

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

# 博士論文概要

## 論文題目

FAN1 ヌクレアーゼによる DNA 鎖間架橋  
塩基の切り出し機構に関する研究

Studies on the mechanism of DNA interstrand  
crosslink incision by the FAN1 nuclease

申請者

高橋	大介
Daisuke	TAKAHASHI

電気・情報生命専攻 構造生物学研究

2015 年 11 月

遺伝情報の担体である DNA は、電離放射線や紫外線、細胞内代謝産物により、日々損傷を受けている。DNA 損傷の蓄積は、細胞の機能障害だけでなく、細胞死、細胞のがん化を引き起こす。DNA 損傷の中でも、DNA 鎖間架橋 (Interstrand crosslink、以下 ICL と略) は、DNA 複製や転写といった二重鎖 DNA の分離を伴う反応を阻害するため、特に細胞毒性が強いことが示されている。この強い細胞毒性を利用して、ICL を導入するマイトマイシン C やシスプラチンなどの薬剤は、抗がん剤として臨床に用いられている。ICL は細胞内代謝によっても生じ、脂質やアルコールの代謝により生じるアルデヒドは、ICL を導入することが報告されている。ヒトでは 1 細胞あたり 1 日 10 個程度、以上のような内的及び外的要因により、ICL が生じる。そのため、高等真核生物は ICL を効率的に修復する機構を獲得してきた。

ICL 修復機構が破綻すると、ヒトでは先天的な骨格形成異常、骨髄不全及び高発がんが特徴の劣性遺伝性疾患である Fanconi 貧血 (Fanconi anemia、以下 FA と略) を発症する。これまで FA の原因遺伝子として、19 の原因遺伝子が同定されており、それぞれ *FANCA*、*-B*、*-C*、*-D1*、*-D2*、*-E*、*-F*、*-G*、*-I*、*-J*、*-L*、*-M*、*-N*、*-O*、*-P*、*-Q*、*-R*、*-S*、*-T* と命名されている。これらの遺伝子は、脊椎動物において保存されており、この内 1 つの原因遺伝子産物の機能が欠けても、ICL に対して細胞は強い感受性を示す。したがって、これらの FA 原因遺伝子産物が、互いに連携し合って ICL 修復経路を構成していると考えられている。ICL 修復機構は以下のプロセスを経て進行する。まず、ICL の両方向から進行してくる DNA 複製装置は、ヘリカーゼが ICL で停止することで、ICL の手前およそ 20-40 塩基でリーディング鎖の合成を停止させる。この後、停止した複製装置からヘリカーゼが取り除かれることにより、どちらか 1 つのリーディング鎖の合成が ICL のすぐ隣の塩基まで行われる。ICL によって停止した複製フォークは、FANCM によって認識される。その後、停止した複製フォークに集積した FANCM を足場にして、7 個の FA 原因遺伝子産物、2 個の相互作用因子で構成されるタンパク質複合体である FA コア複合体及び、別の FA 原因遺伝子産物からなるタンパク質複合体の FANCI-FANCD2(ID)複合体が ICL 部位に集積する。一方、複製フォークの単鎖 DNA 領域には、Replication protein A(以下 RPA と略)が迅速に集積し、これを足場にして ATR-ATRIP キナーゼが ICL 近傍に集積する。ATR は、ID 複合体をはじめ、多くの FA 原因遺伝子産物をリン酸化する。リン酸化された ID 複合体の両サブユニットは、FA コア複合体中の E3 ユビキチン連結酵素である FANCL とユビキチン E2 酵素である FANCT によって、モノユビキチン化される。モノユビキチン化された ID 複合体は ICL の近傍に集積し、架橋塩基の切り出しを担うヌクレアーゼをリクルートする。これまでに、FAN1、SNM1A 及び SLX4(FANCP)複合体の 3 つヌクレアーゼが架橋塩基の切り出しに関与することが示唆されている。これらの

