

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26281021

研究課題名(和文)RINGフィンガードメインを持つ新規ファンconi貧血原因遺伝子産物の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of the novel RING-finger domain containing Fanconi anemia protein

研究代表者

石合 正道 (Ishiai, Masamichi)

京都大学・放射線生物研究センター・准教授

研究者番号：90298844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：ファンconi貧血(FA)は、再生不良性貧血、高発がん性などの臨床症状を特徴とする稀な遺伝性疾患であり、ゲノム不安定性症候群に分類され、DNAクロスリンク(ICL)修復に欠損を示す。

FAの新規原因遺伝子RFWD3/FANCWの欠損細胞の解析から、相同組換え(HR)の中心分子RPA、RAD51が、RFWD3によりポリユビキチン化されることをみいだした。詳細な解析により、RFWD3によるポリユビキチン化によりRPAとRAD51が適切なタイミングでDNA損傷部位から除去されることがHRの後期反応の進行に必要という、HRの新たな制御メカニズムを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Fanconi anemia (FA) is a hereditary disorder defective in DNA interstrand crosslinks (ICL) and characterized by developmental anomalies, progressive bone marrow failure, leukemia, and solid tumors.

RFWD3 is a recently identified FA protein FANCW whose ubiquitin E3 ligase activity toward RPA is essential in homologous recombination (HR) repair. However, how RPA ubiquitination promotes HR remained unknown. We identified RAD51, the central HR protein, as another target of RFWD3. We show that RFWD3 polyubiquitinates both RPA and RAD51, in vitro and in vivo. From further analysis, our data reveal a mechanism that facilitates timely removal of RPA and RAD51 from DNA damage sites, which is crucial for progression to the late-phase HR.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA修復 ユビキチン ファンconi貧血 相同組換え RPA RAD51 RFWD3 FANCW

1. 研究開始当初の背景

ファンコニ貧血 (FA) はゲノム不安定症候群に分類され、骨格形成異常、再生不良性貧血、高発がん性などの臨床症状を特徴とする稀な遺伝性疾患である。患者由来の細胞はマイトマイシン C (MMC) やシスプラチンなどの DNA クロスリンク (ICL) 薬剤に対して高感受性であり、試験管内で FA 経路分子が実際に ICL 損傷を修復する活性を持つことが示されている。

共同研究先のドイツ Wurzburg 大学 Schindler 研究室で、FA の新規原因遺伝子 FANCW として RFWD3 が同定された (論文)。RFWD3 にはユビキチン E3 リガーゼ活性を担う RING フィンガードドメインが存在する。また、DNA 損傷応答キナーゼである ATM, ATR の基質として同定されており、ATM, ATR のリン酸化標的配列である S/TQ 配列を多く含む。加えて、C 末端側には、タンパク質-タンパク質相互作用に寄与する WD40 リピートがある。RFWD3 は RPA 複合体と相互作用するなどの先行研究が散見されたが、RFWD3 と FA 経路の関連性を検討する詳細な解析は、本研究課題の開始まで行われていない。

RFWD3 と FA 経路との関連を直接的に検討するため、我々はトリ DT40 細胞由来の RFWD3 ノックアウト細胞を樹立した。樹立した欠損細胞は増殖速度の遅延がみられ、さらに、FA の最大の特徴である ICL 薬剤への高感受性が見られた。また、DNA 修復、中でも相同組換え (homologous recombination: HR) 活性の指標の 1 つとなるジーンターゲティング効率が著減することを予備実験で確認した。

2. 研究の目的

本研究課題では

- (1) RFWD3 欠損細胞の表現型解析
- (2) RFWD3 のユビキチン化基質の同定
- (3) RFWD3 によりユビキチン化を受ける標的分子の解析

などを通じ、DNA 損傷応答・DNA 修復における RFWD3 の新規機能を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) RFWD3 欠損 DT40 細胞の表現型解析

