

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590391

研究課題名(和文)染色体脆弱部位におけるファンconi貧血蛋白質群の機能解明

研究課題名(英文)Functional analysis of Fanconi anemia proteins in chromosome fragile site

研究代表者

松下 暢子(Matsushita, Nobuko)

東京薬科大学・生命科学部・准教授

研究者番号：30333222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：siRNAライブラリーを用いたポストゲノム的なアプローチにより複製ストレス応答制御機構に機能する遺伝子群の同定を行った結果、クロマチンリモデリングに機能する複数の遺伝子を同定し、そのうちの一つはファンconi貧血原因蛋白質であるFANCD2と結合することを明らかにした。この遺伝子(D2RP:D2 related protein)の機能の解析を行ったところ、D2RPはFANCD2と結合するが、DNA損傷時におけるFANCD2の損傷部位への移行には関与していないことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We identified several genes that are involved in DNA replication stress response by siRNA library screening. These genes are reported to function as chromatin remodeling factors, but their roles in replication stress response are not clear. One of them is FancD2 related protein (D2RP) which interacts with FANCD2. According to the functional analysis, we identified that D2RP involved in DNA damage response. However, D2RP dose not take a role in FancD2 localization following DNA replication stress.

研究分野：DNA損傷修復

キーワード：DNA複製 ファンconi貧血

## 1. 研究開始当初の背景

染色体 DNA の複製は細胞増殖において中心的な役割をはたしていますが、鋳型となる DNA の損傷や染色体上の異物、dNTP の枯渇などによる複製ストレスによってその進行は阻害されます。停止した複製フォークはその構造からゲノムの不安定性を引き起こし、遺伝子変異の増加や染色体の欠損、再編成の原因となることより、細胞は DNA 損傷修復機構や複製チェックポイント機構による複製ストレス応答によって複製フォークを安定化しています。

しかし染色体上の「脆弱部位」では複製進行が他のゲノム領域に比較して困難であり、複製ストレスに対する感受性も高く、DNA 合成の部分的阻害が引き起こされます。その結果分裂中期の染色体上で染色体断裂や構造異常が生じやすく、ゲノム不安定性の要因となっており、がん細胞でみられるゲノム不安定性や複製フォーク停止による DNA 損傷応答反応の亢進にも関与していることがわかっています。脆弱部位におけるゲノム不安定性には複製フォーク停止に対する細胞応答が深く関わっており、複製ストレス応答に機能する ATR キナーゼや BRCA1, CHK1、染色体不安定性症候群の一つであるファンコニ貧血 (FA) の原因蛋白質である FANCD2 や、DNA 二本鎖断裂修復経路に働く RAD51, DNA-PKcs, LigaseIV, BRCA2 などの蛋白質群が機能していることが明らかになっています。

これらの蛋白質のうち、BRCA1 や RAD51 は DNA 合成阻害剤である APH (ahidicolin) 投与後に形成される核内 foci にリクルートされますが、有糸分裂の前に Foci から解離していきます。しかし FANCD2 は有糸分裂時においても Foci を形成し脆弱部位と共局在がみとめられることより、脆弱部位における FANCD2 特有な機能があることが示唆されています。また現在までに脆弱部位において DNA 合成の部分的阻害が起こりやすく、染色体断裂や構造異常が多くみられる理由については、複製のタイミングの遅延がみられることや、脆弱部位において複製開始点が見られないために複製フォークの進行距離が長くなることなどがあげられています。そのため FANCD2 を中心としたファンコニ貧血経路による複製ストレス応答反応の詳細を解析することによって、脆弱部位におけるゲノムの安定性維持機構を明らかにするとともに、がん細胞にみられるゲノム不安定性の発症のメカニズムを解明する手がかりを得る事が期待されます。

## 2. 研究の目的

染色体 DNA の複製を行うためには、多様な細胞内複製ストレス環境下においても複製を正確に進行させるための分子機構が必要です。しかし、ゲノム上にある「脆弱部位」

においては複製ストレスへの感受性が高く、複製の進行が阻害されやすく、その結果としてゲノム不安定性を引き起こされます。本研究においては、DNA 損傷後におけるゲノム脆弱部位特有な複製ストレス応答制御機構を解明することによって、がん細胞にみられるゲノム不安定性や複製フォーク停止による DNA 損傷応答反応の亢進メカニズムの解明を目指しました。

