

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790234

研究課題名（和文） BRCA1 関連遺伝子 FA-J 欠損による大規模ゲノム欠失の分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanism of large genome deletion induced by
Disrupting BRCA1-related gene, FA-J.

研究代表者

北尾 洋之（KITAO HIROYUKI）

九州大学・医学研究院・寄附講座教員

研究者番号：30368617

研究成果の概要：

ファンコニ貧血（Fanconi Anemia, FA）はまれな小児遺伝性疾患で、骨髄不全、骨格異常、高発がん性が主な臨床症状である。平成 17 年、新たな FA 原因遺伝子として同定された FA-J は、以前に家族性乳がん原因遺伝子 BRCA1 と会合する DNA ヘリケースとして同定された BACH1 と同一であることが判明し、家族性乳がん発症と FA 経路との関連が示唆された。申請者は、ニワトリ DT40 細胞 FA-J 破壊株を解析していたところ、免疫グロブリン重鎖（Immunoglobulin Heavy chain; IgH）遺伝子座可変領域の VDJ 組換えを完了した転写活性アリルが特異的に高頻度で染色体上から欠失を起こすことを見出し、平成 19 年度より本助成金を受け研究を開始した。平成 19 年度は、まず FA-J 破壊株で見られる IgH 遺伝子座欠失が IgH 遺伝子座領域とその周辺に限局したものであることを FISH 法などで明らかにした。平成 20 年に入り、FA-J に DNA 上の G quadruplex という 2 次構造を解消する活性があることが報告された。IgH 遺伝子座は G quadruplex を作りやすい配列を多く含んでおり、FA-J 欠損のためうまく解消されずに残ったゲノム上の 2 次構造により上記表現型が現れると予想された。実際、FA-J 欠損細胞は、G quadruplex を安定化する化合物 TMPyP4 に対して感受性を示した。FA-J と G quadruplex との関連があることを支持する結果と考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：ファンコニ貧血、FANCI、ゲノム不安定性、家族性乳癌、BRCA1

1. 研究開始当初の背景

ファンコニ貧血（Fanconi Anemia, FA）はまれな小児遺伝性疾患で、骨髄不全、骨格異常、

高発がん性が主な臨床症状である。細胞レベルでは、マイトマイシン C（MMC）やシスプラチンなどの DNA 架橋剤にきわめて高感

受性で、MMC 処理後多数の染色体断裂を認めることが特徴的である。2009 年現在、13 の相補群が知られており、その全ての原因遺伝子が同定されている。これらの遺伝子群は細胞内で1つの共通した生化学経路で機能していることが想定されており、その経路はファンコ貧血経路 (FA 経路) と呼ばれている。FA 経路活性化の指標として原因遺伝子の1つである FA-D2 のモノユビキチン化がある。この現象は核内で8つの FA 原因遺伝子により形成される FA コア複合体の存在に依存し、どの遺伝子が欠損しても FA-D2 のモノユビキチン化が阻害される。FA-D2 のモノユビキチン化は DNA 架橋剤耐性に必須であることが知られており、FA 遺伝子欠損による DNA 架橋剤高感受性の分子基盤となっている。

本研究課題申請の前年の 2005 年に新たな FA 原因遺伝子として FA-J が同定された (Levran et al. Nat Genet 37: 931-933 (2005) など)。驚くべきことに、FA-J は以前に家族性乳がん原因遺伝子 BRCA1 と会合する DNA ヘリケースとして同定された BACH1 (BRCA1-Associating C-terminal Helicase) と同一であった (Cantor et al. Cell 105: 149-160 (2001))。FA-J 欠損細胞では FA-D2 のモノユビキチン化は阻害されないが、DNA 架橋剤に対して高感受性を示す (Bridge et al., Nat Genet 37: 953-957)。FA-J が DNA 修復において FA 経路の制御を受けている新たな因子であることが示唆されていたが、その具体的な分子作用機序は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

FA-J のゲノム安定性を維持するための細胞内での機能を、分子レベルで明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

