

# ファンコニ貧血原因遺伝子 *FANCD2* 会合因子の同定と解析の試み

関 聰 介

Fanconi 貧血 (以下 FA) は, 進行性骨髄不全, 好発癌を特徴とする遺伝性疾患である。細胞レベルでは, 染色体不安定性, シスプラチンやマイトマイシン C のような DNA 架橋型抗癌剤に対する高感受性を特徴とし, 現在までに11種類の原因遺伝子 (*FANCA*, *B*, *C*, *D1*, *D2*, *E*, *F*, *G*, *J*, *L*, *M*) が同定されている。このうち8種類 (*FANCA*, *B*, *C*, *E*, *F*, *G*, *L*, *M*) は, 核内において FA コア複合体を形成していると考えられている。FA 蛋白質は共通の遺伝経路上に存在し (FA pathway), DNA 損傷修復への関与が示唆されている。中でも *FANCD2* はその中心的役割を担っているが, 詳細な作用機構は不明である。今回, *FANCD2* と相互作用する分子の検索に, *FANCD2* を bait とした Yeast Two-hybrid 法を用い, 候補分子を33種類同定した。このうち, 論文検索と, 強制発現系における細胞内局在と免疫沈降解析により, *BCCIP* と *DEADC1* が実際に相互作用する可能性が高いと考えられた。これらの分子の機能を明らかにするべく, ニワトリ DT40 細胞を用いて両者の破壊を試みたが, いずれも致死遺伝子と思われ, 欠損細胞の樹立にはいたらなかった。今後, siRNA などの手法により機能解析が必要であると考えらる。

(平成18年10月17日受理)

## Identification and Analysis of *FANCD2*-Interacting Factors

Sosuke SEKI

Fanconi anemia (FA) is a rare hereditary disorder, clinically characterized by progressive bone marrow failure, cancer susceptibility, and genome instability. FA cells display hypersensitivity to interstrand DNA crosslinking agents, such as cisplatin and mitomycin C (MMC). Eleven of the FA genes (*FANCA*, *B*, *C*, *D1*, *D2*, *E*, *F*, *G*, *J*, *L* and *M*) have been identified at present. These genes have been considered to cooperate in a common DNA repair pathway (the FA pathway). Among them, eight FA gene products (*FANCA*, *B*, *C*, *E*, *F*, *G*, *L* and *M*) form the FA core complex, which monoubiquitinates *FANCD2*, a central molecule of the FA pathway following DNA damage. However, the function of *FANCD2* remained unknown. To gain insight into its function and regulatory mechanisms, we isolated 33 clones by using the Yeast Two-hybrid method as an interaction factor of chicken *FANCD2*. We selected *BCCIP* and *DEADC1* as likely interacting factors, and tried to delete both genes in the chicken B cell line DT40, but neither knockout cell line could be obtained. These results suggest that both genes are essential for cell viability. In the









メカニズムを明らかにするために、FANCD2蛋白質に相互作用する蛋白質を、Y2H法を用いてスクリーニングした。baitとして用いたch FANCD2プラスミドのシェーマをFigure 1Bに示す。FANCD2の様々な領域を網羅するように、4つのフラグメント(SS1~SS4)をそれぞれ含むbaitプラスミドを用意した。ほぼfull lengthのFANCD2(SS2)は、Y2H法の予備実験でreporter遺伝子のauto activation(自己賦活)が確認されたため使用しなかった。最終的に得られたdouble positive cloneは、ch FANCD2のN末側(SS4)から55個、C末側(SS3)から41個、SS1領域からは0個であった。得られたdouble positive cloneよりプラスミドDNAを精製しPCRで増幅後、DNA塩基配列をもとに遺伝子データベースを用いて解析したところ、最終的に33クローンの同定に成功した(Table 1)。興味深いことに、我々が同定に成功したクローンに、ユビキチンリガーゼと考えられるPHF9、およびFANCD1(BRCA2)と関連する蛋白質をコードするBCCIP遺伝子が含まれていた。PHF9は我々がY2H法を行った時期の直後に、FA原因遺伝子であることが報告された<sup>7)</sup>。またBCCIPは、FANCD1(BRCA2)と相互作用することが知られている遺伝子<sup>8)~10)</sup>であり、FAに強く関連することが示唆されるため、解析を引き続き行うこととした。

