様式Ｃ－１９

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 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：14301
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2010～2011
課題番号：22710054
研究課題名（和文）　DNA 修復タンパク質 FANCD2 の中心体複製制御における機能解析

研究課題名（英文）　The role of DNA repair factor FNACD2 in centrosome duplication maintenance

研究代表者 島田幹男（SHIMADA MIKIO）
京都大学・放射線生物研究センター・研究員
研究者番号：20548557

研究成果の概要（和文）:
中心体は細胞分裂の際に均等な染色体分配に必須の細胞内小器官である。中心体の機能異常は染色体異常を誘発し、細胞の癌化につながることが知られている。本課題研究では DNA 修復タンパク質である FANCD2 の中心体の複製への関与を検討した。FANCD2 は染色体不安定性遺伝性疾患であるファンコニ貧血の原因遺伝子である。本研究により染色体異常が誘起される原因の一因として中心体の機能制御が重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）:
Centrosome is an organelle function as microtubules organizing center. Disfunction of centrosome results in improper cell division and chromosome unstability leads to tumorigenesis. FANCD2 is a cause gene of Fanconi Anemia, which represent predisposition malignancy. In this study, we addressed the role of FNACD2 in centrosome maintence. Defect of FANCD2 by siRNA knockdown in U2OS cells result in centrosome overduplication and reducing of mictorubule assembly function. These results indicated that FANCD2 is involved in centrosome functions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
平成 22 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
平成 23 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：DNA 修復
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：DNA 修復、中心体、発癌

１．研究開始当初の背景

ファンコニ貧血は先天性の再生不良性貧血、高発癌性を示す重篤な遺伝病であり、細胞学的特徴として染色体不安定性を示す。現在まで15種類の原因遺伝子が同定されており、それらの転写産物はいずれも抗癌剤であるマイトマイシンCなどにより生成されるDNA架橋損傷の修復に機能することが知られている。一方中心体は微小管形成中心として機能し、正確な染色体の分配に必須の細胞内小器官である。中心体の機能以上は染色体の不安定性を惹起することが示唆されている。染色体の不安定性は発癌の原因の一つと考えられており、実際いくつかの癌細胞では過剰に複製した中心体が存在することが報告されている。近年申請者らはファン

コニ貧血と類似した臨床症状を示す遺伝病であるNBSの原因タンパク質NBS1が中心体の複製制御に関与していることを発見し報告した。また、他のDNA修復に関与するタンパク質が中心体の複製及び機能制御に関与しているといった報告が近年相次いでいる。このような背景から申請者はファンコニ貧血の原因タンパク質の一つであるFANCD2に着目した。ファンコニ貧血の染色体不安定性が原因タンパク質の中心体制御異常にあると仮定し、その原因遺伝子転写産物であるFANCD2と中心体の機能制御を解析した。

２．研究の目的
現在まで様々なDNA修復タンパク質が中心体に局在していることが報告されているがその機能及び意義はほとんど明らかにされていない。DNA 修復タンパク質はDNAに損傷が生じた際、細胞周期を止めるチェックポイント機構に関与している。そのため、よりスムーズにチェックポイントを活性化出来るようにDNA修復タンパク質が細胞分裂の重要な器官である中心体に局在し何らかの制御を行っている可能性が高い。本研究ではファンコニ貧血の細胞学的特徴である染色体不安定性の原因が中心体複製制御に異常があと仮定し原因タンパク質の一つである FANCD2 に着目した。FANCD2 の機能が欠損している患者細胞では染色体の断片が観察される。これは FANCD2 が機能しない為に DNA 複製修復が正常に完了せず、強制的に分裂期に進行することで染色体が切断され起こる現象であると考えられている。しかし、中心体の数が異常な細胞でも同様に染色体の断片が観察される。このようにファンコニ貧血の患者細胞と中心体異常を持つ細胞との類似点から FANCD2 が中心体の複製制御に関与すると仮定し、その役割を解析することが本研究の目的である。

