

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310042

研究課題名(和文) DNAクロスリンク修復における CtIPヌクレアーゼ制御機構の解析

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of CtIP nuclease during DNA crosslink repair

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：ファンconi貧血(FA)はまれな小児の遺伝病で、DNA損傷の修復に欠損を持ち、再生不良性貧血と白血病などの高発がん性を示す。我々は、FAの病態とDNA損傷応答メカニズムの解明を目的として、FAのキー分子であるFANCD2の会合分子を解析し、CtIPを同定した。CtIPはDNA末端の削り込みを行う重要なヌクレアーゼであり、我々の研究によって、FANCD2がその細胞内局在の制御を行うこと、CtIPがFAに関連する重要な修復因子であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The Fanconi anemia (FA) pathway is critically involved in the maintenance of hematopoietic stem cells and the suppression of carcinogenesis. A key FA protein, FANCD2, is monoubiquitinated and accumulates in chromatin in response to DNA interstrand crosslinks (ICLs), where it coordinates DNA repair through mechanisms that are still poorly understood. Here we report that CtIP protein is a direct interactor of FANCD2. A region spanning amino acids 166 to 273 of CtIP, and monoubiquitination of FANCD2, were both essential for the FANCD2-CtIP interaction and MMC-induced CtIP foci. Remarkably, both FANCD2 and CtIP were critical for MMC-induced RPA2 hyperphosphorylation, an event that accompanies end resection of double strand breaks. Collectively, our results reveal a role of monoubiquitinated FANCD2 in end resection, anchoring CtIP to chromatin during ICL repair.

研究分野：分子放射線生物学

キーワード：Fanconi貧血 FANCD2 CtIP ユビキチン化 DNAクロスリンク損傷 DNA損傷修復

## 1. 研究開始当初の背景

細胞は放射線や環境変異原による外因性、細胞内代謝産物による内因性のゲノム損傷に常にさらされている。これらのゲノム損傷による DNA 鎖間のクロスリンク (interstrand crosslink; ICL) や DNA-蛋白質クロスリンク (DNA-protein crosslink; DPC) を修復することは、複製や転写といったゲノム機能を維持し、細胞の健全な増殖生存にとって非常に重要な生体防御システムといえる。その分子機構の解明は医学的にも重要な課題である。

ファンconi貧血 (FA) はこういった DNA クロスリンク損傷修復に欠損を持つ代表的な疾患の一つである。FA はまれな小児の遺伝病で、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 クロスリンカー剤に対する高感受性が特徴的である。

本申請の背景について、DNA クロスリンク修復と FA に関連する事項を以下にまとめる。

DNAクロスリンク損傷とは：通常代表的抗がん剤であるMMCやシスプラチンによるICLのことを意味するが、実際の生体内では、内因性のアルデヒド類によるICLやDPCがその本態であることが示唆されている (Nature. 2011 Jul 6;475(7354):53-8.; Nat SMB in press)。FAにおいては、これらの損傷の修復欠損がその病態の基盤にあると思われる。

多数のFA原因遺伝子がFA経路を形成する：FAには現在17の原因遺伝子が知られており、それぞれFANCA、FANCB等と呼ばれる。いずれのFA遺伝子の欠損で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。

FA経路の中核はユビキチンシステムである：現在知られているFA遺伝子のうち、8つの産物は核内で会合しFAコア複合体を形成する。FAコア複合体はDNA傷害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、基質であるFANCD2とFANCIの構成するID複合体をATRキナーゼによるリン酸化依存的にモノユビキチン化する。ID複合体はモノユビキチン化に伴ってクロスリンク部位に結合することでDNA障害部位に集積し(フォーカス形成)、相同組み換え修復(HR)経路、損傷乗り越え複製(TLS)経路などをコーディネートしてクロスリンク修復の中心として機能している。

## 2. 研究の目的

ID複合体は傷害を受けたDNAに結合するが、明らかな機能ドメインをもっておらず、如何にしてクロスリンク修復に機能するのかが問題である。我々は、この問題に解答をあたえるべく、2003年ごろからFANCD2の会合分子をエフェクター分子と想定し、その同定に様々な方法で取り組んで来た。最近、FANCD2複合体の精製とその成分のマスマスペクトロメトリーによる同定に成功し、独自に新たな会合分子としてCtIPを同定した。CtIPはDSB末端の削り込み(resection)にBRCA1、MRN複合体(Mre11-Rad50-Nbs1)とともに重要とされ、DNA修復分野で注目を集めて

いる分子である。近年の研究の進展により、TLSポリメラーゼ (TLS pol) やHR分子に加えて、モノユビキチン化型ID複合体がFAN1やSLX4などのヌクレアーゼ分子群をリクルートすることが、DNAクロスリンク修復に重要であると示唆されている。これらの分子に加えて、CtIPはID複合体下流の重要なエフェクター機能分子と想定される。本研究は、その調節機構と機能の解明を目的とした。

