

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

2016 年 2 月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科  
電気・情報生命専攻 構造生物学研究

高橋 大介

Daisuke TAKAHASHI

<b>第 1 章</b>	<b>序論</b>	
<b>1-1.</b>	<b>DNA 損傷</b>	<b>6</b>
<b>1-2.</b>	<b>DNA 鎖間架橋と Fanconi 貧血</b>	
1-2-1.	<i>DNA 鎖間架橋</i>	6
1-2-2.	<i>Fanconi 貧血</i>	8
<b>1-3.</b>	<b>DNA 鎖間架橋修復経路</b>	
1-3-1.	<i>ICL 修復経路の概観</i>	10
1-3-2.	<i>ICL 修復経路の活性化</i>	10
1-3-3.	<i>架橋塩基の切り出し</i>	14
1-3-4.	<i>損傷乗り越え合成及び相同組換え修復</i>	14
<b>1-4.</b>	<b>本研究</b>	<b>16</b>
<b>第 2 章</b>	<b>FAN1 の生化学的機能解析</b>	
<b>2-1.</b>	<b>序</b>	<b>18</b>
<b>2-2.</b>	<b>実験方法及び材料</b>	
2-2-1.	<i>ヒト FAN1 ヌクレアーゼの発現系の構築</i>	19
2-2-2.	<i>ヒト FAN1 ヌクレアーゼの精製</i>	19
2-2-3.	<i>RPA の精製</i>	21
2-2-4.	<i>5'-flap DNA 基質の作製</i>	22
2-2-5.	<i>ヌクレアーゼアッセイ</i>	23
2-2-6.	<i>ゲルシフトアッセイ</i>	24
<b>2-3.</b>	<b>実験結果</b>	

2-3-1.	ヒト <i>FAN1</i> ヌクレアーゼの精製	24
2-3-2.	大腸菌発現系を用いて精製した ヒト <i>FAN1</i> のヌクレアーゼ活性の解析	25
2-3-3.	<i>RPA</i> が結合した <i>DNA</i> 基質に対する ヒト <i>FAN1</i> のヌクレアーゼ活性の解析	27
2-4.	考察	30

### 第3章大腸菌を用いたヒト *FANCI* 及びヒト *FANCD2* の 新規発現・精製系の確立

3-1.	序	36
3-2.	実験方法及び材料	
3-2-1.	ヒト <i>FANCI</i> 及びヒト <i>FANCD2</i> タンパク質発現系の構築	37
3-2-2.	大腸菌発現系を用いたヒト <i>FANCI</i> の精製	38
3-2-3.	大腸菌発現系を用いたヒト <i>FANCD2</i> の精製	39
3-2-4.	昆虫細胞・バキュロウイルス発現系用いたヒト <i>FANCD2</i> の精製	40
3-2-5.	ゲル濾過カラムクロマトグラフィー	41
3-2-6.	ゲルシフトアッセイ	41
3-2-7.	ヌクレオソーム形成アッセイ	42
3-3.	実験結果	
3-3-1.	ヒト <i>FANCI</i> 及びヒト <i>FANCD2</i> の精製	43
3-3-2.	ヒト <i>FANCI</i> とヒト <i>FANCD2</i> の物理的相互作用	44
3-3-3.	ヒト <i>FANCI</i> 、ヒト <i>FANCD2</i> 及びヒト <i>ID</i> 複合体の <i>DNA</i> 結合活性	49

3-3-4. ヒト <i>FANCI</i> 、ヒト <i>FANCD2</i> 及びヒト <i>ID</i> 複合体の ヌクレオソーム形成活性	51
3-4. 考察	54
第 4 章 総合討論	58
引用文献	62
謝辞	73
研究業績	74

## 略語一覽

ATP: adenosine 5'-(tetrahydrogen triphosphate)

BSA: bovine serum albumin

DNA: 2-deoxy  $\beta$ -D-deoxyribonucleic acid

ds: double-stranded

DSB: double-strand break

DTT: (2*S*, 3*S*)-1,4-bis(sulfanyl)butane-2, 3-diol

EDTA: 2, 2', 2'', 2'''-(ethane-1,2-diyldinitrilo)tetraacetic acid

HEPES: 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid

HJ: Holliday junction

ICL: DNA interstrand crosslink

IPTG: isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside

LB: lysogeny broth

Ni-NTA: nickel-nitrilotriacetic acid

NP-40: nonyl phenoxypolyethoxylethanol-40

OD: optical density

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis

PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride

SDS: sodium dodecyl sulfate

Tris: 2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1, 3-diol

TAE: tris-acetate-EDTA

TBE: tris-borate-EDTA

## 第 1 章 序論

### 1-1. DNA 損傷

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、そして細胞のがん化を引き起こす(Jasin and Rothstein, 2013、Aparicio *et al.*, 2014)。DNA 損傷の中でも、DNA 鎖間架橋(Interstrand crosslink、以下 ICL と略)は特に細胞毒性が強いことが示されている(Kook, 2005)。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(Monyahan and Jasin, 2010)。本研究では、ICL 修復の中心的反応である、架橋塩基の切り出し反応に重要と考えられている FAN1 ヌクレアーゼに着目し、その機能解析を行った。本章では、まずこれまでに明らかになっている ICL 修復機構について概説し、その後、本研究の目的について記述する。

### 1-2. DNA 鎖間架橋と Fanconi 貧血

#### 1-2-1. DNA 鎖間架橋

ICL は、DNA の相補鎖間が共有結合で架橋される DNA 損傷である (図 1)。ICL は、DNA の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、細胞死や細胞のがん化を引き起こす(図 1)。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(Deans and West, 2011)。ICL は細胞内代謝によっても生じることが明らかになっており、脂質の酸化的分解により生じるアクロレインや、エタノールの代謝により生じるアセトアルデヒドは、ICL を形成する

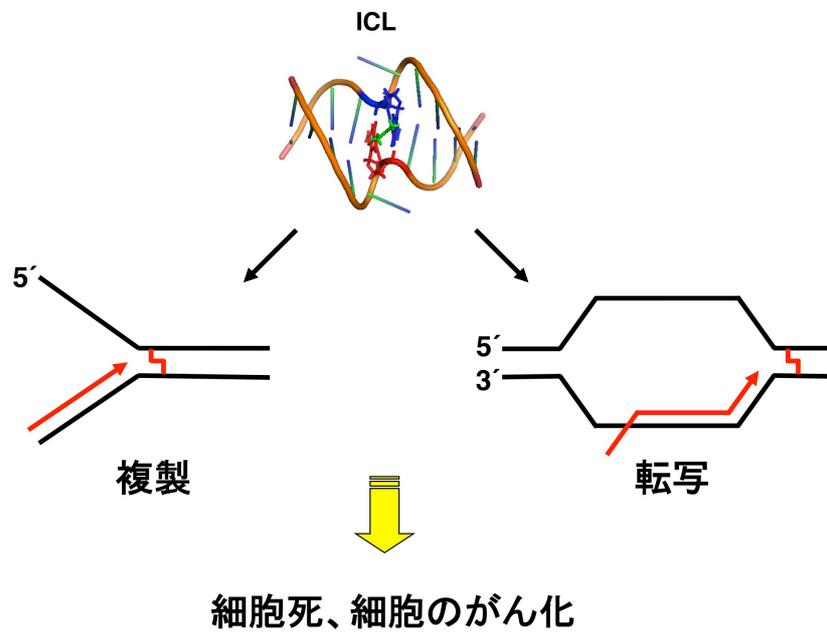


図 1. DNA 鎖間架橋(ICL)

アルデヒドなどの細胞内代謝産物やICL薬剤(図中はシスプラチンによるICL:1DDP)は、DNA複製や転写を阻害する。その結果、細胞死や細胞のがん化が引き起こされる。

(Kovekovet *et al.*, 2003、Brooks and Theruvathu, 2005、Stone *et al.*, 2008、Langevin *et al.*, 2011)。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が生じると報告されている(Grillari *et al.*, 2007)。

#### 1-2-2. Fanconi 貧血

Fanconi 貧血(FA)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り、1927年にスイスの小児科医 Guido Fanconi によって初めて報告された(Kook, 2005、Auerbach, 2009)。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いる(表1)(Deans and West, 2011、Sawyer *et al.*, 2014、Wang *et al.*, 2015、Hira *et al.*, 2015、Rickman *et al.*, 2015)。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。これまでに、DNA複製装置がICLに衝突・停止した後にこのICL修復経路が活性化され、架橋塩基を切り出すことでICLが修復されることが明らかになっている(Meetei *et al.*, 2005、Ciccia *et al.*, 2007、Räschle *et al.*, 2008、Knipscheer *et al.*, 2009、Yan *et al.*, 2010、Long *et al.*, 2011、Wang *et al.*, 2013)。

表 1. ヒト Fanconi 遺伝子

相補グループ	遺伝子	アミノ酸数	遺伝子座
A	<i>FANCA</i>	1455	16q24.3
B	<i>FANCB</i>	859	Xp22.2
C	<i>FANCC</i>	558	9q22.3
D1	<i>FANCD1/BRCA2</i>	3418	13q12.3
D2	<i>FANCD2</i>	1451	3p25
E	<i>FANCE</i>	536	6p21.31
F	<i>FANCF</i>	374	11p15
G	<i>FANCG</i>	622	9p13
I	<i>FANCI</i>	1328	15q26.1
J	<i>FANCI/BRIP1</i>	1249	17q22.2
L	<i>FANCL</i>	375	2p16.1
M	<i>FANCM</i>	2022	14q21.2
N	<i>FANCN/PALB2</i>	1186	16p12.2
O	<i>FANCO/RAD51C</i>	376	17q22
P	<i>FANCP/SLX4</i>	1834	16p13.3
Q	<i>FANCO/XPF</i>	916	16p13.12
R	<i>FANCR/RAD51</i>	339	15q15.1
S	<i>FANCS/BRCA1</i>	1863	17q21
T	<i>FANCT/UBE2T</i>	197	1q32.1

### 1-3. DNA 鎖間架橋修復経路

#### 1-3-1. ICL 修復経路の概観

近年、試験管内再構成系を用いた解析により、ICL 修復のプロセスが明らかになりつつある(図 2)(Räschle *et al.*, 2008、Knipscheer *et al.*, 2009、Long *et al.*, 2011)。まず、DNA 複製装置中の MCM 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が停止する(図 2(iii))(Räschle *et al.*, 2008、Knipscheer *et al.*, 2009、Long *et al.*, 2011、Long *et al.*, 2014)。この後、停止した複製装置から MCM ヘリカーゼが取り除かれることにより、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(Räschle *et al.*, 2008、Knipscheer *et al.*, 2009、Long *et al.*, 2011、Long *et al.*, 2014) (図 2(iii))。ICL の 1 塩基手前まで DNA 合成が行われると、その鋳型鎖の相補鎖において、ICL を囲むように架橋塩基が切り出される(図 2(iii))(Räschle *et al.*, 2008、Knipscheer *et al.*, 2009)。この後、切り出された ICL を乗り越えて DNA 合成が起こる(図 2(iv))(Budzowska *et al.*, 2015)。切り出された架橋塩基はヌクレオチド除去修復により、DNA 鎖から取り除かれる。最後に、架橋塩基の切り出しによって生じた DNA 二重鎖切断(DSB)が修復されることにより ICL 修復が完了する(図 2(v))。以下に、これまで明らかになった各反応の概要を記述する。

#### 1-3-2. ICL 修復経路の活性化

ICL によって停止した複製フォークは、まず FANCM によって認識される(図 3(i)-(iii))(Meetei *et al.*, 2005)。FANCM は、MHF1/2 及び FAAP24 と複合体を形成することで、停止した複製フォークに強く集積することが報告されている

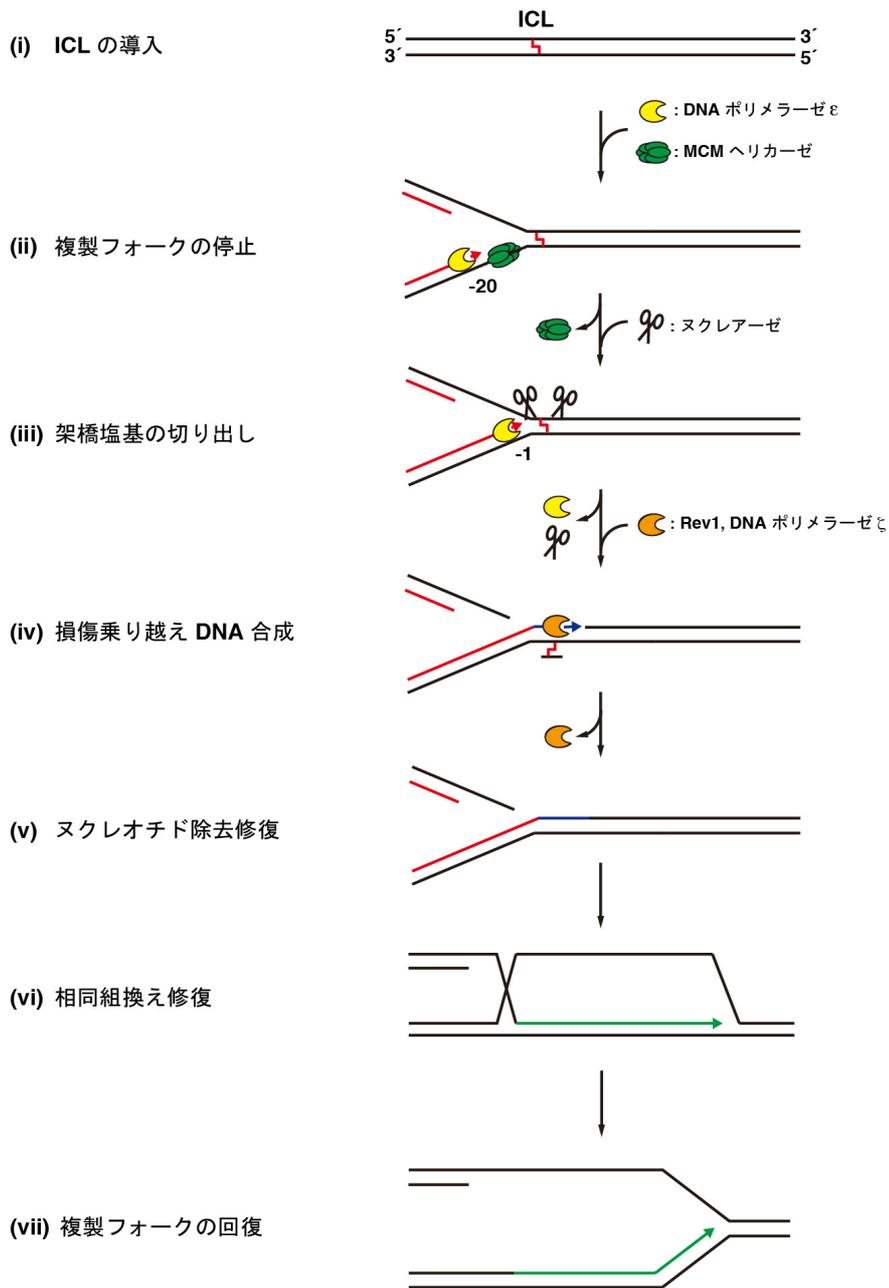


図 2. ICL 修復経路

DNA 複製装置が ICL(i)に衝突すると、DNA 複製が停止する(ii)。その後、ICL の手前 20 塩基まで DNA 複製で働く DNA ポリメラーゼ $\epsilon$ によって DNA 合成が行なわれる(ii)。その後、MCM ヘリカーゼの脱離に伴い、DNA 合成が ICL の 1 塩基手前まで進む(iii)。続いて、ヌクレアーゼによって架橋塩基が切り出され(iii)、損傷乗り越え合成を担う Rev1 及び DNA ポリメラーゼ $\zeta$ によってギャップが埋められる(iv)。架橋塩基はヌクレオチド除去修復によって取り除かれる(v)。架橋塩基の切り出しによって生じた DSB は、相同組換え(HR)で修復される(v)。

(Ciccia *et al.*, 2007、Yan *et al.*, 2010、Wang *et al.*, 2013)。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(図 3(ii) 及び(iii))(Michael, *et al.*, 2000、Walter, 2000)、これを足場にして ATR-ATRIP キナーゼが ICL 近傍に集積する(図 3(iii))(Zou and Elledge, 2003、Ball *et al.*, 2005、Shigechi *et al.*, 2012)。集積した FANCM は HCLK2 と相互作用し、この複合体が ATR と相互作用することで、ATR を活性化することが知られている(図 3(iii)) (Collis *et al.*, 2007、Collis *et al.*, 2008、Horejši *et al.*, 2009)。その後 ATR は、多くの FA 原因遺伝子産物をリン酸化することで ICL 修復経路を活性化する。

FA コア複合体は、7 個の FA 原因遺伝子産物 (FANCA、-B、-C、-E、-F、-G、-L) 及び 2 個の相互作用因子 FAAP100、FAAP20 で構成されるタンパク質複合体である。FA コア複合体を構成するいくつかのタンパク質は、ATR にリン酸化されることが明らかにされている (Qiao *et al.*, 2004、Wang *et al.*, 2007、Collins *et al.*, 2009)。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)複合体も、両サブユニットが ATR によってリン酸化を受け(Andreassen *et al.*, 2004、Ho *et al.*, 2006、Ishiai *et al.*, 2008)。特に FANCI がリン酸化されると、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、両サブユニットがモノユビキチン化されることが明らかになっている(図 3(iv)) (Garcia-Higuera *et al.*, 2001、Meetei *et al.*, 2004、Machida *et al.*, 2006、Ishiai *et al.*, 2008、Cole *et al.*, 2010)。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反応が開始されることが明らかにされている。(Meetei *et al.*, 2003、Smogorzewska *et al.*, 2007、Raschle *et al.*, 2008、Ishiai *et al.*, 2008、Knipscheer *et al.*, 2009)。

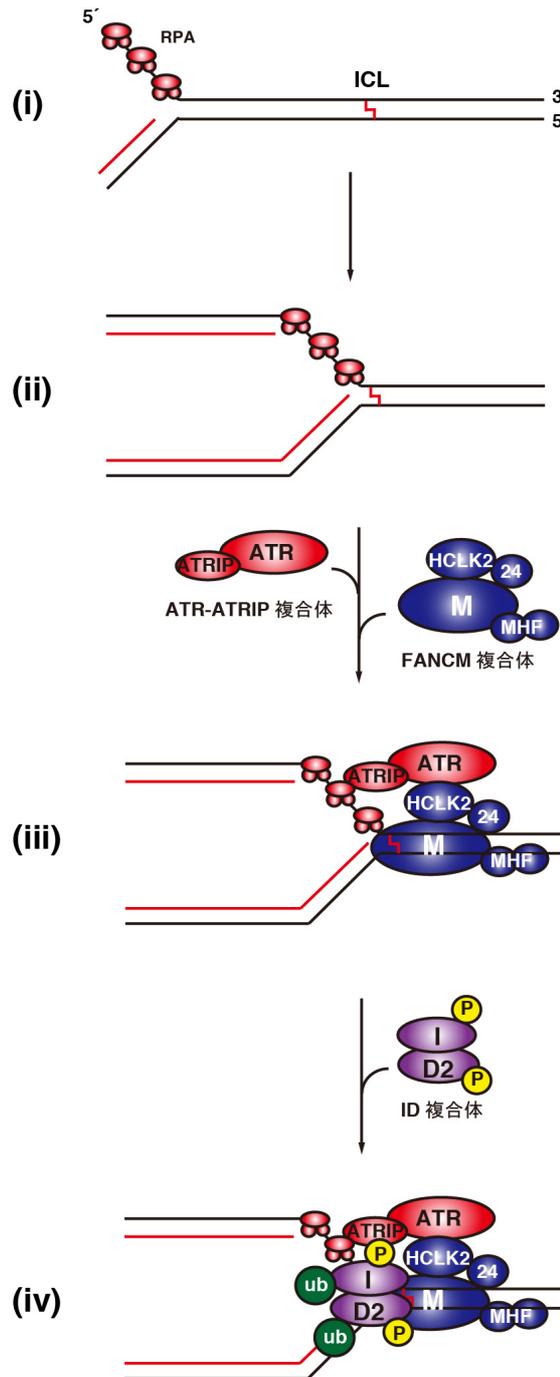


図 3. ICL 修復経路の活性化

DNA 複製装置(図では省略)が ICL で停止する(i)と、DNA 複製の際に生じた単鎖 DNA 領域に RPA が集積する(ii)。FANCM 複合体は停止した複製フォークを目印に、ATR-ATRIP 複合体は RPA-単鎖 DNA を目印にして損傷部位近傍に集積する(iii)。その後、ID 複合体が、ATR-ATRIP 複合体によってリン酸化され、損傷部位に集積する(iv)。ICL 部位に結合した ID 複合体は、FA コア複合体(図では省略)によってモノユビキチン化される(iv)。