３．研究の方法
研究材料として Hela 細胞、U2OS 細胞、ファンコニ貧血の患者細胞である PD20 及び相補細胞を用いた。中心体はγ-tubulin 抗体をマーカーとしてウエスタンブロッティング法及び免疫染色法により検出した。また FANCD2 の機能欠損は siRNA を用いたノックダウン法、またはファンコニ貧血の患者細胞を用いて解析した。また、微小管再構成の解析として FANCD2 をノックダウンした細胞において低温培地とノコダゾールによる微小管脱重合後、37℃培地で再度培養し微小管を再度重合させるアッセイ系を用いた。その他、中心体の機能に関与するタンパク質として CG-NAP の解析を抗体及び siRNA のノックダウン法により行った。

４．研究成果
まずHela細胞において免疫染色法を用いてFANCD2の中心体への局在を確認した(図1)。

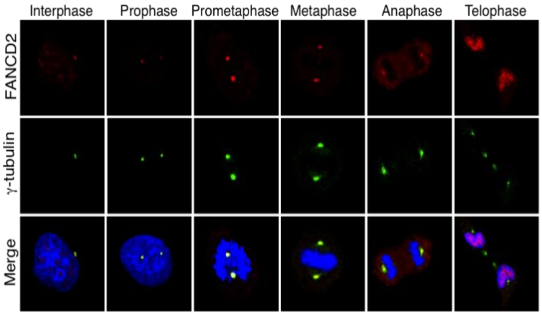

図1 FANCD2の中心体への局在

siRNAによりFANCD2をノックダウンした細胞ではコントロール細胞と比較して中心体が過剰に複製されていた。また、微小管が過形成されたことから、FANCD2は微小管が過剰に大きくならないように抑制する機能があることが示唆された(図2)。また、FANCD2が微小管の再構成を制御する際に必要なタンパク質の検索及び解析を行った。CG-NAPは

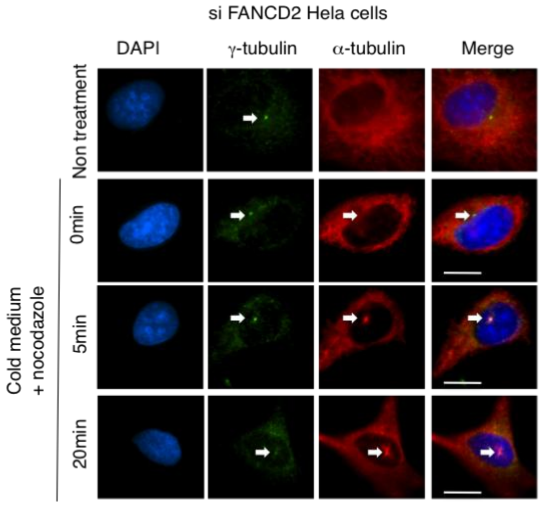

図2　FACD2ノックダウン細胞における微小管再構成アッセイ

450kDの巨大タンパク質で中心体とゴルジ体に局在している。CG-NAPはγ-tubulin ring complex (γ-TuRC)を中心体に集積させることにより微小管の再構成を制御する事が知られている。FANCD2をノックダウンした細胞で

はCG-NAPの中心体へ過剰に集積する事が見出された(図3)。
この結果はFANCD2がCG-NAPの中心体への抑制し、同時にγ-TuRCの中心体への集積を抑制する事により微小管の過剰構成を抑制していると考えられる。

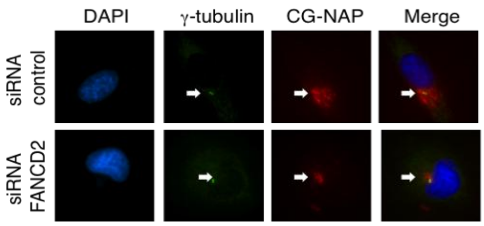

図3　FANCD2ノックダウン細胞におけるCG-NAPの集積

以上の結果よりファンコニ貧血の原因タンパク質の一つである FANCD2 が細胞周期を通して中心体の局在しており、その欠損は中心体の過剰複製を惹起することから中心体の複製の制御に関与することが示唆された。細胞分裂期に特異的に中心体に集積し、いくつかの分子シグナルを介するなど細胞周期特異的に中心体に局在するタンパク質が多くあるが、FANCD2 は細胞周期を通して局在することから常に中心体の何らかの制御に必要な可能性が考えられる。また、siRNA によるノックダウンによる FANCD2 の抑制により CG-NAP の中心体への集積が抑制されたことから微小管の重合制御にも関与することが示唆された。これらの機能異常は正常な細胞分裂を阻害し、細胞分裂の停止や不均等な染色体の分配を起こす可能性がある。その結果 mitotic catastrohe による細胞死や突然変異の増加による発癌につながると考えられる。今後、これらの実験結果をさらに発展させ、FANCD2 の他の中心体タンパク質との関係を中心に解析を進めたい。

