

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07286

研究課題名(和文) ファンコニ貧血タンパク質とアルデヒド代謝の新たな相互制御関係の解明

研究課題名(英文) Analysis of functional crosstalk between Fanconi anemia proteins and aldehyde metabolism

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：必須栄養素である脂質は、DNA損傷を引き起こす種々のアルデヒドの発生源として知られているが、それらが無害化する分子機構については不明な点が多く残されている。本研究課題では、脂質代謝に関与する酵素の一つがファンコニ貧血責任遺伝子産物(FAタンパク質)の一つと協調し、内因性のDNA損傷の発生を未然に防いでいる新たな可能性を見出した。また本研究期間内に行われたFAタンパク質と脂質代謝における解析において、FAタンパク質の当初予想していなかった新規の細胞内動態変化を見出すに至った。これらの知見はファンコニ貧血のみならず種々の疾患・病態発症機序の解明に寄与することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

希少遺伝疾患であるファンコニ貧血患者の多くが若年期から脂質代謝異常を示すことが報告されている。FAタンパク質のDNA損傷応答に関する研究・理解が進む一方、それらの発症機序については依然として不明な点が多い。本研究課題では一部のFAタンパク質が脂質代謝環境の変化に応答して細胞内での局在を変化させることを見出した。特に核内外に存在する細胞小器官周辺への局在変化はこれまで他に全く報告がなく特出すべき研究成果の一つである。今後はファンコニ貧血に見られる病態との関連性についても解析していく予定である。

研究成果の概要(英文)：Lipid is known as a source of various aldehydes that cause DNA damage such as DNA adduct and DNA crosslink. However, it still remains unclear how those genotoxic stresses are repaired and suppressed in the cell. This research project obtained a new possibility that one of the enzymes in lipid metabolism cooperates with the Fanconi anemia proteins (FA proteins) to prevent the occurrence of endogenous DNA damage. Surprisingly, a novel cellular dynamics of FA proteins were unveiled that some FA proteins translocates and accumulates onto surface of the organelle membranes in response to lipid metabolism. Detail molecular mechanism of this novel phenomenon is unknown, but this finding will contribute to the elucidation of the pathogenic mechanism of not only Fanconi anemia but also other diseases.

研究分野：分子生物学

キーワード：ファンコニ貧血 アルデヒド 脂質代謝 DNA損傷 DNA修復

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ファンコニ貧血 (Fanconi anemia, FA) は、我が国の厚生労働省により難病指定されている希少遺伝疾患の1つである。皮膚の色素沈着や身体奇形などの先天的異常に加え、幼少期から骨髄機能不全に起因する重度の貧血が見られ、多くは急性骨髄性白血病を発症する。2020年5月までに責任遺伝子が22種類同定されており、これらがコードする遺伝子産物(FAタンパク質)は、「FA経路」と呼ばれる細胞内シグナル伝達経路を構成し、DNA上に発生したDNA損傷、特にDNA鎖間架橋(interstrand crosslink, ICL)損傷に対する細胞応答および修復に関与することが判明している。ファンコニ貧血に見られる多様な病態はICL損傷応答の異常に起因すると考えられている。しかし、半数以上のファンコニ貧血の患者において内分泌機能や脂質代謝異常などの症状が報告されている。これらの発症機序はこれまでに知られているDNA損傷応答機構の異常だけでは説明が困難なものも存在し、FAタンパク質の未知の機能の異常が関与する可能性が示唆されている。

近年、生体内で生じるホルムアルデヒドやアセトアルデヒドがDNAと反応することでFA経路の標的となるICL損傷を引き起こしている可能性が報告されている。分子内にホルミル基(-CHO)を含む化学物質の総称であるアルデヒド類の多くは、発がんリスクの高い物質として分類されているが、生活環境中にも豊富に存在する。しかし、そのような化学物質の曝露に関係なくファンコニ貧血の病態が見られることから、ICL損傷の真の発生源に関しては依然として不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

研究代表者の予備実験の結果から、FAタンパク質は脂質代謝を起因として生じる内因性アルデヒドの発生とその影響(ICL損傷)を監視・制御する機構を構成しており、従来のFA経路(修復)はその一部であるという新たな可能性を着想するに至った。本研究課題はこれらの可能性を検証することによって、FA経路と脂質代謝の未知の分子制御機構を明らかにすると共に、その破綻によって引き起こされるゲノム不安定性や種々の病態発症機序との関連性の解明を目指す。さらに、これらの新たな機序に基づいたファンコニ貧血の治療法や薬剤の開発、さらにはファンコニ貧血患者の生活の質の向上とその家族の負担軽減に資することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 質量分析によるFANCD2相互作用因子の単離と解析

FA経路で働く多数のFAタンパク質の中でもFANCD2は鍵となる重要な因子として知られている。しかし、その機能は多様で依然として不明な点が多い。そこで本研究課題では、FANCD2と相互作用を示す因子を網羅的に単離・同定するため、N末端にFLAGタグを付加したFANCD2を発現する細胞をヒト骨肉腫由来U2OSを用いて樹立した。FLAGタグを利用した免疫沈降によってFANCD2複合体を単離した後、これらをSDS-PAGEで展開し、その構成成分を質量分析によって解析した。