ヌクレアーゼは全てユビキチン結合ドメインを有し、モノユビキチン化された FANCD2 によって損傷部位にリクルートされることが示されている。ヌクレアーゼが架橋塩基を切り出すと、REV1 及びポリメラーゼ $\zeta$ (REV3/REV7 複合体)によって、切り出された架橋塩基を乗り越えて DNA 合成が行なわれる。その後、架橋塩基の切り出しで生じた DNA 二重鎖切断損傷が、相同組換えによって修復されることで、ICL 修復が完了する。

ICL 修復の中で中心的なプロセスは架橋塩基の切り出し反応である。しかし、架橋塩基の切り出し反応の分子基盤は、ICL 修復の他のプロセスに比べ未だ不明な点が多い。FAN1 は架橋塩基切り出しへの関与が示唆された、近年新たに同定されたヌクレアーゼである。生化学的解析により FAN1 は、DNA 複製が ICL によって停止した際に形成される 5'-flap 構造に対し、構造特異的なエンドヌクレアーゼ活性を示すことが報告されている。また、FAN1 は ICL 修復に関与する 3 種のヌクレアーゼの中でも、損傷部で FANCD2 と高い頻度で共局在することが明らかになっている。FAN1 の不活性化細胞は、DNA 鎖間架橋剤に対し高感受性を示し、染色体の断裂や連結といった染色体異常が高い頻度で観察される。更に、ICL を誘導する抗がん剤への耐性をもつようになったがん細胞では、FAN1 の発現量が増加していることが報告されている。以上から、FAN1 は架橋塩基の切り出し反応を触媒する主要なヌクレアーゼと考えられているが、FAN1 による架橋塩基の切り出し機構は未だ不明瞭な点が多い。そこで本研究では、FAN1 による架橋塩基の切り出しの分子機構を明らかにするため、まず大腸菌発現系を用いたヒト FAN1 タンパク質の精製系を新規に確立した。DNA 複製が ICL によって停止した際に形成される 5'-flap 構造の単鎖 DNA 領域には、RPA が直ちに集積する。これを模倣した DNA 基質を用いて、精製した FAN1 の DNA 切断活性を解析した。また、FAN1 は ID 複合体により損傷部にリクルートされるため、FAN1 の損傷部での機能を理解するためには、ID 複合体が FAN1 の活性に及ぼす影響を解明する必要がある。本研究ではその解析へ向け、従来困難であったヒト FANCI 及びヒト FANCD2 リコンビナントタンパク質の精製系を独自に確立した。更に、この新規精製系により調製したヒト FANCI 及びヒト FANCD2 の生化学的活性を解析した。最後に、本研究で得られた結果を総括し、FAN1 による損傷塩基の切り出し機構を考察した。

本論文は、4 つの章から構成される。序論である第 1 章では、ICL と FA の関係及び ICL 修復機構に関して、現在までに得られている知見を詳述する。続いて、本研究に至る背景とその概要を述べ、ICL 修復機構解明における本論文の意義を記述する。第 2 章では、ヒト FAN1 の DNA 切断機構の解析について述べる。まず、本研究で新たに確立した大腸菌発現系を用いたヒト FAN1 タンパク質の精製法について記述する。続いて、ヒト FAN1 の試験管内における DNA 切断反応の生化学