### 1-3-3. 架橋塩基の切り出し

ICL 近傍に集積した ID 複合体は、モノユビキチン化された FANCD2 を介してヌクレアーゼをリクルートすることが明らかにされている。このヌクレアーゼが、ICL 修復の中心的な反応である架橋塩基の切り出し反応を触媒すると考えられている。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(図 4A)(Deans and West, 2011、Zhang and Walter, 2014)。以上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(Liu *et al.*, 2010、MacKay *et al.*, 2010、Kratz *et al.*, 2010、Smogorzewska *et al.*, 2010、Yamamoto *et al.*, 2011、Wang *et al.*, 2011)。また、生化学的解析により、これらのヌクレアーゼは DNA 構造特異的であることが報告されている(図 4B)(de Laat *et al.*, 1998、Kuraoka *et al.*, 2000、Ciccia *et al.*, 2003、Fricke and Brill, 2003、Liu *et al.*, 2010、MacKay *et al.*, 2010、Kratz *et al.*, 2010、Smogorzewska *et al.*, 2010、Yamamoto *et al.*, 2011、Wang *et al.*, 2011、Sengerová *et al.*, 2012、Hodskinson *et al.*, 2014)。しかし、これらのヌクレアーゼが架橋塩基を切り出すプロセスは明らかになっていない。

### 1-3-4. 損傷乗り越え合成及び相同組換え修復

構造特異的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 ICL を乗り越えて DNA 合成が行なわれる(Sharma *et al.*, 2011、Sharma and Canman, 2012、Budzowska *et al.*, 2015)。REV1 及びポリメラーゼ  $\zeta$  による損傷乗り越え合成は、DNA に変異が入りやすい

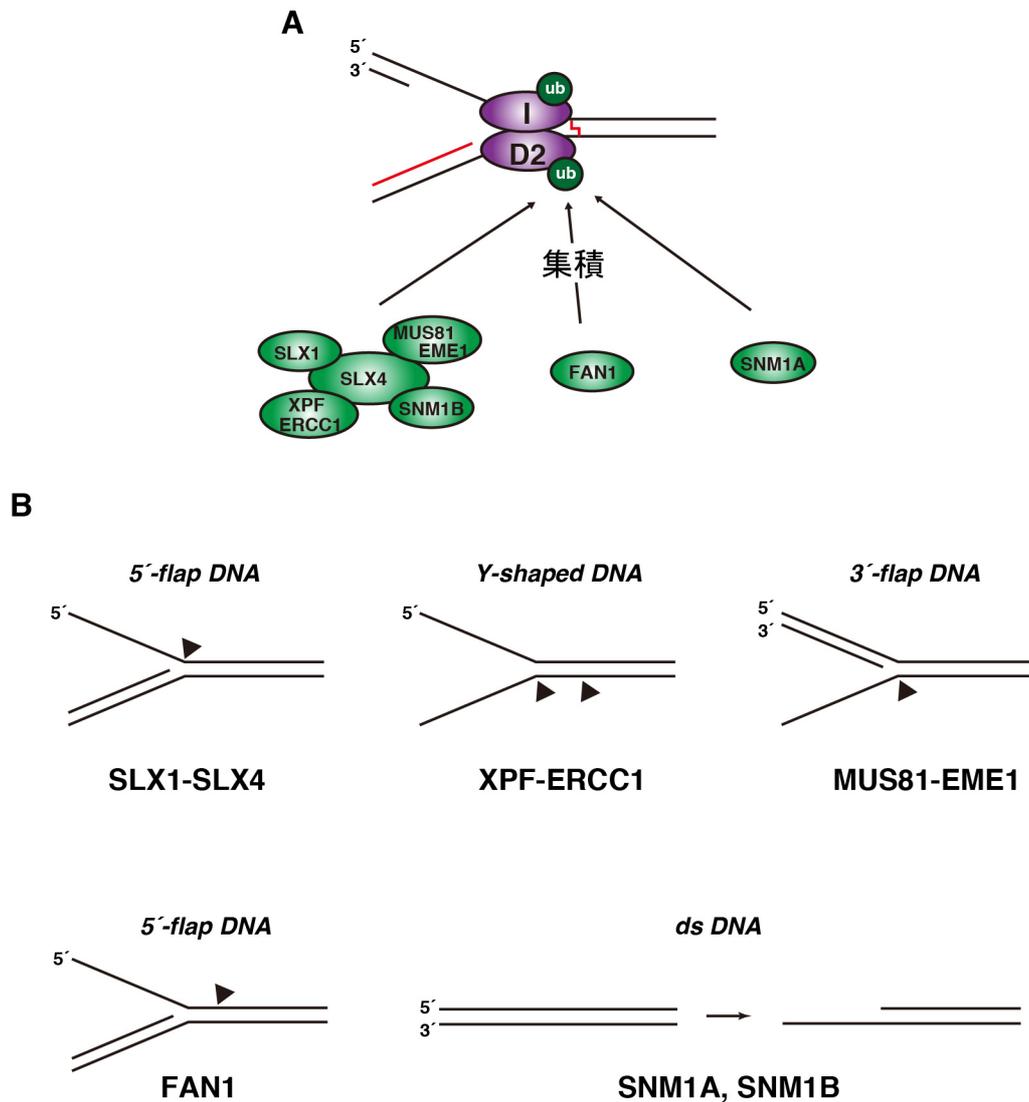


図 4. 架橋塩基の切り出し

(A)モノユビキチン化された FANCD2 を目印に、ユビキチン結合モチーフを有するヌクレアーゼ(SLX4 複合体、FAN1 及び SNM1A)が ICL 部位に集積し、架橋塩基の切り出し反応を行なう。(B) ICL 修復に関わるとされるヌクレアーゼは構造特異性を有する。SLX1-SLX4 及び FAN1 は 5'-flap 構造、XPF-ERCC1 は Y 字構造、MUS81-EME1 は 3'-flap 構造特異的なエンドヌクレアーゼ活性を示す。SNM1A および B は dsDNA に対するエキソヌクレアーゼ活性を有する。黒矢頭は各ヌクレアーゼによる DNA の切断箇所を示す。

ことが報告されている(Budzowska *et al.*, 2015)。その後、架橋塩基の切り出しによって生じた DSB が修復される。細胞は DSB に対し、2 つの修復機構を有する。1 つは非相同末端結合であり、切断された末端同士を再結合させることで DNA 損傷を修復する機構である。非相同末端結合は、相同的な鋳型鎖を必要とせず、切断された DNA 末端をそのまま結合することから、修復の際、遺伝情報が失われる可能性が高い(Lieber, 1999、Ferguson and Alt, 2001)。もう一つは、相同組換えであり、姉妹染色分体の相同鎖を鋳型にして、遺伝情報を失うことなく損傷を正確に修復する(Haber, 1999、Ferguson and Alt, 2001)。ICL 修復において、架橋塩基の切り出しの際に生じた DNA 二重鎖切断は、相同組換えにより修復されることが報告されている(Long *et al.*, 2011)。

#### 1-4. 本研究

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(Liu *et al.*, 2010、MacKay *et al.*, 2010、Kratz *et al.*, 2010、Smogorzewska *et al.*, 2010)。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、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(Liu *et al.*, 2010、Kratz *et al.*, 2010、MacKay *et al.*, 2010、Smogorzewska *et al.*, 2010、Yoshikiyo *et al.*, 2010)。また、FAN1 は損傷部で、FANCD2 と高い頻度で共局在することが明らかになっている(Liu *et al.*, 2010、MacKay *et al.*, 2010、Kratz *et al.*, 2010、Smogorzewska *et al.*, 2010)。FAN1 のノッ

クダウンまたはロックアウト細胞は、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(Liu *et al.*, 2010、MacKay *et al.*, 2010、Kratz *et al.*, 2010)。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(Santarpia *et al.*, 2013、Pfäffle *et al.*, 2013)。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。しかし、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。次に修復過程で見られる、RPA が結合した複製フォークを模倣した DNA 基質を用いて、精製した FAN1 のヌクレアーゼ活性を解析した。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、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。

## 第 2 章 FAN1 の生化学的機能解析

### 2-1. 序

本研究で着目する FAN1 は、1,017 アミノ酸からなるヌクレアーゼであり、N 末端領域にユビキチン結合ドメイン(UBZ; ubiquitin binding zinc finger)、中央部に DNA 結合ドメイン(SAP; SAF-A/B, Acinus and PIAS)、タンパク質間相互作用ドメイン(TPR; tetratricopeptide)、そして C 末端領域にヌクレアーゼドメイン(VRR-Nuc; viral replication and repair nuclease)を有する (図 5A)。昆虫細胞を用いてリコンビナントタンパク質として精製した 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(Liu *et al.*, 2010、Kratz *et al.*, 2010、MacKay *et al.*, 2010、Smogorzewska *et al.*, 2010、Yoshikiyo *et al.*, 2010)。しかし、一方で、この構造の単鎖 DNA 領域には、直ちに RPA が集積することが報告されている (Michael *et al.*, 2000、Walter, 2000、Long *et al.* 2011)。RPA は、RPA70、RPA32 および RPA14 の 3 つのサブユニットで構成される真核生物の単鎖 DNA 結合タンパク質であり、約 30 塩基の DNA を保護することが明らかにされている (Kim *et al.*, 1992)。したがって、架橋塩基の切り出しを担う構造特異的ヌクレアーゼは RPA が結合した 5'-flap 構造上で機能することが考えられている。事実、FAN1 は損傷部において RPA と共局在することが報告されている(Kratz *et al.*, 2010)。しかし、RPA が結合した DNA 基質における FAN1 の活性は解析されてこなかった。本研究では、この課題を生化学的手法により明らかにするために、まず大腸菌を用いた FAN1 タンパク質の精製方法を確立した。精製した FAN1 を用いて、RPA が結合した DNA 基質における FAN1 のヌクレアーゼ活性を解析した。

## 2-2. 実験方法及び材料

### 2-2-1. ヒト *FAN1* ヌクレアーゼの発現系の構築

全長の野生型ヒト *FAN1*(h*FAN1*)ヌクレアーゼタンパク質及び h*FAN1* D960A 変異体は、目的遺伝子を pET21a プラスミドベクターの *NdeI-XhoI* 制限酵素切断部位に挿入したものをを用いて発現させた。His<sub>6</sub>-Smt3 (yeast SUMO homolog)配列を h*FAN1* 遺伝子上流に挿入し、N 末端側に His<sub>6</sub>-Smt3 タグが融合した h*FAN1* タンパク質となるように設計した。h*FAN1* 遺伝子は京都大学の高田穰博士より供与いただいた。h*FAN1* D960A 変異体の作製には KOD -plus- Mutagenesis Kit (TOYOBO)を使用した。

### 2-2-2. ヒト *FAN1* ヌクレアーゼの精製

全長の野生型 h*FAN1* 遺伝子を挿入した pET21a ベクターを BL21(DE3) codon(+)*RIL* 株(Stratagene)に取り込ませ、形質転換した。この菌体を、50 µg/mL ampicillin 及び 17.5 µg/mL chloramphenicol を含む 28 L の LB で、30°Cにて OD<sub>600</sub> の値が 0.8 になるまで震盪培養を行った。その後 IPTG を終濃度が 0.25 mM となるように加え、培地の温度を 18°Cに下げ、一晚培養した。培養した菌体は遠心分離により集菌し、12 mM imidazole を含む 60 mL のバッファーA [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 5 mM 2-ME, 1 mM PMSF, 10% glycerol]で懸濁した。懸濁液を超音波破碎し、30 分間の遠心分離(27,200×g)により、破碎液を可溶性画分と不溶性画分に分けた。バッチ法を用いて、可溶性画分と 3 mL の Ni-NTA agarose レジン(Qiagen)を 4°Cで 1 時間混合した。その後、エコノカラム (Bio-Rad)にタンパク質が結合した Ni-NTA agarose レジンを充填し、120 mL のバ

ッファーA で洗浄した。タンパク質の溶出は、12-400 mM imidazole を含むバッファーA (60 mL)を用いた線形勾配により行った。His<sub>6</sub>-Smt3 タグを取り除くため、30 mL の溶出画分中に含まれるタンパク質 1 mg に対して 0.6 unit の PreScission Protease を加え、2 L のバッファーB [20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 5 mM 2-ME, 10% glycerol]に対し、12 時間透析した。その後、再度 2 L のバッファーB に対し 3 時間透析を行なった。透析後、40 mL のバッファーB であらかじめ平衡化した 2 mL の Heparin Sepharose Fast Flow6 カラム(GE Healthcare)にタンパク質を負荷し、100 mL のバッファーB を用いて洗浄した。その後、200-1000 mM NaCl を含むバッファーB (100 mL)を用いた線形勾配によりタンパク質を溶出した。回収した 20 mL の溶出画分を、2 L のバッファーB に対して 12 時間透析を行なった。その後、再度 2 L のバッファーB に対し 3 時間透析を行なった。透析後、40 mL のバッファーB で平衡化した 2 mL の Q Sepharose Fast Flow カラム(GE Healthcare)にタンパク質を負荷し、通過画分を回収した。通過画分を 20 mL のバッファーB で平衡化した 1 mL の SP Sepharose Fast Flow カラム(GE Healthcare)に負荷し、40 mL のバッファーB を用いて洗浄した。タンパク質の溶出は、200-1000 mM NaCl を含むバッファーB (20 mL)を用いた線形勾配により行った。溶出した 10 mL の試料を、Amicon Ultra-15 Centrifugal 30 K filter Unit (Millipore) を用いて 4 mL まで濃縮し、バッファーB で平衡化した Superdex 200 ゲル濾過カラム(HiLoad 16/60 preparation grade; GE Healthcare)へ負荷した。その後、120 mL のバッファーB を用いてタンパク質を溶出した。溶出画分に含まれるタンパク質は 0.4 mg/mL まで濃縮し、10  $\mu$ L ずつに分注して-80°Cで保存した。BSA を標準タンパク質に用いた Bradford 法により、精製タンパク質の定量を行った

(Bradford, 1976)。hFAN1 D960A 変異体も同様の方法で精製を行なった。

### 2-2-3. RPA タンパク質の精製

RPA の精製は、既報と同様の方法を用いて行った(Henricksen *et al.*, 1994)。野生型 RPA 遺伝子が挿入された p11d ベクターを BL21(DE3) codon(+)RIL 株に導入し、形質転換した。一つのコロニーを採取し、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ampicillin 及び 35  $\mu\text{g}/\text{mL}$  chloramphenicol を添加した 10 L の培地(1%トリプトン、0.5% NaCl)で、37°Cで静置培養した。12 時間後、OD<sub>600</sub> の値が 0.6 になるまで 37°Cで震盪培養を行った。その後 IPTG を終濃度が 0.4 mM となるように加え、37°Cで 2 時間震盪培養した。培養した菌体は遠心分離により集菌し、1 mM PMSF を含むバッファーC [30 mM HEPES-KOH (pH 7.8), 1 M DTT, 0.25 mM EDTA, 0.25% inositol, 0.01% NP-40]で懸濁した。懸濁液を超音波破碎し、30 分間の遠心分離 (27,200 $\times$ g)により、破碎液を可溶性画分と不溶性画分に分けた。その後、エコノカラムに充填した 10 mL の Affi-Gel Blue Gel (Bio-Rad) レジンに、ペリスタポンプを用いて可溶性画分を吸着させた。カラムに吸着したタンパク質を 100 mL の 50 mM KCl を含むバッファーC、150 mL の 800 mM KCl を含むバッファーC 及び 500 mM NaSCN を含むバッファーC で順次洗浄した。80 mL の 1.5 M NaSCN を含むバッファーC を用いて 40 mL の RPA を含む溶出画分を回収した。2 L の バッファーD [25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM KCl, 1 M DTT, 0.01% Triton X-100, 10% glycerol]に対し 12 時間透析した。その後、再度 2 L のバッファーD に対し透析を行なった。透析後、100 mL のバッファーE [20 mM potassium phosphate (pH 7.5), 1 mM DTT, 0.01% Triton X-100, 10% glycerol]であらかじめ平衡化した

10 mL の Hydroxyapatite カラム(Bio-Rad)にタンパク質を負荷し、100 mL のバッファーD を用いて洗浄した。その後、20-300 mM potassium phosphate を含むバッファーC (100 mL)を用いた線形勾配によりタンパク質を溶出した。回収した20 mL の溶出画分を、2 L のバッファーD に対して12時間透析を行なった。その後、再度2 L のバッファーD に対し、3時間透析を行なった。透析後、バッファーD で平衡化した Mono Q カラム(GE Healthcare)にタンパク質を負荷し、10 mL のバッファーD を用いて洗浄した。その後、50 mM-400 mM KCl の直線勾配により RPA を含む画分を溶出した。溶出した試料は、2 L のバッファーF [25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM KCl, 1 M DTT, 10% glycerol]に対し、3時間透析を行った。透析した RPA は、10  $\mu$ L ずつに分注して-80°Cで保存した。

#### 2-2-4. 5'-flap DNA 基質の作製

5'-flap DNA 基質の作製には、表2に示すオリゴDNAを用いた。ストランド1 (60  $\mu$ M)またはストランド2 (60  $\mu$ M)と T4 Polynucleotide Kinase (TOYOBO)を50  $\mu$ L の反応溶液 [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 2% glycerol, 740 kBq [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]dATP]中で混合し、37°Cで30分間温置した。未反応の[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]dATP を除去するため、反応物を CHROMA SPIN カラム(Clontech)に1回、ProbeQuant G-50 Micro カラム (GE Healthcare)に2回通し、<sup>32</sup>P で放射性標識されたオリゴDNA を精製した。5'-flap DNA 基質は、10 mM Bis-Tris propane (pH 7.5)、100 mM NaCl、1 mM MgCl<sub>2</sub> を含む溶液下で、ストランド1、ストランド2 及びストランド3 を100°Cで3分間煮沸したのち、12時間かけて温度を室温まで下げ、アニーリングさせることで作製した。

表 2. オリゴ DNA

<p>ストランド 1</p> <p>5´-ATCGATGTCTCCTCGATCCTACCAACCAGATGACGCGCTGCTACGTGCTACCGGAAGTCG-3´</p>
<p>ストランド 2</p> <p>5´-CGACTTCCGGTAGCACGTAGCAGCGGCTCGCCACGAACTGCACTCTAGGCTTCGCGTAAC-3´</p>
<p>ストランド 3</p> <p>5´-GTTACGCGAAGCCTAGAGTGCAGTTCGTGGCGAGC-3´</p>

