

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590345

研究課題名（和文） ファンconi貧血の発症を制御する遺伝子群の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of Fanconi anemia gene

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

研究成果の概要（和文）：我々はこれまでファンconi貧血原因遺伝子群の解析を行ってきたが、そのうち特に FANCD2 の機能に着目し解析を行ってきた。FANCD2 は DNA 損傷後においてクロマチン上に移行し DNA 損傷修復反応に機能することが明らかになってきたが、その他の機能として、モノユビキチン化依存的に TNF- $\alpha$  のプロモーター領域の NF- $\kappa$ B 結合部位に結合してその転写活性を抑制することがわかった。さらに FANCD2 欠損患者細胞では TNF- $\alpha$  の転写活性が亢進していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We performed a functional analysis of Fanconi anemia gene FANCD2. Previously studies reported that FANCD2 functions in DNA repair. However, we found that FANCD2 also involves in transcriptional regulation of TNF- $\alpha$  gene through binding to its promoter region, which resulted in enhanced TNF- $\alpha$  mRNA level in FANCD2 deficient cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子病態学

## 1. 研究開始当初の背景

ファンconi貧血 (FA) 原因遺伝子は研究開始当初において 13 種類同定されていた。その産物 (FA 蛋白質) は共通の経路で働き、8 個の FA 蛋白質が複合体を形成し、この経路の中心因子である FANCD2 とその結合蛋白質 FANCI をモノユビキチン化する。モノユビキチン化された FANCD2 と FANCI はクロマチン上へ移行し、相同組み換えによる DNA 損傷修復経路で機能することがわかっていた。さら

に乳がん原因遺伝子として報告されていた BRCA2 遺伝子が、FA 細胞において変異がみられており、FA 原因遺伝子の一つである FANCD1 であることが報告された。BRCA2 遺伝子は、これまでに DNA 損傷修復反応に機能することがわかっていたが、同様に細胞周期のコントロールにも深く関与していることも報告されていた。

このように、DNA 損傷後に機能する修復関連蛋白質がファンconi貧血蛋白質群と機能

することが発見されており、DNA 損傷後において、これらの修復蛋白質が局所的に集積し、修復センターの形成をおこなっていることから、この領域における修復蛋白質の時間的、空間的な相互関係についても報告されていた。これらのことより、ファンconi貧血蛋白質群のそれぞれの機能の解析を行うことによって、これまで解明されていなかった DNA 損傷ネットワークの存在を明らかになる可能性が示唆されていた。

## 2. 研究の目的

DNA 損傷後において修復蛋白質は集積し、おそらく DNA を含んだ超複合体を形成しフォーカスをつくるが、修復反応後における修復蛋白質の不活性化と、フォーカスの消退を制御するメカニズムも細胞の生死に重要であると考えられる。そのため、siRNA library を GFP-FANCD2 発現細胞株に導入し、フォーカスの形成と消退を制御する遺伝子の検索を行う。研究開始時において、遺伝子の発現を siRNA によって抑制すると、DNA 損傷後において FANCD2 はフォーカスを形成するが、その後のフォーカスの解離が認められない複数の遺伝子を同定していた。そのため、これらの遺伝子の機能解析を行うことによって、その遺伝子産物がファンconi貧血蛋白質群とともに、どのように DNA 損傷修復反応を制御しているのか、あるいはこれらの遺伝子産物がどのようにして DNA 損傷修復後のチェックポイントリカバリーに機能するのかを明らかにすることを旨とする。

さらに FANCD2 蛋白質においては、クロマチン上において報告されている相同組み換えによる DNA 損傷修復反応だけではなく、新たなクロマチン上での機能の解明を目指す。さらに、これらの結果よりファンconi貧血における貧血症状や発癌の発症のメカニズムの解明の手がかりを得ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) DNA 損傷修復反応において、修復関連蛋白質の修復部位への集積と修復反応後における解離、さらに修復反応にとどまらず、そのほかの pathway への新たなネットワーク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発見する。その手法には、すでに作製している FANCD2 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、GFP-FANCD2 の損傷部位への集積は認められるが、その解離が認められない標的遺伝子を同定する。研究開始時においてすでに複数の遺伝子が同定されており、さらにスクリーニングのスケールを広げる。

(2) ファンconi貧血患者においては患者血清中の TNF- $\alpha$  産生量の増加が認められており、さらに FANCC 欠損マウス細胞では TNF- $\alpha$  刺激によって腫瘍化が促進されることが報告されていることより、ファンconi貧血蛋白質が炎症反応に機能しており、さらにファンconi貧血の発症には炎症反応の異常が関与していることが示唆されている。このことより、ファンconi貧血蛋白質による炎症反応関連転写因子である NF- $\kappa$ B の転写活性や TNF- $\alpha$  産生の制御機構のメカニズムの解析を行う。さらにそれらの結果によって、既に報告されているクロマチン上における DNA 損傷修復反応以外の FANCD2 をはじめとするファンconi貧血蛋白質群の新たな機能の探索を行う。