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 4 件）

① Shimada M, Kato A, Habu T, Komatsu K (2011) Genisitein, isoflcavonoids in sybeans, prevents the formation of excess radiation-induced centrosomes via p21 up-regulation.
Mutation Res,Volume 716, Number1-2 , p27-32, 2011, 査読有り,
DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2011.07.017

② Shimada M, Kato A, Kobayashi J. Poteintial role of DNA repiar proteins in centrosome maintenance. Book 4/DNA repair Intech publisher, p55-66, 2011.
査読有り,DOI: 10.5772/21396

③Kyosuke Nakamura, Akihiro Kato, Junya Kobayashi, Shunichi Sakamoto, Douglas V. N. P. Oliveira, Mikio Shimada, Hiromi Yanagoihara, Hiroshi Tauchi, Hidekazu Suzuki, Satoshi Tashiro, Lee Zou, Kenshi Komatsu. Regulation of homologous recombination by RNF20-dependent H2B ubiquitination. Molecular Cell, 42:515-528, 2011.
査読有り,
DOI: 10.1016/j.molcel.2011.02.002

④Shimada M, Kobayashi J, Hirayama R, Komatsu K (2010) Differential role of repair proteins, BRCA1/NBS1 and Ku70/DNA-PKcs, in radiation-induced centrosome overduplication. Cancer Sci **101**: 2531-2537 査読有り,
DOI:10.1111/j.1349-7006.2010.01702.x.

〔学会発表〕（計 9 件）

①M Shimada, JN Puivers, F Matsuzaki, T Matsumoto, K Komatsu. Ionizing radiation induced-microcephaly depends on dissociation of apical structure during embryonic development of the mouse cerebral cortex. International Congress of Radiation Research. Walsaw, 2011年8月29日

②島田幹男、平山亮一、小松賢志 : High LET 重粒子線照射時の中心体複製への影響の検討、平成二十二年度 HIMAC 共同利用研究成果発表会、平成 23 年 4 月 23 日、千葉。

③Mikio Shimada and Kenshi Komatsu. Centrosome maintenance by NBS1/BRCA1 dependent ubiquitination of γ-tubulin. Keystone symposia,

Genomic Instability and DNA repair. Keystone, Colorado, 2011年2月3日

④島田幹男、松崎文雄、小松賢志：放射線誘発小頭症における中心体による神経幹細胞制御機構の解析：第一回放射線神経生物研究集会、2011 年 1 月 29 日、前橋

⑤Mikio shimada and Kenshi Komatsu. Centrosome maintenance by NBS1/BRCA1-dependent ubiquitination of γ-tubulin. RBC International Symposium. Kyoto, 2010 年 10 月 22 日

⑥島田幹男、小林純也、小松賢志「中心体過剰複製と線量率効果の解析」 第 53 回 日本放射線影響学会 京都 2010 年 10 月 21 日

⑦島田幹男、小林純也、小松賢志「Novel role of DNA repair protein FANCD2 in centrosome maintenance」 第 67 回 日本癌学会学術総会 大阪 2010 年 9 月 22 日

⑧島田幹男、小林純也、小松賢志「Novel role of DNA repair protein FANCD2 in centrosome maintenance」 日本細胞生物学会 大阪 2010年5月22 日

⑨島田幹男、平山亮一、小松賢志：High LET 重粒子線照射時の中心体複製への影響の検討、平成二十一年度 HIMAC 共同利用研究成果発表会、平成 22 年 4 月 19 日－20 日、千葉

６．研究組織

(1)研究代表者

島田幹男（SHIMADA MIKIO）
京都大学・放射線生物研究センター・研究員
研究者番号:20548557