#### 2-2-5. ヌクレアーゼアッセイ

精製した hFAN1(0.1、0.2 及び 0.3 nM)とストランド 1 またはストランド 2 の 5´端を <sup>32</sup>P で放射性標識された 5´-flap DNA(1 µM)を、10 µL の反応溶液 [22 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM Bis-Tris propane (pH 7.5), 70 mM NaCl, 0.1 mg/mL BSA, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 0.1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 3% glycerol]中で混合し、37°Cで 10 分間温置した。その後、2 µL の反応停止溶液[1.4% SDS, 8.5 mg/mL proteinase K]を加え、37°Cで 15 分間反応させた。各サンプルに 60 µL の Hi-Di ホルムアミド(Applied Biosystems)を加え、各サンプルを 100°Cで 10 分間煮沸した後、直ちに氷上で 5 分間冷却した。反応物を 1×TBE [89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA]中の 12% 尿素変性 PAGE により分離した。RPA 存在下におけるヌクレアーゼアッセイでは、精製したヒト RPA(12.5、25、50 及び 75 nM)とストランド 1 の 5´端を <sup>32</sup>P で放射性標識された 5´-flap DNA(1 µM)を、9 µL の反応溶液 [22 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM Bis-Tris propane (pH 7.5), 30 mM NaCl, 10 mM KCl, 0.1 mg/mL BSA, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 0.1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5.2 mM DTT, 3% glycerol]中で混合し、37°Cで 10 分間温置した。続いて、反応溶液に 2 nM の hFAN1 を 1 µL 加え、37°Cで 10 分間反応さ

せた。その後、上述した方法で除タンパク質処理を行ない、反応物を1×TBE中の12%尿素変性PAGEにて展開した。ゲルをイメージングプレートに露光し、DNAバンドはFLA-7000イメージングアナライザー(Fujifilm)を用いて検出した。バンドの定量はImage Gaugeソフトウェア(Fujifilm)を用いて行なった。

#### 2-2-6. ゲルシフトアッセイ

精製したRPA(12.5、25、50及び75 nM)とストランド1の5'端を<sup>32</sup>Pで放射性標識された5'-flap DNA(1 μM)を、10 μLの反応溶液[22 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM Bis-Tris propane (pH 7.5), 30 mM NaCl, 10 mM KCl, 0.1 mg/mL BSA, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 0.1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5.2 mM DTT, 3% glycerol]中で混合し、37°Cで10分間温置した。反応物を0.2×TBE [18 mM Tris-borate, 0.4 mM EDTA]中の6% PAGEにより分離し、ゲルをイメージングプレートに露光した。DNAバンドはFLA-7000イメージングアナライザーを用いて可視化し、バンドの定量はImage Gaugeソフトウェアを用いて行なった。

### 2-3. 実験結果

#### 2-3-1. ヒトFAN1ヌクレアーゼの精製

FAN1は、これまで、昆虫細胞・バキュロウイルスによる発現系を用いてリコンビナントタンパク質として精製され、生化学的解析が行なわれてきた(Liu *et al.*, 2010、Kratz *et al.*, 2010、MacKay *et al.*, 2010、Pizzolato *et al.*, 2015)。しかし、昆虫細胞を用いた精製系では、リコンビナントタンパク質に非特異的な翻訳後修飾が導入される可能性が高い。この問題を解決するために、本研究では大腸

菌発現系を用いた hFAN1 の精製系を確立した(図 5)。このタンパク質発現系では、hFAN1 は、その N 末端に His<sub>6</sub>-Smt3 タグが融合したタンパク質として産生される(図 5B) (Ichikawa *et al.*, 2013)。N 末端側の His<sub>6</sub>-Smt3 タグは目的タンパク質の可溶性を上昇させる。このタグの直後の C 末端側には PreScission Protease の認識配列があるため、PreScission Protease によって精製過程で His<sub>6</sub>-Smt3 タグを除去することができる (図 5B)。本精製系を用いて、野生型 hFAN1 及びヌクレアーゼの活性中心である 960 番目のアスパラギン酸残基をアラニンに置換した hFAN1 D960A 変異体を精製した結果を図 5C に示す。図 5C より、両タンパク質がそれぞれ高い純度で精製されていることが確認された。

### 2-3-2. 大腸菌発現系を用いて精製したヒト FAN1 のヌクレアーゼ活性の解析

大腸菌発現系を用いて精製した野生型 hFAN1 が、既報の昆虫細胞・バキュロウイルスによる発現系を用いて精製した FAN1 と同様の活性を有するかを確認するため、ヌクレアーゼアッセイを用いて本研究で精製した FAN1 のヌクレアーゼ活性を評価した (図 6)。この試験法では、精製した hFAN1 と <sup>32</sup>P で放射性標識した 5'-flap DNA(図 6A)を、マンガニンイオン存在下において温置した後、proteinase K を用いて除タンパク質処理を行なった。その後、DNA 反応産物を、尿素変性ポリアクリルアミドゲルを用いて変性条件下で分離し、解析を行った (図 6B)。大腸菌発現系を用いて精製した hFAN1 のヌクレアーゼアッセイの解析結果を図 6C に示す。ストランド 1 の 5'端を <sup>32</sup>P で放射性標識した 5'-flap DNA と hFAN1 を反応させると、31 ヌクレオチドマーカより大きな単鎖 DNA フラグメントが検出された(図 6C レーン 3-5)。その一方で、ストランド 2 の 5'端を

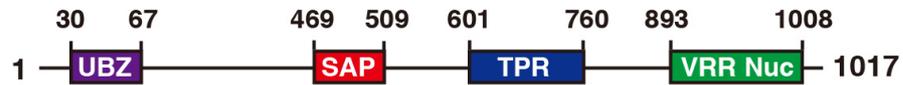
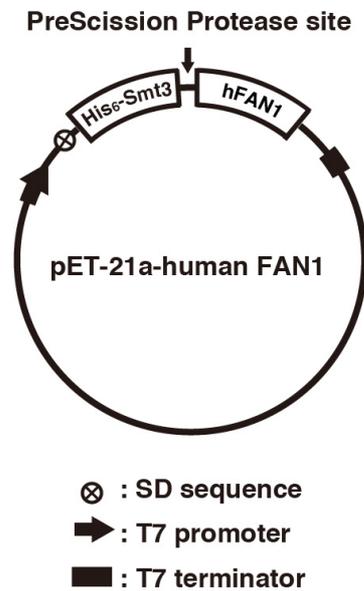
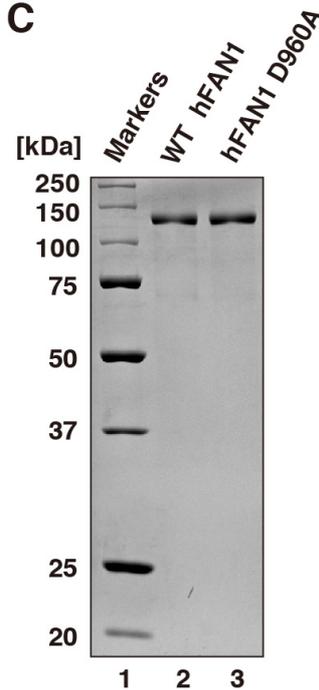
**A****B****C**

図 5. hFAN1 スクレーアーゼの精製

(A) hFAN1 のドメイン図を示す。UBZ、SAP、TPR 及び VRR Nuc はそれぞれ、ubiquitin binding finger 4、SAF-A/B、Acinus and PIAS、tetratricopeptide 及び viral replication and repair nuclease ドメインを示す(Takahashi, D., *et al.*, 2015 Fig.1A より引用)。

(B) hFAN1 発現ベクターの模式図を示す。この発現システムでは、hFAN1 の N 末端側に His<sub>6</sub>-Smt3 タグが付加されている(Takahashi, D., *et al.*, 2015 Fig.1B より一部改変)。

(C) 野生型 hFAN1(レーン 2)及び hFAN1 D960A 変異体(レーン 3)を 12% SDS-PAGE で展開し、タンパク質をクーマシーブリリアントブルーで検出した(Takahashi, D., *et al.*, 2015 Fig.1C より引用)。

$^{32}\text{P}$  で放射性標識した 5'-flap DNA と hFAN1 の反応産物には、hFAN1 の DNA 切断反応によって生じる単鎖 DNA フラグメントは検出されなかった(図 6C レーン 8-10)。以上から、大腸菌発現系により精製した hFAN1 は、5'-flap DNA において、分岐点に隣接するストランド 1 の二重鎖 DNA 領域に対し強いエンドヌクレアーゼ活性を有することが示唆された。この反応が、精製タンパク質中に存在する夾雑物の活性に由来する可能性を排除するため、コントロール実験として、ヌクレアーゼ活性を失うことが報告されている hFAN1 D960A 変異体を用いて、ヌクレアーゼアッセイによる解析を行なった。その結果、hFAN1 D960A 変異体はストランド 1 及び 2 に対しエンドヌクレアーゼ活性を示さなかった。したがって、野生型 hFAN1 のストランド 1 に対するエンドヌクレアーゼ活性は、本研究で精製した hFAN1 由来による活性であることを明らかにした。この結果は、昆虫細胞・バキュロウイルスによる発現系を用いて精製した hFAN1 の過去の解析とよく一致する(Liu *et al.*, 2010、Kratz *et al.*, 2010、MacKay *et al.*, 2010)。以上から、大腸菌発現系を用いて精製した hFAN1 は、既報の活性と同様の活性を有することが明らかになった。

### 2-3-3. RPA が結合した DNA 基質に対するヒト FAN1 のヌクレアーゼ活性の解析

ICL 修復において、DNA 複製の停止により形成された 5'-flap 構造の単鎖領域には、FAN1 の集積より先に RPA が結合することが明らかになっている(Long *et al.*, 2011)。このことから、RPA は FAN1 のヌクレアーゼ活性に影響を与えることが示唆された。そのため、RPA が FAN1 のヌクレアーゼ活性に与える影響を解析するため、まず RPA をリコンビナントタンパク質として精製し(図 7A)、続

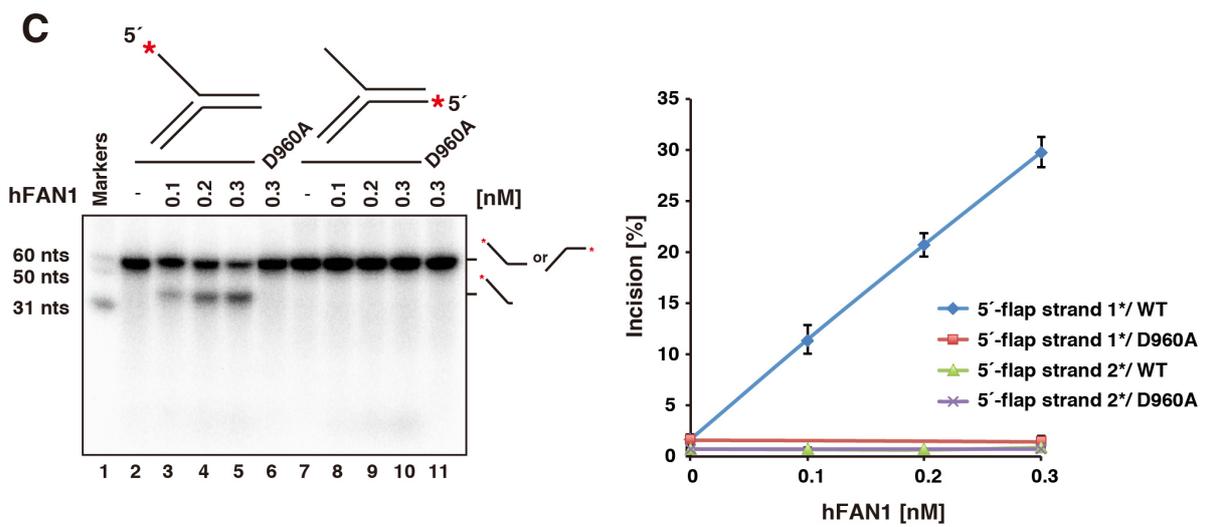
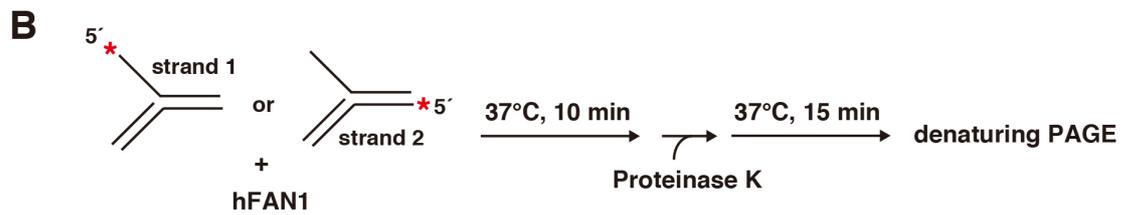
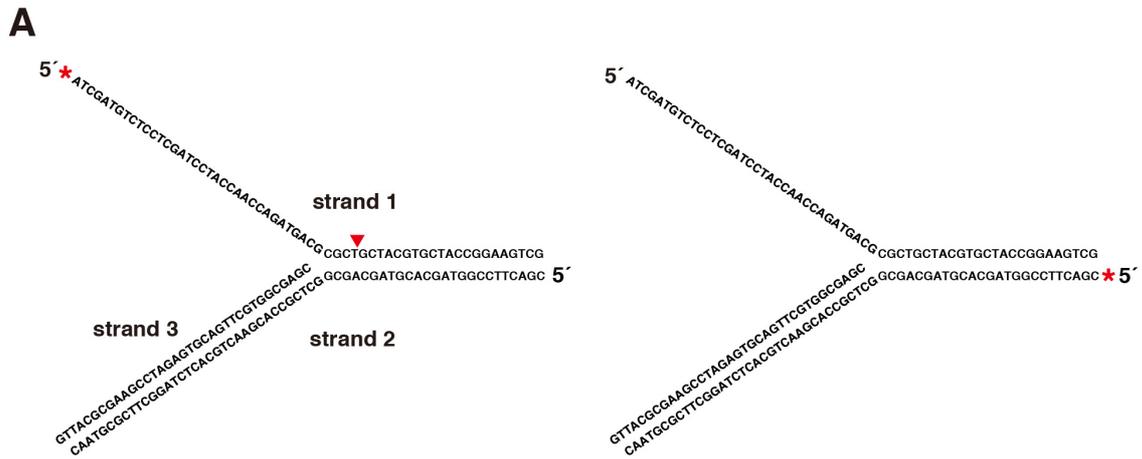


図 6. hFAN1 のヌクレアーゼ活性の解析

(A) 本実験で用いた 5'-flap DNA を示す。<sup>32</sup>P で放射性標識したストランド 1 またはストランド 2 の 5'端を赤のアスタリスクで示す。赤矢頭は FAN1 による切断部位を示し、単鎖/二重鎖 DNA の分岐点から 3-4 塩基下流を切断すると予想される。

(B) ヌクレアーゼアッセイの実験手順を示す。hFAN1 と <sup>32</sup>P で放射性標識した 5'-flap DNA を、マンガンイオン存在下において反応させた。その後、proteinase K を用いて除タンパク質処理を行なった。反応産物は 12%尿素変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で展開した(Takahashi, D., *et al.*, 2015 Fig.2A より引用)。

(C) hFAN1(0、0.1、0.2 及び 0.3 nM)と、ストランド 1(レーン 2-5)またはストランド 2(レーン 7-10)の 5'端を <sup>32</sup>P で放射性標識した 5'-flap DNA(1 μM)を反応させた。レーン 1 はオリゴヌクレオチドマーカを示す。ネガティブコントロールとして hFAN1 を反応系に加えずに実験を行った(レーン 2 及びレーン 7) (Takahashi, D., *et al.*, 2015 Fig.2B より引用)。右図にその定量結果を示す。hFAN1 のエンドヌクレアーゼ活性により切り込まれた DNA 量をグラフで示した。実験は独立して 3 回行い、標準偏差とともに測定値の平均をグラフに示した(Takahashi, D., *et al.*, 2015 Fig.2C より一部改変)。

いてゲルシフトアッセイを用いて、RPA が反応系に存在する全ての 5'-flap DNA に結合する条件を探索した。その結果、RPA の濃度が 50 nM 及び 75 nM の条件において、RPA は全ての 5'-flap DNA に結合することが明らかになった(図 7B レーン 4, 5 及び図 7C)。RPA の濃度が 75 nM の条件では、5'-flap DNA のバンドシフトが 2 段階にわたって観察された(図 7B レーン 5)。これは、1 分子の 5'-flap DNA に対し、1 分子及び 2 分子の RPA が結合したものと考えられる。また、5'-flap DNA に 1 分子の RPA が結合した時に比べ、2 つ目の RPA が結合した際のバンドの移動度の変化はわずかであった(図 7B レーン 5)。これは、2 つ目の RPA が結合した際に生じた 5'-flap DNA の立体構造の変化が、1 分子の RPA が結合した際に生じたものより小さかったためと考えられる。次に RPA 存在下における FAN1 のヌクレアーゼ活性を解析した (図 8A) 。この解析では、ストランド 1 の 5'端を  $^{32}\text{P}$  で放射性標識した 5'-flap DNA と精製した RPA(図 8B レーン 2)を温置し、その後、hFAN1 を加えることで反応を開始させた(図 7B)。その結果、RPA 存在下においても hFAN1 は 5'-flap DNA のストランド 1 を切断できることが明らかになった(図 8B レーン 4-7)。RPA が全ての 5'-flap DNA に結合した条件においても、hFAN1 の DNA の切断活性は、RPA 非存在下に比べ、60%程度の効率を維持していた (図 8B レーン 7)。これらの結果より、hFAN1 は、RPA が結合した 5'-flap DNA を効率よく認識し、DNA を切断できることが明らかになった。

## 2-4. 考察

ICL で DNA 複製装置が停止すると、リーディング鎖の合成が ICL の 1 塩基隣まで行なわれ、損傷部に 5'-flap 構造が形成されることが報告されている(Räschle