(2) 脂質代謝関連因子に着目した解析

質量分析によって得られた多数のFANCD2相互作用因子に対して、遺伝子オントロジー解析によるパスウェイ解析を行った。遺伝子オントロジー解析には、National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)から無償で提供されているデータベースであるThe Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID, <https://david.ncifcrf.gov>)を利用した。

(3) 脂質代謝におけるFAタンパク質の新規機能について

リアルタイムでのFANCD2の細胞内動態の観察を可能にするため、蛍光タンパク質EGFPをN末端に付加したFANCD2を発現するU2OS細胞を樹立した。またFANCD2とヘテロ二量体を形成してFA経路において機能することが知られているFANCIタンパク質についても同様に、蛍光タンパク質mCherryをN末端に付加したものを発現するU2OS細胞を樹立した。樹立したそれぞれの細胞を用いて脂質代謝環境に反応したFAタンパク質の細胞内動態を共焦点レーザー顕微鏡により詳細に解析した。

(4) 天然由来ポリフェノールを用いた内因性DNA損傷の発生抑制の試み

生体内で生じる種々のアルデヒド類は、DNAやタンパク質などの生体分子に結合することによって、様々な病態の起因になると考えられている。通常脂質代謝や脂質の酸化反応によっても種々のアルデヒド類が発生することから、研究代表者は、既にアルデヒドの毒性を抑制する効果が多数報告されている天然由来のポリフェノールに着目した。まず、安全に摂取可能な身近なポリフェノールによって内因性DNA損傷の発生抑制が可能かどうかについて、培養細胞を用いて予備的な解析を行った。

4. 研究成果

(1) 質量分析によるFANCD2相互作用因子の単離と解析

FLAG-FANCD2 を発現する U2OS 細胞から単離した FANCD2 複合体の構成成分を質量分析によって解析した結果、既知を含めて 130 を超える FANCD2 相互作用因子の単離に成功した。それらの因子に対して遺伝子オントロジーに基づいたパスウェイ解析を行った結果、FANCD2 複合体の構成成分として脂質代謝に関連する因子が約 10% 近く含まれることが明らかになった。FANCD2 を含む FA タンパク質は細胞の核内における ICL 損傷に対する細胞応答や修復に関する因子との相互作用が多数知られているが、この結果は想定外であった。しかし、改めてファンコニ貧血に見られる病態について文献等を調査した結果、ファンコニ貧血患者の半数以上に原因不明の脂質代謝異常が見られることが報告されていた。そのため、遺伝子オントロジーによって得られた結果は、FA タンパク質と脂質代謝の未知の機能的連関を示唆するのではないかと考えられた。そこで、今回単離された脂質代謝に関連する因子の一つに着目して、FANCD2 との相互作用を免疫沈降解析によって改めて確認した。その結果、500 μ M 以上の塩濃度のバッファーで洗浄を複数回繰り返しても、FANCD2 との安定な相互作用が依然として検出された。以上の解析結果から、FANCD2 の相互作用因子として単離された脂質代謝に関連する因子は、これまでに報告されていない未知の機能的連関の可能性を示すものであると考え、さらに以下の解析を行った。

(2) 脂質代謝関連因子に着目した解析

FANCD2 相互作用因子として単離された複数の脂質代謝関連因子の中から、生体内の脂質由来のアルデヒドの代謝に関連する酵素の一つに着目して解析を行った（以降この因子を FANCD2 Binding Protein 1, FABP1 と表記する）。FA 経路が標的とする内因性 ICL 損傷は生体内の代謝過程で生じるホルムアルデヒドやアセトアルデヒドなどが原因ではないかと考えられている。一方で、脂質代謝や脂質過酸化反応によって生じる脂質由来の様々なアルデヒドも、内因性 ICL 損傷の原因の一つと考えられている。そこで、まず FABP1 を siRNA によって発現抑制したところ、FANCD2 のみならず他の FA タンパク質の発現レベルも減少する現象が得られた。多様な複合体を形成して機能する FA タンパク質は、いずれかの因子を発現抑制すると他の FA タンパク質のタンパク質安定性も失われ、それらの発現レベルが連動して減少することが知られている。本解析で得られた FABP1 の発現抑制の結果は、これまでの報告と一致する。これらの結果は、FABP1 が FANCD2 や他の FA タンパク質と共に細胞内で安定な複合体を形成する可能性を示唆している。

さらに、FABP1 を発現抑制した時のゲノム安定性への影響を調べるため、DNA 損傷マーカーであるヒストンバリエント H2AX のリン酸化 (γ H2AX) を免疫染色によって解析した。その結果、FABP1 を発現抑制した細胞では、 γ H2AX の核内点局在がコントロール細胞と比較して顕著に増加することが判明した。同様の結果は FABP1 に対する複数の siRNA を用いた発現抑制でも得られた。これより、FABP1 が DNA 損傷の抑制または DNA 修復に関与する新たな可能性が示唆された。FABP1 の発現抑制による DNA 損傷の増加の分子メカニズムやどのような DNA 損傷が生じているかは不明である。しかし FABP1 と FA タンパク質の相互作用についてはこれまでに報告はなく、内因性の DNA 損傷、特に ICL 損傷の発生制御に関連する新規のメカニズムの可能性があり、今後さらなる解析を行う予定である。