### 3 . 研究の方法

FANCD2 複合体を精製し、その成分として CtIP を同定した。すでに、FANCD2 欠損細胞や相補細胞、ノックダウン細胞などを用いて、FANCD2 や CtIP の局在やクロマチン結合状態を調べた。また、両者の直接会合を精製蛋白質によって検証した。さらに変異体を用いて会合に必要なドメインを確定し、ID 複合体との結合様式と細胞内局在の制御機構を明らかにした。また、CtIP のクロスリンク修復における機能的意義を細胞レベルで検討した。

### 4 . 研究成果

FANCD2 複合体を精製し、マスマスペクトロメトリーとウェスタンブロッティングで既知の会合蛋白質とともに、CtIP が含まれることを確定した。FANCD2 と CtIP の会合を精製蛋白や PLA 法を用いて調べ、両者が直接会合していることがわかった。CtIP の N 末部分が FANCD2 との会合に必要で、細胞内では、この会合は FANCD2 モノユビキチン化に依存していた。FANCD2 の存在は、CtIP の DNA 損傷部位へのリクルートメントに必須であった。CtIP と FANCD2 は協調してクロスリンク修復に機能しており、CtIP は FANCD2 依存的に起

こる DNA 二重鎖切断をさらにプロセスする過程 (リゼクション) に必須と考えられた。FANCD2 と会合できない CtIP 変異体は、CtIP の欠損を十分相補できず、また、FANCD2 と CtIP のダブルノックダウンは MMC 感受性に相加的な効果を示した。これは、FANCD2 と CtIP が互いに依存的な機能と、非依存的な機能の両者を持つことを示している

これらの結果は、FANCD2 という注目の DNA 修復分子のあらたな機能を明らかにするものであり、ファンconi貧血の病態理解においても重要である。我々はこれらの結果をまとめて、Cell Rep. 2014 May 22;7(4):1039-47 において発表した。なお、スイスの Alex Sartori のグループ、ミネソタ大の Alex Sobek らのグループも同様の所見を得て、それぞれ前後して発表を行った。Sartori らとは緊密な連絡を取っており、Cell Rep 誌では back to back の掲載となった。

### 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16件)

Pluripotent Cell Models of Fanconi Anemia Identify the Early Pathological Defect in Human Hemoangiogenic Progenitors. Suzuki NM, Niwa A, Yabe M, Hira A, Okada C, Amano N, Watanabe A, Watanabe KI, Heike T, Takata M, Nakahata T, Saito MK. Stem Cells Transl Med. 2015 Mar 11. pii: sctm.2013-0172. [Epub ahead of print]

Defective FANCI Binding by a Fanconi Anemia-Related FANCD2 Mutant.

Sato K, Ishiai M, Takata M, Kurumizaka H. PLoS One. 2014 Dec 9;9(12):e114752. doi: 10.1371/journal.pone.0114752. eCollection 2014.

The Trp53-Trp53inp1-Tnfrsf10b Pathway Regulates the Radiation Response of Mouse Spermatogonial Stem Cells. Kei Ishii, Masamichi Ishiai, Hiroko Morimoto, Mito Kanatsu-Shinohara, Ohtsura Niwa, Minoru Takata, and Takashi Shinohara. Stem Cell Reports. 2014 Oct 14;3(4):676-89. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.08.006. Epub 2014 Sep 18.

Expression and purification of human FANCI and FANCD2 using Escherichia coli cells. Takahashi D, Sato K, Shimomuki M, Takata M, Kurumizaka H. Protein Expr Purif. 2014 Aug 26;103C:8-15. doi: 10.1016/j.pep.2014.08.012

Modularized functions of the Fanconi anemia core complex. Huang Y, Leung JW, Lowery M, Matsushita N, Wang Y, Shen X, Huang D, Takata M, Chen J, Li L. Cell Rep. 2014 Jun 26;7(6):1849-57. doi: 10.1016/j.celrep.2014.04.029.

FANCD2 binds CtIP and regulates DNA-end resection during DNA interstrand crosslink repair. Unno J, Itaya A, Taoka M, Sato K, Tomida J, Sakai W, Sugawara K, Ishiai M, Ikura T, Isobe T, Kurumizaka H, Takata M. Cell Rep. 2014 May 22;7(4):1039-47. doi: 10.1016/j.celrep.2014.04.005.

A novel interplay between the Fanconi anemia core complex and ATR-ATRIP kinase during DNA cross-link repair. Tomida J, Itaya A, Shigechi T, Unno J, Uchida E, Ikura M, Masuda Y, Matsuda S, Adachi J, Kobayashi M, Meetei AR, Maehara Y, Yamamoto KI, Kamiya K, Matsuura A, Matsuda T, Ikura T, Ishiai M, Takata M. Nucleic Acids Res. 2013 Aug 1;41(14):6930-6941.

Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients. Hira A, Yabe H, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Nakamura J, Kojima S, Ogawa S, Matsuo K, Takata M, Yabe M. Blood. 2013 Oct 31;122(18):3206-9. doi: 10.1182/blood-2013-06-507962.