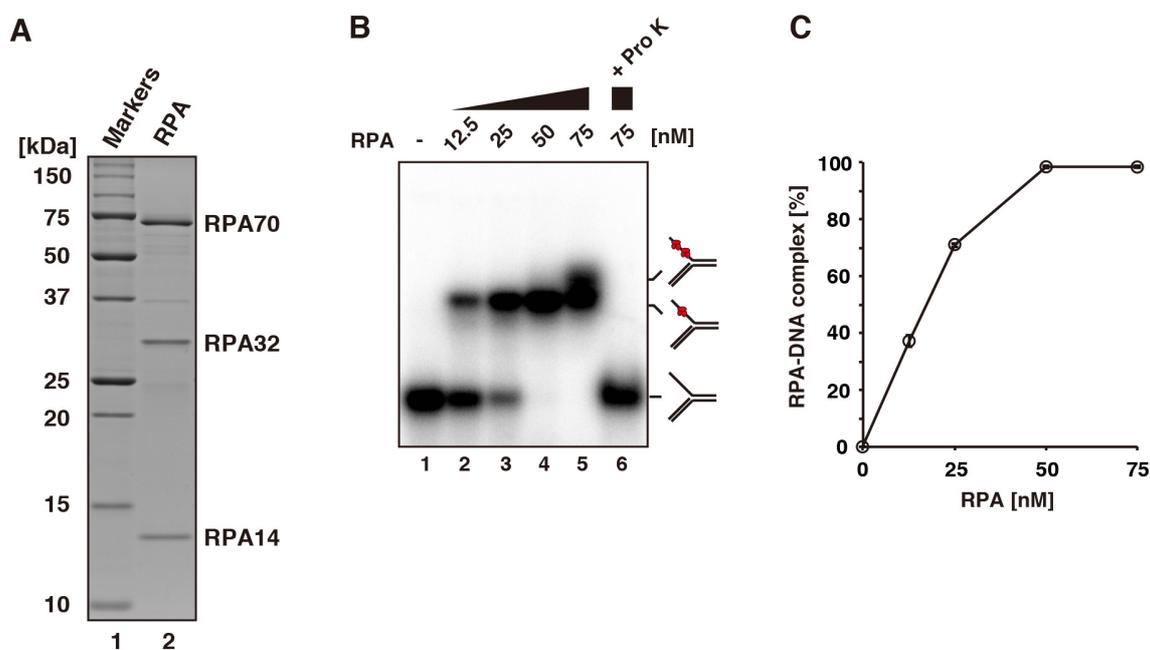


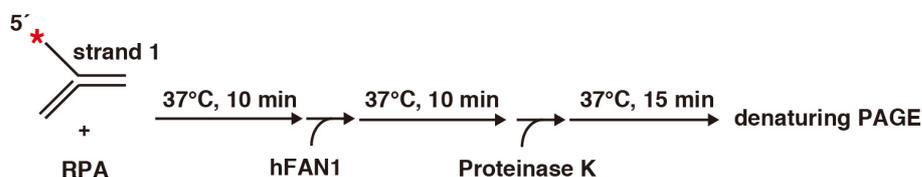
図 7. RPA の DNA 結合活性の解析

(A) 精製した RPA を 15% SDS-PAGE で展開し、タンパク質をクーマシーブリリアントブルーで検出した(レーン 2) (Takahashi, D., *et al.*, 2015 Fig.3A より引用)。

(B) RPA(0、12.5、25、50 及び 75 nM)と、ストランド 1 の 5'端を  $^{32}\text{P}$  で放射性標識した 5'-flap DNA(1  $\mu\text{M}$ )を反応させた。コントロール実験として、RPA と DNA を反応させた後、proteinase K を用いて除タンパク質処理を行なった(レーン 6)。反応産物を 6%非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で展開し、解析した(Takahashi, D., *et al.*, 2015 Fig.4A より引用)。

(C) パネル B で行った実験を定量したグラフを示す。RPA が 5'-flap DNA に結合した量をプロットしグラフ化した。実験は独立して 3 回行い、標準偏差とともに測定値の平均をグラフに示した(Takahashi, D., *et al.*, 2015 Fig.4B より引用)。

**A**



**B**

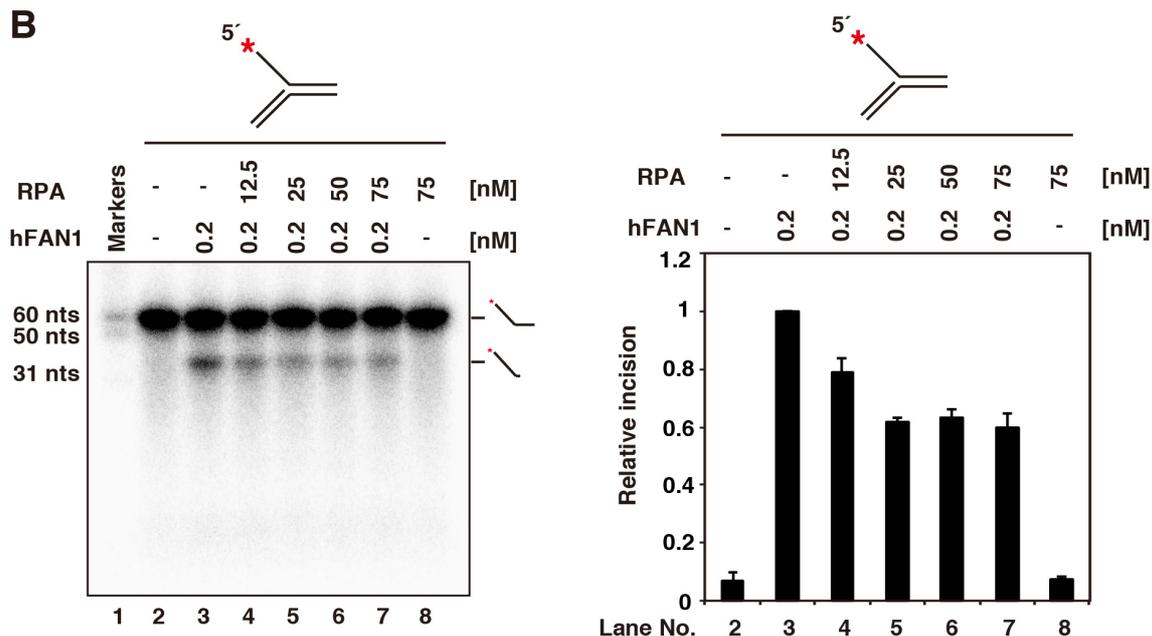


図 8. RPA 存在下における hFAN1 のヌクラーゼ活性の解析

(A) RPA 存在下におけるヌクラーゼアッセイの実験手順を示す。RPA とストランド 1 の 5' 端を <sup>32</sup>P で放射性標識した 5'-flap DNA を反応させた後、hFAN1 を加えて DNA 切り込み反応を開始させた。その後、proteinase K を用いて除タンパク質処理を行ない、反応産物を 12% 尿素変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で展開した。アスタリスクはストランド 1 の 5' 端の <sup>32</sup>P を示す(Takahashi, D., *et al.*, 2015 Fig.3B より引用)。

(B) hFAN1(0 及び 0.2 nM) とストランド 1 の 5' 端を <sup>32</sup>P で放射性標識した 5'-flap DNA(1 μM) を、RPA 存在下(0、12.5、25、50 及び 75 nM) において反応させた。ネガティブコントロールとして hFAN1 を反応系に加えずに実験を行った(レーン 8) (Takahashi, D., *et al.*, 2015 Fig.3C より引用)。右図に定量したグラフを示す。hFAN1 により切り込まれた DNA 量の、RPA 非存在下におけるその相対値をグラフで示した。実験は独立して 3 回行い、標準偏差とともに測定値の平均をグラフに示した(Takahashi, D., *et al.*, 2015 Fig.3D より引用)。

*et al.*, 2008, Knipscheer *et al.*, 2009)。また、この基質の単鎖 DNA 領域には、RPA が直ちに結合することが明らかになっている (Michael, *et al.*, 2000, Walter, 2000, Long *et al.* 2011) 。このことから、FAN1 は RPA が結合した 5'-flap 構造上で機能することが考えられた。本研究では、RPA が結合した 5'-flap DNA に対し、hFAN1 ヌクレアーゼは効率的に DNA を切断することが可能であることを示した。これは、FAN1 が 5'-flap DNA の単鎖領域を認識しているのではなく、5'-flap DNA の二重鎖 DNA 領域を主に認識していることを示している。また、25-75 nM RPA 存在下では、FAN1 による 5'-flap DNA の切断効率が、RPA 非存在下と比較して 40%程度低下していた(図 8C レーン 5-7)。これは、RPA が、5'-flap DNA の単鎖 DNA/二重鎖 DNA 分岐点近傍の単鎖 DNA に結合し、FAN1 の 5'-flap DNA へ結合が一部阻害されたためと考えられる。以上のことは、近年明らかにされた 5'-flap DNA に結合した hFAN1 の結晶構造と矛盾しない(Wang *et al.*, 2014)。この結晶構造中では、hFAN1 は 5'-flap DNA の単鎖 DNA/二重鎖 DNA 分岐点近傍の二重鎖 DNA 領域を主に認識し、単鎖領域で認識している塩基は分岐点に隣接する 1 塩基だけであった。これより、hFAN1 は、RPA が単鎖 DNA 領域に結合した 5'-flap DNA に対しても、報告された結晶構造と同様に 5'-flap DNA を認識し、RPA と立体障害を起こすことなく、5'-flap DNA を切断するモデルが考えられる(図 9)。FAN1 は、5'-flap DNA の単鎖 DNA/二重鎖 DNA 分岐点から 3-4 塩基離れた、二重鎖 DNA 領域の 1 箇所だけを切断する(図 9)(MacKay *et al.*, 2010, Kratz *et al.*, 2010, Smogorzewska *et al.*, 2010, Pizzolato *et al.*, 2015)。そのため、架橋塩基を切り出すには、単鎖 DNA/二重鎖 DNA 分岐点近傍のもう 1 箇所で、DNA が切断される必要がある。事実、5'-flap DNA の単鎖 DNA/二重鎖 DNA 分岐点近

傍を切断するヌクレアーゼに SLX1-SLX4 複合体が報告されており(Fricke and Brill, 2003)、FAN1 は他のヌクレアーゼと協調して、架橋塩基の切り出しに関与していることが考えられる。

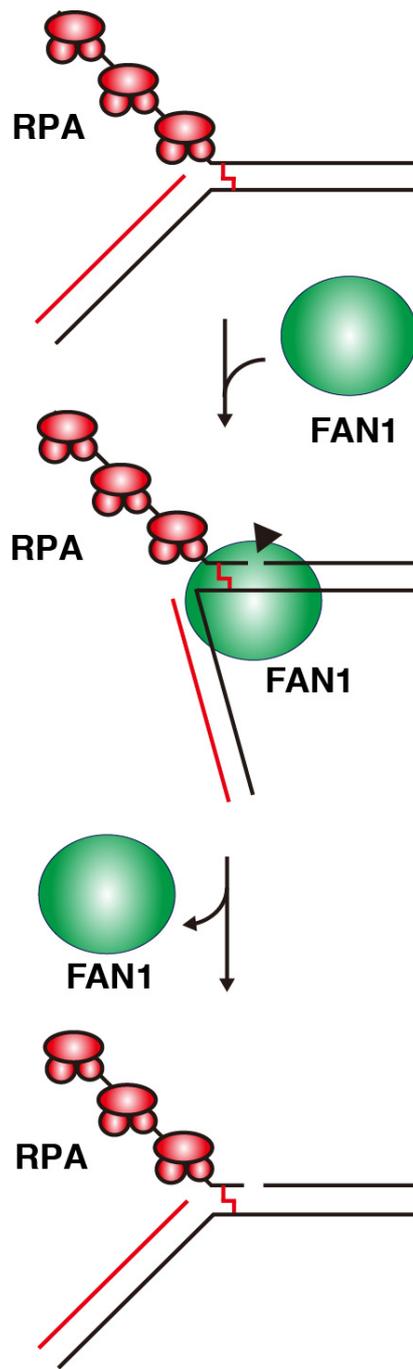


図 9. 停止した複製フォークにおける FAN1 の DNA 切断モデル

DNA 複製装置が ICL に衝突し、進行が停止すると、5'-flap DNA が形成される。RPA は 5'-flap DNA の単鎖 DNA 領域に集積する。FAN1 は、単鎖 DNA と結合した RPA と立体障害を起こすことなく 5'-flap DNA を正確に認識し、架橋された塩基を切り出す。矢頭は FAN1 による DNA の切断箇所を示す(Takahashi, D., *et al.*, 2015 Fig.5 より一部改変)。

## 第3章 ヒト FANCI 及びヒト FANCD2 の新規精製系の確立

### 3-1. 序

FAN1 は、ICL 近傍に集積したモノユビキチン化 ID 複合体によって損傷部にリクルートされる (Liu *et al.*, 2010、Kratz *et al.*, 2010、MacKay *et al.*, 2010、Smogorzewska *et al.*, 2010)。このことは、FAN1 と ID 複合体は、協調して架橋塩基を切り出すことを示唆している。しかし、ID 複合体が FAN1 の活性に及ぼす影響は未だ不明な点が多い。

ヒト FANCI(hFANCI)及びヒト FANCD2(hFANCD2)はそれぞれ、1,328 アミノ酸及び 1,451 アミノ酸からなる高分子量のタンパク質である(Timmers *et al.*, 2001、Smogorzewska *et al.*, 2007)。そのため、リコンビナント hFANCI タンパク質及び hFANCD2 タンパク質の精製は、これまで昆虫細胞・バキュロウイルスによる発現系を用いて行われてきた(Park *et al.*, 2005、Alpi *et al.*, 2008、Longerich *et al.*, 2009、Roques *et al.*, 2009、Yuan *et al.*, 2009、Joo *et al.*, 2011、Longerich *et al.*, 2014、Sato *et al.*, 2012b)。しかし、この精製系では、目的タンパク質に無秩序な翻訳後修飾が導入される可能性がある。そのため、精製タンパク質を用いた生化学的解析の結果は、そのタンパク質が本来有する機能を反映していないことが考えられる。また、真核細胞を発現宿主にしているため、機能解析を行なう際に、宿主由来の因子によるコンタミネーションの影響を排除することが困難である。大腸菌では、リン酸化などの翻訳後修飾は起こらず、加えて、FANCI 及び FANCD2 のオルソログは大腸菌には存在しないため、発現宿主に大腸菌を用いることで、これらの問題を解決できると考えた。そこで、本研究では大腸菌発現系を用いた hFANCI 及び hFANCD2 の精製系を新たに構築した。本章では、まず実験方法

について述べ、その後、大腸菌発現系を用いた hFANCI 及び hFANCD2 タンパク質の生化学的解析結果について述べる。

## 3-2. 実験方法及び材料

### 3-2-1. ヒト FANCI 及びヒト FANCD2 タンパク質発現系の構築

hFANCI タンパク質の発現には、*hFANCI* 遺伝子を pET21a ベクターの *NdeI-BamHI* 制限酵素切断部位に挿入したものをを用いた。His<sub>6</sub>-SUMO 配列を *hFANCI* 遺伝子上流に挿入し、N 末端側に His<sub>6</sub>-SUMO タグが融合した hFANCI タンパク質が発現されるように設計した。N 末端側の His<sub>6</sub>-SUMO タグは PreScission Protease で切除が可能である。hFANCD2 タンパク質の発現には、*hFANCD2* 遺伝子を pET15b ベクターの *NdeI-XhoI* 制限酵素切断部位に挿入したものをを用いた。hFANCI 及び hFANCD2 発現プラスミドの増幅には XL10-Gold 株 (Agilent Technologies)を用い、菌体は 30°Cで培養した。昆虫細胞・バキュロウイルスを用いた hFANCD2 の発現には、Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Invitrogen)を用いてバキュロウイルスを作製した。*NdeI-XhoI* 制限酵素切断部位に *hFANCD2* 遺伝子を挿入した pFastBac ベクターを用いて DH10Bac 株 (Invitrogen)を形質転換し、N 末端に His<sub>6</sub> タグが融合した *hFANCD2* 遺伝子を有するバクミドを精製した。次に、*hFANCD2* 遺伝子を有するバキュロウイルスを作製するため、このバクミドを Cellfectin Reagent (Invitrogen)を用いて、Sf9 昆虫細胞 (Invitrogen)に遺伝子導入した。*hFANCI* 及び *hFANCD2* 遺伝子は高田穰博士(京都大学)より供与いただいた。

### 3-2-2. 大腸菌発現系を用いたヒト FANCI の精製

*hFANCI* 遺伝子が挿入された pET21a ベクターを、BL21(DE3) codon(+)*RIL* 株に取り込ませ、100 µg/mL ampicillin 及び 35 µg/mL chloramphenicol を含む LB プレート上で 20-30 時間培養した。この菌体を、50 µg/mL ampicillin 及び 17.5 µg/mL chloramphenicol を添加した 10 L の LB に植菌し、OD<sub>600</sub> 値が 0.8 になるまで 30°C で震盪培養した。その後、終濃度 0.5 mM IPTG を加え、18°C で 18-20 時間震盪培養した。培養した菌体は遠心分離により集菌し、60 mL のバッファーA で懸濁した後、超音波破碎を行なった。その後、30 分間の遠心分離(27,200×g)により、破碎液を可溶性画分と不溶性画分に分けた。バッチ法を用いて、可溶性画分と 3 mL の Ni-NTA agarose レジンを 4°C で 1 時間混合した。その後、エコノカラム (Bio-Rad) にタンパク質が結合した Ni-NTA agarose レジンを充填し、150 mL のバッファーA で洗浄した。タンパク質の溶出は、12-400 mM imidazole を含むバッファーA (60 mL) を用いた線形勾配により行った。N 末端側の His<sub>6</sub>-SUMO タグを取り除くため、30 mL の溶出画分に含まれるタンパク質 1 mg あたり 15 unit の PreScission Protease を添加した。その後、試料を 2 L のバッファーC [20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 5 mM 2-ME, 10% glycerol] に対し 12 時間透析した。その後、再度 2 L のバッファーC に対し、3 時間透析を行なった。透析後、40 mL のバッファーC で平衡化した 2mL の Heparin Sepharose CL-6B カラム (GE Healthcare) にタンパク質を負荷し、260 mM NaCl を含むバッファーC (120 mL) を用いて洗浄した。タンパク質の溶出は、260-500 mM NaCl を含むバッファーC (40 mL) を用いた線形勾配により行った。20 mL の溶出したタンパク質は 1.5 mg/mL まで濃縮し、1L のバッファーB に対して 3 時間透析を行なった。透

析後、タンパク質は 10  $\mu$ L ずつに分注して、-80 $^{\circ}$ C で保存した。BSA を標準タンパク質に用いた Bradford 法により、精製タンパク質の定量を行った(Bradford, 1976)。

### 3-2-3. 大腸菌発現系を用いたヒト *FANCD2* の精製

*hFANCD2* 遺伝子を組み込んだ pET15b ベクターを、BL21(DE3) codon(+)*RIL* 株に取り込ませ、100  $\mu$ g/mL ampicillin 及び 35  $\mu$ g/mL chloramphenicol を含む LB プレート上で 20-30 時間培養した。この菌体を、50  $\mu$ g/mL ampicillin 及び 17.5  $\mu$ g/mL chloramphenicol を添加した 20 L の LB に植菌し、OD<sub>600</sub> の値が 0.6 になるまで 30 $^{\circ}$ C で震盪培養を行った。その後、終濃度 0.5 mM IPTG を加え、16 $^{\circ}$ C で 18-20 時間、震盪培養した。培養した菌体は遠心分離により集菌し、60 mL のバッファー A で懸濁した。その後、超音波破碎を行ない、30 分間の遠心分離(27,200 $\times$ g)により、破碎液を可溶性画分と不溶性画分に分けた。バッチ法を用いて、可溶性画分と 3 mL の Ni-NTA agarose レジンを 4 $^{\circ}$ C で 1 時間混合した。その後、エコノカラム (Bio-Rad) にタンパク質が結合した Ni-NTA agarose レジンを充填し、200 mL のバッファー A で洗浄した。タンパク質は、12-400 mM imidazole を含むバッファー A (60 mL) を用いた線形勾配により溶出した。N 末端側の His<sub>6</sub> タグを取り除くため、30 mL の溶出画分に含まれるタンパク質 1 mg あたり 2 unit の thrombin protease (GE Healthcare) を加え、試料を 2 L のバッファー B に対して 12 時間透析を行なった。その後、再度 2 L のバッファー C に対し、3 時間透析を行なった。透析後、50 mL のバッファー B で平衡化した 2.5 mL の Q Sepharose Fast Flow カラムにタンパク質を負荷し、150 mL の 250 mM NaCl を含むバッファー B を用いて洗浄した。