的解析の手法を記述したのち、その解析結果を述べる。まず、大腸菌発現系を用いて、ヒト FAN1 をリコンビナントタンパク質として大量に精製することに成功した。次に、ヒト FAN1 による DNA 切断反応を試験管内で行った。その結果、ヒト FAN1 は 5'-flap DNA に対し、強い DNA 切断活性を有することが明らかになった。更に、ICL の修復過程で見られる、RPA が結合した 5'-flap DNA を基質に対しても、ヒト FAN1 は DNA を切断できることを明らかにした。最後に、FAN1 による架橋塩基認識機構について考察した。第 3 章では、大腸菌発現系を用いたヒト FANCI 及びヒト FANCD2 の新規精製系について記述する。まず、これまでのヒト FANCI 及びヒト FANCD2 の調製における問題点を述べ、次にヒト FANCI 及びヒト FANCD2 精製系の構築について詳述した。続いて、精製したタンパク質を用いた生化学的解析の手法について記述し、その後、これらの解析結果を記述した。本研究ではまず、大腸菌を発現宿主としたヒト FANCI 及びヒト FANCD2 の大量精製系を独自に確立した。次に、これらヒト FANCI 及びヒト FANCD2 の生化学的解析を行い、ヒト FANCI 及びヒト FANCD2 は安定なヘテロ二量体を形成すること、分岐構造を有する DNA に対し、優先的に結合することを明らかにした。更に、ヒト FANCD2 はヌクレオソーム形成活性を有することを明らかにした。最後に、ヒト FANCI 及びヒト FANCD2 タンパク質の精製法について考察した。第 4 章では、今後の展望として、FAN1 と ID 複合体による架橋塩基除去の協調機構について記述する。

## 早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名 高橋 大介 印

(2015年11月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	<p>○<u>Takahashi D</u>, Sato K, Shimomuki M, Takata M, Kurumizaka H. Expression and purification of human FANCI and FANCD2 using Escherichia coli cells. Protein Expression and Purification, vol. 103, pp8-15. (2014 Aug.)</p> <p>○<u>Takahashi D</u>, Sato K, Hirayama E, Takata M, Kurumizaka H. Human FAN1 promotes strand incision in 5'-flapped DNA complexed with RPA. The Journal of Biochemistry, vol. 158, pp263-270. (2015 Sep.)</p>
講演	<p>学会発表</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・国際学会(ポスター発表)</li> <li>○<u>Takahashi D</u>, Sato K, Hirayama E, Takata M, Kurumizaka H. Biochemical analysis of Fanconi-associated nuclease FAN1. The 9th 3R Symposium (International Symposium on DNA Replication, Recombination and Repair), P-25, Gotemba, Japan (2014 Nov.)</li> <li>・国内学会(ポスター発表)</li> <li>○高橋大介, 高久誉大, 胡桃坂仁志 RAD51 及び DNA topoisomeraseIII-alpha の相同組換えにおける機能的相互作用 第 32 回分子生物学会年会, 3P-0187, 横浜, 2009 年 12 月</li> <li>○高橋大介, 佐藤浩一, 下向真代, 西山敦哉, 中西真, 有田恭平, 胡桃坂仁志 Histone H3-ubiquitination by UHRF1 in maintenance of DNA methylation. 第 36 回日本分子生物学会年会, 1P-0234, 神戸, 2013 年 12 月</li> <li>○高橋大介, 佐藤浩一, 平山恵美子, 高田穰, 胡桃坂仁志 FAN1 ヌクレアーゼが担う DNA 鎖間架橋除去機構の解明 第 22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ, P-21, 仙台, 2013 年 11 月</li> <li>○高橋大介, 佐藤浩一, 平山恵美子, 高田穰, 胡桃坂仁志 DNA 鎖間架橋除去における FAN1 ヌクレアーゼの役割 第 87 回日本生化学会大会, 3P-333, 京都, 2014 年 10 月</li> </ul>
その他	<p>(論文)</p> <p>Takaku M, Machida S, Nakayama S, <u>Takahashi D</u>, Kurumizaka H. Biochemical analysis of the human EVL domains in homologous recombination. The FEBS journal, vol. 276, pp5841-5848. (2009 Oct.)</p> <p>Takaku M, <u>Takahashi D</u>, Machida S, Ueno H, Hosoya N, Ikawa S, Miyagawa K, Shibata T, Kurumizaka H. Single-stranded DNA catenation mediated by human EVL and a type I topoisomerase. Nucleic Acids Research, vol. 38, pp7579-7586. (2010 Nov.)</p> <p>Uchigasaki S, Tie J, <u>Takahashi D</u>. Genetic analysis of twelve X-chromosomal STRs in Japanese and Chinese populations. Molecular Biology Reports, vol. 40, pp3193-3196. (2013 Apr.)</p>