## 3. 研究の方法

複製ストレス応答に関連している新規蛋白質をポストゲノム的なアプローチにより同定することを目的に実験を行いました。FA 原因遺伝子 FANCD2 欠損患者細胞に GFP-FANCD2 を発現させた細胞株を用いて、siRNA ライブラリーと GFP-FANCD2 をマーカーとするイメージングを組み合わせることで、DNA 架橋剤投与後、GFP-FANCD2 の損傷部位への集積、解離や細胞分裂像に異常がみとめられる標的遺伝子の同定を行い、その機能解析を行いました。

### (1) DNA 複製ストレス応答反応に関与する遺伝子のスクリーニング

DNA 複製ストレス応答反応の多くは、リン酸化、ユビキチン化、アセチル化などの翻訳後修飾によって制御されており、これらの可逆的な修飾反応が修復機能と DNA 複製の進行との間にあるネットワークを制御していることが考えられます。これらの siRNA ライブラリーを用いて新規関連遺伝子の同定を行い、いくつかの遺伝子をすでに同定しました。これらの遺伝子はどれもクロマチンリモデリングに機能する蛋白質でした。さらにスクリーニングのスケールを広げておこなっていききました。

### (2) 新規関連遺伝子の DNA 損傷修復機能の解析

現在までに同定されている遺伝子について、siRNA によってそれらの発現抑制を行ったときに、MMC などの DNA 架橋剤に対する感受性について検討をおこないました。既に同定されているヒストンアセチル基転移酵素遺伝子 (D2RP:D2 related protein) と FANCL、さらに control の siRNA によってそれぞれ発現抑制を行い、コントロール siRNA を導入したときの生細胞の比率を 100% としたときの相対的な生細胞の比率をそれぞれの濃度の MMC に対する感受性として検討しました。

### (3) ゲノムクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-Seq)

これまでに同定してきたクロマチンリモデリング因子は、DNA 架橋剤による DNA 損傷応答反応に機能する可能性が明らかになっていますが、DNA 損傷時にゲノム上の特異な部位への結合がみられるのかを全ゲノムク

ロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-Seq) を用いて解析を行います。また、このクロマチンリモデリング因子と結合するファンコニ貧血原因遺伝子 FANCD2、及びその他に同定されている新規遺伝子についても同様に ChIP-Seq 解析を行います。

さらに、同定された部位におけるそれらの蛋白質の結合が細胞周期、あるいは DNA 損傷に応じてどのように変化するのか時間的な解析を行っていきます。

### (3) 新規遺伝子の機能解析

現在までに同定している遺伝子及び新たに siRNA ライブラリースクリーニングによって同定する新規蛋白質について、FANCD2 蛋白質との直接的、あるいは間接的な蛋白質結合について組み替え蛋白質を用いて検討します。さらに、その遺伝子を siRNA で発現を抑制したときの、FANCD2 以外のファンコニ貧血蛋白質の核内動態を解析する。FANCD2 と同様に、FANCC, FANCG, FANCL も DNA 損傷後核内に集積することが報告されていることより、これらの蛋白質の核内集積の有無について検討を行います。

さらにニワトリ DT40 細胞において遺伝子破壊を行い、同定された遺伝子の欠損細胞を作製し、その表現型の解析を行います。まず、DNA 架橋剤である MMC やシスプラチンへの感受性を検討します。さらに複製ストレスとなる APH (ahidicolin) や HU (hydroxyurea) に対する感受性についても検討をおこなっていきます。次に生化学的解析方法として、TAP や Flag の標的遺伝子へのノックインを行い、複合体を形成する蛋白質を免疫沈降法と質量分析装置を用いて同定します。また、ライプセルイメージング方法としては、Rad51 などの修復蛋白質の GFP-融合遺伝子を発現させた細胞株において新規蛋白質の遺伝子破壊を行い、その細胞株の表現型の解析を行うと同時に、Rad51 の修復部位への集積解離などを解析します。さらに、この細胞に目的遺伝子の Ds-Red monomer 融合遺伝子を挿入し、Rad51 との相関関係を検討し、修復蛋白質群との関連を解析します。