## 4. 研究成果

(1) GFP-FANCD2 を発現させた細胞株を作製し、siRNA ライブラリーを用いて GFP-FANCD2 の集積やその後に見られる解離において機能している遺伝子の同定を行った。

DNA 損傷直後においては、損傷修復反応と細胞周期、DNA 損傷応答反応、クロマチンリモデリングのネットワークの存在が報告されている。これらの反応は、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、損傷修復の後期においても、これらの可逆的な修飾反応が存在することが考えられる。そのため、まず脱ユビキチン化酵素、あるいは脱リン酸化酵素 siRNA ライブラリーを用いてこの反応に関与する新規遺伝子の同定を行った。

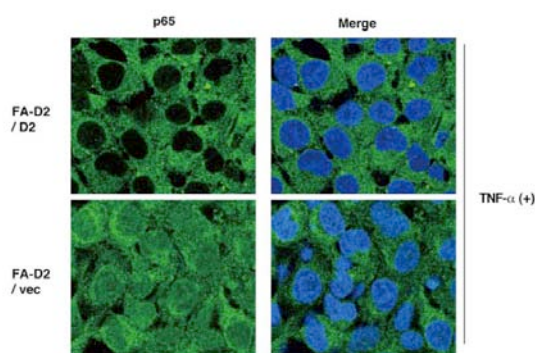
その結果、遺伝子の発現を siRNA によって抑制すると、DNA 損傷後において FANCD2 はフォーカスを形成するが、その後のフォーカスの解離が認められない複数の遺伝子を同定した。さらにこれらの遺伝子の発現を抑制すると、MMC やシスプラチンなどの DNA 架橋剤に対して強い感受性が認められることを明らかにした。また、このときに、核異型が著明で、巨核・多核の細胞の割合の増加も同時に認められた。また、これらの遺伝子産物においては FANCD2 と結合することを明らかにした。

(2) ファンconi貧血患者の血清中において TNF- $\alpha$  産生量の増加が認められることが既に報告されていることより、ファンconi貧血遺伝子欠損患者細胞においても同様な結果が認められるのではないかと検討を行ったところ、FANCD2 欠損患者繊維芽細胞において、FANCD2 発現細胞と比較して TNF- $\alpha$  の mRNA 量の増加が認められた。

さらに、TNF- $\alpha$  刺激によって NF- $\kappa$ B 転写活性を FANCD2 欠損細胞と FANCD2 発現細胞と比較したところ、明らかに FANCD2 欠損細胞においてその転写活性が亢進していること

がわかった。さらにその他のファンconi貧血蛋白質である FANCD2 欠損繊維芽細胞においても検討したところ、同様に TNF- $\alpha$  刺激によって NF- $\kappa$ B 転写活性が発現細胞と比較して亢進していることがわかった。

次に FANCD2 欠損細胞においては、TNF- $\alpha$  刺激後の NF- $\kappa$ B 蛋白質(p65)の核内移行を検討したところ、持続的に亢進していることがわかった。FANCD2 発現細胞においては刺激直後に p65 の核内移行が認められるが、刺激後 4 時間においては p65 の核内移行がほとんど認められなくなり、刺激前と同様になった。しかしながら、FANCD2 欠損患者細胞においては、刺激直後から続いて、p65 の核内移行が継続してみられており、下図のように、刺激後 24 時間後においても核内移行がみられることがわかった。



(3) FANCD2 を強発現することによって、TNF- $\alpha$  刺激による NF- $\kappa$ B 転写活性が抑制されることがわかった。しかしながら、FANCD2 と同様にその欠損細胞において TNF- $\alpha$  刺激によって NF- $\kappa$ B 転写活性が亢進する FANCC やその他のファンconi貧血蛋白質である FANCI においては、強発現することによっても NF- $\kappa$ B 転写活性を抑制することができなかった。

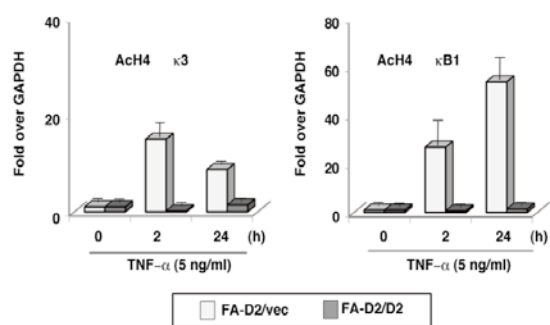
また FANCD2 欠損細胞においては TNF- $\alpha$  のプロモーター活性をルシフェラーゼアッセイ法によって検討したところ、FANCD2 産生細胞と比較して亢進しており、そのために FANCD2 欠損患者細胞において、TNF- $\alpha$  の mRNA 量における増加が認められることを明らかにした。

