

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 12 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830128

研究課題名(和文) DNA鎖間架橋修復に重要なFAN1ヌクレアーゼの機能解析

研究課題名(英文) Biochemical analysis of a DNA crosslink repair protein, FAN1

研究代表者

佐藤 浩一 (SATO, Koichi)

早稲田大学・理工学術院・次席研究員(研究院助教)

研究者番号：60708585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：二重鎖DNAの相補鎖間が共有結合で架橋される「DNA鎖間架橋損傷(ICL)」は、DNA複製や転写を阻害するために細胞毒性が著しく高く、その修復は細胞死や細胞がん化の抑制に必須である。ICL修復の中心反応は、架橋塩基の切り出しであり、この反応を担うヌクレアーゼの候補としてFAN1が同定されている。しかし、FAN1による架橋塩基の認識機構や、切り出し機構はこれまで不明であった。本研究では、生化学的解析により、FAN1の基質認識機構を明らかにした。さらに、FAN1のリクルート因子であるFANCD1-FANCD2複合体による、FAN1のヌクレアーゼ活性の調節機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：DNA interstrand crosslink (ICL) prevents the progression of DNA replication and transcription by covalent crosslinking between complementary strands of double-stranded DNA. ICL repair is essential for suppression of chromosomal aberrations that contribute to cell death and tumorigenesis. Dual-incision around the crosslinked bases (ICL unhook) is a central step in the ICL repair. FAN1 is a structure-specific endonuclease that is considered to be involved in the ICL unhook. However, the mechanism how FAN1 recognizes the damaged bases and mediates the ICL unhook has remained elusive. In this study, our biochemical analyses with the purified FAN1 protein revealed the mechanism of the substrate-recognition and -incision by FAN1. In addition, we found that the FANCD1-FANCD2 complex that recruits FAN1 to ICL sites functions to regulate the nuclease activity of FAN1.

研究分野：分子生物学、生化学

キーワード：ゲノム維持修復 Fanconi anemia DNA crosslink FAN1 FANCD2 FANCD1 RAD51 RPA

1. 研究開始当初の背景

生物の遺伝情報を担う DNA は、様々な要因により恒常的に損傷を受けている。中でも DNA の相補鎖間が共有結合で架橋される損傷は、「DNA 鎖間架橋 (ICL)」と呼ばれ、細胞機能に必須の DNA 複製や転写を強く阻害する。これまでに、内因性の代謝で生じるアルデヒドや、マイトマイシン C などの抗がん剤により ICL が引き起こされることが明らかにされている(1,2)。ICL に高感受性を示す遺伝子疾患としてファンコニ貧血 (FA) が知られている。FA は、高発がんや骨髄不全などで特徴付けられる重篤な小児性遺伝子疾患であり、我が国では難病に指定されている。現在まで 19 の原因遺伝子が同定されており、これらの遺伝子産物が協働して ICL 修復経路を構成していることが示されている(3)(図 1)。

DNA 複製の際に複製装置が ICL に衝突すると、8 個の FA 原因遺伝子産物からなる FA コア複合体が停止した複製フォークに集積する。FA コア複合体はマルチサブユニット E3 ユビキチンリガーゼであり、2 つの FA 原因遺伝子産物からなる FANCI-FANCD2 (ID) 複合体の両サブユニットをモノユビキチン化する(4)。モノユビキチン化された ID 複合体は、ICL 近傍のクロマチンに集積し、ヌクレアーゼをリクルートすることで ICL の切り出しを開始させると考えられている(5)。Fanconi anemia-associated nuclease 1 (FAN1) は、モノユビキチン化された FANCD2 に結合する構造特異的エンドヌクレアーゼとして同定され、ICL の切り出し反応を触媒する候補因子として考えられている(6-9)。しかし、FAN1 による架橋塩基の認識機構や、切り出し機構の多くはこれまで明らかになっておらず、このことにより、ICL 修復機構も依然として不明瞭なままであった。

