

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870356

研究課題名(和文) ファンコニ貧血症タンパク質によるアポトーシス制御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 on apoptosis regulation of FA proteins

## 研究代表者

酒井 恒 (SAKAI, Wataru)

神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・助教

研究者番号：70526251

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)：ファンコニ貧血(Fanconi anemia, FA)に関する分子レベルの解析は、DNA損傷に対する細胞応答および修復に関するものが多い。申請者は予備解析において、DNA損傷刺激に依存しない細胞死制御におけるFAタンパク質の新たな機能の可能性を見出し、本研究課題ではその詳細な検証を行った。その結果、一部のFAタンパク質はアポトーシスを抑制的に制御していることが明らかとなった。さらに、FAタンパク質の相互作用因子の網羅的探索の結果、多数の新規候補因子を単離した。それらに対して遺伝子オントロジーによるパスウェイ解析を行ったところ、FA経路の新たな制御経路を示唆する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Fanconi anemia (FA) is rare genetic disorder characterized by genome instability. Molecular mechanism of FA proteins is generally focused on the DNA damage response and repair. However, mechanisms of some FA symptoms are still unknown. In the pilot study, I revealed a novel possibility that a FA protein function in regulation of cell death. In this study, the possibility was verified more detail, and implying that a novel mechanism of FA proteins as a negative regulator of apoptosis in DNA damage independent manner. Furthermore, to explore the novel regulation of FA proteins, I challenged isolation of unknown FA-interaction proteins. The comprehensive screening identified more than 100 candidates as novel FA interacting proteins. Gene ontology analysis showed that about 10% of those candidates belong to a specific pathway, unrelated to classic FA pathway.

研究分野：DNA損傷修復

キーワード：ファンコニ貧血 アポトーシス



(3)申請者による解析結果から、DNA 損傷応答に直接的に関与しない FA タンパク質の新規機能の可能性が示唆されたため、DNA 損傷刺激を与えない条件下での FANCD2 タンパク質との新規相互作用因子の網羅的解析を行った。

#### 4. 研究成果

申請者は FANCD2 の欠損した患者由来細胞から、FANCD2 が DNA 損傷非依存的なアポトーシスを抑制的に制御している可能性を見出したが、これらの現象を以下の複数の方法によって検証した。

(1)ヒト骨肉腫由来細胞株 U2OS を用いて、siRNA によって内在性 FANCD2 の発現抑制を行ったところ、TNF/CHX 処理に対して有意に高感受性を示すことが判明した(図2)。

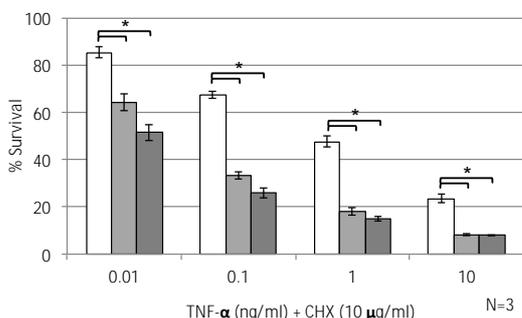


図2. siRNA によって FANCD2 を発現抑制した条件下で(淡グレイ、濃グレイ) さまざまな濃度の TNF/CHX 処理を施した結果、いずれの濃度においてもコントロール(白)と比べて有意に高い感受性を示した。\*P < 0.05

(2)(1)とは逆に、U2OS 細胞に野生型 FANCD2 を高発現させた細胞株を樹立し、TNF/CHX 処理による感受性を調べたところ、高発現細胞は親株に比べ有意に抵抗性を示した(図3)。