ニワトリ DT40 を用いて、FA-J 遺伝子ノックアウトした細胞を作製し、遺伝学的に FA-J 遺伝子の細胞内での機能について解析を行う。

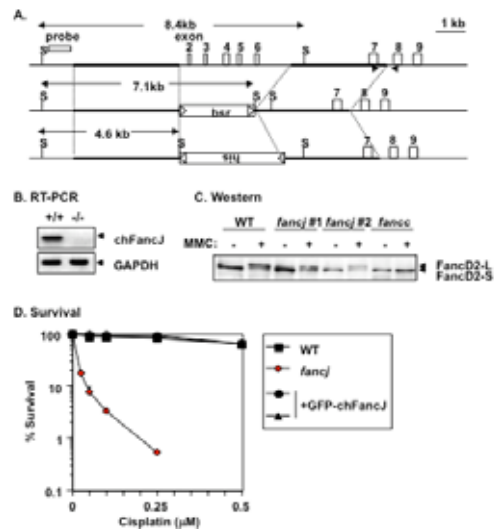
4. 研究成果

(1) FA-J 遺伝子ノックアウト細胞では、散発的に IgH 遺伝子座におけるゲノム欠失が起こることを明らかにした。

我々は、ニワトリ DT40 細胞を用いて、FA-J 遺伝子破壊株 (*fancj*) を作製した (図 1)。我々が作製した FA-J 遺伝子破壊株は、タンパクの開始コドンに薬剤マーカーで置換しているため、null 変異体であると考えられる (図 1A,B)。 *fancj* では、マイトマイシン C (MMC) による FA-D2 のモノユビキチン化は正常に誘導されたが (図 1C)、シスプラチンに対して高い感受性を示した (図 1D)。我々が独自に作製した *fancj* も既報で報告された *fancj* と同様の表現型を示すことが明らか

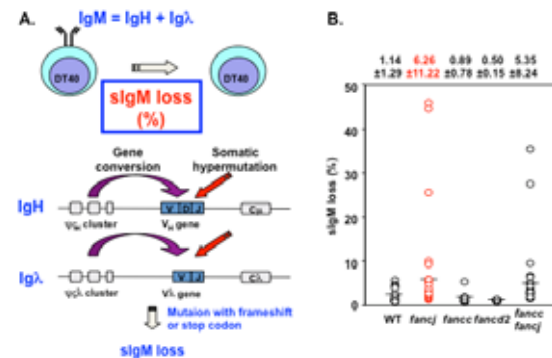
になった。

図 1



DT40 細胞は成熟 B リンパ腫由来の細胞株で、細胞表面に抗体分子 IgM (surface IgM, sIgM) を発現しており、その可変部はゲノム上の免疫グロブリン遺伝子 (Ig) 座での塩基配列の変化によって、常時変化している (図 2A)。その結果、野生型 DT40 細胞を 3 ~ 4 週間継続培養を行うと、平均 1% 前後 sIgM 発現を失う細胞群が現れる。我々は、独自に作製した *fancj* を 3 ~ 4 週間継続培養を行い、その sIgM 発現喪失の頻度を計測したところ、約 5 倍上昇することを見出した (図 2B)。他の相補群の欠損細胞 (*fance*, *fancd2*) ではそのような表現型は現れなかったことから、この表現型は *fancj* に特異的なものであることが示唆された。

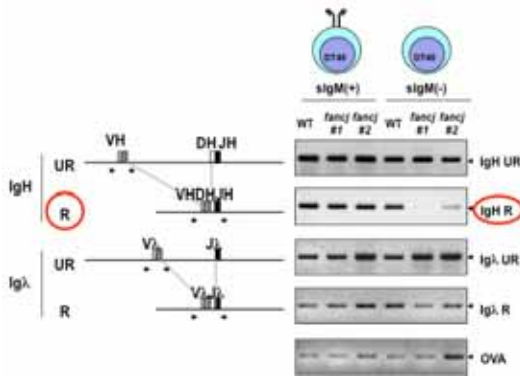
図 2



次に、*fancj* において高頻度で sIgM 発現喪失が起こる原因について検証するために、sIgM 発現を喪失した細胞を集め、そのゲノムを抽出し、Ig 鎖可変部の塩基配列を決定し、培養開始時のものと比較を行った。*fancj* において変異導入効率が亢進しているの