タンパク質の溶出は、250-450 mM NaCl を含むバッファーB (50 mL)を用いた線形勾配により行った。溶出したタンパク質は、Amicon Ultra-15 Centrifugal 30 K filter Unit を用いて 4 mL まで濃縮した。濃縮した試料を、バッファーB で平衡化した Superdex 200 ゲル濾過カラム(HiLoad 16/60 preparation grade)へ負荷し、120 mL のバッファーB を用いて溶出した。溶出したタンパク質は 1.2 mg/mL まで濃縮し、10  $\mu$ L ずつに分注して、-80°Cで保存した。BSA を標準タンパク質に用いた Bradford 法により、精製タンパク質の定量を行った(Bradford, 1976)。

#### 3-2-4. 昆虫細胞・バキュロウイルス発現系を用いたヒト *FANCD2* の精製

Sf9 昆虫細胞( $1.5 \times 10^6$  細胞/mL; 3 L)に、*hFANCD2* 遺伝子を有するバキュロウイルスを混合し、27°Cで 69 時間震盪培養することで感染させた。培養した細胞は遠心分離により回収し、30 mL のバッファーA で懸濁した後、超音波破碎を行なった。その後、30 分間の遠心分離(27,200 $\times$ g)により、破碎液を可溶性画分と不溶性画分に分けた。バッチ法を用いて、可溶性画分と 3 mL の Ni-NTA agarose レジンを 4°Cで 1 時間混合した。その後、エコノカラムにタンパク質が結合した Ni-NTA agarose レジンを充填し、150 mL のバッファーA で洗浄した。タンパク質の溶出は、15-400 mM imidazole を含むバッファーA (30 mL)を用いた線形勾配により行った。N 末 His<sub>6</sub> タグを取り除くため、30 mL の溶出画分に含まれるタンパク質 1 mg あたり 2 unit の thrombin protease を加え、試料を 2 L のバッファーB に対して 12 時間透析を行なった。その後、再度 2 L のバッファーC に対し、3 時間透析を行なった。透析後、50 mL のバッファーB で平衡化した 2.5mL の Heparin Sepharose CL-6B カラムにタンパク質を負荷し、200 mM NaCl を含むバッ

ファーC (120 mL)を用いて洗浄した。タンパク質の溶出は、200-1000 mM NaClを含むバッファーC (50 mL)を用いた線形勾配により行った。溶出したタンパク質は、Amicon Ultra-15 Centrifugal 30 K filter Unit を用いて 4 mL まで濃縮した。濃縮した試料を、バッファーB で平衡化した Superdex 200 ゲル濾過カラム (HiLoad 16/60 preparation grade)へ負荷し、120 mL のバッファーB を用いて溶出した。溶出したタンパク質は 1 mg/mL まで濃縮し、10  $\mu$ L ずつに分注して、-80°C で保存した。BSA を標準タンパク質に用いた Bradford 法により、精製タンパク質の定量を行った(Bradford, 1976)。

#### 3-2-5. ゲル濾過カラムクロマトグラフィー

大腸菌発現系を用いて精製した hFANCI (11.3  $\mu$ g)、hFANCD2 (11.4  $\mu$ g)及び hFANCI と hFANCD2 の等モル混合物 (22.7  $\mu$ g)を、Superdex 200 10/300 GL ゲル濾過カラム (GE Healthcare)によって分画した。溶出液にはバッファーC を用いた。ピーク画分を 7% SDS-PAGE で分離し、タンパク質は銀染色法によって検出した。Blue dextran 2000 (2,000 kDa)、thyroglobulin (660 kDa)、catalase (232 kDa)、conalbumin (75 kDa)及び chymotrypsinogen (25 kDa)を標準分子質量マーカーとして検量線を作成し、サンプルの分子質量を推定した。

#### 3-2-6. ゲルシフトアッセイ

大腸菌発現系を用いて精製した hFANCI (0.1, 0.2, 0.4, 0.6  $\mu$ M)、hFANCD2 (0.1, 0.2, 0.4, 0.6  $\mu$ M)及び hFANCI-hFANCD2 複合体 (0.06, 0.12, 0.24, 0.36  $\mu$ M)と、ホリデイ構造 DNA (2.5  $\mu$ M)、Y 字構造 DNA (2.5  $\mu$ M)及び二重鎖 DNA (2.5  $\mu$ M)を、

10  $\mu$ L の反応溶液[28 mM Tris-HCl (pH 8.0), 120 mM NaCl, 0.01 mg/mL BSA, 5 mM DTT, 6% glycerol]中で混合し、37°Cで 15 分間反応させた。反応産物を 0.2×TBE 中で 8% PAGE にて展開し、DNA は SYBR Gold (Invitrogen)を用いて検出した。バンドの定量は Image Gauge ソフトウェアを用いて行なった。コントロール実験として、反応物に 2  $\mu$ L の反応停止溶液[1.4% SDS, 8.5 mg/mL proteinase K]を加え、37°Cで 15 分間反応させた後、電気泳動を行なった。

### 3-2-7. ヌクレオソーム形成アッセイ

ヒストン H2A/H2B 複合体(120 ng または 85 ng)とヒストン H3/H4 複合体(120 ng または 85 ng)を hFANCI (0.4, 0.8 及び 1.2  $\mu$ M)、hFANCD2(0.4, 0.8 及び 1.2  $\mu$ M)または hFANCI-hFANCD2 複合体(0.15  $\mu$ M)と、9  $\mu$ L の反応溶液中 [18 mM Tris-HCl (pH 8.0), 67 mM NaCl, 2.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.8 mM DTT, 3.3% glycerol]で混合し、37°Cで 15 分間反応させた。その後、100 ng の弛緩した $\phi$ X174 環状二重鎖 DNA を加え、37°Cで 60 分間温置することで、ヌクレオソーム形成反応を開始させた。弛緩した $\phi$ X174 環状二重鎖 DNA は、18 mM Tris-HCl (pH 8.0)、84 mM NaCl、2 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM EDTA、2.7 mM DTT、8% glycerol を含む反応溶液中に 2 unit の topoisomerase I (Promega)を加え、37°Cで 150 分間反応させることで得た。その後、反応溶液に 60  $\mu$ L の反応停止溶液 [20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA, 0.5% SDS, 0.5 mg/mL proteinase K]を加え、ヌクレオソーム形成反応を停止させた。DNA をフェノール・クロロホルムにより抽出し、エタノール沈殿法により回収した。反応物を 1×TAE [40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA]中の 1%アガロースゲル電気泳動により分離し、DNA は SYBR Gold を用いて検出した。

### 3-3. 実験結果

#### 3-3-1. ヒト *FANCI* 及びヒト *FANCD2* の精製

hFANCI を大腸菌発現系により精製するため、N 末端側に His<sub>6</sub>-SUMO タグが融合したタンパク質が産生される pET21a ベクター(Ichikawa *et al.*, 2013)に、*hFANCI* 遺伝子を挿入したコンストラクトを構築した(図 10B)。この pET21a-*hFANCI* プラスミドを BL21(DE3) codon(+)-RIL 株に導入し、hFANCI の精製を行った。BL21(DE3) codon(+)-RIL 株は、アルギニン、イソロイシン及びロイシンに対するマイナーコドン tRNA(それぞれ *argU*(AGA/AGG)、*ileY*(AUA)及び *leuW*(CUA))を発現するプラスミドを保持し、ヒトのタンパク質を大腸菌内でより効率的に翻訳できる。His<sub>6</sub>-SUMO-hFANCI タンパク質は、18°Cで発現誘導することで、可溶性画分に多く検出された。hFANCI の精製は、図 10C に示す 2 ステップで行った。まず、His<sub>6</sub>-SUMO-hFANCI を Ni-NTA アガロースカラムクロマトグラフィーカラムに通し、溶出画分を回収した(図 10D)。その後、PreScission Protease で処理することによって、目的タンパク質の N 末端側にある His<sub>6</sub>-SUMO タグを取り除いた(図 10E レーン 3)。次に、hFANCI を Heparin Sepharose カラムクロマトグラフィーにより精製(図 9F)することで、hFANCI を得た(図 10G)。この精製法では、10 L 培養あたり 1 mg の hFANCI タンパク質を得ることができた。

hFANCD2 を大腸菌発現系により精製するため、*hFANCD2* 遺伝子を pET15b ベクターに挿入し、pET15b-*hFANCD2* プラスミドを BL21(DE3) codon(+)-RIL 株に導入した。その後 16°Cにおいて大腸菌内で発現誘導を行い、hFANCD2 を N

末端 His<sub>6</sub>-tag 融合タンパク質として発現させた。hFANCD2 の精製は、図 11C に示す 3 つのステップで行った。まず、His<sub>6</sub>-hFANCD2 を Ni-NTA アガロースカラムクロマトグラフィーカラムで精製し、thrombin protease で N 末 His<sub>6</sub> タグを除去した(図 11E レーン 3)。その後、Q Sepharose カラムクロマトグラフィーによる精製を行った(図 11F)。Q Sepharose の溶出画分には夾雑物と思われるバンドが、SDS-PAGE により確認された(図 11F)。これらの位置に対応するバンドは、抗 hFANCD2 モノクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnology, FI17)を用いた解析では検出されなかった。このことから、これらのバンドは、大腸菌由来の夾雑物または抗 hFANCD2 モノクローナル抗体認識部位を持たない hFANCD2 の分解物であることが考えられる(図 11G)。そこで、更にゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより精製した結果、hFANCD2 は赤線で示した容量に溶出され、hFANCD2 を高純度に精製することに成功した(図 11H)。この精製法では、20 L 培養あたり 1 mg の hFANCD2 タンパク質を得ることができた。大腸菌発現系及び昆虫細胞・バキュロウイルス発現系を用いて精製した hFANCD2 タンパク質の純度を、SDS-PAGE により比較したところ、昆虫細胞・バキュロウイルス発現系を用いて精製した hFANCD2 よりも、本研究で確立した方法で精製した hFANCD2 の方が、高純度であることが明らかになった (図 11I 及び 11J)。

### 3-3-2. ヒト FANCI とヒト FANCD2 の物理的相互作用

hFANCI と hFANCD2 は ID 複合体と呼ばれるヘテロ二量体を形成し、細胞内では ICL 近傍に共局在する (Sims *et al.*, 2007, Smogorzewska *et al.*, 2007, Yuan *et al.*, 2009, Joo *et al.*, 2011, Sato *et al.*, 2012b)。そこで、大腸菌発現系を用いて精製し

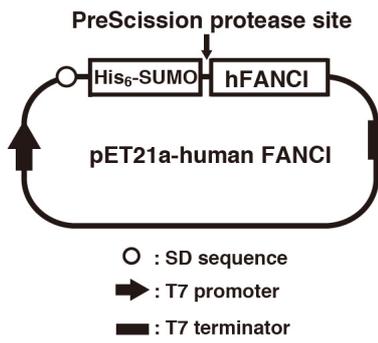
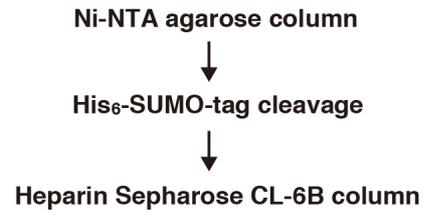
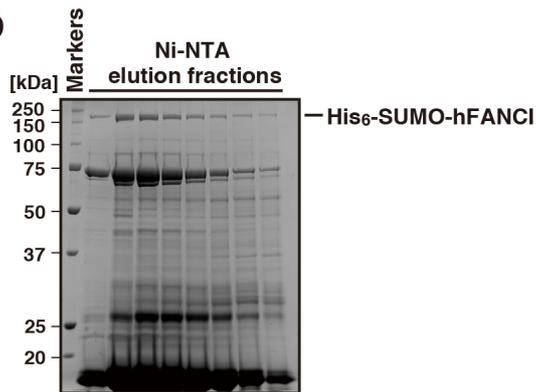
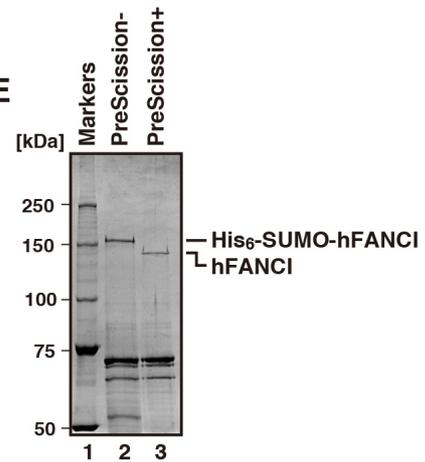
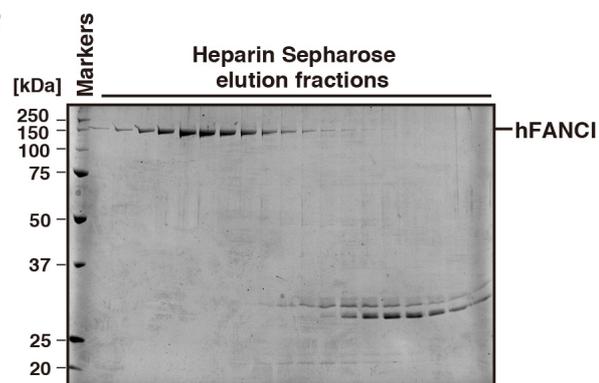
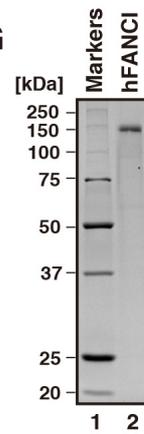
**A****B****C****D****E****F****G**

図 10. hFANCI タンパク質の発現及び精製

(A) hFANCI のドメイン図を示す。S1-Cap、HD1、S2、HD2、S3 及び S4 は、それぞれ、solenoid 1 Cap、solenoid 1、helical domain 1、solenoid 2、helical domain 2、solenoid3 及び solenoid 4 を示す(Takahashi, D., *et al.*, 2014 Fig.1A より一部改変)。

(B) hFANCI 発現ベクターの模式図を示す。この発現システムでは、hFANCI の N 末端側に His<sub>6</sub>-SUMO タグが付加されている(Takahashi, D., *et al.*, 2014 Fig.1B より一部改変)。

(C) hFANCI の精製スキームを示す(Takahashi, D., *et al.*, 2014 Fig.1C より引用)。

(D) Ni-NTA アガロースカラムクロマトグラフィーにより、ヒト His<sub>6</sub>-SUMO-FANCI の粗精製を行った。溶出画分を 12% SDS-PAGE で分離し、ゲルはクーマシーブリリアントブルーで染色した(Takahashi, D., *et al.*, 2014 Fig.1D より引用)。

(E) ヒト His<sub>6</sub>-SUMO-FANCI を含む Ni-NTA アガロースカラムクロマトグラフィー溶出画分を、PreScission Protease で処理した。処理前のサンプル(レーン 2)、処理後のサンプル(レーン 3)を 7%SDS-PAGE で展開し、ゲルはクーマシーブリリアントブルーで染色した(Takahashi, D., *et al.*, 2014 Fig.1E より引用)。

(F) hFANCI を含む Heparin Sepharose カラムクロマトグラフィー溶出画分を、12% SDS-PAGE にて展開した。ゲルはクーマシーブリリアントブルーで染色した(Takahashi, D., *et al.*, 2014 Fig.1F より引用)。

(G)精製した hFANCI (700 ng)を 12% SDS-PAGE で展開後、バンドをクーマシーブリリアントブルーで検出した(Takahashi, D., *et al.*, 2014 Fig.1G より引用)。

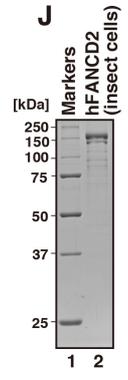
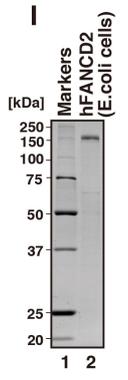
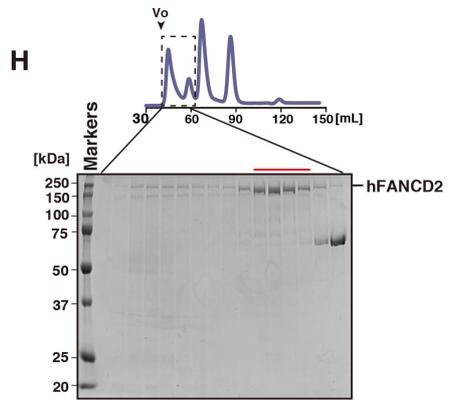
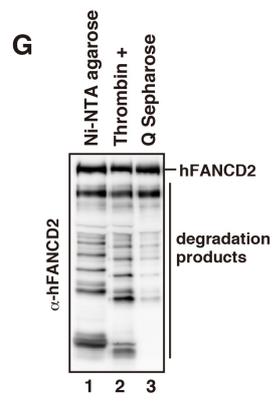
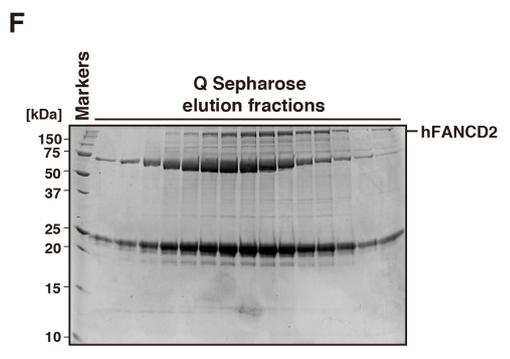
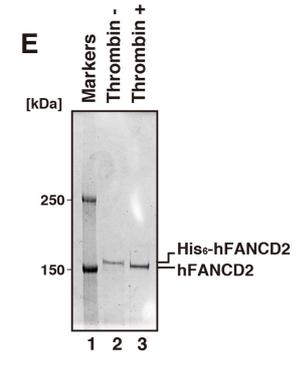
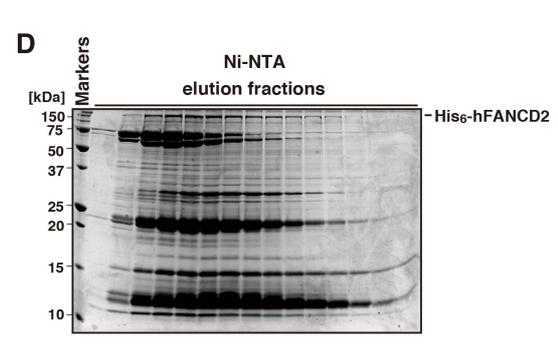
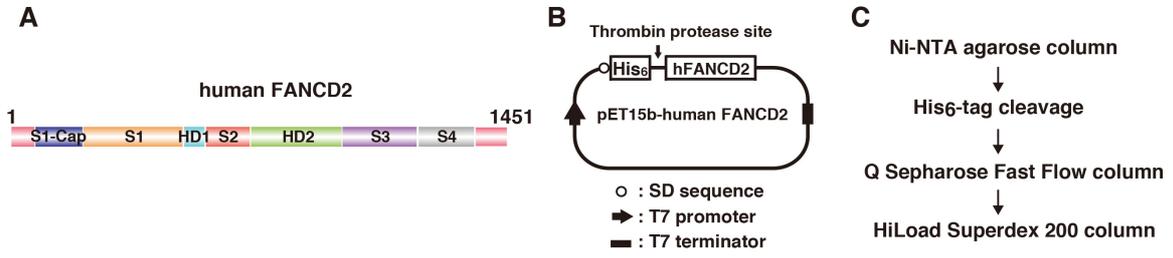