(3) 脂質代謝制御における FA タンパク質の新規機能について

FA タンパク質の機能解析の多くは主に核内の ICL 損傷応答に関するものが世界的に行われている。一方で、ファンコニ貧血の患者の多くが成人前の若年期から脂質代謝異常を示すことが報告されているが、それらの病態発症機序については DNA 損傷応答の異常では説明が困難であり、依然として不明な点が多く残されている。そのような研究背景の中、研究代表者は樹立した様々な細胞を用いて、脂質代謝と FA タンパク質の細胞内動態の変化を共焦点レーザー顕微鏡で詳細に解析した。その結果、脂質代謝に関係する細胞培養の条件を変化させることによって、FANCD2 および FANCI が細胞内での局在を変化させることが判明した。驚くべきことに、この局在変化は核内だけでなく細胞質中においても検出された。細胞質におけるこれら FA タンパク質の局在変化は、脂質代謝に関連する細胞小器官に局在した動態変化であると考えられた。このような脂質代謝環境の変化に応答した FA タンパク質の局在変化はこれまで他に全く報告がなく特出すべき研究成果の一つである。今後はその他の FA タンパク質の動態を調べると共に、細胞質での局在を電子顕微鏡レベルで詳細に分析する。さらに、ファンコニ貧血に見られる病態との関連性についても解析していく予定である。

(4) 天然由来ポリフェノールを用いた内因性 DNA 損傷の発生抑制の試み

脂質に由来するアルデヒド類の代謝に関与する FABP1 の発現抑制によって、DNA 損傷マーカーである γ H2AX のレベルが上昇したことから、脂質由来のアルデヒド類の蓄積が内因性 DNA 損傷の起因となる可能性が考えられた。そこで、研究代表者は様々なアルデヒドに対してその毒性の抑制効果が報告されている天然由来のポリフェノールを培地中に加えることで、FABP1 の発現抑制による DNA 損傷の発生を抑制できるのではないかと考えた。一般的に摂取される様々なフルーツ類に多く含まれるポリフェノールの一種を培地中に添加して、同様の FABP1 の発現抑制を行った結果、 γ H2AX のレベルの上昇が有意に抑制された。これらの結果はファンコニ貧血の病態の起因となる内因性 DNA 損傷の発生を抑制し、病態緩和や発症抑制などへの応用が期待される。今後は使用したポリフェノールの適性濃度の検討を行うとともに、将来的にはモデ

ル動物を用いた解析へと発展する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wataru Sakai, Kaoru Sugasawa	4. 巻 41
2. 論文標題 Importance of finding the bona fide target of the Fanconi anemia pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes and Environment	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41021-019-0122-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 酒井 恒、乾 愛実、大槻侑恵、後藤元成、横井雅幸、菅澤 薫
2. 発表標題 脂質代謝に応答したファンコニ貧血タンパク質のダイナミクス
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大槻侑恵、後藤元成、乾 愛実、松田 俊、松田知成、横井雅幸、菅澤 薫、酒井 恒
2. 発表標題 ファンコニ貧血タンパク質FANCD2と脂質代謝関連因子の機能的連関の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 酒井 恒
2. 発表標題 核内 - 細胞質における脂肪滴のダイナミクス
3. 学会等名 第3回オルガネラ・ゾーン研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukie Otsuki, Motonari Goto, Megumi Inui, Masayuki Yokoi, Kaoru Sugasawa, Wataru Sakai
2. 発表標題 Dynamics of FANCD2 in response to lipid metabolism.
3. 学会等名 2019 Fanconi Anemia Scientific Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 酒井 恒
2. 発表標題 メタボリックDNA損傷を抑制する新規メカニズムの可能性について
3. 学会等名 日本環境変異原学会公開シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 酒井 恒、大槻侑恵、後藤元成、乾 愛実、松田 俊、松田知成、菅澤 薫
2. 発表標題 脂肪酸アルデヒド代謝におけるファンconi貧血タンパク質の機能解析
3. 学会等名 日本環境変異原学会第47回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大槻侑恵、後藤元成、乾 愛実、松田 俊、松田 知成、菅澤 薫、酒井 恒
2. 発表標題 ファンconi貧血タンパク質FANCD2と脂質代謝関連因子の相互作用解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wataru Sakai
2. 発表標題 Fatty aldehyde dehydrogenase is a novel binding partner of FANCD2
3. 学会等名 29th Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 酒井 恒
2. 発表標題 脂質アルデヒド代謝におけるファンconi貧血タンパク質の機能解析
3. 学会等名 日本環境変異原学会第46回大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

所属研究室 (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) のウェブサイト http://www.research.kobe-u.ac.jp/brce-sugasawa/index.html

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考