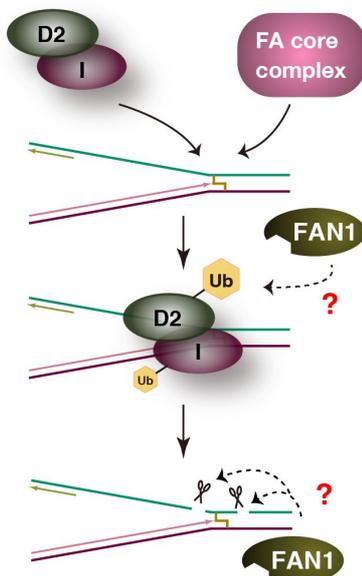


図 1. ICL 修復経路

2. 研究の目的

本研究の目的は、ICL 修復における中心的な過程である「ICL の切り出し反応」の分子基盤を生化学的手法によって明らかにすることである。ICL の切り出し反応には、構造特異的エンドヌクレアーゼである FAN1 が関与すると考えられている。さらに、FAN1 の活性は、FAN1 のリクルート因子である ID 複合体をはじめとする修復因子や、クロマチン構造により制御されることが考えられている。しかし、FAN1 による架橋塩基の切断反応や、これら因子群による活性制御の分子基盤は、依然として未解明である。そこで本研究では、FAN1 および、ID 複合体をはじめとした修復因子群を精製し、生化学的解析を行うことで、ICL の切り出し反応の分子機構を解明することを目指す。本研究の成果は、FA やがんの発症機構の理解だけでなく、これらの疾病に対する新規治療薬の開発に解明に対しても多大な知見をもたらすことが期待される。

3. 研究の方法

本研究を遂行するために、生化学的解析に用いる FAN1、FANCI、FANCD2、そしてこれらのタンパク質と損傷部で共局在する単鎖 DNA 結合タンパク質である RPA をリコンビナントタンパク質として精製する。さらに、従来の研究過程で確立した試験管内反応系を用いて、FANCD2 がモノユビキチン化された ID 複合体を調製する。加えて、クロマチン上での FAN1 の機能解析を行うために、コアヒストン (H2A、H2B、H3、H4) をリコンビナントタンパク質として精製する。精製したコアヒストンと DNA を用いて、従来までに確立した手法により、高純度なトリヌクレオソーム基質を調製する。

精製した FAN1 と複製フォーク様 DNA 基質を用いて、まず FAN1 のヌクレアーゼ活性を解析する。次に、調製したモノユビキチン化 ID 複合体を複製フォーク様 DNA 基質に結合させ、FAN1 のヌクレアーゼ活性に及ぼす影響を解析する。同様に、停止した複製フォークに迅速に集積することが示されている Replication protein A (RPA) が FAN1 のヌクレアーゼ活性に及ぼす影響を解析し、これらの因子による FAN1 の制御機構を明らかにする。さらに、調製したトリヌクレオソーム基質に精製した FAN1 を混合し、クロマチン上における FAN1 の活性を解析する。

4. 研究成果

本研究では、まず FAN1 の生化学的機能解析を行うため、FAN1 を大腸菌リコンビナントタンパク質として高純度かつ大量に精製する系を確立した。先行研究から、FAN1 は複製フォークを模した 5'-flapped DNA 基質に対し、特異的なエンドヌクレアーゼ活性を示すことが報告されていた。そこで次に、³²P で標識した 5'-flapped DNA と精製した FAN1 タンパク質を用いて、FAN1 のヌクレアーゼ活性

を評価する解析系を確立し、5'-flapped DNA における FAN1 の切断点を同定した。FAN1 による切断は、flap 鎖と同一の鎖で生じ、その切断点は、複製フォークの分岐点から 3-4 塩基上流(3'側)であった(図 2A)。

ICL で複製フォークが停止すると、単鎖 DNA 領域に迅速に RPA が集積することが知られている。そこで次に、単鎖 DNA 領域に RPA が結合した 5'-flapped DNA 基質を調製し、より生理的な環境を模した DNA 基質における FAN1 の活性を解析した。その結果、FAN1 はこの DNA 基質も RPA 非存在下と同様に認識し、切断活性を示すことが明らかになった。このことから、単鎖 DNA 領域にタンパク質が結合しても、FAN1 が 5'-flapped DNA を認識できることが示唆された(図 2B)。

次に、FAN1 のリクルート因子である ID 複合体が結合した 5'-flapped DNA 基質を調製し、FAN1 の活性を解析した。その結果、ID 複合体は FAN1 のエンドヌクレアーゼ活性を強く阻害することが明らかになった。加えて、モノユビキチン化 FANCD2 を含む ID 複合体を用いた解析から、FANCD2 のモノユビキチン化により、FAN1 の活性がより強く阻害されることが明らかになった(図 2C)。これらの結果は、FAN1 が停止した複製フォークを認識するためには、ID 複合体が複製フォークから解離する必要があることを示唆している。これらの結果から、FAN1 の基質認識機構や ICL の切り出し機構のモデルを構築することができ、これらの ICL 修復機構に重要な知見を与えることができた。