## 4. 研究成果

siRNA ライブラリーを使用したポストゲノム的なアプローチを用いて、複製ストレス応答に働く遺伝子群の同定とその機能解析を目的とした実験を行ってきました。その結果、現在までにクロマチンリモデリングに機能する複数の遺伝子を同定し、そのうちの一つについてはファンコニ貧血原因遺伝子である FANCD2 と結合することを明らかにしました。この遺伝子 (D2RP: D2 related protein) の機能の解析を行ってきました。

まず、D2RP 遺伝子の発現抑制時における MMC やシスプラチンなどの DNA 架橋剤に対する感受性を解析したところ、コントロールと

比較して感受性が増加していることがわかりました。このとき、H2AX のリン酸化レベルの増加や、DNA 損傷修復経路と複製フォークの安定性維持機構の2つのネットワークに共通する因子である Rad51 タンパク質の foci 形成の増加が認められることから D2RP 発現抑制による DNA 損傷の亢進がひきおこされることがわかりました。さらに、D2RP は核内においては foci 形成が認められますが、この foci における FANCD2 との共局在と機能関連を明らかにしていません。しかしながら D2RP 遺伝子の発現抑制時において、FANCD2 のクロマチン上への移行は増加しており、さらに foci 形成も増加が認められました。また、ニワトリ DT40 細胞において D2R 欠損細胞を作製してその機能解析をおこないましたが同様な結果がえられました。このことより D2RP は FANCD2 と結合し、DNA 架橋剤による DNA 損傷修復に機能することが示唆されますが、FANCD2 の DNA 損傷部位への移行には関与していないことが明らかになりました。

さらに、FANCD2 以外のファンコニ貧血蛋白質の関連を調べるために、FANCD2 及びその結合蛋白質である FANCI をユビキチン化する FA 複合体蛋白質群との機能の関連を調べました。FA 複合体の機能には、FANCD2、FANCI をモノユビキチン化する E3 リガーゼとしての機能とともに、FA 複合体そのものがクロマチン上に移行し、DNA 損傷修復に働くことがわかっています。まず、FA 複合体の詳細な機能を明らかにするために、そのサブユニットについて検討しました。その結果、FA 複合体は3つのサブユニットに分けられることを明らかにしました。まず、E3 リガーゼである FANCL を中心とした FANCL-FANCB-FAAP100 の3つの蛋白質からなる触媒サブユニットがあります。次に、FANCA-FANCG-FAAP20 からなるサブユニットと FANCC-FANCE-FANCF からなるサブユニットが存在することを明らかにし、この二つのサブユニットはクロマチン上に移行し、DNA 損傷部位への結合に機能することがわかりました。これらの3つのサブユニットのうち、触媒サブユニットの欠損によって、FA 複合体の機能は失われますが、その他のサブユニットの欠損では FA 複合体の機能異常は認められませんでした (Huang, Y., et al., Cell reports(2014))。これらの FA 複合体には D2RP は結合せず、また、D2RP 発現抑制時においても FA 複合体蛋白質のクロマチン上への移行にも異常がみられませんでした。このことから、D2RP は FA 複合体との関連がないことが示唆されます。

次に、D2RP の予測される機能ドメインの解析を、D2RP 変異体を作製することによって行いました。D2RP は N 末端と C 末端に特異な機能ドメインを有しており、これらの部位を欠失させた変異体を作製し細胞内に発現させたところ、D2RP の N 末端欠損変異体においては FANCD2 との結合の著しい減少が認められましたが、C 末端欠損変異体に関しては

FANCD2 との結合に変化が認められませんでした。この結果より、D2RP はその N 末端部位において FANCD2 と結合することがわかりました。さらに、これらの変異体の核内におけるフォーカス形成をみたところ、野性型 D2RP 蛋白質は DNA 損傷後において核内に foci 形成がみられ FANCD2 と共局在しますが、N 末端欠損変異体では核内 foci 形成の減少と、FANCD2 との共局在の明らかな減少が認められました。しかしながら C 末端欠損変異体においては foci 形成や FANCD2 との共局在には変化が見られませんでした。

これらの結果から新たな FANCD2 結合蛋白質 D2RP は N 末端で FANCD2 と結合し、新たな DNA 損傷修復反応経路に機能していることを明らかにしました。

