

博士論文審査報告書

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

2016年2月

遺伝情報を担うゲノム DNA は、電離放射線や紫外線などの外的要因や、細胞内代謝産物や DNA 複製のエラーなどの内的要因により、日常的に損傷を受けている。このような DNA 損傷は直ちに修復される必要があり、損傷の蓄積は、細胞の機能障害、細胞死、がん化などの要因となる。DNA 鎖間架橋 (Interstrand crosslink、以下 ICL と略) は、DNA 損傷の中でも重篤な損傷で、DNA の複製や転写を著しく阻害する。そのため、特に細胞毒性が強いことが知られている。ICL を導入するマイトマイシン C やシスプラチンなどの DNA 架橋剤は、この強い細胞毒性を利用した抗がん剤として臨床に用いられている。また ICL は、脂質やアルコールの代謝により生じるアルデヒドによっても引き起こされる。ヒトにおいては、1 細胞あたり 1 日 10 個程度の高い頻度で ICL が導入されると考えられている。このような外的要因および内的要因によって引き起こされる ICL から、ゲノム DNA の恒常性を守るため、生物は ICL を効率良く修復する機構を獲得してきた。

ヒトでは、ICL 修復機構の破綻により、Fanconi 貧血 (Fanconi anemia、以下 FA と略) が発症することが知られている。FA の患者では、先天的な骨格形成異常、骨髄不全、及び高発がんが特徴として見られる。FA は劣性遺伝性疾患であり、原因遺伝子として *FANCA*、*-B*、*-C*、*-D1*、*-D2*、*-E*、*-F*、*-G*、*-I*、*-J*、*-L*、*-M*、*-N*、*-O*、*-P*、*-Q*、*-R*、*-S*、*-T* などが報告されている。これらの FA 原因遺伝子産物が、ICL 修復経路を構成していると考えられており、1 つの遺伝子の機能が欠損しても、ICL に対して高感受性となる。

これまでの研究から、ICL 修復機構は以下のプロセスを経て進行すると考えられている。1) ICL によって停止した複製フォークは、ICL の手前およそ 20-40 塩基の箇所でリーディング鎖の合成を停止する。2) 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もなって、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。3) ICL によって停止した複製フォークが、FANCM によって認識される。4) 停止した複製フォークに集積した FANCM に、7 個の FA 原因遺伝子産物と 2 個の相互作用タンパク質で構成される FA コア複合体と、FANCI と FANCD2 からなる FANCI-FANCD2 (ID) 複合体が ICL 部位に集積する。5) 複製フォークに形成されている単鎖 DNA 領域には、Replication protein A (以下 RPA と略) が迅速に集積し、そこに ATR-ATRIP キナーゼが集積する。6) ATR によって、ID 複合体を含む FA 原因遺伝子産物がリン酸化される。7) 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。8) モノユビキチン化された ID 複合体は、ICL の近傍に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。9) ヌクレアーゼが架橋塩基を切り出した後、REV1 及びポリメラーゼ ζ (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。10) そして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 修復において、架橋 DNA 塩基の切り出し反応は重要である。これまでに、架橋された DNA 塩基の切り出しに関与するヌクレアーゼとして、FAN1、SNM1A 及び SLX4(FANCP)複合体の 3 種類が報告されている。これらのヌクレアーゼは、いずれもユビキチン結合ドメインを有していることから、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と考えられている。しかし、架橋塩基の切り出し反応の分子機構は、未だ不明な点が多い。FAN1 は、近年新たに同定されたヌクレアーゼである。これまでの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知られている。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、高い頻度で FANCD2 と共局在することが報告されている。FAN1 の機能が欠損した細胞では、DNA 鎖間架橋剤に対し高い感受性を示す。そのような細胞では、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ている。興味あることに、ICL を誘導する抗がん剤に対する耐性を獲得したがん細胞では、FAN1 の発現量が増加していることが見いだされた。これらの事実は、ICL 修復の際に、FAN1 が架橋 DNA 塩基の切り出し反応を触媒する中心的なヌクレアーゼであることを示唆している。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。