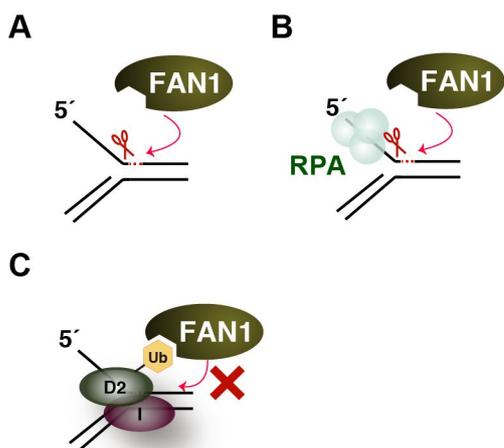


図 2. FAN1 のエンドヌクレアーゼ活性

FAN1 はエンドヌクレアーゼ活性の他に、5'-3' エクソヌクレアーゼ活性を有することが報告されている。細胞中でこの活性が制御されなくなった場合、複製フォークが分解され、染色体異常が引き起こされることが示されている(10)。FAN1 のこのエクソヌクレアーゼ活性は、本研究で精製した FAN1 でも観察された。そこで次に、精製タンパク質を用いて、FAN1 のヌクレアーゼ活性の制御機構を検討した。従来の研究過程で、FAN1 のリクルー

ト因子である ID 複合体が、ヌクレオソーム形成活性を有することを見出しているため、まずヌクレオソーム構造が FAN1 のヌクレアーゼ活性に及ぼす影響を解析した。調製したトリヌクレオソーム基質と FAN1 を混合したところ、FAN1 のエクソヌクレアーゼ活性が著しく阻害されることが明らかになった。また、ID 複合体が相同組換えで中心的な役割を果たす RAD51 と直接相互作用し、RAD51-DNA 複合体を安定化することを明らかにした。さらに、ID 複合体によって安定化された RAD51-DNA 複合体が、効率的に FAN1 のエクソヌクレアーゼ活性を阻害することが明らかになった。これらの解析から、ID 複合体による FAN1 のヌクレアーゼ活性の制御機構に大きな知見を与えることができた。

<引用文献>

1. Deans A.J., West S.C. (2011) DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat Rev Cancer*, 11, 467-480.
2. Langevin F., Crossan G.P., Rosado I.V., Arends M.J., Patel K.J. (2011) Fancd2 counteracts the toxic effects of naturally produced aldehydes in mice. *Nature*, 475, 53-58.
3. Ceccaldi R., Sarangi P., D'Andrea A.D. (2016) The Fanconi anaemia pathway: new players and new functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 17, 337-349.
4. Kottmann M.C., Smogorzewska A. (2013) Fanconi anaemia and the repair of Watson and Crick DNA crosslinks. *Nature*, 493, 356-363.
5. Knipscheer P., Räschele M., Smogorzewska A., Enoiu M., Ho T.V., Schärer O.D., Elledge S.J., Walter J.C. (2009) The Fanconi anemia pathway promotes replication-dependent DNA interstrand cross-link repair. *Science*, 326, 1698-1701.
6. Kratz K., Schöpf B., Kaden S., Sendoel A., Eberhard R., Lademann C., Cannavò E., Sartori A.A., Hengartner M.O., Jiricny J. (2010) Deficiency of FANCD2-associated nuclease KIAA1018/FAN1 sensitizes cells to interstrand crosslinking agents. *Cell*, 142, 77-88.
7. Liu T., Ghosal G., Yuan J., Chen J., Huang J. (2010) FAN1 acts with FANCI-FANCD2 to promote DNA interstrand cross-link repair. *Science*, 329, 693-696.
8. MacKay C., Déclais A.C., Lundin C., Agostinho A., Deans A.J., MacArtney T.J., Hofmann K., Gartner A., West S.C., Helleday T., *et al.* (2010) Identification of KIAA1018/FAN1, a DNA repair nuclease recruited to DNA damage by monoubiquitinated FANCD2. *Cell*, 142, 65-76.
9. Smogorzewska A., Desetty R., Saito T.T.,