図 11. hFANCD2 タンパク質の発現及び精製

- (A) hFANCD2 のドメイン図を示す。各ドメインは図 10A に示す通りである(Takahashi, D., *et al.*, 2014 Fig.2A より一部改変)。
- (B) hFANCD2 発現ベクターの模式図を示す。この発現システムでは、hFANCD2 の N 末端側に His<sub>6</sub> タグが付加されている(Takahashi, D., *et al.*, 2014 Fig.2B より一部改変)。
- (C) hFANCD2 の精製スキームを示す(Takahashi, D., *et al.*, 2014 Fig.2C より引用)。
- (D) Ni-NTA アガロースカラムクロマトグラフィーにより、ヒト His<sub>6</sub>-FANCD2 の粗精製を行った。溶出画分を 15% SDS-PAGE で展開した後、バンドをクーマシーブリリアントブルーで検出した(Takahashi, D., *et al.*, 2014 Fig.2D より引用)。
- (E) ヒト His<sub>6</sub>-FANCD2 を含む Ni-NTA アガロースカラムクロマトグラフィー溶出画分を、thrombin protease で処理した。処理前のサンプル(レーン 2)、処理後のサンプル(レーン 3)を 5%SDS-PAGE で展開し、ゲルはクーマシーブリリアントブルーで染色した(Takahashi, D., *et al.*, 2014 Fig.2E より引用)。
- (F) hFANCD2 を含む Q Sepharose カラムクロマトグラフィー溶出画分を、15% SDS-PAGE を用いて展開した。ゲルはクーマシーブリリアントブルーで染色した(Takahashi, D., *et al.*, 2014 Fig.2F より引用)。
- (G) ウェスタンブロットによる解析結果を示す。Ni-NTA アガロースカラムクロマトグラフィー溶出画分(レーン 1)、thrombin protease 処理サンプル(レーン 2)、Q Sepharose カラムクロマトグラフィー溶出画分(レーン 3)中に含まれる hFANCD2 を、抗 hFANCD2 抗体で検出した(Takahashi, D., *et al.*, 2014 Fig.2G より引用)。
- (H) ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより hFANCD2 の精製を行った。溶出プロファイルパネルの上部に示す。破線で囲まれた溶出画分を、12% SDS-PAGE にて展開した。ゲルはクーマシーブリリアントブルーで染色し、赤線で示した箇所の画分を回収した。HiLoad 16/60 Superdex 200 preparation grade の排他体積は、溶出プロファイル上に 'Vo' で示した(Takahashi, D., *et al.*, 2014 Fig.2H より一部改変)。
- (I) 大腸菌発現系を用いて精製した hFANCD2 (900 ng)を 12% SDS-PAGE で展開後、バンドをクーマシーブリリアントブルーで検出した(Takahashi, D., *et al.*, 2014 Fig.2I より引用)。
- (J) 昆虫細胞・バキュロウイルス発現系を用いて精製した hFANCD2 (900 ng)を 12% SDS-PAGE で展開後、バンドをクーマシーブリリアントブルーで検出した(Takahashi, D., *et al.*, 2014 Fig.2J より引用)。

た hFANCI と hFANCD2 の相互作用を、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより解析した。hFANCI 及び hFANCD2 は単一のピークで溶出され(図 12A、B)、見かけ上の分子質量はそれぞれ 209 kDa と 279 kDa であった(図 12D)。理論上の分子質量は、hFANCI が 149 kDa、hFANCD2 が 164 kDa である。これらの結果は、hFANCI 及び hFANCD2 は単量体または二量体で溶出されていることを示唆している。また、hFANCI と hFANCD2 を等モル比で混合し、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより解析したところ、見かけ上の分子質量が 370 kDa に対応する単一ピークが得られた(図 12C、D)。このピーク画分を SDS-PAGE で分離したところ、hFANCI と hFANCD2 が 1:1 の割合で含まれていた(図 12C)。このことから、大腸菌発現系を用いて精製した hFANCI と hFANCD2 は、昆虫細胞を用いて精製した hFANCI 及び hFANCD2 同様に、ID 複合体を形成することが明らかになった。

### 3-3-3. ヒト FANCI、ヒト FANCD2 及びヒト ID 複合体の DNA 結合活性

これまでの生化学的な解析により、昆虫細胞・バキュロウイルスによる発現系により精製した hFANCI、hFANCD2、更に hID 複合体はそれぞれ、ホリデイ構造 DNA や Y 字構造 DNA(図 12A)といった、分岐構造を有する DNA に優先的に結合することが、ゲルシフトアッセイを用いた解析により明らかになっている(Park *et al.*, 2005、Longerich *et al.*, 2009、Yuan *et al.*, 2009、Sato *et al.*, 2012a、Longerich *et al.*, 2014)。これらの報告と同様に、分岐構造を持つホリデイ構造 DNA や Y 字構造 DNA に対して、hFANCI(図 13C レーン 2-5 及び D)、hFANCD2(図 13E レーン 2-5 及び F)及び hID 複合体(図 13G レーン 2-5 及び H)は、直鎖状の二

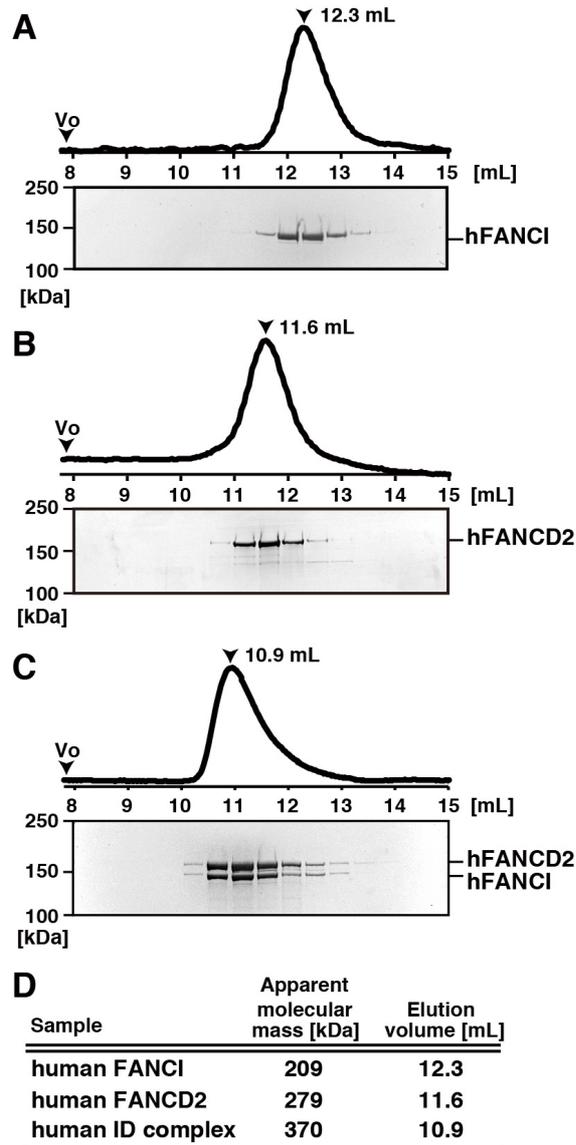


図 12. hFANCI、hFANCD2 及び hID 複合体のゲル濾過解析

(A-C) hFANCI (A)、hFANCD2 (B)及び、hFANCI と hFANCD2 の等モル混合物(C)を、Superdex 200 10/300 GL ゲル濾過カラムで解析した。それぞれの溶出画分を 7% SDS-PAGE で展開し、タンパク質は銀染色法によって検出した。Superdex 200 10/300 GL の排除体積は、溶出プロファイル上に‘Vo’で示した(Takahashi, D., *et al.*, 2014 Fig.3A-C より引用)。

(D) hFANCI、hFANCD2 及び、hID 複合体の見かけ上の分子質量を示す。Blue dextran 2000 (2,000 kDa)、thyroglobulin (660 kDa)、catalase (232 kDa)、conalbumin (75 kDa)及び chymotrypsinogen (25 kDa)を標準タンパク質として、検量線を作成した(Takahashi, D., *et al.*, 2014 Fig.3D より一部改変)。

重鎖 DNA よりも高い親和性を示した。これらの結果より、本研究で精製した hFANCI、hFANCD2 及び hID 複合体は、既報の結果と同様に、分岐構造を有する DNA 基質に高い親和性を有することが明らかになった。

#### 3-3-4. hFANCI、hFANCD2 及び hID 複合体のヌクレオソーム形成活性

ID 複合体は、ヒストン H3/H4 複合体と相互作用し、その DNA 上への着脱を制御するヒストンシャペロン活性を有する(Sato *et al.*, 2012b)。この触媒サブユニットは FANCD2 であり、FANCI がその活性を促進することも明らかにされている。そのため、まず本研究で精製した hFANCD2 が、ヒストンシャペロン活性を有するかどうかを、ヌクレオソームアセンブリーアッセイによって調べた。FANCD2 のヒストンシャペロン活性によってヌクレオソームが形成されると、プラスミド DNA に正の超螺旋が導入される。この正の超螺旋は、topoisomerase I によって解消される。その後、除タンパク質処理を行なうと、プラスミド DNA 上に形成されたヌクレオソームの数に応じて負の超螺旋が誘起される(図 14A)。プラスミド DNA 上の超螺旋の数が多いほど、アガロース電気泳動において、DNA の泳動距離が長くなる。このヌクレオソームアセンブリーアッセイの結果、大腸菌発現系を用いて精製した hFANCD2 により、コアヒストン存在下においてプラスミド DNA の超螺旋の増加が観察された(図 14B レーン 3-5)。これより、大腸菌発現系を用いて精製した hFANCD2 が、ヌクレオソームアセンブリー活性を有することが明らかになった。この活性は、昆虫細胞・バキュロウイルス発現系を用いて精製した hFANCD2 と同程度であることも明らかとなった (図 14C レーン 3-5 及び 8-10)。また、hFANCI はヌクレオソームアセンブリー活性を示

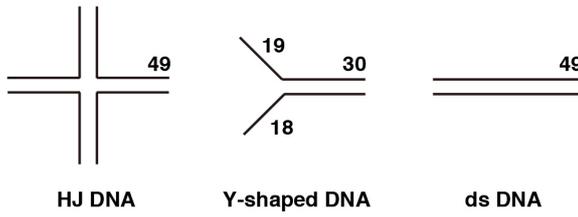
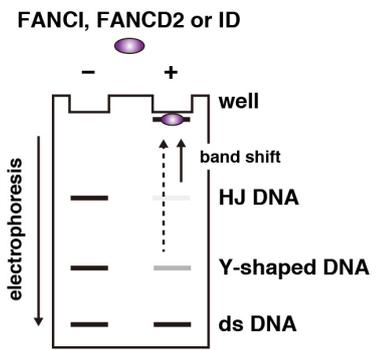
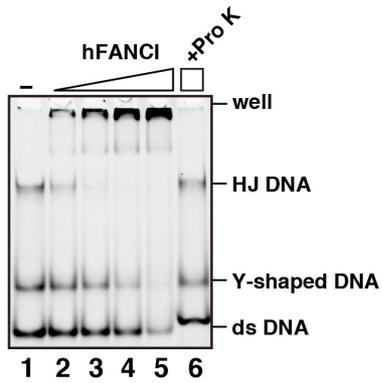
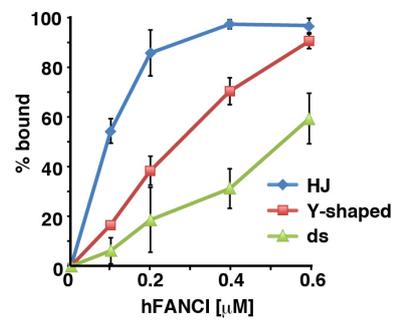
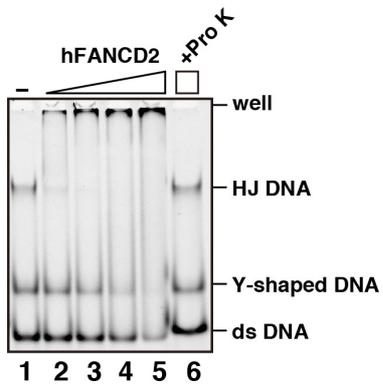
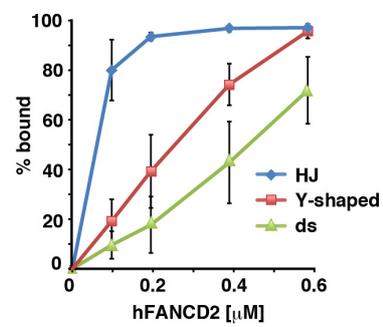
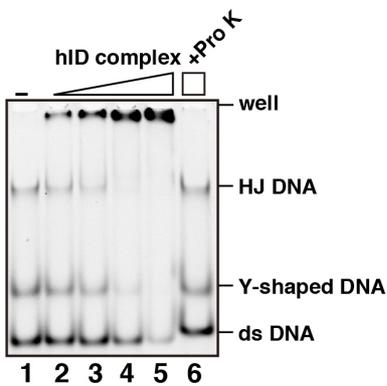
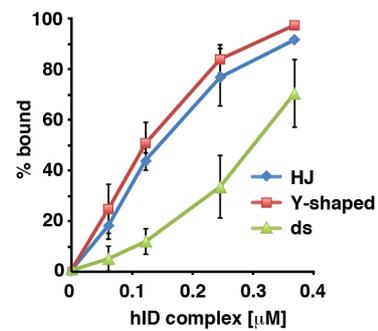
**A****B****C****D****E****F****G****H**

図 13. hFANCI、hFANCD2 及び hID 複合体の DNA 結合活性の解析

(A) ゲルシフトアッセイに用いた各 DNA 基質(HJ DNA: ホリデイ構造 DNA、Y-shaped DNA: Y 字構造 DNA、dsDNA: 二重鎖 DNA)の模式図。数字はヌクレオチド数を示す。

(B) 本研究で用いたゲルシフトアッセイの模式図を示す。HJ DNA、Y-shaped DNA 及び dsDNA 存在下において競合的 DNA 結合活性の解析を行った。DNA(図中では HJ DNA 及び Y-shaped DNA)にタンパク質が結合すると、それぞれの DNA の見かけ上の分子量が大きくなるため、電気泳動度が小さくなる。

(C) hFANCI の競合的 DNA 結合活性の解析。HJ DNA(2.5  $\mu$ M)、Y-shaped DNA(2.5  $\mu$ M)及び ds DNA(2.5  $\mu$ M)と hFANCI(0、0.1、0.2、0.4 及び 0.6  $\mu$ M)を、37°C で 15 分間反応させた(レーン 1-5)。コントロール実験として、hFANCI(0.6  $\mu$ M)を含む反応溶液は、SDS と proteinase K で除タンパク質処理を行なった(レーン 6)。サンプルを 0.2×TBE バッファー中の 8%非変性 PAGE にて展開し、DNA を SYBR Gold 染色で検出した。

(D) (C)で行った実験は独立して 3 回行い、標準偏差とともに測定値の平均をグラフに示した(Takahashi, D., *et al.*, 2014 Fig.4A より引用)。

(E) hFANCD2 の競合的 DNA 結合活性の解析。0、0.1、0.2、0.4 及び 0.6  $\mu$ M の hFANCD2 を用いて、(C)と同様の競合 DNA 的 DNA 結合活性の解析を行なった。

(F) (E)で行った実験を、標準偏差とともに測定値の平均をグラフに示した(Takahashi, D., *et al.*, 2014 Fig.4B より引用)。

(G) hID 複合体の競合的 DNA 結合活性の解析。0、0.06、0.12、0.24 及び 0.36  $\mu$ M の hID 複合体を用いて、(C)と同様の競合 DNA 的 DNA 結合活性の解析を行なった。

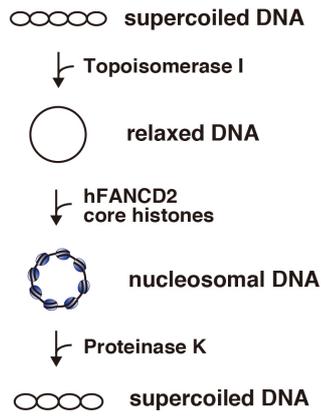
(H) (G)で行った実験を、標準偏差とともに測定値の平均をグラフに示した(Takahashi, D., *et al.*, 2014 Fig.4C より引用)。

さない一方で(図 14B レーン 8-10)、hFANCI は、低濃度における hFANCD2 (150 nM)のヌクレオソームアセンブリー活性を、著しく促進させることが明らかになった(図 14D レーン 3-5)。これらの結果も、昆虫細胞・バキュロウイルス発現系を用いて精製した hFANCI と hFANCD2 の解析結果(Sato *et al.*, 2012b)と一致していた。以上の解析により、大腸菌発現系を用いて精製した hFANCD2 は、昆虫細胞・バキュロウイルス発現系を用いて精製した hFANCD2 と同等のヌクレオソーム形成活性を有しており、大腸菌発現系を用いて精製した hFANCI も、この hFANCD2 のヌクレオソーム形成活性を促進させることが明らかになった。

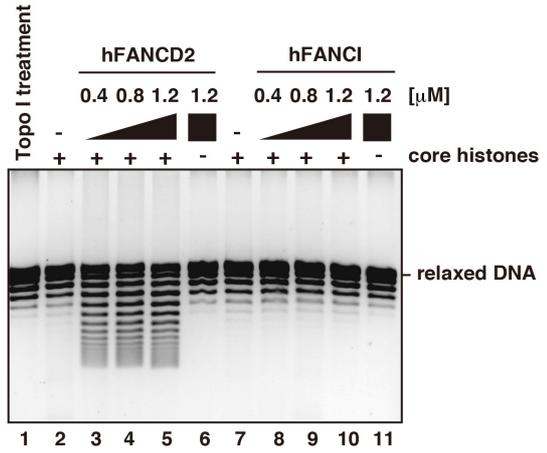
### 3-4. 考察

これまで、hFANCI、hFANCD2 及び hID 複合体の生化学的解析は、昆虫細胞・バキュロウイルス発現系を用いて精製したタンパク質により行なわれてきた(Park *et al.*, 2005、Alpi *et al.*, 2008、Longerich *et al.*, 2009、Roques *et al.*, 2009、Yuan *et al.*, 2009、Joo *et al.*, 2011、Longerich *et al.*, 2014、Sato *et al.*, 2012b)。しかし、真核細胞を発現宿主としているため、目的リコンビナントタンパク質には、非特異的な翻訳後修飾が導入される可能性がある。さらに、精製したタンパク質には、昆虫細胞由来の因子の混入が考えられ、それが解析結果に与える影響を否定することは困難である。本研究では、これらの問題を解決するため、大腸菌発現系を用いた hFANCI 及び hFANCD2 の新規大量発現系を確立した(図 10 及び 11)。また、これらのタンパク質が過去の報告と同様に、ヘテロ二量体を形成すること、分岐構造を有する DNA に優先的に結合することを示した(図 12 及び 13)。また、本研究で精製した hFANCD2 が、既報と同様にヒストンシャペロン活性を