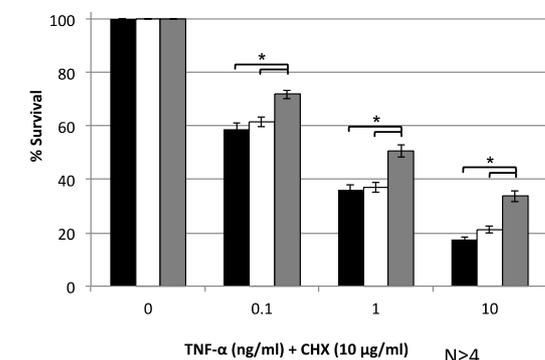


図3. U2OS 細胞に FANCD2 を高発現させた細胞は(グレイ) 親株である U2OS (黒)やベクターのみ(白)の細胞と比べて、有意に TNF/CHX 処理に対して抵抗性を示した。\*P < 0.05

(3)FA タンパク質のひとつである FANCI は、FA 経路において FANCD2 とヘテロダイマーを形成しゲノム安定性の維持に寄与することが知られている。そこで、上記と同様の解析を FANCI 欠損細胞および siRNA による発現抑制下で行ったところ、FANCD2 と同様の傾向が見られた。

(4) FANCA、FANCC、FANCF においても、それぞれの欠損細胞とその欠損を相補した細胞を用いて同様の解析を行ったが、FANCD2 や FANCI のような結果は得られた。

これらの解析結果より、FA タンパク質の中で少なくとも FANCD2 と FANCI は、TNF/CHX 処理によって誘導される細胞死を抑制的に制御している可能性が示された。現在 siRNA 抵抗性 FANCD2 を安定に発現する細胞株を用いて、siRNA のオフターゲット効果の有無についても検証中である。また、これらに関連して、申請者は CRISPR/Cas9 システムを応用した FANCD2 ノックアウト細胞の樹立に成功しており、現在このノックアウト細胞を親株として、野生型 FANCD2 発現細胞を樹立し、細胞死制御の更なる検証を行っている。

次に、上記の解析のみでは TNF/CHX 処理によって誘導される細胞死が、アポトーシスとネクローシスのどちらを主にしているか判別することが困難であったため、それぞれの阻害剤である Z-VAD-FMK (zVAD) および Necrostatin-1 (Nec1) で細胞を処理することによる影響を検証した。その結果、TNF/CHX 処理によって誘導される細胞死は、zVAD 処理によってほぼ完全に抑制される一方、Nec1 処理では全く変化ないことが判明した(図4)。つまり FANCD2 および FANCI はアポトーシス誘導を抑制的に制御していると考えられる。

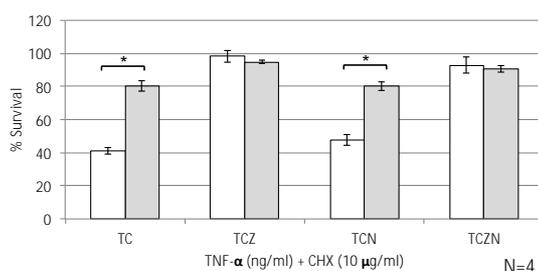


図4. FANCD2 欠損細胞 PD20F (白)は、野生型 FANCD2 を相補した細胞(グレイ)に比べて TNF/CHX 処理に対して高い感受性を示すが、アポトーシス阻害剤 zVAD によって細胞死がほぼ完全に抑制された。ネクローシス阻害剤 Nec1 では依然として高い感受性を示した。(TC : TNF/CHX、TCZ : TNF/CHX/zVAD、TCN : TNF/CHX/Nec1、TCZN : TNF/CHX/zVAD/Nec1) \*P < 0.05