- Schlabach M., Lach F.P., Sowa M.E., Clark A.B., Kunkel T.A., Harper J.W., Colaiacovo M.P. *et al.* (2010) A genetic screen identifies FAN1, a Fanconi anemia-associated nuclease necessary for DNA interstrand crosslink repair. *Mol Cell*, 39, 36-47.
10. Chaudhury I., Stroik D.R., Sobeck A. (2014) FANCD2-controlled chromatin access of the Fanconi-associated nuclease FAN1 is crucial for the recovery of stalled replication forks. *Mol Cell Biol.*, 34, 3939-3954.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7件)

1. Kujirai T., Horikoshi N., Sato K., Maehara K., Machida S., Osakabe A., Kimura H., Ohkawa Y., Kurumizaka H. (2016) Structure and function of human histone H3.Y nucleosome. *Nucleic Acids Res.*, in press. 査読有
2. Urahama T., Harada A., Maehara K., Horikoshi N., Sato K., Sato Y., Shiraishi K., Sugino N., Osakabe A., Tachiwana H., Kagawa W., Kimura H., Ohkawa Y., Kurumizaka H. (2016) Histone H3.5 forms an unstable nucleosome and accumulates around transcription start sites in human testis. *Epigenetics Chromatin*, 9, 2. doi: 10.1186/s13072-016-0051-y. 査読有
3. Hira A., Yoshida K., Sato K., Okuno Y., Shiraishi Y., Chiba K., Tanaka H., Miyano S., Shimamoto A., Tahara H., Ito E., Kojima S., Kurumizaka H., Ogawa S., Takata M., Yabe H., Yabe M. (2015) Mutations in the gene encoding the E2 conjugating enzyme *UBE2T* cause Fanconi anemia. *Am J Hum Genet.*, 96, 1001-1007. doi: 10.1016/j.ajhg.2015.04.022. 査読有
4. Takahashi D.*, Sato K.*, Hirayama E., Takata M., Kurumizaka H. (2015) Human FAN1 promotes strand incision in 5'-flapped DNA complexed with RPA. *J Biochem.*, 158, 263-270. doi: 10.1093/jb/mvv043. (*: equal contribution) 査読有
5. Sato K., Ishiai M., Takata M., Kurumizaka H. (2014) Defective FANCI binding by a Fanconi anemia-related FANCD2 mutant. *PLoS One.*, 9, e114752. doi: 10.1371/journal.pone.0114752. 査読有
6. Takahashi D.*, Sato K.*, Shimomuki M., Takata M., Kurumizaka H. (2014) Expression and purification of human FANCI and FANCD2 using *Escherichia coli* cells. *Protein Expr Purif.*, 103, 8-15. doi:

10.1016/j.pep.2014.08.012. (*: equal contribution) 査読有

7. Unno J., Itaya A., Taoka M., Sato K., Tomida J., Sakai W., Sugasawa K., Ishiai M., Ikura T., Isobe T., Kurumizaka H., Takata M. (2014) FANCD2 binds CtIP and regulates DNA-end resection during DNA interstrand crosslink repair. *Cell Rep.*, 7, 1039-1047. doi: 10.1016/j.celrep.2014.04.005. 査読有

〔学会発表〕(計 4件)

1. 佐藤浩一, 下向真代, 胡桃坂仁志 「相同組換え修復に重要な FANCI-FANCD2 複合体の生化学的機能解析」第 23 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ, 焼津, 2015 年 10 月 19-21 日 (口頭発表)
2. Sato K., Shimomuki M., Kurumizaka H. 「Biochemical analysis of DNA crosslink repair proteins, FANCI-FANCD2 complex in homologous recombination」International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function, 淡路島, 2015 年 8 月 23-26 日 (ポスター発表)
3. 佐藤浩一, 石合正道, 高田穰, 胡桃坂仁志 「Fanconi 貧血患者にみられる FANCD2 変異体の機能解析」第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014 年 11 月 25-27 日 (ポスター発表)
4. 佐藤浩一, 高橋大介, 平山恵美子, 高田穰, 胡桃坂仁志 「ファンコニ貧血タンパク質に相互作用する FAN1 ヌクレアーゼの機能解析」第 2 回若手の会「クロマチン動構造 若手交流ワークショップ」, 佐幌, 2014 年 7 月 2-3 日 (口頭発表)

〔図書〕(計 0件)

〔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://www.kurumizaka.sci.waseda.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 浩一 (SATO, Koichi)
早稲田大学 理工学術院 次席研究員 (研究院助教)
研究者番号: 60708585