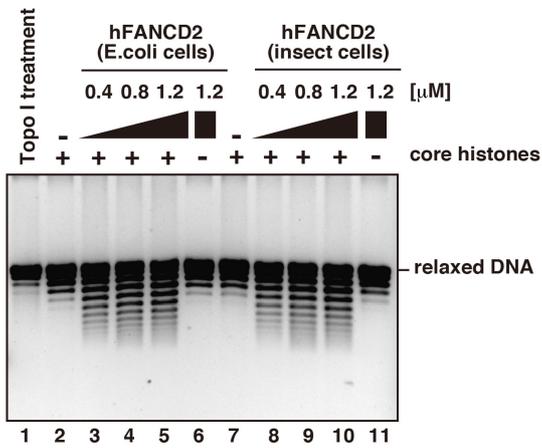
**A**



**B**



**C**



**D**

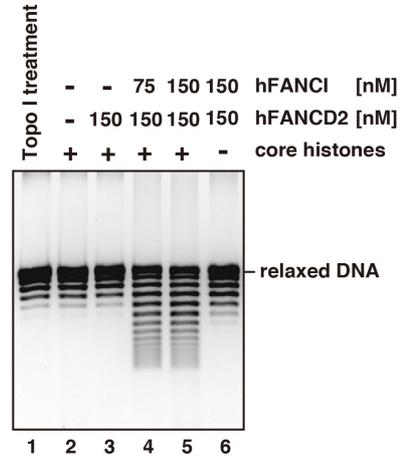


図 14. hFANCI、hFANCD2 及び hID 複合体のヌクレオソームアセンブリー活性の解析

(A) スーパーコイリングアッセイの実験手順を示す。topoisomerase I 存在下において、ヌクレオソームは hFANCD2 または hID 複合体によって、弛緩したプラスミド DNA 上に形成される(Takahashi, D., *et al.*, 2014 Fig.5A より引用)。

(B) hFANCD2(レーン 2-5)または hFANCI(レーン 7-10)を、topoisomerase I 存在下において、弛緩したプラスミド DNA 及びコアヒストンと反応させた。その後、サンプルを除タンパク質処理し、1%アガロース電気泳動により DNA トポアイソマーを分離した。DNA を SYBR Gold 染色によって検出した。ヌクレオソームアセンブリー活性を、プラスミド DNA における超螺旋の密度の変化で評価した。hFANCD2 及び hFANCI の濃度は、0  $\mu\text{M}$ (レーン 2 及び 7)、0.4  $\mu\text{M}$ (レーン 3 及び 8)、0.8  $\mu\text{M}$ (レーン 4 及び 9)、1.2  $\mu\text{M}$ (レーン 5、6、10 及び 11)である(Takahashi, D., *et al.*, 2014 Fig.5B より一部改変)。

(C) 大腸菌発現系を用いて精製した hFANCD2(レーン 2-5)または昆虫細胞・バキュロウイルス発現系を用いて精製した hFANCD2(レーン 7-10)を、topoisomerase I 存在下において、弛緩したプラスミド DNA 及びコアヒストンと反応させた。その後、(B)で示した手順に従い実験を行なった。大腸菌発現系及び昆虫細胞・バキュロウイルス発現系を用いて精製した hFANCD2 の濃度は、0  $\mu\text{M}$ (レーン 2 及び 7)、0.4  $\mu\text{M}$ (レーン 3 及び 8)、0.8  $\mu\text{M}$ (レーン 4 及び 9)、1.2  $\mu\text{M}$ (レーン 5、6、10 及び 11)である(Takahashi, D., *et al.*, 2014 Fig.5C より一部改変)。

(D) hFANCD2 及び hFANCI を、topoisomerase I 存在下において、弛緩したプラスミド DNA 及びコアヒストンと反応させた。その後、(B)で示した手順に従い実験を行なった。hFANCD2 の濃度は 0 nM(レーン 2)及び 150 nM(レーン 3-6)、hFANCI の濃度は 0 nM(レーン 2)、75 nM(レーン 3)及び 150 nM(レーン 5 及び 6)である(Takahashi, D., *et al.*, 2014 Fig.5D より引用)。

有することも明らかにした(図 14)。本精製系の確立に成功した理由として、以下の 2 点が挙げられる。1 つ目に、大腸菌内において、使用頻度が低いコドンを用いてリコンビナントタンパク質を発現させると、翻訳が遅滞し、タンパク質の変性又は誤ったアミノ酸の取り込みが起こる(Kurland and Gallant, 1996、Baca and Hol, 2000)。その結果、目的タンパク質が発現しない、又は、大腸菌内で封入体を形成してしまうため、そのタンパク質の精製が困難なものになる。そこで、アルギニン(AGA/AGG)、イソロイシン(AUA)及びロイシン(CUA)に対するマイナーコドン tRNA 発現ベクターを有する大腸菌株を発現宿主とすることで、それらの問題が解決され、リコンビナント hFANCI 及び hFANCD2 タンパク質を高レベルで発現させることが可能になったと考えられる。2 つ目に、目的タンパク質を低温で発現誘導させると、mRNA の転写及びタンパク質の翻訳速度が低下する。その結果、タンパク質のミスフォールディングが軽減されることで凝集体の形成が起こりにくくなり、タンパク質の可溶性が向上する(Baneyx and Mujacic, 2004)。hFANCI 及び hFANCD2 を 18°C 及び 16°C において発現誘導を行うことで、可溶性が上昇し、これらのタンパク質の大量精製が可能になったと考えられる。今後、コドンの最適化や、hFANCI 及び hFANCD2 を大腸菌内で共発現させ、hID 複合体として精製することで、タンパク質の収量改善が期待される。また、この方法は、これまで精製が困難であった他の高分子量のタンパク質精製への応用が可能であると考えられる。

## 第 4 章 総合討論

本研究では、FAN1 が RPA の結合した停止した複製フォークを認識し、DNA の切断が可能であることを明らかにし、FAN1 による架橋塩基の切り出し反応の一端を解明することができた。FAN1 による架橋塩基対の除去機構をより詳細に明らかにするためには、第 3 章でリコンビナントタンパク質としての新規精製系を確立した ID 複合体が、FAN1 のヌクレアーゼ活性に及ぼす影響を解析する必要がある。FAN1 の損傷部への集積には、FANCD2 のモノユビキチン化と、ユビキチン結合活性を有する FAN1 の UBZ ドメインが必須である(Liu *et al.*, 2010、MacKay *et al.*, 2010、Kratz *et al.*, 2010、Smogorzewska *et al.*, 2010、Shereda *et al.*, 2010)。また、FAN1 は FANCD2 とともに、DNA 複製を阻害する薬剤であるアフィデコリンにより停止した複製フォークの再開に関与すると報告されている(Chaundhury *et al.*, 2014)。しかし、その報告では、複製フォークの再開には、FAN1 のヌクレアーゼドメインは必須であるが、FAN1 のユビキチン結合モチーフは不要であるとされている。このことから、FAN1 にはモノユビキチン化されていない FANCD2 と相互作用するドメインまたはモチーフを有することが示唆される。以上より、FAN1 の働きを理解するには、モノユビキチン化された FANCD2 またはモノユビキチン化されていない FANCD2 を含む ID 複合体の双方を用いた解析が求められる(図 15A(i)-(iii))。ID 複合体中の FANCD2 のモノユビキチン化反応は、ID 複合体の DNA 結合がトリガーとなること、E1 ユビキチン活性化酵素、FANCT(E2 ユビキチン結合酵素)、そして FANCL(E3 ユビキチン連結酵素)により試験管内で効率的に触媒されることが既に示されている(Sato *et al.*, 2012a、Longerich *et al.*, 2014)。この反応系にリコンビナント FAN1 を加えることにより、

FAN1 の損傷部への集積機構、そして FAN1 による複製フォークの切り出し反応をより詳細に解析することが可能になると考えられる。

細胞内では、ICL はヌクレオソーム中の DNA に導入される可能性がある。そのため、架橋塩基の切り出し反応の解析には、DNA 基質にヌクレオソームを用いる必要がある。先行研究で、FANCD2 はヌクレオソームの構成因子であるヒストン H3/H4 複合体と相互作用し、その着脱を行なうヒストンシャペロン活性を有することが明らかになっている(Sato *et al.*, 2012b)。さらに、FANCI によって、FANCD2 のヒストンシャペロン活性が強く促進されることが明らかにされている(Sato *et al.*, 2012b)。以上のことから、ヌクレオソーム上に導入された架橋塩基は、以下のステップで切り出されると考えられる(図 15B)。まず、ID 複合体がヌクレオソームのリンカー DNA に結合し、モノユビキチン化される(図 15B(ii))。続いて、FANCD2 のヒストンシャペロン活性により、ヒストン H3/H4 複合体が脱離することで、ヌクレオソーム構造が解消される(図 15B(iii))。その後、FAN1 が FANCD2 のモノユビキチン分子を認識して ICL 部位に呼び込まれ、露出した架橋塩基を切り出す(図 15B(iv))。この解析を行なうには、まず以下の 2 点を明らかにする必要がある。1 つ目に、FAN1 のヌクレアーゼ活性が、リンカー部位に 5'-flap 構造を持つヌクレオソームに、どのような影響を受けるかを解析することが求められる。本研究及び 5'-flap DNA に結合した hFAN1 の結晶構造解析(Wang *et al.*, 2014)で得られた FAN1 の DNA 認識機構を考慮すると、FAN1 が結合する部位の DNA は、ヌクレオソーム中に含まれるため、FAN1 はヌクレオソームに結合できず、DNA を切断することができないと考えられる。2 つ目に、5'-flap 構造を持つヌクレオソームを基質に用いた FANCD2 のモノユビキチ

ン化反応を解析する必要がある。DNA 基質がヌクレオソームの場合、FANCD2 のモノユビキチン化はほとんど起こらないが、リンカーDNA を有するアレイのヌクレオソームでは、FANCD2 のモノユビキチン化が促進されることが報告されている(Longerich *et al.*, 2014)。このことは、5'-flap 構造を持つヌクレオソームでは、FANCD2 のモノユビキチン化反応は促進されることを示唆している。以上の解析を行なった上で、5'-flap 構造を持つヌクレオソームに対する FAN1 の切断反応が、FANCD2 のヒストンシャペロン活性により促進されるかを解析することで、ヌクレオソーム中の架橋塩基の除去機構解明が可能になると考えられる。

このように、本研究で確立した技術は、ICL 修復の中心反応である架橋塩基の切り出し反応を明らかにするための材料となることが期待される。

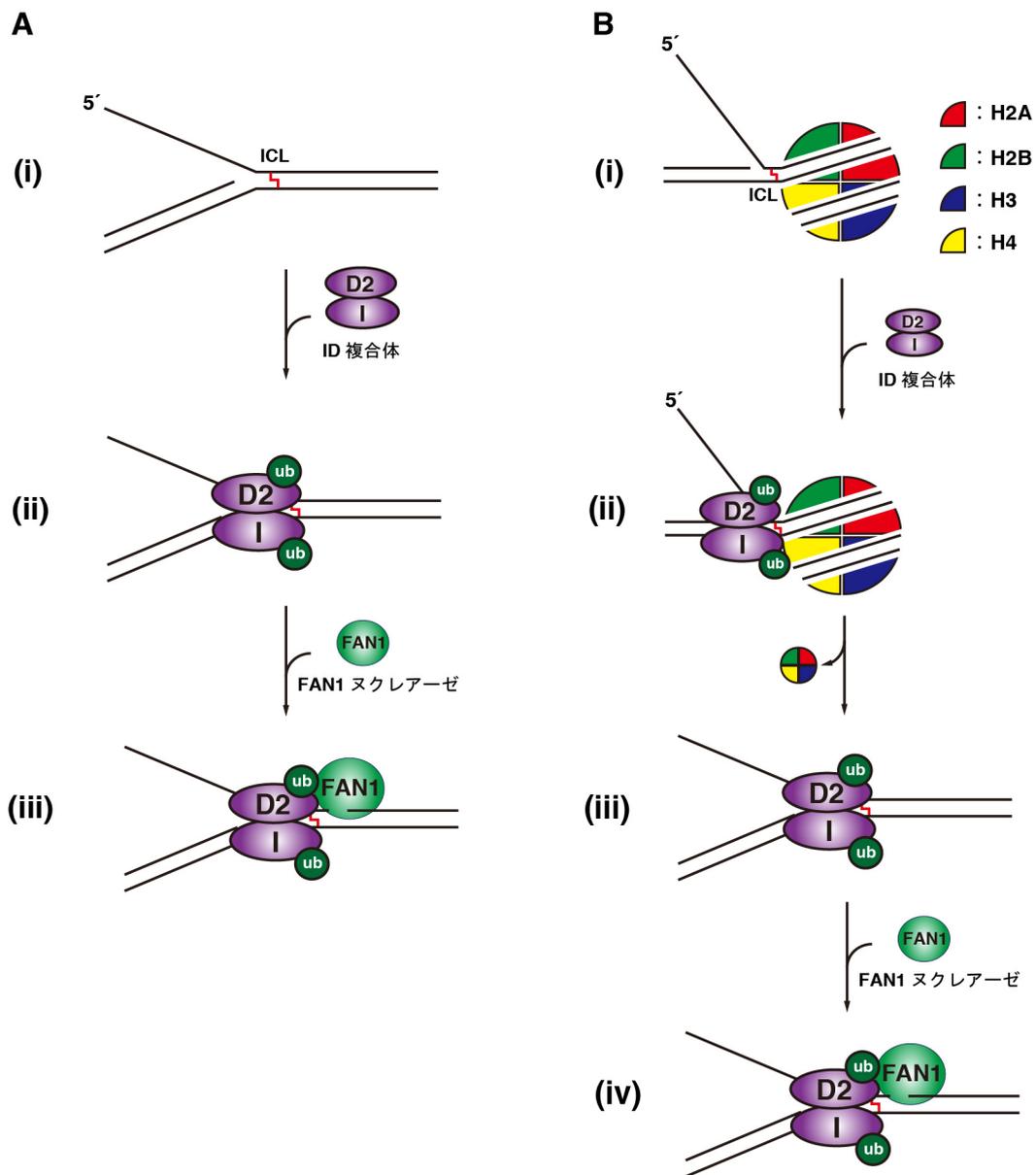


図 15. FAN1 及び ID 複合体による架橋塩基切り出しの協調機構モデル

(A) ICL に DNA 複製装置が衝突すると、損傷部位に ID 複合体が集積する(i)。続いて、FA コア複合体(図中では省略)によって、ID 複合体の両サブユニットがモノユビキチン化される(ii)。その後、FAN1 が FANCD2 のモノユビキチン分子を目印に ICL 部位にリクルートされ、DNA を切断する(iii)。

(B) ID 複合体は ICL 部位に集積した後、FA コア複合体(図中では省略)によってモノユビキチン化される((i)及び(ii))。続いて、FANCD2 のヒストンシャペロン活性によりヒストン H3/H4 複合体が脱離し、ヌクレオソーム構造が解消される(iii)。その後、FAN1 がモノユビキチン化された FANCD2 にリクルートされ、DNA を切断する(iv)。

## 引用文献

Alpi, A.F., Pace, P.E., Babu, M.M., and Patel, K.J. (2008) Mechanistic insight into site-restricted monoubiquitination of FANCD2 by Ube2t, FANCL, and FANCI, *Mol. Cell* **26**, 767-777.

Andreassen, P.R., D'Andrea, A.D., and Taniguchi, T. (2004) ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *Genes Dev.* **18**, 1958-1963.

Aparicio, T., Baer, R., and Gautier, J. (2014) DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. *DNA Repair (Amst)*. **19**, 169-175.

Auerbach, A.D. (2009) Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat. Res.* **668**, 4-10.

Baca, A.M., and Hol, W.G. (2000) Overcoming codon bias: a method for high-level overexpression of Plasmodium and other AT-rich parasite genes in Escherichia coli. *Int. J. Parasitol.* **30**, 113-118.

Ball, H.L., Myers, J.S., and Cortez, D. (2005) ATRIP binding to replication protein A-single-stranded DNA promotes ATR-ATRIP localization but is dispensable for Chk1 phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* **16**, 2372-2381.

Baneyx, F., and Mujacic, M. (2004) Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1399-1408.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Brooks, P.J., and Theruvathu, J.A. (2005) DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. *Alcohol* **35**, 187-193.

Budzowska, M., Graham, T.G., Sobeck, A., Waga, S., and Walter, J.C. (2015)

Regulation of the Rev1-pol  $\zeta$  complex during bypass of a DNA interstrand cross-link. *EMBO J.* **34**, 1971-1985.

Ciccica, A., Constantinou, A., and West, S.C. (2003) Identification and characterization of the human mus81-eme1 endonuclease. *J. Biol. Chem.* **278**, 25172-25178.

Ciccica, A., Ling, C., Coulthard, R., Yan, Z., Xue, Y., Meetei, A.R., Laghmani, el, H., Joenje, H., McDonald, N., de Winter, J.P., Wang, W., and West, S.C. (2007) Identification of FAAP24, a Fanconi anemia core complex protein that interacts with FANCM. *Mol. Cell* **25**, 331-343.

Cole, A.R., Lewis, L.P., and Walden, H. (2010) The structure of the catalytic subunit FANCL of the Fanconi anemia core complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 294-298.

Collis, S.J., Barber, L.J., Clark, A.J., Martin, J.S., Ward, J.D., and Boulton, S.J. (2007) HCLK2 is essential for the mammalian S-phase checkpoint and impacts on Chk1 stability. *Nat. Cell Biol.* **9**, 391-401.

Collis, S.J., Ciccica, A., Deans, A.J., Horejší, Z., Martin, J.S., Maslen, S.L., Skehel, J.M., Elledge, S.J., West, S.C., and Boulton, S.J. (2008) FANCM and FAAP24 function in ATR-mediated checkpoint signaling independently of the Fanconi anemia core complex. *Mol. Cell* **32**, 313-324.

Collins, N.B., Wilson, J.B., Bush, T., Thomashevski, A., Roberts, K.J., Jones, N.J., and Kupfer, G.M. (2009) ATR-dependent phosphorylation of FANCA on serine 1449 after DNA damage is important for FA pathway function. *Blood* **113**, 2181-2190.

Deans, A.J., and West, S.C. (2011) DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 467-480.

de Laat, W.L., Appeldoorn, E., Jaspers, N.G., Hoeijmakers, J.H. (1998) DNA structural elements required for ERCC1-XPF endonuclease activity. *J. Biol. Chem.* **273**, 7835-7842.

Ferguson, D.O. and Alt, F.W. (2001) DNA double strand break repair and chromosomal translocation: Lessons from animal models. *Oncogene* **20**, 5572-5579.

Fricke, W.M., and Brill, S.J. (2003) Slx1-Slx4 is a second structure-specific endonuclease functionally redundant with Sgs1-Top3. *Genes Dev.* **17**, 17868-1778.

Garcia-Higuera, I., Taniguchi, T., Ganesan, S., Meyn, M.S., Timmers, C., Hejna, J., Grompe, M., and D'Andrea, A.D. (2001) Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol. Cell* **7**, 249-262.

Grillari, J., Katinger, H., and Voglauer, R. (2007) Contributions of DNA interstrand cross-links to aging of cells and organisms. *Nucleic Acids Res.* **35**, 7566-7576.

Haber, J.E. (1999) DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 271-275.

Horejší, Z., Collis, S.J., and Boulton, S.J. (2009) FANCM-FAAP24 and HCLK2: roles in ATR signalling and the Fanconi anemia pathway. *Cell Cycle* **8**, 1133-1137.

Henricksen, L.A., Umbricht, C.B., and Wold, M.S. (1994) Recombinant replication protein A: expression, complex formation, and functional characterization. *J. Biol. Chem.* **269**, 11121-11132.

Hira, A., Yoshida, K., Sato, K., Okuno, Y., Shiraishi, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Miyano, S., Shimamoto, A., Tahara, H., Ito, E., Kojima, S., Kurumizaka, H., Ogawa, S., Takata, M., Yabe, H., and Yabe, M. (2015) Mutations in the gene encoding the E2 conjugating enzyme UBE2T cause Fanconi anemia. *Am. J. Hum. Genet.* **96**, 1001-1007.