Tumor suppressor RecQL5 controls recombination induced by DNA crosslinking agents. Hosono Y, Abe T, Ishiai M, Islam MN, Arakawa H, Wang W, Takeda S, Ishii Y, Takata M, Seki M, Enomoto T. Biochim Biophys Acta. 2014 Jan 10. pii: S0167-4889(14)00006-8. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.01.005.

Synergistic Effect of Olaparib with Combination of Cisplatin on PTEN-Deficient Lung Cancer Cells. Minami D, Takigawa N, Takeda H, Takata M, Ochi N, Ichihara E, Hisamoto A, Hotta K, Tanimoto M, Kiura K. Mol Cancer Res. 2013 Feb;11(2):140-8.

NBS1 directly activates ATR independently of MRE11 and TOPBP1.

Kobayashi M, Hayashi N, Takata M, Yamamoto K. Genes Cells. 2013 Mar;18(3):238-46.

Sato K, Toda K, Ishiai M, Takata M, Kurumizaka H. DNA robustly stimulates FANCD2 monoubiquitylation in the complex with FANCI. Nucleic Acids Res. 2012 May 1;40(10):4553-61.

Matched sibling donor stem cell transplantation for Fanconi anemia patients with T-cell somatic mosaicism. Yabe M, Shimizu T, Morimoto T, Koike T, Takakura H, Tsukamoto H, Muroi K, Oshima K, Asami K, Takata M, Yamashita T, Kato S, Yabe H. Pediatr Transplant. 2012 Jun;16(4):340-5.

Histone chaperone activity of Fanconi anemia proteins, FANCD2 and FANCI, is required for DNA crosslink repair. Sato K, Ishiai M, Toda K, Furukoshi S, Osakabe A, Tachiwana H, Takizawa Y, Kagawa W, Kitao H, Dohmae N, Obuse C, Kimura H, Takata M, Kurumizaka H. EMBO J. 2012 Jul 24;31(17):3524-36.

Mcm8 and Mcm9 Form a Complex that Functions in Homologous Recombination Repair Induced by DNA Interstrand Crosslinks. Nishimura K, Ishiai M, Horikawa K, Fukagawa T, Takata M, Takisawa H, Kanemaki MT. Mol Cell. 2012 Aug 24;47(4):511-22.

A ubiquitin-binding protein, FAAP20, links RNF8-mediated ubiquitination to the Fanconi anemia DNA repair network. Yan Z, Guo R, Paramasivam M,

Shen W, Ling C, Fox D 3rd, Wang Y, Oostra AB, Kuehl J, Lee DY, Takata M, Hoatlin ME, Schindler D, Joenje H, de Winter JP, Li L, Seidman MM, Wang W. Mol Cell. 2012 Jul 13;47(1):61-75.

[学会発表](計 42 件)(口演発表のみ、ポスターを除く)

高田 穰「ファンコニ貧血症と DNA 修復メカニズム」第 36 回日本光医学・光生物学会シンポジウム 大阪大学銀杏会館 2014 年 7 月 25 日 (招待講演)

高田 穰「遺伝性 DNA 修復異常疾患：家族性乳がんとファンコニ貧血」日本家族性腫瘍学会 第 17 回家族性腫瘍セミナー 近畿大学・東大阪キャンパス 2014 年 8 月 24 日 (招待講演)

Minoru Takata, Asuka Hira, Kenichi Yoshida, Koichi Sato, Akira Shimamoto, Hidetoshi Tahara, Hitoshi Kurumizaka, Seishi Ogawa, Hiromasa Yabe, and Miharuru Yabe 「UBE2T is a novel FA gene identified in Japanese Fanconi anemia patients」The 9<sup>th</sup> 3R Symposium, 17-21, November, 2014 Gotemba Kogen Hotel

Minoru Takata. Comprehensive analysis of Japanese Fanconi anemia (FA) patients has led to the identification of an E2 enzyme UBE2T as a novel FA gene. 日米修復会議 エクシブ鳴門 10 月 29 日 (招待講演)

M. Yabe, A. Hira, H. Yabe, T. Morimoto, A. Fukumura, M. Miyashita, K. Ohtsubo, K. Matsuo, M. Takata. Infant Japanese

Fanconi anemia patients with the ALDH2-AA genotype. 26<sup>th</sup> Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium. September 18-21, 2014. Bethesda MA, USA

以下、ページ数オーバーのため省略しました。

〔図書〕(計2件)

1. Ishiai M, Uchida E, and Takata M. Establishment of the DNA repair-defective mutants in DT40 cells. Methods Mol Biol. 2012;920:39-49.
2. Multiple genetic manipulations of DT40 cell line. Motegi A, Takata M. Methods Mol Biol. 2014;1114:25-35. doi: 10.1007/978-1-62703-761-7\_3.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)  
取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://house.rbc.kyoto-u.ac.jp/late-effect>

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 海野純也 (平成24年3月～平成25年12月) (UNNO, Junya)

京都大学・放射線生物研究センター・研究員

研究者番号: 50614153

勝木陽子 (平成26年4月～平成27年3

月) (KATSUKI, Yoko)

京都大学・放射線生物研究センター・研究員

研究者番号: 00645377

(3) 連携研究者 なし