本論文では、FAN1 による架橋塩基の切り出しの分子機構を、生化学的に明らかにすることを目的としている。まず大腸菌を用いた発現系を独自に構築し、ヒト FAN1 タンパク質を高純度に精製する系を新規に確立した。そして、DNA 複製が ICL によって停止した際に形成される、RPA が結合した 5'-flap 構造の 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、ID 複合体が FAN1 の活性に及ぼす影響を検討するために、ヒト FANCI 及びヒト FANCD2 を、大腸菌を用いた発現系にてリコンビナントタンパク質として精製する系を独自に確立した。そして、本論文で得られた新たな研究結果を総括し、FAN1 による損傷塩基の切り出しのメカニズムを考察した。

本論文は、4 つの章から構成されている。

第 1 章は序論で、研究の背景となる ICL と FA との関係や、これまでの ICL 修復機構に関する知見について概説されている。本論文の背景が理解できるように構成されており、本論文の意義を理解するために適切な記述がなされている。

第 2 章では、ヒト FAN1 精製法の確立と、FAN1 による DNA 切断機構の生化学的解析について記載されている。本論文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、詳細に記述されている。実際に、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ており、今後の当該分野の研究に大きく貢献する新たな実験系を提供していると評価できる。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と結果を記述している。ヒト FAN1 による DNA 切

断反応を試験管内で行った結果として、今回大腸菌での発現系を用いて精製したヒト FAN1 が、5'-flap DNA に対して強い DNA 切断活性を有することが明らかにされている。ICL の修復過程で見られる、RPA が結合した 5'-flap DNA に対しても、ヒト FAN1 は効率良く DNA 切断を導入できることを明らかにしている。これらの結果は、FAN1 による架橋塩基認識と切断の機構を理解する上で重要な知見であり、当該領域研究への貢献は大きいと評価できる。

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している。これまでの研究では、ヒト FANCI 及びヒト FANCD2 は昆虫細胞を用いた系で精製されていたが、その調製法における問題点を説明し、今回構築した大腸菌を用いた発現系でのヒト FANCI 及びヒト FANCD2 精製系について詳述している。また、本手法で精製されたタンパク質の活性試験を行っ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議論している。その結果、大腸菌を用いた発現にて調製したヒト FANCI 及びヒト FANCD2 は、安定なヘテロ二量体を形成し、分岐構造を有する DNA に対し、高い親和性を持って優先的に結合することを明らかにしている。また、ヒト FANCD2 が有するヌクレオソーム形成活性を、今回新たな手法で調製したヒト FANCD2 でも保存されていることを明らかにしている。これらの結果は、FANCI および FANCD2 の機能解析を行うために、新たなツールを提供するものであり、当該領域の研究に新たな展開をもたらす可能性を持つ重要なものである。

第 4 章では、本論文で明らかにした研究成果を総括し、既知の研究結果を踏まえて DNA 鎖間架橋の修復機構に関するモデルを提案している。

これらのことより、本論文は FA 経路による ICL 修復のメカニズムを明らかにするために重要な手法や材料を新たに提供しており、当該分野の研究の進展に重要な貢献をしていると評価できる。また、FAN1 ヌクレアーゼによる DNA 鎖の正確な切断が、RPA が結合した状態の DNA 基質でも起こることなど、ICL 修復機構の理解にも重要な知見を与えている。したがって、これらの研究結果は、当該領域への貢献は大きいと考え、本論文は博士(理学)の学位論文として、十分価値のあるものであると判断できる。

2016 年 1 月

審査員

(主査) 早稲田大学教授 博士(学術) 埼玉大学 胡桃坂 仁志

早稲田大学教授 博士(理学) 京都大学 岡野 俊行

理化学研究所名誉研究員 理学博士(東京大学) 柴田 武彦