakai, K. Sugasawa

[その他]

ホームページ等

神戸大学バイオシグナル研究センター  
菅澤研究室

(<http://www.research.kobe-u.ac.jp/brce-sugasawa/index.html>)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

酒井 恒 (SAKAI WATARU)

神戸大学自然科学系先端融合研究環  
バイオシグナル研究センター・助教

研究者番号: 70526251