Ho, G.P., Margossian, S., Taniguchi, T., and D'Andrea, A.D. (2006) Phosphorylation of FANCD2 on two novel sites is required for mitomycin C resistance. *Mol. Cell Biol.* **26**, 7005-7015.

Hodskinson, M.R., Silhan, J., Crossan, G.P., Garaycochea, J.I., Mukherjee, S., Johnson, C.M., Schärer, O.D., and Patel, K.J. (2014) Mouse SLX4 is a tumor suppressor that stimulates the activity of the nuclease XPF-ERCC1 in DNA crosslink repair. *Mol. Cell.* **54**, 472-484.

Ichikawa, Y., Kagawa, W., Saito, K., Chikashige, Y., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., and Kurumizaka, H. (2013) Purification and characterization of the fission yeast telomere clustering factors, Bqt1 and Bqt2. *Protein Expr. Purif.* **88**, 207-213.

Ishiai, M., Kitao, H., Smogorzewska, A., Tomida, J., Kinomura, A., Uchida, E., Saberi, A., Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Koike, T., Tashiro, S., Elledge, S.J., and Takata, M. (2008) FANCI phosphorylation functions as a molecular switch to turn on the Fanconi anemia pathway. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 1138-1146.

Jasin M, and Rothstein R. (2013) Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* **5**, a012740.

Joo, W., Xu, G., Persky, N.S., Smogorzewska, A., Rudge, D.G., Buzovetsky, O., Elledge, S.J., and Pavletich, N.P. (2011) Structure of the FANCI-FANCD2 complex: insights into the Fanconi anemia DNA repair pathway. *Science* **333**, 312-316.

Knipscheer, P., Räschle, M., Smogorzewska, A., Enoiu, M., Ho, T.V., Schärer, O.D., Elledge, S.J., and Walter, J.C. (2009) The Fanconi anemia pathway promotes replication-dependent DNA interstrand cross-link repair. *Science* **326**, 1698-1701.

Kook, H. (2005) Fanconi anemia: current management. *Hematology* **10**, 108-110.

Kozekov, I.D., Nechev, L.V., Moseley, M.S., Harris, C.M., Rizzo, C.J., Stone, M.P., and Harris, T.M. (2003) DNA interchain cross-links formed by acrolein and crotonaldehyde. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 50-61.

Kratz, K., Schöpf, B., Kaden, S., Sendoel, A., Eberhard, R., Lademann, C., Cannavó, E., Sartori, A.A., Hengartner, M.O., and Jiricny, J. (2010) Deficiency of

FANCD2-associated nuclease KIAA1018/FAN1 sensitizes cells to interstrand crosslinking agents. *Cell* **142**, 77-88.

Kurland, C., and Gallant, J. (1996) Errors of heterologous protein expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**, 489-493.

Kuraoka, I., Kobertz, W.R., Ariza, R.R., Biggerstaff, M., Essigmann, J.M., and Wood, R.D. (2000) Repair of an interstrand DNA cross-link initiated by ERCC1-XPF repair/recombination nuclease. *J. Biol. Chem.* **275**, 26632-26636.

Langevin, F., Crossan, G.P., Rosado, I.V., Arends, M.J., and Patel, K.J. (2011) Fancd2 counteracts the toxic effects of naturally produced aldehydes in mice. *Nature* **475**, 53-58.

Lieber, M.R. (1999) The biochemistry and biological significance of nonhomologous DNA end joining: an essential repair process in multicellular eukaryotes. *Genes Cells* **4**, 77-85.

Liu, T., Ghosal, G., Yuan, J., Chen, J., and Huang, J. (2010) FAN1 acts with FANCI-FANCD2 to promote DNA interstrand cross-link repair. *Science* **329**, 693-696.

Long, D.T., Räschle, M., Joukov, V., and Walter, J.C. (2011) Mechanism of RAD51-dependent DNA interstrand cross-link repair. *Science* **333**, 84-87.

Long, D.T., Joukov, V., Budzowska, M., and Walter, J.C. (2014) BRCA1 promotes unloading of the CMG helicase from a stalled DNA replication fork. *Mol. Cell* **56**, 174-185.

Longerich, S., San, Filippo, J., Liu, D., and Sung, P. (2009) FANCI binds branched DNA and is monoubiquitinated by UBE2T-FANCL. *J. Biol. Chem.* **284**, 23182-23186.

Longerich, S., Kwon, Y., Tsai, M.S., Hlaing, A.S., Kupfer, G.M., and Sung, P. (2014)

Regulation of FANCD2 and FANCI monoubiquitination by their interaction and by DNA. *Nucleic Acids Res.* **42**, 5657-5670.

Machida, Y.J., Machida, Y., Chen, Y., Gurtan, A.M., Kupfer, G.M., D'Andrea, A.D., and Dutta, A. (2006) UBE2T is the E2 in the Fanconi anemia pathway and undergoes negative autoregulation. *Mol. Cell* **23**, 589-596.

MacKay, C., Déclais, A.C., Lundin, C., Agostinho, A., Deans, A.J., MacArtney, T.J., Hofmann, K., Gartner, A., West, S.C., Helleday, T., Lilley, D.M., and Rouse, J. (2010) Identification of KIAA1018/FAN1, a DNA repair nuclease recruited to DNA damage by monoubiquitinated FANCD2. *Cell* **142**, 65-76.

Matsushita, N., Kitao, H., Ishiai, M., Nagashima, N., Hirano, S., Okawa, K., Ohta, T., Yu, D.S., McHugh, P.J., Hickson, I.D., Venkitaraman, A.R., Kurumizaka, H., and Takata, M. (2005) A FancD2-monoubiquitin fusion reveals hidden functions of Fanconi anemia core complex in DNA repair. *Mol. Cell* **19**, 841-847.

Meetei, A.R., de Winter, J.P., Medhurst, A.L., Wallisch, M., Waisfisz, Q., van de Vrugt, H.J., Oostra, A.B., Yan, Z., Ling, C., Bishop, C.E., Hoatlin, M.E., Joenje, H., and Wang, W. (2003) A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat. Genet.* **35**, 165-170.

Meetei, A.R., Yan, Z., and Wang, W. (2004) FANCL replaces BRCA1 as the likely ubiquitin ligase responsible for FANCD2 monoubiquitination. *Cell Cycle* **3**, 179-181.

Meetei, A.R., Medhurst, A.L., Ling, C., Xue, Y., Singh, T.R., Bier, P., Steltenpool, J., Stone, S., Dokal, I., Mathew, C.G., Hoatlin, M., Joenje, H., de Winter, J.P., and Wang, W. (2005) A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. *Nat. Genet.* **37**, 958-963.

Michael, W.M., Ott, R., Fanning, E., and Newport, J. (2000) Activation of the DNA replication checkpoint through RNA synthesis by primase. *Science* **289**, 2133-2137.

Muñoz, I.M., Hain, K., Déclais, A.C., Gardiner, M., Toh, G.W., Sanchez-Pulido, L., Heuckmann, J.M., Toth, R., Macartney, T., Eppink, B., Kanaar, R., Ponting, C.P., Lilley, D.M., and Rouse, J. (2009) Coordination of structure-specific nucleases by human SLX4/BTBD12 is required for DNA repair. *Mol. Cell* **35**, 116-127.

Park, W.H., Margossian, S., Horwitz, A.A., Simons, A.M., D'Andrea, A.D., and Parvin, J.D. (2005) Direct DNA binding activity of the Fanconi anemia D2 protein. *J. Biol. Chem.* **280**, 23593-23598.

Pfäffle, H.N., Wang, M., Gheorghiu, L., Ferraiolo, N., Greninger, P., Borgmann, K., Settleman, J., Benes, C.H., Sequist, L.V., Zou, L., and Willers, H. (2013) EGFR-activating mutations correlate with a Fanconi anemia-like cellular phenotype that includes PARP inhibitor sensitivity. *Cancer Res.* **73**, 6254-6263.

Pizzolato, J., Mukherjee, S., Schärer, O.D., and Jiricny, J. (2015) FANCD2-associated Nuclease 1, but Not Exonuclease 1 or Flap Endonuclease 1, Is Able to Unhook DNA Interstrand Cross-links in Vitro. *J. Biol. Chem.* **290**, 22602-22611.

Qiao, F., Mi, J., Wilson, J.B., Zhi, G., Bucheimer, N.R., Jones, N.J., and Kupfer, G.M. (2004) Phosphorylation of fanconi anemia (FA) complementation group G protein, FANCG, at serine 7 is important for function of the FA pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 46035-46045.

Räschle, M., Knipscheer, P., Enoiu, M., Angelov, T., Sun, J., Griffith, J.D., Ellenberger, T.E., Schärer, O.D., and Walter, J.C. (2008) Mechanism of replication-coupled DNA interstrand crosslink repair. *Cell* **134**, 969-980.

Rickman, K.A., Lach, F.P., Abhyankar, A., Donovan, F.X., Sanborn, E.M., Kennedy, J.A., Sougnez, C., Gabriel, S.B., Elemento, O., Chandrasekharappa, S.C., Schindler, D., Auerbach, A.D., and Smogorzewska, A. (2015) Deficiency of UBE2T, the E2 Ubiquitin Ligase Necessary for FANCD2 and FANCI Ubiquitination, Causes FA-T Subtype of Fanconi Anemia. *Cell Rep.* **12**, 35-41.

Roques, C., Coulombe, Y., Delannoy, M., Vignard, J., Grossi, S., Brodeur, I., Rodrigue, A., Gautier, J., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., Constantinou, A., and Masson, J.Y. (2009) MRE11-RAD50-NBS1 is a critical regulator of FANCD2 stability and function during DNA double-strand break repair. *EMBO J.* **28**, 2400-2413.

Santarpia, L., Iwamoto, T., Di Leo, A., Hayashi, N., Bottai, G., Stampfer, M., André, F., Turner, N.C., Symmans, W.F., Hortobágyi, G.N., Pusztai, L., and Bianchini, G. (2013) DNA Repair Gene Patterns as Prognostic and Predictive Factors in Molecular Breast Cancer Subtypes. *Oncologist* **18**, 1063–1073.

Sato, K., Toda, K., Ishiai, M., Takata, M., and Kurumizaka, H. (2012a) DNA robustly stimulates FANCD2 monoubiquitylation in the complex with FANCI. *Nucleic Acids Res.* **40**, 4553-4561.

Sato, K., Ishiai, M., Toda, K., Furukoshi, S., Osakabe, A., Tachiwana, H., Takizawa, Y., Kagawa, W., Kitao, H., Dohmae, N., Obuse, C., Kimura, H., Takata, M., and Kurumizaka, H. (2012b) Histone chaperone activity of Fanconi anemia proteins, FANCD2 and FANCI, is required for DNA crosslink repair. *EMBO J.* **31**, 3524-3536.

Sawyer, S.L., Tian, L., Kahkonen, M., Schwartzentruber, J., Kircher, M., Majewski, J., Dymont, D.A., Innes, A.M., Boycott, K.M., Moreau, L.A., Moilanen, J.S., and Greenberg, R.A. (2014). Biallelic Mutations in BRCA1 Cause a New Fanconi Anemia Subtype. *Cancer Discov.* **5**, 135–142.

Sengerová, B., Allerston, C.K., Abu, M., Lee, S.Y., Hartley, J., Kiakos, K., Schofield, C.J., Hartley, J.A., Gileadi, O., and McHugh, P.J. (2012) Characterization of the human SNM1A and SNM1B/Apollo DNA repair exonucleases. *J. Biol. Chem.* **287**, 26254-26267.

Sharma, S., and Canman, C.E. (2012) REV1 and DNA polymerase zeta in DNA interstrand crosslink repair. *Environ. Mol. Mutagen.* **53**, 725-740.

Sharma, S., Hicks, J.K., Chute, C.L., Brennan, J.R., Ahn, J.Y., Glover, T.W., and Canman, C.E. (2012) REV1 and polymerase  $\zeta$  facilitate homologous recombination repair. *Nucleic Acids Res.* **40**, 682-691.

Shereda, R.D., Machida, Y., and Machida, Y.J. (2010) Human KIAA1018/FAN1 localizes to stalled replication forks via its ubiquitin-binding domain. *Cell Cycle* **9**, 3977-3983.

Sims, A.E., Spiteri, E., Sims, 3rd, R.J., Arita, A.G., Lach, F.P., Landers, T., Wurm, M., Freund, M., Neveling, K., Hanenberg, H., Auerbach, A.D., and Huang, T.T. (2007) FANCI is a second monoubiquitinated member of the Fanconi anemia pathway. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 564-567.

Shigechi, T., Tomida, J., Sato, K., Kobayashi, M., Eykelenboom, J.K., Pessina, F., Zhang, Y., Uchida, E., Ishiai, M., Lowndes, N.F., Yamamoto, K., Kurumizaka, H., Maehara, Y., and Takata, M. (2012) ATR-ATRIP kinase complex triggers activation of the Fanconi anemia DNA repair pathway. *Cancer Res.* **72**, 1149-1156.

Smogorzewska, A., Matsuoka, S., Vinciguerra, P., McDonald, E.R. 3rd., Hurov, K.E., Luo, J., Ballif, B.A., Gygi, S.P., Hofmann, K., D'Andrea, A.D., and Elledge, S.J. (2007) Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. *Cell* **129**, 289-301.

Smogorzewska, A., Desetty, R., Saito, T.T., Schlabach, M., Lach, F.P., Sowa, M.E., Clark, A.B., Kunkel, T.A., Harper, J.W., Colaiácovo, M.P., and Elledge, S.J. (2010) A genetic screen identifies FAN1, a Fanconi anemia-associated nuclease necessary for DNA interstrand crosslink repair. *Mol. Cell* **39**, 36-47.

Sobeck, A., Stone, S., Costanzo, V., de Graaf, B., Reuter, T., de Winter, J., Wallisch, M., Akkari, Y., Olson, S., Wang, W., Joenje, H., Christian, J.L., Lupardus, P.J., Cimprich, K.A., Gautier, J., and Hoatlin, M.E. (2006) Fanconi anemia proteins are required to prevent accumulation of replication-associated DNA double-strand breaks. *Mol. Cell Biol.* **26**, 425-437.

Stone, M.P., Cho, Y.J., Huang, H., Kim, H.Y., Kozekov, I.D., Kozekova, A., Wang, H., Minko, I.G., Lloyd, R.S., Harris, T.M., and Rizzo, C.J. (2008) Interstrand DNA cross-links induced by alpha, beta-unsaturated aldehydes derived from lipid peroxidation and environmental sources. *Acc. Chem. Res.* **41**, 793-804.

Taniguchi, T., Garcia-Higuera, I., Andreassen, P.R., Gregory, R.C., Grompe, M., and D'Andrea, A.D. (2002) S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51. *Blood* **100**, 2414-2420.

Timmers, C., Taniguchi, T., Hejna, J., Reifsteck, C., Lucas, L., Bruun, D., Thayer, M., Cox, B., Olson, S., D'Andrea, A.D., Moses, R., and Grompe, M. (2001) Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. *Mol. Cell* **7**, 241-248.

Walter, J.C. (2000) Evidence for Sequential Action of cdc7 and cdk2 Protein Kinases during Initiation of DNA Replication in Xenopus Egg Extracts. *J. Biol. Chem.* **275**, 39773-39778.

Wang, X., Kennedy, R.D., Ray, K., Stuckert, P., Ellenberger, T., and D'Andrea, A.D. (2007) Chk1-mediated phosphorylation of FANCD2 is required for the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 3098-3108.

Wang, A.T., Sengerová, B., Cattell, E., Inagawa, T., Hartley, J.M., Kiakos, K., Burgess-Brown, N.A., Swift, L.P., Enzlin, J.H., Schofield, C.J., Gileadi, O., Hartley, J.A., and McHugh, P.J. (2011) Human SNM1A and XPF-ERCC1 collaborate to initiate DNA interstrand cross-link repair. *Genes Dev.* **25**, 1859-1870.

Wang, Y., Leung, J.W., Jiang, Y., Lowery, M.G., Do, H., Vasquez, K.M., Chen, J., Wang, W., and Li, L. (2013) FANCD2 and FAAP24 Maintain Genome Stability via Cooperative as Well as Unique Functions. *Mol. Cell* **49**, 997-1009.

Wang, R., Persky, N.S., Yoo, B., Ouerfelli, O., Smogorzewska, A., Elledge, S.J., and Pavletich, N.P. (2014) Mechanism of DNA interstrand cross-link processing by repair nuclease FANCD1. *Science* **346**, 1127-1130.

Wang, A.T., Kim, T., Wagner, J.E., Conti, B.A., Lach, F.P., Huang, A.L., Molina, H., Sanborn, E.M., Zierhut, H., Cornes, B.K., Abhyankar, A., Sougnez, C., Gabriel, S.B., Auerbach, A.D., Kowalczykowski, S.C., and Smogorzewska, A. (2015) A Dominant Mutation in Human RAD51 Reveals Its Function in DNA Interstrand Crosslink Repair Independent of Homologous Recombination. *Mol. Cell* **59**, 478-490.

Yamamoto, K.N., Kobayashi, S., Tsuda, M., Kurumizaka, H., Takata, M., Kono, K., Jiricny, J., Takeda, S., and Hirota, K. (2011) Involvement of SLX4 in interstrand cross-link repair is regulated by the Fanconi anemia pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 6492-6496.

Yan, Z., Delannoy, M., Ling, C., Dae, D., Osman, F., Muniandy, P.A., Shen, X., Oostra, A.B., Du, H., Steltenpool, J., Lin, T., Schuster, B., Decaillet, C., Stasiak, A., Stasiak, A.Z., Stone, S., Hoatlin, M.E., Schindler, D., Woodcock, C.L., Joenje, H., Sen, R., de Winter, J.P., Li, L., Seidman, M.M., Whitby, M.C., Myung, K., Constantinou, A., and Wang, W. (2010) A histone-fold complex and FANCM form a conserved DNA-remodeling complex to maintain genome stability. *Mol. Cell* **37**, 865–878.

Yoshikiyo, K., Kratz, K., Hirota, K., Nishihara, K., Takata, M., Kurumizaka, H., Horimoto, S., Takeda, S., and Jiricny, J. (2010) KIAA1018/FAN1 nuclease protects cells against genomic instability induced by interstrand cross-linking agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 21553-21557.

Yuan, F., El, Hokayem, J., Zhou, W., and Zhang, Y. (2009) FANCI protein binds to DNA and interacts with FANCD2 to recognize branched structures. *J. Biol. Chem.* **284**, 24443-24452.

Zhang, J., and Walter, J.C. (2014) Mechanism and regulation of incisions during DNA interstrand cross-link repair. *DNA Repair (Amst)*. **19**, 135-142.

Zou, L., and Elledge, S.J. (2003) Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* **300**, 1542-1548.

## 謝辞

早稲田大学理工学術院教授 胡桃坂仁志先生には、本研究を遂行するにあたりまして、研究の機会及び懇切丁寧なご指導・ご鞭撻を賜りました。また本論文を作成するにあたりまして、貴重なご助言を賜りました。心より深く感謝いたします。

京都大学放射線生物研究センター教授 高田穰先生には、本研究を遂行するにあたりまして、貴重なヒト*FANCI*、ヒト*FANCD2*及びヒト*FANI*遺伝子をご提供下さいました。心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたりまして、様々な面におきましてご支援をいただきました、胡桃坂研究室の皆様にご感謝申し上げます。

## 研究業績

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, Sato K, Shimomuki M, Takata M, Kurumizaka H.</u> 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, Sato K, Hirayama E, Takata M, Kurumizaka H.</u> 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, Sato K, Hirayama E, Takata M, Kurumizaka H.</u> 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>