Table 1. Positive clones isolated by Y2H screening

Function	Number of clones	Candidate interactor
Chromatin	2	
DNA modification	2	DEADC1
Transcription	5	
Translation	1	
Nuclear Protein	1	
Cell cycle	1	BCCIP
Protein folding	2	
Protein modification	2	PHF9/FANCL
Oxidation	3	
Homologue of mammalian unnamed protein	10	
others	4	

#### 候補分子の細胞内局在ならびに相互作用の確認

Y2H法により単離された候補分子はしばしば偽陽性であり、別の方法での検討が必須とされている。そこで、候補分子を293T細胞内で強制発現後、その細胞内局在を観察し、さらにFANCD2との相互作用をプルダウン法によって確認した。前述した、33クローンのうち、転写・翻訳に関するもの、ならびに核外で機能していると思われるもの(FANCD2は核蛋白質であるため)、BCCIP、FANCLを除外してGFP融合蛋白質を作製し、6クローン(#25, #86, #418, #439, #615, #616)に関して、ヒト293T細胞内で発現させた。GFPを蛍光顕微鏡で観察した際に確認される緑色の発色を指標とし、各々のクローンの局在が核内に認められるかどうかを確認した。1クローン(クローン#439)は、明らかに細胞質のみに局在を認めしたが、残りのクローンはコントロールに使用したEGFPを含め全く異なる分布をとり、核内への分布の存在が示唆された(Fig. 2)。

プルダウン法による相互作用の確認は、細胞質にのみ局在を認めた#439以外の、#418, #615, #616, #86, #25の5クローンについて行った。FANCD2-TAPを共発現させていないと、すべての候補分子はプルダウンされなかったが、共発現後のプルダウンにより、DEADC1(クローン#615: cytidine deaminase 1)においてのみ、抗GFP抗体によるウェスタンブロット法で、相互作用が確認された(Fig. 3)。上記のごとくDEADC1は核内にも存在するため、同クローンの解析を引き続き行うこととした。

#### DT40細胞を用いたBCCIPならびにDEADC1欠損細胞の樹立

ニワトリB細胞株DT40は、導入されたDNAコンストラクトを、相同性のある遺伝子領域に高頻度に組み込む(Target integration)。この現象を利用することで、DT40では特定の遺伝子座を特異的、しかも高効率に破壊することが可能<sup>11), 12)</sup>である。そこで、BCCIPならび



Table 2. BCCIP ならびに DEADC1 の targeting frequency

	BCCIP	BCCIP/IRES-EGFP	DEADC1	DEADC1/IRES-EGFP
First allele	13/39 (33.3%)	—	8/87 (9.2%)	—
Second allele	0/98 (0.0%)	0/441 (0.0%)	0/235 (0.0%)	0/143 (0.0%)

に *DEADC1* について、DT40細胞を用いて、各々の遺伝子欠損細胞と *FANCD2* 欠損細胞の表現型の比較を試みた。各々の cDNA 塩基配列を元に、ゲノムフラグメントを PCR 法によって増幅後、各遺伝子のターゲティングベクターの構築を行った (Fig. 4)。各々のターゲティングベクターを DT40細胞にトランスフェクションし、サザンプロット法により検討したところ、片側のアレルの破壊効率は、*BCCIP* が約 30% (26/87)、*DEADC1* が約 12% (7/58) (Table 2) と良好であった。その後、二つ目のベクターをヘテロのノックアウト細胞にトランスフェクトし、両側のアレルの破壊を試みた。多数のクローンを単離してサザンプロット法でスクリーニングを行ったが、どうしても *BCCIP*、*DEADC1* とともにノックアウト細胞を単離できなかった (Table 2)。このような場合、遺伝子が失われることで細胞の生存が不可能になっていることが考えやすい (致死遺伝子)。そこで、ヘテロのノックアウト細胞に外来性の発現ベクターを導入し、たとえ両方の遺伝子が破壊されても、その遺伝子の発現自体は保たれる状況を作り出し、ホモのノックアウト細胞の単離を試みた。IRES-EGFP を用いた発現ベクターにより *BCCIP*、*DEADC1* の発現が GFP 蛍光によって検出された細胞にターゲティングベクターを導入し、2つ目のアレルの破壊を試みたが、同様にノックアウト細胞の樹立に至らなかった (Table 2)。

## 考 察

一連の研究において、著者は Y2H スクリーニングによって *FANCD2* と相互作用している蛋白質として、*FANCL*、*BCCIP*、*DEADC1* の 3 遺伝子を同定した。2001年に *FANCD2* が同

定された際、*FANCD2* が DNA 損傷に反応して FA コア複合体依存性にモノユビキチン化を受け、さらに核内でドット状に集積しフォーカスを形成することが報告<sup>2)</sup>された。FA-A、FA-B、FA-C、FA-E、FA-F、FA-G 細胞においては、核内で *FANCD2* がびまん性に分布するのに対し、各々を cDNA 発現で補正した細胞では、*FANCD2* の核内フォーカスが観察される<sup>2)</sup>。また、*FANCD2* の 561 番目のリジンをアルギニンに変換した変異体 (*FANCD2*-K561R) はモノユビキチン化を認めず、核内でフォーカスを形成しない<sup>2)</sup>。このことから、モノユビキチン化は、*FANCD2* の核内での局在を変えるシグナルとして機能していると考えられている。さらに *FANCD2*-K561R は、FA-D2 細胞の DNA 架橋型抗癌剤に対する感受性を補正する機能が欠損することから、モノユビキチン化は、FA pathway に重要な機能であることが示唆されている<sup>2)</sup>。その後、*FANCL* が胚細胞欠損マウスの原因遺伝子として同定されていた *PHF9/POG* と同一の遺伝子であることが明らかとなり、著者が同遺伝子を同定した時期と前後して、2003年に米国 NIH の Weidong Wang らによって報告された<sup>7)</sup>。*FANCL* は、FA コア複合体の構成要素の一つで、PHD-type Zinc-finger domain と、蛋白質-蛋白質の相互作用に関与すると考えられている WD40 リピートを 3 箇所有している<sup>7)</sup>。PHD-type Zinc-finger domain は、ユビキチン化酵素 (E3 リガーゼ) にある Ring finger domain に類似しており、実際、*FANCL* 蛋白質は *in vitro* において自己ユビキチン化活性を有していた<sup>7)</sup>。*FANCL* 欠損細胞では、*FANCD2* のモノユビキチン化は認められず、*FANCL* が FA コア複合体の E3 リガーゼサブユニット (ユビキチン化酵素) であり、*FANCD2* のモノユビキチン化を行うと

考えられている。我々は、DT40細胞を用いて *FANCL* 欠損細胞の樹立に成功し、*FANCD2* 欠損細胞との表現型の比較や、これまでの報告<sup>13)</sup>との関連も含めて解析を行った (Genes to Cells 誌, 印刷中)。

*BCCIP* は、過去に家族性乳癌原因遺伝子 *BRCA2* および *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *Waf1*) と相互作用することが報告されている<sup>8)-10)</sup>。2002年に Howlett らは、*FANCD1* 細胞において *BRCA2* 遺伝子のハイポモルフィック変異を両アレルに同定し、D1群の細胞に正常の *BRCA2* を発現させることで、DNA 裂橋型抗癌

剤 (MMC) の感受性が補正されることを示し、*FANCD1* が *BRCA2* に他ならないことが報告された<sup>14)</sup>。また、この遺伝子の片方のアレルに変異を持つ女性患者は、高頻度に乳癌、卵巣癌などを発症する。この腫瘍細胞は、正常なアレルが欠損しており (loss of heterozygosity : LOH), *BRCA2* の機能が欠損することで染色体不安定性が引き起こされ、発癌に関与すると考えられている。その腫瘍細胞と同様のことが、一部の FA 患者の体細胞で起こっているわけである。*BRCA2* は、真核生物の相同組換え (Homologous Recombination : 以下 HR) による DNA 修

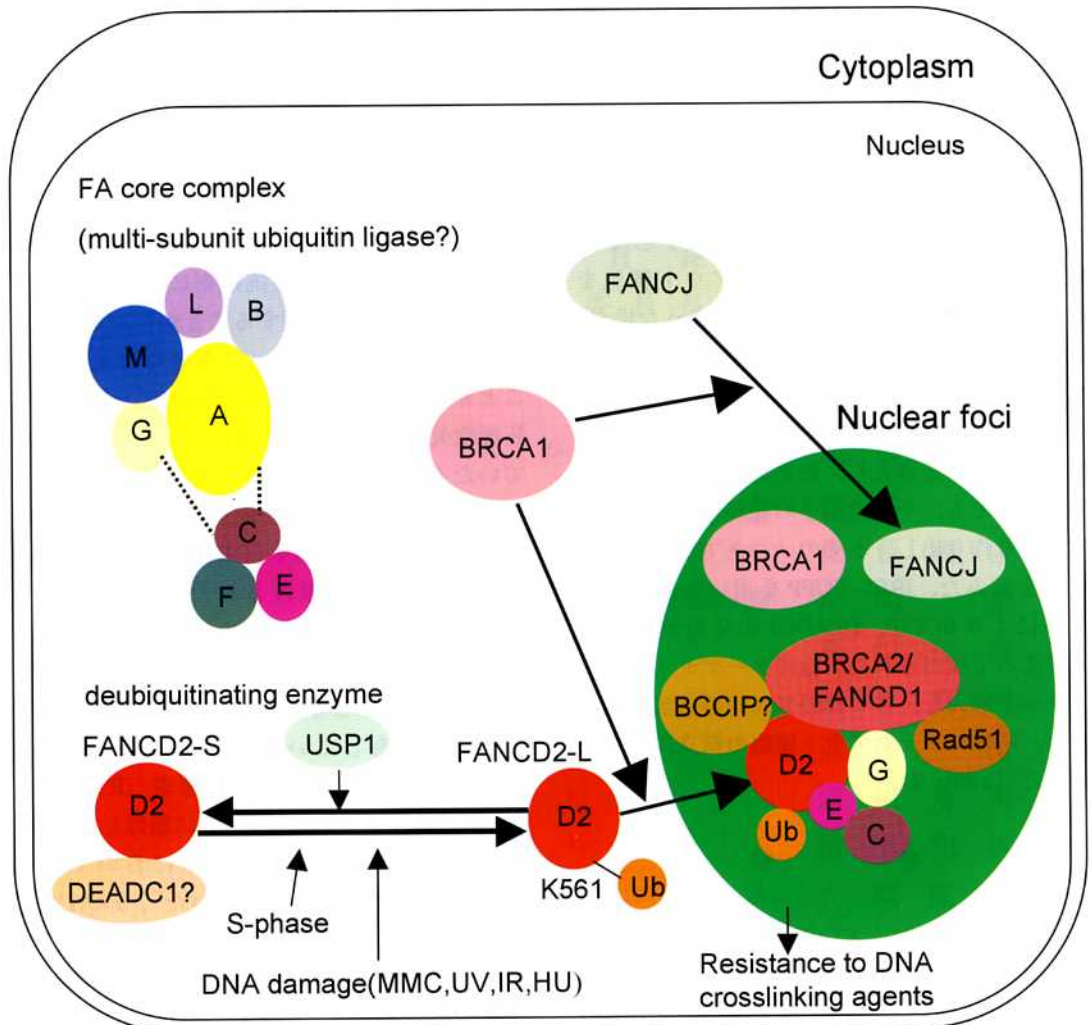


Fig. 5. FA pathway のシエーマ



復において中心的役割を担う *Rad51* (大腸菌 *RecA* のホモログ) の機能を制御することが知られている<sup>15)</sup>。 *Rad51* は、 *BRCA2* の *BRC* モチーフ (exon11 にコードされ保存されている反復配列) およびカルボキシ領域末端 (exon27 にコードされている) で相互作用することが明らかにになっている<sup>16)~18)</sup>。 *BRCA2* は *FANCD2*, *FANCG* とも会合することが報告されており<sup>19), 20)</sup>、我々の Y2H による *FANCD2* と *BCCIP* との会合の発見は、 *BRCA2*-*BCCIP*-*FANCD2* の 3 者が、 DNA 損傷修復において複合体を形成して機能する可能性を示唆する。 *BCCIP* は *Rad51* の細胞内局在にも関与するとされており、今後これら分子の複雑な相互作用を、一つ一つ解明する作業が必要であろう。

cytosine deaminase は、 cytosine を脱アミノ化し uracil に変換させる酵素であり、比較的低下生物から存在している。そのファミリーのひとつである *DEADC1* が、 *FANCD2* との Y2H で同定されたことから、 FA に関連がある可能性が考えられたが、現在のところその機能の詳細は明らかにできていない。 *FANCD2* は核蛋白質であり、 DNA 損傷により核内にドット状に存在することが過去に報告されている<sup>2)</sup>。 *DEADC1* の細胞内局在を変化をマイトマイシン C 添加後、 GFP 蛍光によって調べたが、特にドット状の局在は示さなかった (data not shown)。

*FANCL*, *BCCIP*, *DEADC1* 遺伝子のいずれもが、 FA と何らかの関連があることが示唆されたため、それぞれの欠損細胞と *FANCD2* 欠損細胞の表現型を比較する予定であったが、それ

ぞれの欠損細胞の樹立は困難を極めた。 *FANCL* については、なんとか樹立に成功したが (Genes to Cells 誌、印刷中)、 *BCCIP*, *DEADC1* については、遺伝子が破壊されることにより致死となると思われる。ヘテロ細胞に目的遺伝子を外来性に発現させ、多数のクローンをスクリーニングしても、なおホモ細胞の樹立に至らなかったのは、これらの遺伝子機能が発現量と密接な関連があることを示唆している。

これらの遺伝子の機能と FA pathway (Fig. 5) との関連をさらに検討するためには、 Cre 組換え酵素を利用したコンディショナルノックアウト細胞の作製<sup>6)</sup>ならびに、 siRNA (small interfering RNA) を用いた遺伝子ノックダウン法による表現型解析等が必要である。現在、両遺伝子について、ヒト HeLa 細胞での siRNA の検討を行っている。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり多大な御指導、御協力をいただきました。川崎医科大学免疫学教室高田 穰先生、石合正道先生、北尾洋之先生、平野世紀先生、松下暢子先生、浪越啓子補助員、木村昌代補助員、内田恵美補助員ならびに、 cDNA ライブラリーを供与いただきました後塚塚僚先生 (東京理科大学)、 pcDNA3.1-TAP ベクターを頂いた夏目徹先生 (産技研・生物情報解析センター)、川崎医科大学組織培養・免疫センター、生化学センター、生理機能センター、 R I センター、組織・電子顕微鏡センターのスタッフの皆様へ深謝いたします。

## 引用文献

- 1) D'Andrea, Grompe M : The Fanconi anemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer* 3 : 23-24, 2003
- 2) Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn MS, Timmers C, Hejna J, Grompe M, D'Andrea AD. Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell* 7 : 249-262, 2001
- 3) Bartel P, Chien CT, Sternqlanz R, Fields S : Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* 14 : 920-924, 1993
- 4) Boardman PE, Sanz-Ezquerro J, Overton IM, Burt DW, Bosch E, Fong WT, Tickle C, Brown WR, Wilson SA, Hub-

- bard SJ : A comprehensive collection of chicken cDNAs. *Curr Biol* 12 : 1965 - 1969, 2002
- 5) Yamamoto K, Hirano S, Ishiai M, Morishima K, Kitao H, Namikoshi K, Kimura M, Matsushita N, Arakawa H, Buerstedde JM, Komatsu K, Thompson LH, Takata M : Fanconi anemia protein FANCD2 promotes immunoglobulin gene conversion and DNA repair through a mechanism related to homologous recombination. *Mol Cell Biol* 25 : 34 - 43, 2005
  - 6) Fujimori A, Tachiiri S, Sonoda E, Thompson LH, Dhar PK, Hiraoka M, Takeda S, Zhang Y, Reth M, Takata M : Rad 52 partially substitutes for the Rad51 paralog XRCC3 in maintaining chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J* 20 : 5513 - 5520, 2001
  - 7) Meetei AR, de Winter JP, Medhurst AL, Wallisch M, Waisfisz Q, van de Vrugt HJ, Oostra AB, Yan Z, Ling C, Bishop CE, Hoatlin ME, Joenje H, Wang W : A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet* 35 : 165 - 170, 2003
  - 8) Ono T, Kitaura H, Ugai H, Murata T, Yokoyama KK, Iguchi-Arigo SM, Ariga H : TOK-1, a novel p21Cip1-binding protein that cooperatively enhances p21-dependent inhibitory activity toward CDK2 kinase. *J Biol Chem* 275 : 31145 - 31154, 2000
  - 9) Liu J, Yuan Y, Huan J, Shen Z : Inhibition of breast and brain cancer cell growth by BCCIP alpha, an evolutionarily conserved nuclear protein that interacts with BRCA2. *Oncogene* 20 : 336 - 345, 2001
  - 10) Lu H, Guo X, Meng X, Liu J, Allen C, Wray J, Nickoloff JA, Shen Z : The BRCA2-interacting protein BCCIP functions in RAD51 and BRCA2 focus formation and homologous recombinational repair. *Mol Cell Biol* 25 : 1949 - 1957, 2005
  - 11) 高田 穰 : DT40細胞を使用した発がん抑制遺伝子群の機能解析. *医学のあゆみ* 208 : 853 - 857, 2004
  - 12) Buerstedde JM, Takeda S : Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines. *Cell* 67 : 179 - 188, 2001
  - 13) Matsushita N, Kitao H, Ishiai M, Nagashima N, Hirano S, Okawa K, Ohta T, Yu DS, McHugh PJ, Hickson ID, Venkitaraman AR, Kurumizaka H, Takata M : A FancD2-mono-ubiquitin fusion reveals hidden functions of Fanconi anemia core complex in DNA repair. *Mol Cell* 19 : 841 - 847, 2005
  - 14) Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, Cox B, Waisfisz Q, De Die-Smulders C, Persky N, Grompe M, Joenje H, Pals G, Ikeda H, Fox EA, D'Andrea AD : Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* 297 : 606 - 609, 2002
  - 15) Venkitaraman AR : Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 108 : 171 - 182, 2002
  - 16) Chen PL, Chen CF, Chen Y, Xiao J, Sharp ZD, Lee WH : The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 : 5287 - 5292, 1998
  - 17) Pellegrini L, Yu DS, Lo T, Anand S, Lee M, Blundell TL, Venkitaraman AR : Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature* 420 : 287 - 293, 2002
  - 18) Esashi F, Christ N, Gannon J, Liu Y, Hunt T, Jasin M, West SC : CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature* 434 : 598 - 604, 2005
  - 19) Hussain S, Witt E, Huber PA, Medhurst AL, Ashworth A, Mathew CG : Direct interaction of the Fanconi anemia protein FANCG with BRCA2/FANCD1. *Hum Mol Genet* 12 : 2503 - 2510, 2003
  - 20) Hussain S, Wilson JB, Medhurst AL, Hejna J, Witt E, Ananth S, Davies A, Masson JY, Moses R, West SC, de Winter JP, Ashworth A, Jones NJ, Mathew CG : Direct interaction of FANCD2 with BRCA2 in DNA damage response pathways. *Hum Mol Genet* 13 : 1241 - 1248, 2004