#### 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 6 件)

1. Huang, Y., Leung, J.W., Lowery, M., Matsushita, N., Wang, Y., Shen, X., Huong, D., Takata, M., Chen, J., and Li, L. Modularized functions of the Fanconi anemia core complex. *Cell Rep.* 7(6), 1849-1857 (2014)  
doi: 10.1016/j.celrep.2014.04.029.
2. Homma, M., Nagashima, S., Fukuda, T., Yanagi, S., Miyakawa, H., Suzuki, E., and Morimoto, T. Downregulation of Centaurin gamma1A increases synaptic transmission at *Drosophila* larval neuromuscular junctions. *Eur. J. Neurosci.* 40(8), 3158-3170 (2014)  
doi: 10.1111/ejn.12681.
3. Nagashima, S., Tokuyama, T., Yonashiro, R., Inatome, R., and Yanagi, S. Roles of mitochondrial ubiquitin ligase MITOL/MARCH5 in mitochondrial dynamics and diseases. *J. Biochem.* 155(5), 273-279 (2014)  
doi: 10.1093/jb/mvu016
4. Konno, A., Shuvaev, A.N., Miyake, N., Miyake, K., Iizuka, A., Matsuura, S., Huda, F., Nakamura, K., Yanagi, S., Shimada, T., and Hirai, H. Mutant ataxin-3 with an abnormally expanded polyglutamine chain disrupts dendritic development and metabotropic glutamate receptor signaling in mouse cerebellar Purkinje cells. *Cerebellum* 13(1), 29-41 (2014)  
doi: 10.1007/s12311-013-0516-5.
5. Sugiura, A., Nagashima, S., Tokuyama, T., Amo, T., Matsuki, Y., Ishido, S., Kudo, Y., McBride, H.M., Fukuda, T., Matsushita, N., Inatome, R., and Yanagi, S. MITOL regulates endoplasmic reticulum-mitochondria contacts via

Mitofusin2. *Mol. Cell* 51(1), 20-34 (2013)  
doi: 10.1016/j.molcel.2013.04.023

6. Yonashiro, R., Kimijima, Y., Shimura, T., Kawaguchi, K., Fukuda, T., Inatome, R., and Yanagi, S. Mitochondrial ubiquitin ligase MITOL blocks S-nitrosylated MAP1B-light chain 1-mediated mitochondrial dysfunction and neuronal cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109(7), 2382-2387 (2012)  
doi: 10.1073/pnas.1114985109

##### [学会発表](計 6 件)

1. 鈴木みどり、伊波英克、松下暢子、柳 茂 TAX1BP1 modulates antigen-specific antibody response through NF- $\kappa$ B pathway 第 73 回日本癌学会学術総会 (2014/10, 横浜)
2. 鈴木みどり、伊波英克、柳 茂、松下暢子 TAX1BP1 は NF- $\kappa$ B 経路を抑制化することによって特異抗体産生を制御する 第 87 回日本生化学会大会 (2014/10, 京都)
3. 鈴木みどり、伊波英克、柳 茂、松下暢子 TAX1BP1 regulates B cell differentiation through NF- $\kappa$ B pathway 第 38 回日本分子生物学会年会 (2014/12, 横浜)
4. 松下暢子、鈴木みどり、伊波英克、柳 茂 TAX1BP1 は体細胞高頻度突然変異を制御することによって抗体遺伝子多様化機構に機能する, 第 72 回日本癌学会学術総会 (口頭発表) (2013/10, 横浜)
5. 鈴木みどり、松下暢子、伊波英克、柳 茂 TAX1BP1 regulates IgM expression at the cell surface through NF- $\kappa$ B pathway 第 72 回日本癌学会学術総会 (2013/10, 横浜)
6. 松下暢子、鈴木みどり、柳 茂 TAX1BP1 plays a role in immunoglobulin gene diversification through regulation of somatic hyper mutation 第 37 回日本分子生物学会年会(2013/12, 神戸)

##### [図書](計 0 件)

##### [産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等:なし

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

松下暢子 (MATSUSHITA NOBUKO)  
東京薬科大学・生命科学部・准教授  
研究者番号：303333222

##### (2)研究分担者

柳茂 (YANAGI SHIGERU)  
東京薬科大学・生命科学部・教授  
研究者番号：60252003