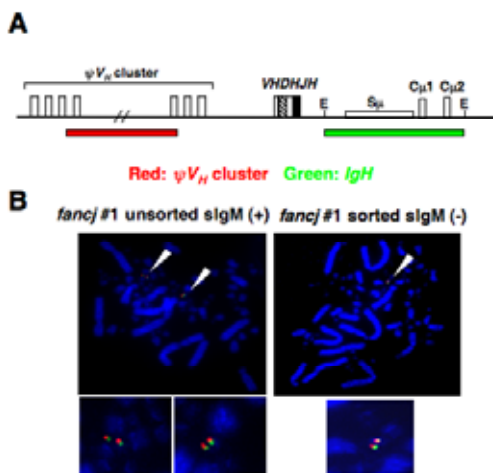
はないかとの予想と反し、特に変異導入効率が亢進しているという結果は得られなかった(図示さず)。次に IgH 鎖、Ig 鎖遺伝子座可変領域(組換え完了(R)アリルと組換え未完了(UR)アリル)について、ゲノム PCR により増幅を試みた。すると、驚いたことに IgH R アリルのみが顕著に増幅されにくいことが明らかになった(図3)。このことは、*fancj* の sIgM 発現喪失した細胞では、IgH R アリルのみが特異的にゲノム上から欠失している可能性を示すものと考えられたので、さらに検討を加えた。

図3



次に、IgH 遺伝子座のプロープ(図4Aに示す)を用いた FISH 解析を行った。sIgM 発現喪失した *fancj* 細胞では2つあるはずのシグナルが1つになっていることを確認した(図4B)。また、IgH 鎖、Ig 鎖の遺伝子発現を RT-PCR により調べたところ、確かに IgH 鎖遺伝子の発現が特異的に抑制されていた(図示さず)。これらの結果から、*fancj* においては、通常培養によって、ゲノム上での IgH R アリル欠失、IgH mRNA 発現喪失、sIgM 発現喪失が野生型に比して高い頻度で起こることが明らかになった。

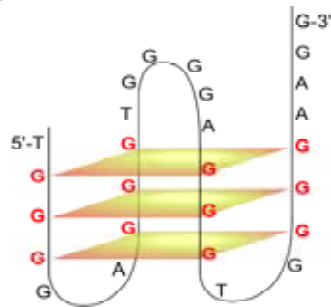
図4



(2) *fancj* におけるゲノム上からの IgH 鎖遺伝子座欠失の原因の究明

では、なぜ IgH 鎖遺伝子座 R アリルのみが特異的にゲノム上から欠失するのであろうか。この疑問について考える上で、ヒントとなる知見が線虫の FA-J ホモログ変異体の解析から得られていた(Cheung et al., *Nature Genetics* 31: 405-409 (2002))。この変異体は *dog-1* (deletion of guanine-rich sequences) と呼ばれていて、線虫の発生過程でグアニンが連続している配列特異的に欠失が生じ、その結果、さまざまな組織に発生異常が生じることで知られている。昨年、欠失が生じる領域の全ゲノムレベルでの詳細な解析結果が報告され、グアニンが連続した配列が1本鎖となった場合に形成されやすい G quadruplex 構造(図5)がゲノム不安定性の原因となっていることが示された(Kruisselbrink et al., *Curr Biol* 18: 900-905 (2008))。また、ヒト FA-J タンパクに G quadruplex 構造を解消する活性があることも報告され(Wu et al., *Mol Cell Biol* 28: 4116-4128)。FA-J が複製時にゲノム上に散発的に生じる G quadruplex 構造を解消することで、ゲノム不安定性を回避していることが予想された。

図5



そこで、我々は、ニワトリ IgH 鎖遺伝子座のゲノム配列について検討しようと試みたが、データベースにこの領域の全ゲノム配列は登録されていなかった。1989年に Weill のグループよりニワトリ IgH 鎖遺伝子座の構造が報告されているが、その中で、この領域を含む DNA 断片は非常に不安定でクローニングが困難であることが記載されていた(Reynaud et al., *Cell* 59: 171-183)。おそらく、クローニングや塩基配列決定が困難な領域が多く含まれていることが原因で、解析できずに残った領域であろうと予想された。

そこで我々は、入手できる IgH 鎖、Ig 鎖遺伝子座の偽 V 遺伝子、V 遺伝子の断片的な塩基配列情報を用いて、Quadfinder (<http://miracle.igib.res.in/quadfinder/>) という解析ソフトにより、G quadruplex を形

成する領域を検索した。その結果、IgH 鎖の *VH1* 遺伝子のリーダーイントロン領域に非常に高密度に G quadruplex 形成配列が存在することが判明した(図 6)。現時点でこの配列と *fancj* での表現型 (IgH R アリル特異的な欠失) との因果関係は明らかではないが、ニワトリにおいても FA-J が複製過程でゲノム上に散発的に発生する G quadruplex 構造を解消することで、ゲノム安定性を保持するという機構が働いていることを示唆する結果と考えている。