作製したトリ DT40 由来の RFWD3 欠損細胞を用い、他の FA 欠損 DT40 細胞の機能解析で用いた実験系を参考に RFWD3 の表現型解析を行った。具体的には、コロニー形成法による感受性テスト、I-SceI アッセイ、核内フォーカス形成の検討などである。I-SceI アッセイは、ゲノム上に I-SceI 制限酵素の切断部位を導入した DT40 細胞を用い (DT40 ゲノムには I-SceI 切断部位は存在しない)、I-SceI タンパク質の発現により、人為的に DNA 二重鎖切断 (double strand breaks: DSB) を導入し、その DNA 修復効率を検討する方法である。核内フォーカスは、抗体による免疫染色、あるいはタグ付きの cDNA の発現により行った。生化学的なクロマチン分画法は確立してお

り、その方法に従った。

- (2) RFWD3 の相互作用分子探索

酵母ツーハイブリッド (y2h) 法は、トリ RFWD3 をベイトとし、トリ DT40 細胞の cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。哺乳類ツーハイブリッド (m2h) 法では、ヒト RFWD3 をベイトに、すでに作製してあるヒト HR 関連分子群との相互作用を検討した。得られた候補分子群は、cDNA をヒト 293T 細胞に形質導入し、タンパク質を発現させ、免疫沈降-ウエスタン法で相互作用を検討した。

- (3) RFWD3 欠損ヒト HAP1 細胞の作製とユビキチン化標的分子の解析

CRISPR/Cas9 法により、ヒト HAP1 で RFWD3 ノックアウト細胞を作製した (Horizon genomics 社)。欠損細胞の解析は、DT40 細胞の解析に準拠して行った。細胞内でのユビキチン化は、タグ付きの cDNA を発現させ、タグに対するプルダウン-ウエスタン法で行った。精製タンパク質によるユビキチン化反応は、早稲田大学・胡桃坂研究室で行った。

4. 研究成果

- (1) 作製した RFWD3 欠損トリ DT40 細胞を用い、以下の一連の実験で、RFWD3 が新規 FA 原因遺伝子であることを確定した。

はじめに、様々な DNA ダメージに対する感受性をテストした。欠損細胞は ICL 薬剤である MMC、シスプラチンに高感受性を示し、他にも抗がん剤であるカンプトテシン、紫外線に感受性が見られたが、放射線には顕著な感受性は認められなかった。

次に RFWD3 欠損 DT40 細胞を用い、HR 活性の指標となるジーンターゲティング効率を調べた。OVA と KU70 の 2 つの遺伝子座で検討し、どちらも効率が著しく減少していた。つまり、RFWD3 の HR 反応への寄与が強く示唆された。

このため、HR 活性に相関する別の方法である染色体断裂を検討した。RFWD3 欠損細胞では、染色体断裂頻度の著しい上昇が見られ、FA の代表的な FANCD2 欠損細胞とほぼ同程度の機能欠損の表現型を示した。野生型トリ RFWD3 cDNA の再発現により、RFWD3 欠損細胞の染色体断裂頻度は野生型 DT40 細胞とほぼ同程度に相補されたが、E3 活性を担う RING ドメインの変異体 (C267A) やヒト FANCW 患者変異 (I639K) に相当する I615K 変異体では、相補されなかった。なお、我々はヒト患者変異 (I639K、トリ I615K) は RFWD3 のクロマチン局在、RPA との相互作用、ICL 修復機能が障害されることを明らかにしている (論文)。加えて、直接 HR 活性を測定する実験である I-SceI アッセイを行った。RFWD3 欠損細胞では、活性の著しい低下が観察された。染色体断裂の実験と同様、この活性減少は、野生型 RFWD3 cDNA の再発現では相補されるが、RING ドメインの変異体やヒト FA 患者相当変異体

では相補されなかった。以上の結果は、他の FA 欠損 DT40 と同様、RFWD3 欠損細胞は DNA 修復の HR 活性が低下していることを明確に示す。また、HR 活性には RING ドメインの担うユビキチン E3 リガーゼの活性が必要であることが示された。また患者変異では HR 活性が低下することから、FA の病態に HR 活性が重要であることを示唆する。

I-SceI アッセイで生じた組換え産物の構造を PCR 法でさらに詳細に解析したが、野生型と RFWD3 欠損細胞との間で有意な差は見られなかった。この事実は、RFWD3 の機能欠損は HR の頻度低下をもたらすが、いったん開始された HR 反応の進行には、RFWD3 は影響しないことを示唆する。

さらに、FA 経路活性化の指標となる FANCD2 のモノユビキチン化は RFWD3 欠損細胞でも正常におこっていた。このため、RFWD3 は FANCD2 モノユビキチン化の下流で機能すると推測された。