(4) ゲルシフトアッセイによって、FANCD2 が TNF- $\alpha$  のプロモーター領域の NF- $\kappa$ B 蛋白質結合部位に結合することを明らかにした。さらにその結合部位の配列に変異を加えた配列においては FANCD2 の結合が認められなかったことより、FANCD2 は配列特異的に TNF- $\alpha$  のプロモーター領域に結合することがわかった。

さらに、この結合によってプロモーターの活性を抑制することを明らかにした。さらにモノユビキチン化依存的に FANCD2 が TNF- $\alpha$

のプロモーター領域に移行することをゲノムクロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイによってわかった。

次に FANCD2 欠損患者細胞において、TNF- $\alpha$  の転写の活性化レベルをプロモーター領域の NF- $\kappa$ B 認識部位におけるヒストン H4 のアセチル化を指標として CHIP アッセイを用いた分析をおこなって検討した。その結果、下図に示すように FANCD2 欠損患者細胞においては、TNF- $\alpha$  刺激後において、ヒストン H4 のアセチル化レベルの明らかな亢進が認められた。



そのため FANCD2 欠損細胞においては、プロモーター活性が亢進することによって、TNF- $\alpha$  の転写活性が亢進していることを示唆する事ができた。

これらの結果より、FANCD2 はモノユビキチン化されクロマチン上に移行した後、DNA 損傷修復反応に機能するだけではなく、TNF- $\alpha$  のプロモーター領域に結合してその転写活性を抑制することを明らかにした。さらに、ファンconi貧血患者にみられる血清中の TNF- $\alpha$  産生量の増加のメカニズムの一端を明らかにすることができた。

## 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 4 件)

- ①. Matsushita, N., Endo, Y., Sato, K., Kurumizaka, H., Yamashita, T., Takata, M., and Yanagi, S.  
Direct Inhibitor of TNF- $\alpha$  promoter activity by Fanconi anemia.  
*PLoS ONE* 6(8): e23324 (2011)  
DOI:10.1371/journal.pone.0023324  
査読有
- ②. Matsushita, N., Yonashiro, R., Ogata, Y., Sugiura, A., Nagashima, S., Fukuda, T., Inatome, R., and Yanagi, S.

Distinct regulation of mitochondrial localization and stability of two human Sirt5 isoforms.

*Genes Cells* 16(2), 190-202 (2011)  
DOI:10.1111/j.1365-2443.2010.01475.  
査読有

- ③. Sugiura, A., Yonashiro, R., Fukuda, T., Matsushita, N., Nagashima, S., Inatome, R., and Yanagi, S.

A mitochondrial ubiquitin ligase MITOL controls cell toxicity of polyglutamine-expanded protein.

*Mitochondrion* 11(1), 139-146 (2011)  
DOI: 10.1016/j.mito.2010.09.001

査読有

- ④. Yonashiro, R., Sugiura, A., Miyachi, M., Fukuda, T., Matsushita, N., Inatome, R., Ogata, Y., Suzuki, T., Dohmae, N., and Yanagi, S.

Mitochondrial ubiquitin ligase MITOL ubiquitinates mutant SOD1 and attenuates mutant SOD1-induced ROS generation.

*Mol. Biol. Cell* 20(21), 4524-4530 (2009)

DOI: 10.1091/mbc.E09-02-0112

査読有

[学会発表] (計5件)

- ①. 君嶋悠矢、杉浦 歩、長谷川江里香、渡辺香林、遠藤雄二郎、松下暢子、與那城亮、柳 茂

ミトコンドリアユビキチンリガーゼ MITOL によるミトコンドリアダイナミクスの制御

第 32 回日本分子生物学会年会. 2009, 12/10, 横浜

- ②. 遠藤雄二郎、松下暢子、菊間啓太、太田莉英子、稲留涼子、柳 茂

ファンconi貧血経路 (FA 経路) の解析  
Analysis of the Fanconi anemia pathway.

BMB 2010 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会. 2010, 12/8, 神戸

- ③. 太田莉英子、松下暢子、罇龍介、徳山剛士、稲留涼子、柳茂 TAX1BP1 欠損 DT40 細胞の機能解析 ～NF- $\kappa$ B 転写活性亢進が細胞に与える影響の検討～  
Functional Analysis of TAX1BP1 deficient cells.

第 34 回日本分子生物学会年会. 2011,

12/14, 横浜

- ④. 松下暢子、菊間啓太、太田莉英子、罇龍介、徳山剛士、高田穰、胡桃坂仁志、山下孝之、稲留涼子、柳茂 ファンconi貧血蛋白 FANCD2 による NF-kappaB 転写制御機構の解析 FANCD2 regulates NF-kappaB transcriptional activity.  
第 34 回日本分子生物学会年会. 2011, 12/15, 横浜

- ⑤. 菊間啓太、松下暢子、志村卓哉、川口浩平、吉田有里、加藤翔太、稲留涼子、柳茂 Analysis of the Fanconi Anemia pathway.

第 34 回日本分子生物学会年会. 2011, 12/15, 横浜

## 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：30333222

### (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