図 5

```

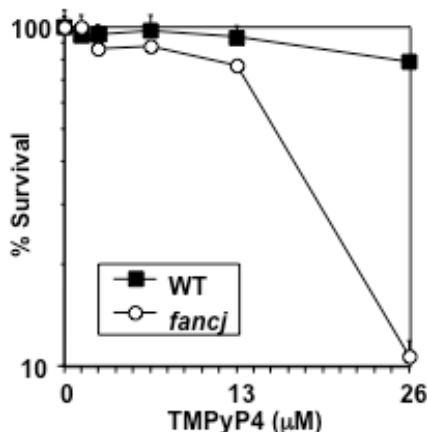
ACGCGCTAACGAAGCCGGAGCCCTCCTTATGCAAATTAGCCCTCCAGAGGGCCATAAA
ACGCGCCGGCTCTCCGACGGAGGACCACCACTCGGCTCCGCAACC ATG AGC CCA CTC
GTC TCC TCC CTC CTG CTC CTG GCC GCC CTG CCA G/ GTGAGGGCGCTGTGG
GGCTCTATGGGGCTCTATGGGGTCTCAGCGGGGCTCTGCGGGCTCAATGGGGCCAAAG
GGGGGGTCTGGGGCTCTATGGGGGGTCAACGGGGGGTCTACGGGGGCGGGCTCCG
CGAGCCGCTGTGGGGGGCTCCGTCAGCGCTCTCTGTCTTCCCCACAG/ GG_
CTG ATG GCG GCC GTG ACG TFG GAC GAG TCC GGG GGC GGC CTC CAG ACG
CCC GGA AGA GCG CTC AGC CTC GTC TGC AAG GCC TCC GGG TTC ACC TTC
AGC AGT TAC AAC ATG GGT TGG GTG CGA CAG GCG CCC GGC AAG GGG CTG
GAG TTC GTC GCT GGT ATT GAC AAC ACT GGT AGA TAC ACA GGC TAC GGG
TCG GCG GTG AAG GGC CGT GCC ACC ATC TCG AGG GAC AAC GGG CAG AGC
ACA GTG AGG CTG CAG CTG AAC AAC CTC AGG GCT GAG GAC ACC GGC ACC
TAC TAC TGC GCC AAA GCT GCT GGT CACGGTGACCCGATCCCCAGCACGGGTGGC
ACAAAACCCACCGTTGCAACCCAAAGCGGGTAA

```

(3) *fancj* は G quadruplex 安定化剤 TMPyP4 に対して感受性を示す。

TMPyP4 は、G quadruplex 構造に特異的に結合する化合物である (Mergny and Helene *Nat Med* 4:1366-7 (1998))。我々は、*fancj* のこの化合物に対する感受性について検討を加えるため、0~26 μ M の濃度で感受性試験を行った。その結果、*fancj* は、野生型と比べ、特に高濃度で高い感受性を示した(図 6)。*fancj* において特に G quadruplex 構造解消能に問題があり、その結果、G quadruplex 安定化剤に対して感受性を示すのではないかと考えている。

図 6



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9件)

松下暢子、北尾洋之、石合正道、高田穰
ファンconi貧血とDNA損傷応答ネットワーク、*蛋白質核酸酵素* 54:580-585 (2009)
査読有り

Ishiai M, Kitao H, Smogorzewska A, Tomida J, Kinomura A, Uchida E, Saberi A, Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T, Tashiro S, Elledge SJ, Takata M. FANCI phosphorylation functions as a molecular switch to turn on the Fanconi anemia pathway. *Nature Structural and Molecular Biology* 15: 1138-1146 (2008)
査読有り

北尾洋之、藤中良彦、久保信英、中ノ子智徳、吉永敬士、徳永えり子、佐伯浩司、遠藤和也、森田勝、掛地吉弘、前原喜彦
ファンconi貧血とゲノム不安定性 *福岡医学雑誌* 99: 115-122 (2008) 査読有り

Kitao H, Kimura M, Yamamoto K, Seo H, Namikoshi K, Agata Y, Ohta K, Takata M. Regulation of histone H4 acetylation by transcription factor E2A in Ig gene conversion. *International Immunology* 20: 277-284. 2008.