以上の成果は論文として投稿し、受理された (論文)

(2) RFWD3 の相互作用分子探索

RFWD3 が HR 活性制御に寄与する分子メカニズムを探る目的で、相互作用分子探索を行った。まず、y2h 法を用い、トリ RFWD3 をベイトにトリ DT40 細胞 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行ったが、有意な候補分子は得られなかった。

次に m2h 法を用い、ヒト RFWD3 をベイトに、ヒト HR 関連分子群との相互作用を検討し、RPA 複合体の構成サブユニット、RAD51 との相互作用を見いだした。

ヒト 293T 細胞で RFWD3 と RPA 複合体や RAD51 cDNA を発現させ、両者の相互作用を免疫沈降-ウエスタン法で確認した。

(3) RFWD3 ヒト HAP1 細胞を用いた解析

RFWD3 の HR 機能への寄与をさらに詳しく調べる目的で、ヒト HAP1 細胞由来の RFWD3 欠損細胞を作製した。(2) で RFWD3 の相互作用分子として RPA 複合体、RAD51 が同定されたので、MMC 処理後の RPA、RAD51 の核内フォーカス形成を検討したところ、欠損細胞は野生型細胞に比べ、これらのフォーカス形成が減弱せず、長い時間保持されることを見いだした。RPA、RAD51 のクロマチン画分への局在も同様の傾向を示した。つまり、RFWD3 欠損細胞では RPA、RAD51 が安定化され、DNA 損傷部位に長く保持されていると考えられた。

RFWD3 は E3 リガーゼ活性を担う RING ドメインを持つため、RFWD3 により RPA、RAD51 がユビキチン化される可能性を検討した。ヒト U2OS 細胞にタグ付きユビキチンを発現させ、プルダウン-ウエスタン法で検討すると、細胞内での RPA、RAD51 のポリユビキチン化が検出された。精製タンパク質による試験管内の再構成系でも RFWD3 による RPA、RAD51 のポリユビキチン化が確認された。詳細な検討

により、これらのポリユビキチン化には、ATR、ATM キナーゼによる RFWD3 のリン酸化、ならびに VCP/p97 による制御が判明した。

加えて、RFWD3 欠損細胞では、HR 反応の後期因子 (具体的には MCM8 と RAD54) のフォーカス形成やクロマチン移行が減少することをみだし、詳細に検討した。RFWD3 欠損細胞では RFWD3 による RPA、RAD51 のポリユビキチン化がおこらず、RPA、RAD51 のクロマチンからの除去が障害される。その結果、HR 後期因子のクロマチンローディングが阻害され、HR 反応の進行に支障が生じていることが判明した。すなわち、RFWD3 によるポリユビキチン化を介した RPA、RAD51 の除去が HR 後期反応の促進に重要である。

これらのデータから、RFWD3 によるポリユビキチン化により RPA と RAD51 が適切なタイミングで DNA 損傷部位から除去され、この反応が HR の後期反応の進行に必要なということ、HR の新たな制御メカニズムが明らかとなった。

以上の成果は論文として発表した (論文)

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 8 件)

Knies K, Inano S, Ramiez MJ, Ishiai M, Suralles J, Takata M, Schindler D. Biallelic mutations in the ubiquitin ligase *RFWD3* cause Fanconi anemia. J. Clin. Invest., 査読有, 印刷中

Inano S, Sato K, Katsuki Y, Kobayashi W, Tanaka H, Nakajima K, Nakada S, Miyoshi H, Knies K, Takaori-Kondo A, Schindler D, Ishiai M, Kurumizaka H, Takata M. RFWD3-mediated ubiquitination promotes timely removal of both RPA and RAD51 from DNA damage sites to facilitate homologous recombination, Mol. Cell, 査読有, Vol. 66, No. 5, 2017, pp. 622-634
DOI: 10.1016/j.molcel.2017.04.022.

Ishiai M, Sato K, Tomida J, Kitao H, Kurumizaka H, Takata M. Activation of the FA pathway mediated by phosphorylation and ubiquitination. Mutat Res., 査読有, 印刷中
DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2017.05.003.