申請者は予備実験の段階において、FANCD2 が TNF- のシグナル伝達に關与する因子と相互作用することを免疫沈降解析によって

示していた。しかし、精製した FANCD2 タンパク質との GST プルダウンアッセイを行った結果、直接的相互作用を示さず、何らかの他の因子を介した相互作用である可能性が示唆された。そこで質量分析を用いた新規相互作用因子の探索を行った。これまで数多く報告されている FA タンパク質との相互作用因子のほとんどは、DNA 損傷応答に関与するものである。申請者は上記に示したような FANCD2 の関与する DNA 損傷非依存的なアポトーシス制御の検討のため、DNA 損傷刺激を与えない条件下で、FLAG タグを融合させた野生型 FANCD2 を発現する細胞を大量に培養し、核質を除いた細胞抽出液を調整した。これを用いた免疫沈降によって FANCD2 複合体を単離し、相互作用因子の網羅的解析を行った結果、既知を含めて 100 を越える多数の新規相互作用因子の単離に成功した(図 5、京都大学流域圏総合環境質研究センター・松田知成准教授との共同研究)。さらに、これらの候補因子に対して、遺伝子オントロジーによるパスウェイ解析を行った結果、FA 経路のみならず、これまで DNA 損傷応答とは直接的に関与が示されていない制御経路に関与するものが 10% 以上も含まれていることが判明した。

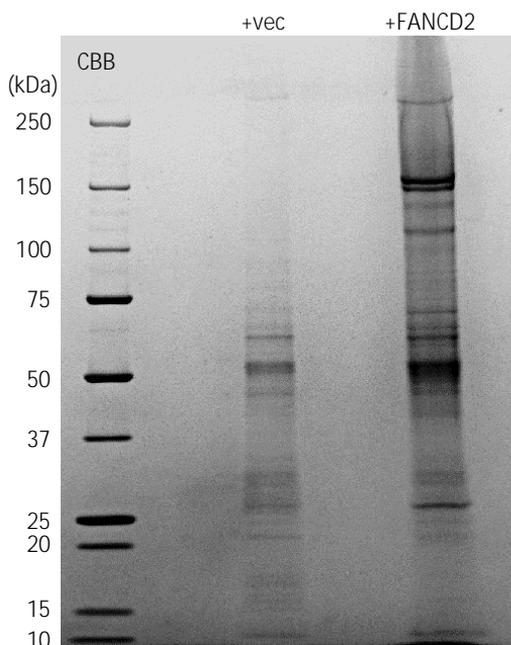


図 5. FANCD2 複合体を SDS-PAGE で展開した結果、多数の因子が単離された(+FANCD2)。これら個々のバンドを切り出し、質量分析によって候補因子の同定を行った。

申請者はこれらの新規相互作用因の一部と FANCD2 の物理的相互作用を免疫沈降解析によって検証済みである。現在プルダウンアッセイによって直接的相互作用の可能性を検討中である。今回同定した新規相互作用因子のうち、約 10% を占める因子が関与する制御経路と FANCD2 をはじめとする FA タンパク質との相互制御関係については、これまで全

く報告がない。今後は、FA タンパク質の新規制御経路との関わりをはじめ、DNA 損傷応答との関連等について更なる解析を行う予定である。

## 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)

[雑誌論文](計 2 件)

いずれも査読有り

1. Wataru Sakai#, Kaoru Sugasawa  
*FANCD2 is a target for caspase 3 during DNA damage-induced apoptosis.*  
**FEBS Letter**, 2014 Oct 16;588(20):3778-3785.

#: 責任著者

本学術論文は掲載された雑誌の表紙に取り上げられた上に、2014Editors' selection に選ばれ、雑誌のウェブサイト上で紹介された。

2. Junya Unno, Akiko Itaya, Masato Taoka, Koichi Sato, Junya Tomida, Wataru Sakai, Kaoru Sugasawa, Masamichi Ishiai, Tsuyoshi Ikura, Toshiaki Isobe, Hitoshi Kurumizaka, Minoru Takata.  
*FANCD2 binds CtIP and regulates DNA-end resection during DNA interstrand crosslink repair.*  
**Cell Reports**, 2014 May 22;7(4):1039-47

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 1 件)

1. 光老化科学の最前線(シーエムシー出版) 2015年4月24日発行、監修:前田 憲寿、第9章 DNA 損傷と DNA 修復(酒井 恒、菅澤 薫)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ウェブサイト:

神戸大学バイオシグナル総合研究センター  
(<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)

神戸大学バイオシグナル総合研究センター  
ゲノム機能制御研究分野・助教

研究者番号: 70526251