Uchida A, Hirano S, Kitao H, Ogino A, Rai K, Toyooka S, Takigawa N, Tabata M, Takata M, Kiura K, Tanimoto M. Activation of downstream epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling provides gefitinib-resistance in cells carrying EGFR mutation. *Cancer Science* 98: 357-363 (2008) 査読有り

Seki S, Ohzeki M, Uchida A, Hirano S, Matsushita N, Kitao H, Oda T, Yamashita T, Kashiwara N, Tsubahara A, Takata M, Ishiai M. A requirement of FancL and FancD2 monoubiquitination in DNA repair. *Genes to Cells* 12: 299-310 (2007) 査読有り

Ogino A, Kitao H, Hirano S, Uchida A, Ishiai M, Kozuki T, Takigawa N, Takata M, Kiura K, Tanimoto M. Emergence of epidermal growth factor receptor T790M mutation during chronic exposure to gefitinib in a non small cell lung cancer cell line. *Cancer Research* 67: 7807-7814 (2007) 査読有り

Takata M, Kitao H, Ishiai M. Fanconi Anemia: genetic analysis of a human disease using chicken system. *Cytogenetic and Genome Research* 117:

346-351 (2007) 査読有り

北尾洋之、高田穰 ファンコニ貧血の分子機構 最新医学 62 : 112-117 (2007) 査読有り

[学会発表](計 10 件)

Kitao H, Nanda I, Kakeji Y, Maehara Y, Takata M. Genomic instability phenotypes induced by loss of FancJ/Brip1 function. American Association for Cancer Research 100th Annual Meeting 平成 21 年 4 月 19 日 Colorado Convention Center, Denver, CO.

北尾洋之、Indrajit Nanda、木野村愛子、山添光芳、Michael Schmid、武田俊一、吉永敬士、前原喜彦、高田穰 FancJ/Brip1 へリカーゼ欠損により生じるゲノム不安定性表現型。第 67 回日本癌学会学術総会 平成 20 年 10 月 28 日 名古屋国際会議場 佐伯浩司、北尾洋之、江見泰徳、森田勝、掛地吉弘、前原喜彦、Maria Jasin. BRC motif-RPA 融合蛋白は BRCA2 欠損細胞の相同組換え修復異常を相補する。第 67 回日本癌学会学術総会 平成 20 年 10 月 28 日 名古屋国際会議場

石合正道、北尾洋之、高田穰。ユビキチン化とリン酸化によるファンコニ貧血経路の制御機構。第 67 回日本癌学会学術総会 平成 20 年 10 月 29 日 名古屋国際会議場

Kitao H, Nanda I, Kinomura A, Schmid M, Takata M. Frequent loss of the Immunoglobulin heavy chain gene occurs in FANCI-deficient DT40 cell line. Ataxia-Telangiectasia Workshop 2008 平成 20 年 4 月 25 日 大津プリンスホテル

Takata M, Kitao H, Kinomura A, Ishiai M. Regulation of DNA crosslink repair through monoubiquitination mediated by the Fanconi anemia core complex. 第 66 回日本癌学会学術総会 平成 19 年 10 月 3 日 パシフィコ横浜

Kitao H, Kinomura A, Kimura M, Ishiai M, Takata M. FancJ/BRIP1 helicase-deficient cells display huge loss of rearranged IgH locus. 第 66 回日本癌学会学術総会 平成 19 年 10 月 5 日 パシフィ

コ横浜

Ogino A, Kitao H, Uchida A, Ishiai M, Takigawa N, Takata M, Kiura K, Tanimoto M. Emergence of EGFR T790M mutation during chronic exposure to gefitinib in a non-small cell lung cancer cell line. 第 66 回日本癌学会学術総会 平成 19 年 10 月 5 日 パシフィコ横浜

Kitao H, Nanda I, Kinomura A, Schmid M, Takata M. Frequent loss of the Immunoglobulin Heavy Chain Gene Occurs in FANCI-deficient DT40 cell line. 19th Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium. 平成 19 年 10 月 10 日 The Westin Michigan Avenue, Chicago, IL

Takata M, Kitao H, Kinomura A, Smogorzewska A, Elledge SJ, Ishiai M. Role of FANCI protein and its phosphorylation for the Fanconi anemia pathway function. 19th Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium. 平成 19 年 10 月 10 日 The Westin Michigan Avenue, Chicago, IL.

[その他]

ホームページ等

<http://www.kyudai2geka.com/contents/group/page11.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北尾 洋之 (HIROYUKI KITAO)

九州大学医学研究院・がん分子病態学講座
研究者番号：

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：