Ling C, Huang J, Yan Z, Li Y, Ohzeki M, Ishiai M, Xu D, Takata M, Seidman M, Wang W. Bloom syndrome complex promotes FANCM recruitment to stalled replication forks and facilitates both repair and traverse of DNA interstrand crosslinks, Cell Discov., 査読有, Vol. 2, 2016, pp. 16047
DOI: 10.1038/celldisc.2016.47.

Sato K, Shimomuki M, Katsuki Y, Takahashi D, Kobayashi W, Ishiai M, Miyoshi H, Takata M, Kurumizaka H. FANCI-FANCD2 stabilizes the RAD51-DNA complex binding by binding RAD51 and protects the 5' -DNA end, *Nucleic Acids Res.*, 査読有, Vol. 44, No. 22, 2016, pp. 10758-10771.
DOI: 10.1093/nar/gkw876

Sato K, Ishiai M, Takata M, Kurumizaka H. Defective FANCI binding by a Fanconi anemia-related FANCD2 mutant. *PLoS One*, 査読有, Vol. 9, No. 12, 2014, pp. e114752
DOI: 10.1371/journal.pone.0114752

Ishii K, Ishiai M, Morimoto H, Kanatsu-Shinohara M, Niwa O, Takata M, Shinohara T, Shinohara T. The Trp53-Trp53lip1-Tnfrs10b pathway regulates the radiation response of mouse spermatogonial stem cells. *Stem Cell Rep.*, 査読有, Vol. 3, No. 4, 2014, pp. 679-689
DOI: 10.1016/j.stemcr.2014.08.006

Unno J, Itaya A, Taoka M, Sato K, Tomida J, Sakai W, Sugasawa K, Ishiai M, Ikura T, Isobe T, Kurumizaka H, Takata M. FANCD2 binds CtIP and regulates DNA-end resection during DNA interstrand crosslink repair. *Cell Rep.*, 査読有, Vol. 7, No. 4, 2014, pp. 1039-47
DOI: 10.1016/j.celrep.2014.04.005

〔学会発表〕(計 6 件)

石合正道、イントロダクション、ワークショップ「放射線・ゲノムストレスに対抗する多彩な生命システムの解明に向けて」座長、日本放射線影響学会第 59 回大会、2016 年 10 月 26-28 日、JMS アステールプラザ(広島県広島市)

石合正道、ファンconi貧血経路による DNA 修復制御、第 18 回京都大学生命科学研究科シンポジウム、2016 年 7 月 7-8 日、京都大学芝蘭会館(京都府京都市)

Ishiai M, Okamoto Y, Iwasaki W, Takahashi K, Kugoh K, Oda R, Ohki C, Inano S, Fukui T, Ohta K, Innan H, Takata M. Analysis of FANCD2 protein accumulation sites on human genome during replication stress, 2nd CEA-RBC International Workshop, 2016 年 4 月 11-12 日, 京都大学放射線生物研究センター(京都府京都市)

石合正道、岩寄航、高橋数冴、久郷和人、小田有沙、大木千夏、福井哲也、河合彦彦、

山本卓、太田邦史、印南秀樹、高田穰、複製ストレスによる FANCD2 集積部位のゲノムワイド解析、ワークショップ「複製フォーク：多様な DNA トランスアクションのプラットフォーム」招待講演、BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学会大会合同大会) 2015 年 12 月 1-4 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

石合正道、FANCD2 変異体の機能解析、国立遺伝学研究所 研究集会「染色体 DNA の安定維持の分子メカニズム」招待講演、2014 年 11 月 6-7 日、国立遺伝学研究所 講堂(静岡県三島市)

石合正道、立花章、序論および総括、ワークショップ「低線量(率)放射線による生物影響研究の新展開」座長、日本放射線影響学会第 57 回大会、2014 年 10 月 1-3 日、かごしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市)

〔図書〕(計 1 件)

Ishiai M, Tomida J, Itaya A, Hejma J, and Takata M. The Fanconi anemia pathway and interstrand crosslink repair. Springer Japan, DNA replication, recombination, repair. Molecular mechanisms and pathology. Edited by Hanaoka F. and Sugasawa K. pp. 175-210, 2016, 総ページ 555 ページ

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.rbc.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石合 正道 (ISHIAI, Masamichi)

京都大学・放射線生物研究センター・
准教授
研究者番号：90298844

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし