

FANCA 遺伝子の変異およびポリモルフィズムの機能的意義の評価

大関美緒子

Fanconi 貧血 (FA) は、FANCA タンパクのような FA コア複合体の構成遺伝子や、FANCD2 タンパク、時にその他の関連遺伝子の変異によって引き起こされる稀な遺伝疾患である。FA コア複合体は、DNA 損傷によって FANCD2 タンパクをモノユビキチン化する E3 リガーゼとしての役割を果たしている。FA 患者由来の細胞はマイトマイシン C (MMC) や cisplatin のような DNA 架橋剤に高感受性を示す。最近、FA 患者ではない癌患者においても、FA 遺伝子の変異やメチル化による発現低下が検出された。しかし、癌患者における FA 遺伝子の変異が細胞におよぼす影響は全く調べられていない。

今回、患者由来の変異ないしは一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism : SNP) を有する cDNA を、ニワトリ B 細胞株 DT40 細胞から作製した FANCA 欠損細胞の系に発現させ、cisplatin への感受性の相補や、FANCD2 モノユビキチン化および核内フォーカス形成について検討した。癌患者由来の SNP をもった FANCA は cisplatin 感受性の相補は不完全で、MMC 処理後の FANCD2 モノユビキチン化はやや減少していた。しかし、これらの細胞は野生株 FANCA を欠損細胞に発現した際と同様に、MMC 処理後に核内フォーカスを形成した。一方で FA 患者由来の変異をもつ cDNA を発現させた細胞では、核内フォーカスは全く観察されなかった。これらの結果から、癌患者で認められた FANCA の SNP は、FA 経路の部分的欠損によってゲノム不安定性を引き起こし、さらには癌を発症させた可能性があることが示唆された。

(平成18年10月10日受理)

The Functional Impairment of Fanconi Anemia Pathway Due to FANCA Mutation or Polymorphism

Mioko OHZEKI

Fanconi anemia (FA) is a rare hereditary disorder caused by mutations in the FA core complex components such as FANCA, and FANCD2, and other related genes. The FA core complex is an E3 ligase that mono-ubiquitinates FANCD2 protein upon DNA damage. Cells from FA patients are highly sensitive to killing by interstrand crosslinking agents such as mitomycin C (MMC) and cisplatin. Recently, mutations of FA genes have been detected in cancer patients unrelated to FA. However, the role of the FA mutation in cancer has not been fully assessed.

In the present study, we expressed FANCA cDNA having either the patient-derived mutation or single nucleotide polymorphisms (SNPs) in FANCA-deficient DT40 cell line, and examined

effects on cisplatin sensitivity, FANCD2 monoubiquitination, and FANCA focus formation. The cells carrying FANCA with the SNPs displayed incomplete complementation of cisplatin sensitivity, and mildly decreased FANCD2 monoubiquitination after treatment with MMC. However, these cells formed nuclear FANCA foci after treatment with MMC, similarly to the cells that expressed wild type FANCA, whereas FANCA with the FA patient-derived mutation formed no nuclear foci. These results suggest that FANCA SNPs found in cancer patients could cause genome instability due to partial loss of FA pathway, leading to carcinogenesis. (Accepted on October 10, 2006) *Kawasaki Medical Journal* 33(2): 87-99, 2007

Key Words ① Fanconi anemia ② FANCA ③ SNP ④ Mutation
⑤ Lung cancer

はじめに

ファンコニ貧血 (Fanconi anemia: FA) は、1927年に Guido Fanconi によって報告された①骨格異常、②骨髓不全 (再生不良性貧血)、③高発癌性 (白血病, 扁平上皮癌) などの特徴とする劣性遺伝性疾患 (例外として FANCB は X 染色体に存在^{1), 2)}) である³⁾⁻⁵⁾。FA 患者由来の細胞は、マイトマイシン C (MMC) や cisplatin などの DNA 架橋剤に対して極度の高感受性を示し、MMC による処理後に多数の染色体断裂を認め、この所見は診断にも用いられている^{6), 7)}。FA は単一の遺伝子欠損によるものではなく、現在のところ少なくとも12の遺伝的相補群が存在し、その遺伝子は FANCA, FANCB 等と命名されており、FANCI 以外の11種類が現時点でクローニングされている。これらのいずれの遺伝子欠損でもほぼ同様の症状が出現するので、すべての FA 遺伝子は基本的に同一ないし関連した生化学的経路で機能するものと考えられている (FA 経路)。実際に、FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL および FANCM タンパクは BLM タンパクとともに、核内で会合し FA コア複合体を形成している⁸⁾。いずれの FA コア複合体成分の変異 (患者において見いだされたもの) も、FA コア複合体としての会合を不可能とし、それゆえ、その機能をも破壊する。

FA コア複合体は FANCD2 タンパクの上流

に存在し、DNA 損傷をうけると 155 kD の FANCD2-S を 162 kD の FANCD2-L へとモノユビキチン化させる。ユビキチン化とは、E1 (ユビキチン活性化酵素) と E2 (ユビキチン結合酵素) の存在下で、E3 リガーゼ (ユビキチンリガーゼ) 機能に依存して起こる蛋白質修飾反応である。ポリユビキチン化は、蛋白質のプロテアソームによる分解系において重要な役割をはたしているが、モノユビキチン化はタンパク質の分解には関与しておらず、蛋白質の局在を変える取り外し可能なシグナルとして作用している。FANCD2 のモノユビキチン化は DNA 損傷時や細胞周期の S 期にみられ、核内での FANCD2 の局在変換とクロマチン移行に機能している^{9), 10)}。FANCD2 タンパクのユビキチン結合部位である 561 番アミノ酸のリジンアルギニンに変えた変異体は、*fancd2* 細胞の MMC 感受性を補正できないことから、モノユビキチン化は FA 経路の機能に必須といえる⁹⁾。FANCD2 フォーカスは家族性乳癌原因遺伝子の BRCA1 や、相同組換えに関与する Rad51 と共局在していることから、FANCD2 タンパクは DNA 修復でも相同組み換え修復機構に関与していることが強く示唆されている^{9), 11)-13)}。さらに最近、実際に FANCD2 への E3 リガーゼ機能を担っているのが PHD フィンガードドメインを持つ FANCL サブユニットであること¹⁴⁾ や、脱ユビキチン化酵素の USP1 によってユビキチンが FANCD2 から取り除かれること¹⁵⁾ が明らかとなった。

今回の研究では、FA コア複合体の構成成分である FANCA 遺伝子に着目した。FA 患者において、最も高頻度に変異が認められている FANCA 遺伝子は、1996年に2つのグループからその同定が報告された^{16), 17)}。ヒト FANCA 遺伝子は、16番染色体長腕上に存在し、1455アミノ酸からなる163 kDの比較的大きなタンパクである。配列には、はっきりと機能を示唆するモチーフは存在しないが、N末に核移行シグナル (nuclear localization signal: NLS)、そして1069~1090アミノ酸の間には蛋白-DNA や蛋白-蛋白相互作用に関係する可能性のある Leucine zipper 様のモチーフを持っている。

FAを発症している患者は非常に少ない。未同定の遺伝子を含めると算定は不可能だが、一般人口でのFA遺伝子異常のヘテロキャリアーは1%程度未満と推定されている¹⁸⁾。一方、近年、FA患者以外の癌患者でもFA遺伝子の変異やメチル化による発現低下が報告されている^{19), 20)}。そこで私は、まずニワトリB細胞株DT40細胞を用いてFANCAノックアウト細胞を樹立した。DT40細胞は、機能検索モデル系として扱いの不便な患者細胞にくらべ、相同組換え活性が上昇しており比較的扱いやすい。そして、ヒト癌由来のFANCA遺伝子の一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) ないしミスセンス変異の機能的な意義を確認するため、患者由来ミスセンス変異型のFANCAを、このFANCAノックアウトDT40細胞に発現させることにより、その機能にはたして異常があるかどうか、解明を試みた。

材 料 と 方 法

細胞の培養方法

培養液はRPMI1640培地に、非動化した10% Fetal Bovine Serum, 1% chicken serum, 1% Penicillin-Streptomycin, 2-mercaptoethanol (50 μ M) および L-glutamine (2 mM) を加えて作製した²¹⁾。細胞は全てニワトリB細胞株DT40細胞 (DT40細胞) 由来であり、この培養液中

で、39.5℃、CO₂ 濃度5%の環境下で培養した。

chicken FANCA のクローニングとノックアウト細胞の作製

chicken FANCA cDNA の全長は、chicken EST database からの検索、および一部cDNAは東大医科研・小田司先生から提供された配列情報によりプライマーをデザインしPCRで増幅させた。chicken FANCA genomeは、エクソン7とエクソン8を含む23 kbの領域のN末側とC末側の一部を、DT40細胞のgenomeをもとにPCRで増幅させ、TOPO-pCR-XL vector (Invitrogen) にサブクローニングした。エクソン7とエクソン8を含む23 kbの領域に、2段階にわけてBlasticidin (Bsr) およびL-Histidinol (His) に対する薬物耐性遺伝子をもつカセットをligationし、competent cell (DH5 α) にtransformationしてプラスミドを作製した。プラスミドはシーケンスによって薬物耐性遺伝子が導入されていることを確認した。プラスミドをKpnIで一本化し、1 \times 10⁷個の野生株DT40細胞にelectroporation (550V, 25 μ FD) でtransfectionした。Electroporationから24時間後にBsr 25 μ g/mlを加え、96穴プレートで約7日間培養しクローニングした。これらの細胞から核酸自動分離装置NA-3000 (KURABO) でgenomeを抽出した。Southern blot解析のため、まずgenomeをBamHIでdigestionした後、0.7% TBE アガロースゲルで泳動した。ゲルは0.5 M NaOH/1.5 M NaClによるアルカリ変成後、0.5 M Tris-HCl/1.5 M NaClで中和処理し、ナイロンメンブレンHybond-N (GE Healthcare) にオーバーナイトで転写した。転写されたメンブレンは、80℃で2時間処理し、DNAを固定した。Probeはターゲットベクターに使用した領域を含まないよりC末のゲノムDNAから作製し、³²Pでラベルしてhybridizationを行った。イメージングプレートでオートラジオグラフィを行い、フルオロイメージアナライザーFLA-3000 (FUJIFILM) で解析した。

RT-PCR

Chicken FANCA ノックアウト細胞から TRIzol (Invitrogen) を用いて total RNA を抽出した。Reverse transcriptase (Invitrogen) で RNA を cDNA に転換した。Chicken FANCA ノックアウト細胞およびコントロールとして chicken RAD51²²⁾ の cDNA を、Gold Taq polymerase (Applied Biosystems Inc.) で増幅させた。

Chicken FANCA の発現

Chicken FANCA cDNA の全長を pIRES2-EGFP vector に導入し発現ベクターを作製した。R350Q および H492R の変異導入は、クイックチェンジキット (Stratagene) により行った。すなわち、当該 mutation のはいった相補的なプライマーを使用し、PCR で増幅後、template のプラスミド DNA を Dpn I で digest することによって作製した。DT40 細胞に EGFP でラベルした chicken FANCA cDNA を electroporation で transfection し、24 時間後に Bsr と His で selection した。7 日後コロニーを回収し、それぞれを FACSCalibur で EGFP の発現を確認した。

cisplatin 感受性

1.4% methylcellulose を含む培養液に、それぞれ 0 μ M, 0.025 μ M, 0.05 μ M, 0.1 μ M, 0.25 μ M, 0.5 μ M の濃度の cisplatin (randax[®]: 日本化薬) を添加し、一定数の細胞をまき、39.5 $^{\circ}$ C, CO₂ 濃度 5% の環境下で培養しコロニーを形成させ算定した²¹⁾。

Western blot 解析

2 \times 10⁵ 個の細胞をマイトマイシン C (MMC) (協和発酵) 500ng/ml を含む培養液中で、39.5 $^{\circ}$ C, CO₂ 濃度 5% の環境下で 6 時間培養した。MMC 処理前後の細胞をそれぞれペレットダウンし、1 \times SDS サンプルバッファーで溶解した。アクリルアミド濃度 6% の SDS-PAGE ゲルを作製し、20 mA で 120 分通電しタンパクを分離した後、セミドライ方式でメンブレンに転

写した。一次抗体は 1/5000 希釈した抗 chicken FANCD2 抗体 (京都大学 小松賢志教授より供与)、二次抗体は 1/1000 希釈した抗 rabbit-IgG-HRP 抗体を用い、ECL-plus Western blotting detection reagents (Amersham Biosciences) で検出した。

核内フォーカスの可視化

細胞を MMC 500 ng/ml を含む培養液中で、39.5 $^{\circ}$ C, CO₂ 濃度 5% の環境下で 6 時間培養した。MMC 処理前後の細胞をそれぞれ cytospin し、4% paraformaldehyde でスライドに固定した後、70% ethanol でトリートメントした²¹⁾。BSA によりブロッキングした後、1/1000 希釈した抗 chicken FANCD2 抗体で染色し、その後、1/250 希釈した Alexa Fluor 594 二次抗体 (Molecular Probes) で処理した²³⁾。作製したスライドは共焦点レーザーイメージングスペクトロフォトメーター TCL SP2 AOBIS (Leica Microsystems) で観察した。

結 果

ニワトリ FANCA 欠損細胞の作成と分析

DT40 細胞は基本的に diploid の細胞であり、chicken FANCA genome は 2 アレルから成っている。まず、Bsr 薬剤耐性遺伝子を導入したターゲットベクターを、野生株 DT40 細胞に transfection したところ、27 個のクローンが形成された。27 個全てのクローンから genome を抽出し Southern blot をしたところ、21 クローンで Bsr のターゲットインテグレーションが確認できた。この中の 1 クローンに、さらに His の薬剤耐性遺伝子を導入したプラスミドを transfection した。19 個のクローンが形成され、Southern blot により、8 個のクローンで chicken FANCA 遺伝子がノックアウトされ、ホモの変異細胞となっていることが確認できた (Fig. 2B)。2 個の chicken FANCA 欠損細胞 (fanca 細胞) から RNA を採取し cDNA を作製し、ターゲットした領域の前後でプライマーを設定

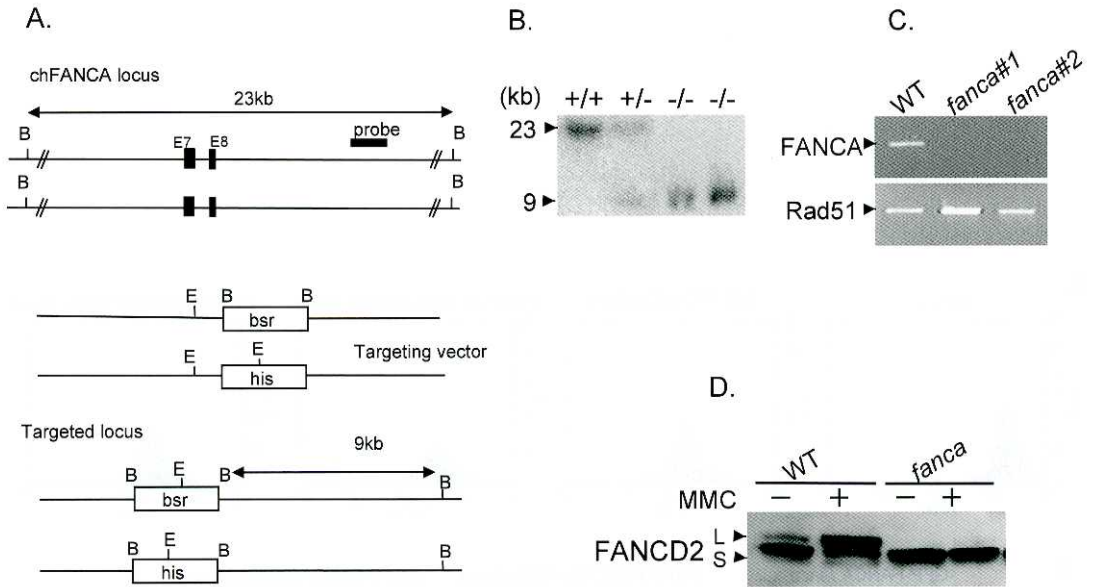


Fig. 2. Targeted disruption of chicken FANCA loci in DT40 cells.

(A) Schematic representation of partial chicken FANCA locus, the gene disruption construct, and the configuration of targeted allele. B, BamHI. Exon 7 and exon 8 were deleted by the gene disruption.

(B) Southern blot analysis of BamHI-digested genomic DNA from cells with indicated genotypes using flanking probe as shown in (A).

(C) RT-PCR analysis of total RNA from wild-type and *fanca* cells. Primers were designed from FANCA sequences of two upstream or downstream exons. As a control, the entire coding region of chicken Rad51 was amplified from each RT product. WT, Wild-type.

(D) Western blot analysis of whole-cell lysate prepared from wild-type and *fanca* cells probed with anti-chicken FANCD2 serum. Cells were treated with MMC (500 ng/ml) for 6 hours. L or S, long or short form of FANCD2, respectively.

し RT-PCR を行った。作製した *fanca* 細胞では band は検出されず、完全にノックアウトされていることが更に確認された (Fig. 2C)。FANCA は核内で FA コア複合体を形成しており、FA 経路の下流ではたらく FANCD2 の DNA 損傷に反応し生じるモノユビキチン化に関与している。予想通り、作製した *fanca* 細胞は MMC で DNA 損傷を加えても、FANCD2 のモノユビキチン化に相当する Long (L) form は観察されず、モノユビキチン化は起こっていなかった (Fig. 2D)。

fanca 細胞に EGFP と融合させた chicken FANCA cDNA の全長を導入し、*fanca*/EGFP-FANCA 細胞を作製した。FACSCalibur により EGFP の発現をみることによって、chicken FANCA cDNA が導入されたことを確認した (Fig. 5A)。*fanca* 細胞は cisplatin に感受性を

示し、chicken FANCA 全長 cDNA を導入したことによって、その感受性は野生株と同等まで完全に相補された (Fig. 3A)。また同様に、*fanca*/EGFP-FANCA 細胞では MMC での DNA 損傷による FANCD2 のモノユビキチン化も回復し、L-form が観察された (Fig. 3B)。したがって、*fanca* 細胞における cisplatin 感受性、FANCD2 モノユビキチン化の欠損は、FANCA 遺伝子の破壊によるものであると確認された。

癌患者における SNP の機能解析

BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) による検索では、ヒトとニワトリのアミノ酸の相同性 (identity) は約 50% であった (Fig. 1B)。国立がんセンターにおける肺癌患者ゲノムの大規模シーケンシングプロジェクトの成果の一部であ

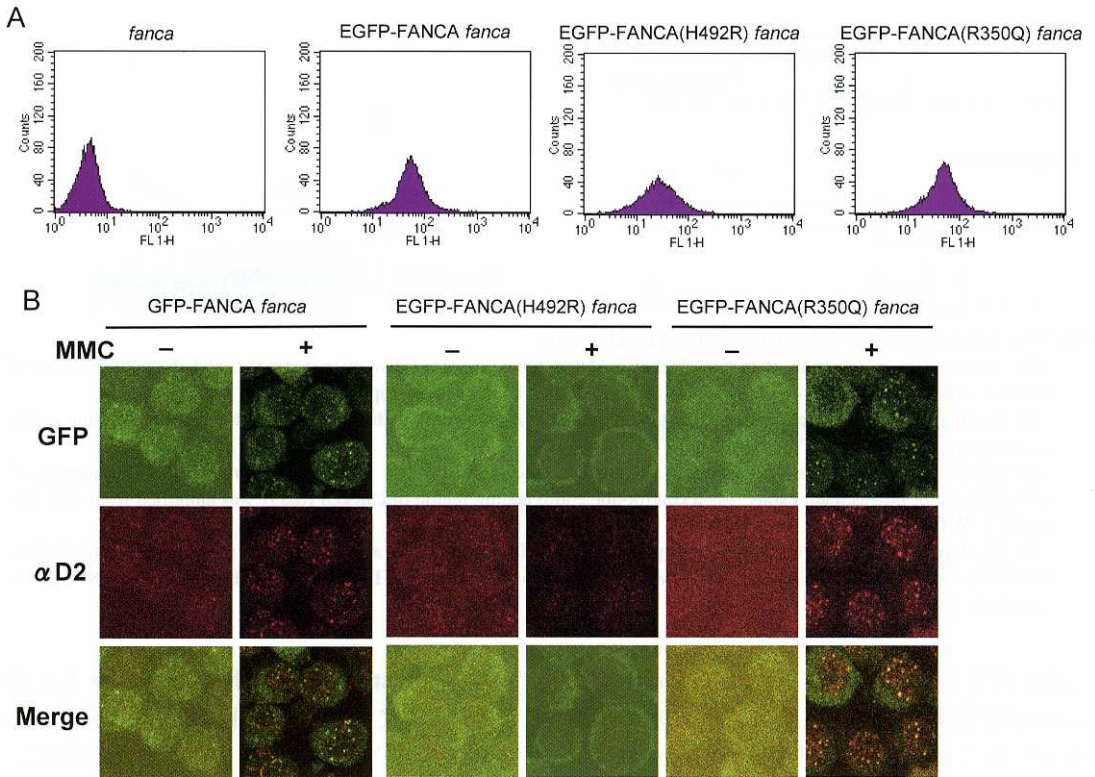


Fig. 5. Visualization of FANCA foci

(A) Expression levels of GFP-tagged wild type, mutant (H492R) or cancer-derived SNP variant (R350Q) chicken FANCA stably expressed in *fanca* cells. Expression levels of GFP in each cells were measured as FL1 fluorescence using FACSCalibur.

(B) Subnuclear focus formation of GFP-tagged wild type, mutant (H492R) or SNP variant (R350Q) FANCA in *fanca* cells. DT40 mutants stably expressing GFP-FANCA cDNAs were treated with MMC (500 ng/ml, 6 hours) or left untreated. Cytospin slides were prepared, stained with anti-FANCD2 antibody followed by anti-rabbit Alexafluor594 secondary antibody, and observed under laser-scanning confocal microscopy.

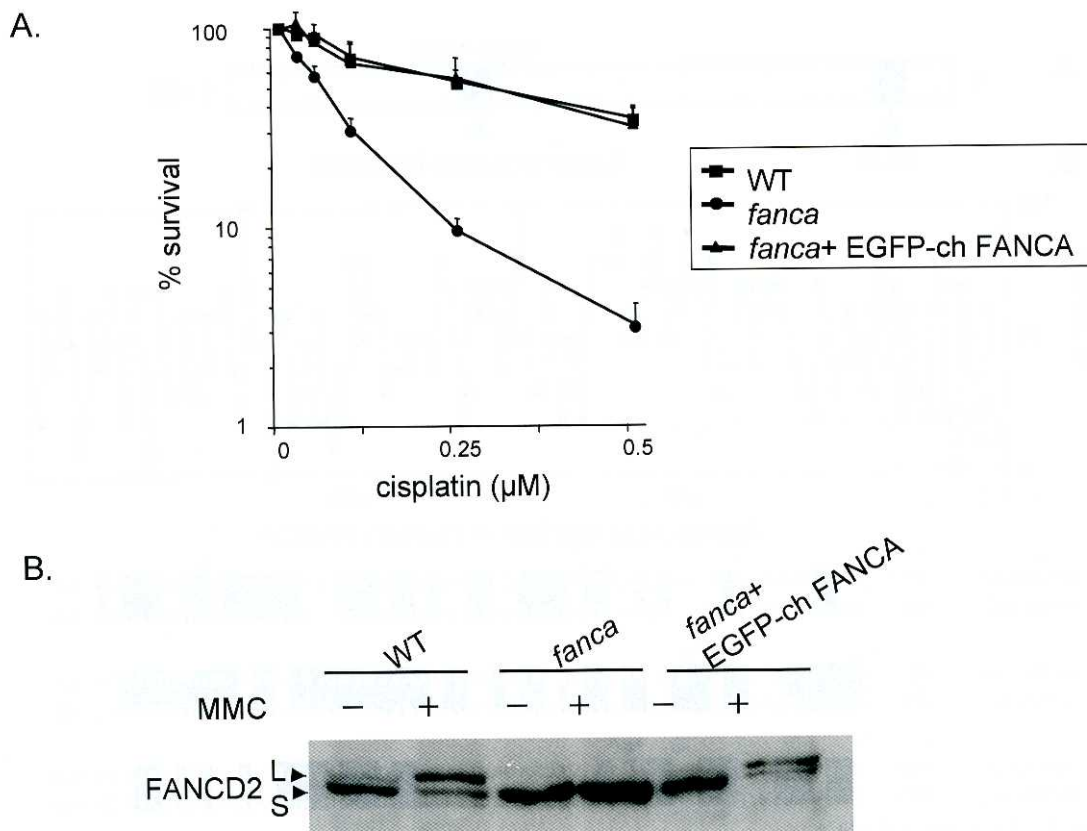


Fig. 3. Characterization of *fanca* cells.

(A) Sensitivity curves of cells exposed to cisplatin. The fraction of surviving colonies in 1.4% methylcellulose plates is shown. The *fanca* cells expressing EGFP-fused chicken FANCA cDNA were compared with wild-type (WT) and *fanca* cells. Mean and standard deviation (s.d.) of at least three independent experiments are shown.

(B) Western blot analysis of whole-cell lysate prepared from wild-type (WT), *fanca* cells, and *fanca* cell expressing GFP-ch FANCA cDNA probed with anti-chicken FANCD2 serum. Cells were treated with MMC (500 ng/ml) for 6 hours. L or S, long or short from of FANCD2, respectively.

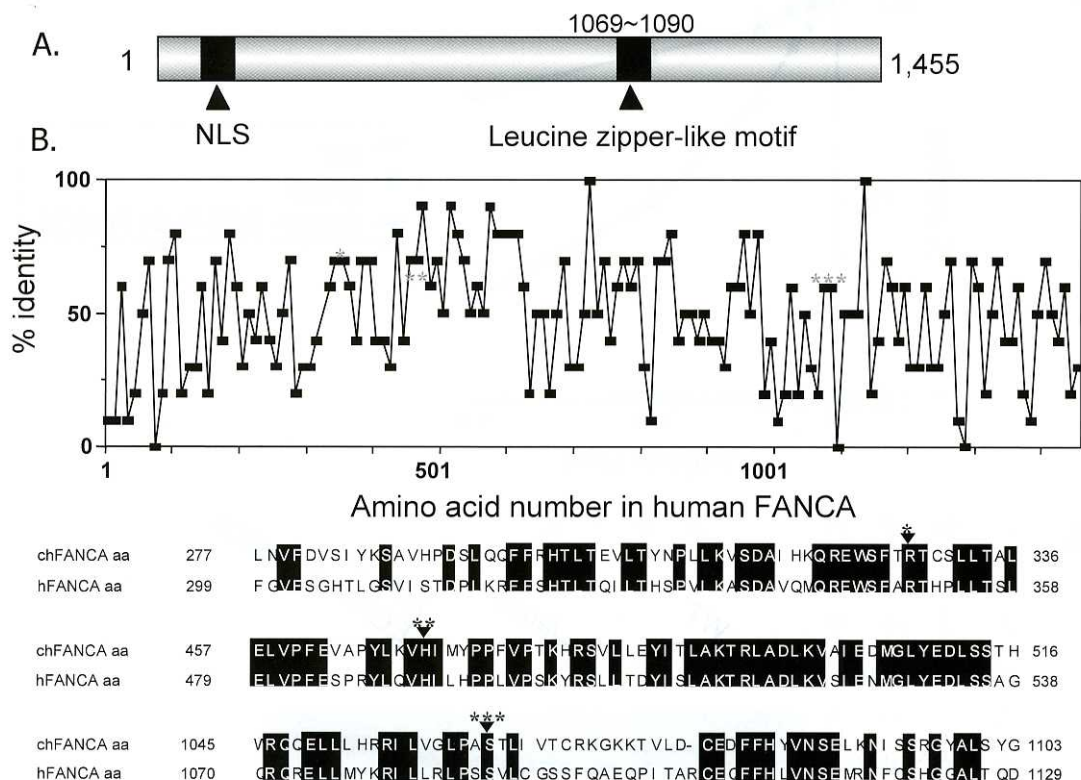


Fig. 1. The structure of FANCA

(A) Schematic diagram of wild type human FANCA. Human FANCA is a relatively large protein with 1455 amino acids and contains a bipartite nuclear localization signal (NLS) at its N-terminus and a leucine zipper-like motif between amino acids 1069 and 1090.

(B) Comparison of human and chicken FANCA. Amino acid sequence of chicken FANCA shares about 50% identity with human FANCA.

The amino acid residues in either FA patient-derived mutation (H492R, **) or lung cancer-derived single nucleotide polymorphisms (SNPs) (R350Q, * or S1088F, ***) are conserved between human and chicken.

る FANCA 一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) 情報 (Table 1) は, 国立がんセンター太田力博士から提供された。ヒトとニワトリの FANCA のアライメントによって比較したところ, ニワトリにアミノ酸が保存されている領域での SNP は 350 番アミノ酸 (アルギニン: R → グルタミン: Q) と 1088 番アミノ酸 (セリン: S → フェニルアラニン: F) の 2 か所のみであった (番号はヒト FANCA より)。進化上保存されたアミノ酸は機能上重要である可能性が高いと考えられる。またコントロールとして, FA を発症することがわかっているミスセンス変異は, ヒトとニワトリのアミノ酸が保存されていることから, 492 番アミノ酸 (ヒスチジン: H → アルギニン: R) を選択した²⁴⁾。

これらの SNP ないし変異をもった cDNA を EGFP-chicken FANCA 発現ベクターを site-directed mutagenesis することによって作製し,

fanca 細胞に導入し, R350Q, H492R, S1088F の変異型 FANCA を発現する細胞を作製した。これらの細胞で cisplatin への感受性を調べたところ, 肺癌患者由来 R350Q と S1088F の mutation を持つ細胞では, 相補は不完全であった (Fig. 4A)。しかし FA 患者に見られる mutation である H492R を発現する細胞では, 感受性は全く相補されなかった。DNA 損傷による FANCD2 モノユビキチン化は R350Q と S1088F 発現細胞では観察されたが, *fanca*/EGFP-FANCA ほど L form 優位ではなく, S form と L form がほぼ同等の比率で観察された。また H492R 発現細胞では, *fanca* 細胞と同様に FANCD2 モノユビキチン化は全くみられなかった (Fig. 4B)。DNA 架橋剤への感受性や FANCD2 モノユビキチン化といった FA に特徴的な性質は, いずれも R350Q と S1088F ではある程度まで回復がみられたが, 完全なものではなかった。

Table 1 List of FANCA SNPs found in lung cancer patients unrelated with Fanconi anemia. Whether single or more patients carried each SNP is indicated. In the right row, the conservation of the amino acid residue between human and chicken are also shown. T, threonine. N, asparagines. Q, glutamine. E, glutamic acid. A, alanine. I, isoleucine. R, arginine. S, serine. G, glycine. L, leucine. M, methionine. D, aspartic acid. F, phenylalanine. P, proline. C, cysteine. V, valine.

SNP	患者数	Chicken での保存
T 138 N	一人	× (→N)
Q 240 E	一人	× (→I)
A 266 T	複数	× (→C)
I 311 T	一人	× (→V)
R 350 Q	複数	○
S 501 G	複数	△ (→T)
S 674 L	一人	× (→P)
M 717 I	一人	× (→V)
D 809 G	複数	× (→V)
S 1088 F	複数	○
R 1204 P	一人	× (→Q)

核内フォーカスの可視化

DNA 損傷をうけると, FANCD2 は核内にフォーカスを形成することが知られている⁹⁾。これは DNA 損傷をうけた部位に, DNA 修復に関与するタンパクとして FANCD2 が集積するためと考えられる。コア複合体成分もまた FANCD2 と同等に障害 DNA 部位に集積するかどうか, FACSCalibur による解析で, EGFP の蛍光強度 (FL-1) がほぼ同じレベルであって, FANCA 発現量が同等と思われる細胞を用いて実験を行った (Fig. 5A)。*fanca*/EGFP-FANCA 細胞は MMC によって DNA 損傷が加わると, 核内に FANCA と FANCD2 のフォーカスを形成し, 両者は共局在していた (Fig. 5B)。R350Q の変異細胞でも, MMC 処理によって同様の核内フォーカスを形成した。一方で H492R では, FANCA, FANCD2 とともに核内フォーカスの形成は全く認められなかった。これは, おそらく, H492R 変異によってコア複合体が破壊されているためと考えられる。

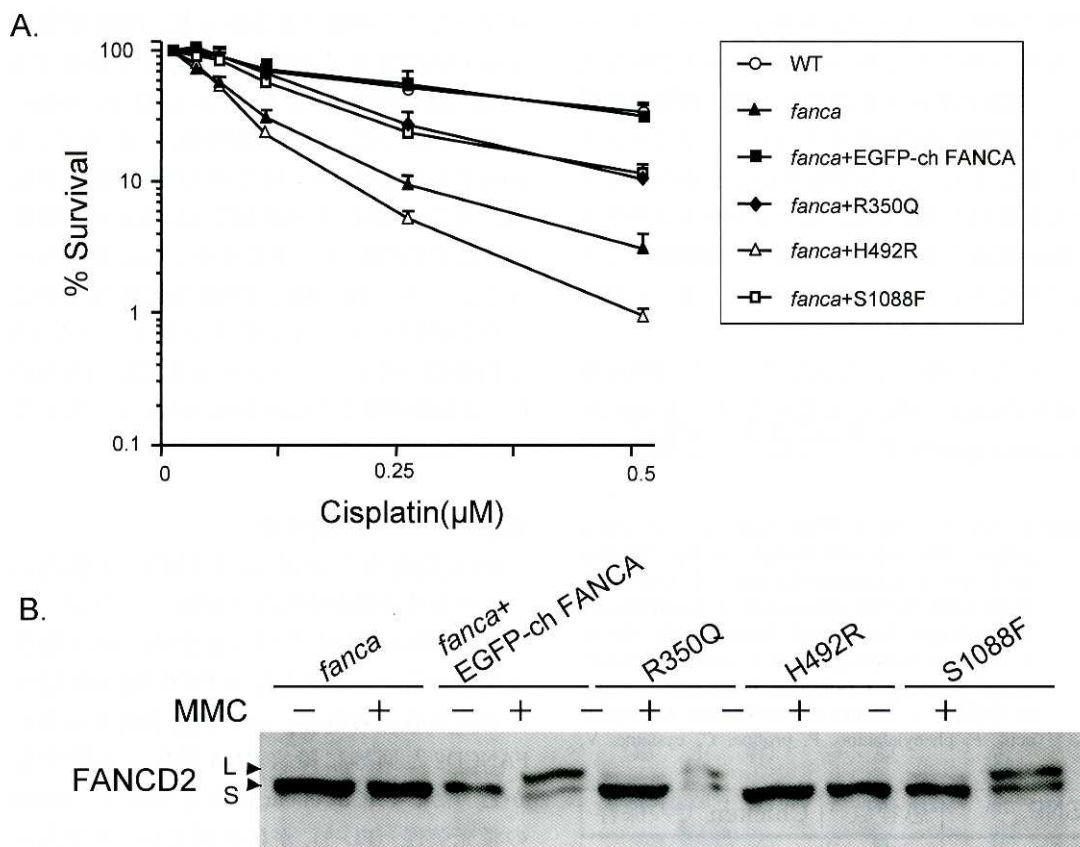


Fig. 4. Genetic analysis of *fanca* mutation or SNPs.

(A) Sensitivity curves of cells exposed to cisplatin. The *fanca* cell expressing wild type or mutant or SNP variant (R350Q, H492R, or S1088F) chicken FANCA cDNAs were compared with wild type (WT) and *fanca* cells in colony survival. Mean and standard deviation (s.d.) of at least three independent experiments are shown.

(B) Western blot analysis of whole-cell lysates prepared from *fanca* cells and *fanca* cells expressing chicken wild type, mutant or SNP variant (R350Q, H492R, or S1088F) chicken FANCA probed with anti-chicken FANCD2 serum. Cells were treated with MMC (500 ng/ml) for 6 hours. L or S, long or short form of FANCD2, respectively.

考 察

FA は非常に稀な疾患で、日本でも年間数例の報告はあるが、たとえば、1988年～1999年のあいだに僅か57症例が登録されているのみである²⁵⁾。日本では FANCC 遺伝子の異常による発症が多いとも言われているが、欧米では FANCA 遺伝子の異常によるものが66%を占め圧倒的に多い²⁶⁾。FA 遺伝子のいずれの異常によっても同様の FA を発症するが、遺伝子により、そして変異のタイプによって多少の重傷度に違いがあると報告されている²⁴⁾。FA の本質は、現在 DNA 修復欠損によるゲノム不安定性と考えられているが、骨格異常や骨髄不全の発症メカニズムは、今のところ十分には説明されていない。DNA 修復は、ゲノムの複製時に自然に発生する障害を回避するために必須であり、したがって、細胞増殖と密接な関連がある。骨髄不全は幹細胞の異常とも考えられ、幹細胞増殖障害が FA 病態に重要である可能性は否定できない。

近年 FA 遺伝子は FA 発症という枠を超えて、注目をあびる存在となっている。特に、FA を基礎疾患としない多数の癌患者から、複数の FA 遺伝子の異常が認められ報告されている。最初の報告は、2003年、谷口らによる cisplatin 感受性の卵巣癌の患者の一部で、FANCF 遺伝子のプロモーター領域のメチル化亢進による発現の抑制が確認されたというものであった¹⁹⁾。また同年、若年発症の膀胱癌で先天性の変異と体細胞変異や LOH により、FANCC 遺伝子や FANCG 遺伝子の両アレルが不活化されている症例が見出された²⁰⁾。

今回の研究では、FANCA 遺伝子のポリモルフィズム、主に SNP によるミスセンス変異のうち、FA を発症するものとししないものの機能的相違について様々なアッセイ系で検討した。FA を発症していない患者でみられた SNP は、DNA 架橋剤感受性の相補は不完全であり、野生株ほどの FANCD2 モノユビキチン化は起こ

さなかったが、それは核内フォーカスを形成するには十分なものであった。一方 FA 患者由来の変異をもつ細胞では DNA 架橋剤に非常に強い感受性を示し、FANCD2 モノユビキチン化は認められなかった。

本研究において、もうひとつ特記すべき点は、今回作製した *fanca*/EGFP-FANCA 細胞で細胞内での FANCA の局在を世界で始めて可視化出来たことである。MMC 処理した *fanca*/EGFP-FANCA 細胞は、核内でドット状に集積し、FANCD2 タンパクと共局在していることを証明した。さらに肺癌患者由来の変異 FANCA では同様のフォーカスが形成され、FA 患者由来の変異 FANCA ではフォーカス形成が認められないことも確認できた。以前、松下らは FANCA 遺伝子と同じ FA コア複合体の構成成分である FANCC タンパクで *fancc*/EGFP-FANCC 細胞を作製し、FANCC が MMC 処理によって核内でフォーカスを形成し、さらに FANCD2 タンパクと共局在することを報告²⁷⁾しており、これとも矛盾しない結果である。

今回検討した chicken FANCA タンパクの350番アミノ酸と1088番アミノ酸の SNP 変異 FANCA を発現した細胞では、DNA 架橋剤への反応や FANCD2 のモノユビキチン化が完全には回復しなかった。しかし FANCD2 タンパクとともに核内にフォーカスを形成しており、一応は DNA 損傷に対する応答を示していることが考えられた。これらアミノ酸の SNP によるミスセンス変異は複数の肺癌患者で確認されており、僅かな DNA 修復の異常が蓄積し肺癌発症に至っている可能性も否定は出来ない。腫瘍細胞において、元来片アレルのみであった SNP は、正常アレルが失われ (Loss of heterozygosity : LOH)、軽度な FA 経路の異常によってゲノム不安定性を生じ、結果として癌を発症する可能性が考えられる。実際にこれらの変異の見出された患者の癌細胞で、LOH が起こっているかどうか、検討が必要である。

FA タンパクが DNA 損傷の修復に関与していることは、今や数多くの論文で報告されてい

る事実であり、そのメカニズムの詳細も徐々に解明されつつある。今回、検討した FANCA タンパクで認められた SNP は複数の肺癌患者から検出されており、細胞の DNA 損傷に対して軽度ながら異常な応答を起こさせ、発癌につながった可能性が考えられる。今後の研究成果の蓄積により、癌発症のリスクの予知や、化学療法を選択、遺伝子治療といった分野への発展が期待される。

結 語

今回、DT40 細胞をモデル系にすることにより、FANCA 遺伝子のノックアウト細胞を作製

した。SNP あるいはミスセンス変異の遺伝子機能に及ぼす影響を評価する系を構築し、がん患者由来の FANCA 変異の機能評価を行ったところ、軽度の機能異常が検出された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました川崎医科大学免疫学教室 高田稷前教授、実験の御指導をいただきました平野世紀前助手に深甚なる謝意を表します。また本研究の遂行に御協力頂いた国立がんセンター 太田力先生、東京大学医科学研究所 山下孝之先生および小田司先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Rahman N, Ashworth A : A new gene on the X involved in Fanconi anemia. *Nat Genet* 36 : 1142–1143, 2004
- 2) Meetei AR, Levitus M, Xue Y, Medhurst AL, Zwaan M, Ling C, Rooimans MA, Bier P, Hoatlin M, Pals G, de Winter JP, Wang W, Joenje H : X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nat Genet* 36 : 1219–1224, 2004
- 3) Grompe M, D'Andrea A : Fanconi anemia and DNA repair. *Hum Mol Genet* 10 : 2253–2259, 2001
- 4) Joenje H, Patel KJ : The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. *Nat Rev Genet* 2 : 446–457, 2001
- 5) D'Andrea AD, Grompe M : The Fanconi anaemia/Brca pathway. *Nat Rev Cancer* 3 : 23–34, 2003
- 6) Sasaki MS : In Fanconi's anaemia defective in a process essential to the repair of DNA crosslinks? *Nature* 257 : 501–503, 1975
- 7) Sasaki MS, Tonomura A : A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents. *Cancer Res* 33 : 1829–1836, 1973
- 8) Meetei AR, Sechi S, Wallisch M, Yang D, Young MK, Joenje H, Hoatlin ME, Wang W : A multiprotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom syndrome. *Mol Cell Biol* 23 : 3417–3426, 2003
- 9) 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
- 10) Timmers C, Taniguchi T, Hejna J, Reifsteck C, Lucas L, Bruun D, Thayer M, Cox B, Olson S, D'Andrea AD, Moses R, Grompe M : Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. *Mol Cell* 7 : 241–248, 2001
- 11) Wang X, Andreassen PR, D'Andrea AD : Functional interaction of monoubiquitinated FANCD2 and BRCA2/FANCD1 in chromatin. *Mol Cell Biol* 24 : 5850–5862, 2004
- 12) Digweed M, Rothe S, Demuth I, Scholz R, Schindler D, Stumm M, Grompe M, Jordan A, Sperling K : Attenuation of the formation of DNA-repair foci containing RAD51 in Fanconi anaemia. *Carcinogenesis* 23 : 1121–1126, 2002
- 13) Taniguchi T, Garcia-Higuera L, Andreassen PR, Gregory RC, Grompe M, D'Andrea AD : S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51. *Blood* 100 : 2414–2420, 2002
- 14) Meetei AR, Yan Z, Wang W : FANCL replaces BRCA1 as the likely ubiquitin ligase responsible for FANCD2 monoubiquitination. *Cell Cycle* 3 : 179–181, 2004

- 15) Nijman SM, Huang TT, Dirac AM, Brummelkamp TR, Kerkhoven RM, D'Andrea AD, Bernards R: The de-ubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. *Mol Cell* 17 : 331 – 339, 2005
- 16) Lo Ten Foe JR, Rooimans MA, Bosnoyan-Collins L, Alon N, Wijker M, Parker L, Lightfoot J, Carreau M, Callen DF, Savoia A, Cheng NC, van Berkel CG, Strunk MH, Gille JJ, Pals J, Kruyt FA, Pronk JC, Arwert F, Buchwald M, Joenje H : Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anaemia gene, FAA. *Nat Genet* 14 : 320 – 323, 1996
- 17) Apostolou S, Whitmore SA, Crawford J, Lennon G, Sutherland GR, Callen DF, Ianzano L, Savino M, D'Apolito M, Notarangelo A, Memeo E, Piemontese MR, Zelante L, Savoia A, Gibson RA, Tipping AJ, Morgan NV, Hassock S, Jansen S, Ravel TJ, Berkell CV, Pronk JC, Easton DF, Mathew CG, Levrin O, Verlander PC, Batish SD, Erlich T, Auerbach AD, Cleton-Jansen A, Moerland EW, Cornelisse CJ, Doggett NA, Deaven LL, Moyzis RK : Positional cloning of the Fanconi anaemia group A gene. *Nat Genet* 14 : 324 – 328, 1996
- 18) Tischkowitz MD, Morgan NV, Grimwade D, Eddy C, Ball S, Vorechovsky L, Langabeer S, Stoger R, Hodgson SV, Mathew CG : Deletion and reduced expression of the Fanconi anemia FANCA gene in sporadic acute myeloid leukemia. *Leukemia* 18 : 420 – 425, 2004
- 19) Taniguchi T, Tischkowitz M, Ameziane N, Hodgson SV, Mathew CG, Joenje H, Mok SC, D'Andrea AD : Disruption of the Fanconi anemia-BRCA pathway in cisplatin-sensitive ovarian tumors. *Nat Med* 9 : 568 – 574, 2003
- 20) Van der Heijden MS, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE : Fanconi anemia gene mutation in young-onset pancreatic cancer. *Cancer Res* 63 : 2585 – 2588, 2003
- 21) Yamamoto K, Ishiai M, Matsushita N, Arakawa H, Lamerdin JE, Buerstedde JM, Tanimoto M, Harada M, Thompson LH, Takata M : Fanconi anemia FANCG protein in mitigating radiation and enzyme-induced DNA double-strand breaks by homologous recombination in vertebrate cell. *Mol Cell Biol* 23 : 5421 – 5430, 2003
- 22) Yamashita YM, Okada T, Matsusaka T, Sonoda E, Zhao GY, Araki K, Tateishi S, Yamaizumi M, Takeda S : RAD18 and RAD54 cooperatively contribute to maintenance of genomic stability in vertebrate cell. *EMBO J* 21 : 5558 – 5566, 2002
- 23) 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
- 24) Adachi D, Oda T, Yagasaki H, Nakasato K, Taniguchi T, D'Andrea AD, Asano S, Yamashita T : Heterogeneous activation of the Fanconi anemia pathway by patient-derived FANCA mutants. *Hum Mol Genet* 11 : 3125 – 3134, 2002
- 25) 中畑龍俊 : 小児の難治性貧血. *最新医学* 61 : 444 – 452, 2006
- 26) D'Andrea AD, Grompe M : Molecular biology of Fanconi anemia : implications for diagnosis and therapy. *Blood* 90 : 1725 – 1736, 1997
- 27) 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-monoubiquitin fusion reveals hidden functions of fanconi anemia core complex in DNA repair. *Mol Cell* 19 : 841 – 847, 2005