

論文の内容の要旨

論文題目 Fanconi 貧血 (FA) 蛋白 FANCA の構造・機能相関

指導教官 浅野 茂隆 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 足立 大樹

背景と目的

Fanconi 貧血 (FA) は、先天奇形、小児期に発症する進行性の骨髄不全と高率の悪性腫瘍発症を特徴とする常染色体劣性遺伝疾患である。細胞生物学的には mitomycin C (MMC) 等の DNA 架橋剤に高感受性を示すことが特徴で、低濃度の MMC 暴露で容易に染色体断裂と細胞死が起こる。FA は遺伝学的に 8 群 (A, B, C, D1, D2, E, F, G) に分類され、このうち 7 群の原因遺伝子は既に同定されている (*FANCA*, *FANCC*, *FANCD1/BRCA2*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*)。各遺伝子産物は既知の蛋白及び相互にもホモロジーがないことからその機能は明らかではない。これまでの知見から、これらの蛋白は細胞内で共通の分子経路を形成して機能するという、FA 分子経路モデルが提唱されている。このモデルによれば、*FANCA* は細胞質でリン酸化され、また *FANCC*, *G* と細胞質で複合体を形成し、核内に移行する。この複合体にさらに *FANCE*, *F* が結合する。*FANCD2* はこの核内蛋白複合体の形成に依存してモノユビキチン化を受けて活性化する。活性化 *FANCD2* は *BRCA1* と相互作用して DNA の相同組み換え修復に関与することが示唆されている。しかし、この FA 経路モデルは主にいずれかの FA 蛋白欠損細胞の解析に基づいており、各蛋白変異体の機能解析による検証は充分なされていない。

A 群原因遺伝子産物 *FANCA* は 1455 アミノ酸からなる蛋白で、アミノ末端

近傍に核局在化シグナル (NLS)、1069-1090 アミノ酸にロイシンジッパー様モチーフを有する以外に明らかな機能モチーフはない。FANCA は i) 核及び細胞質の双方に存在する、ii) FANCC 及び FANCF と間接的に相互作用し、FANCG 及び FANCE と直接結合する、iii) 細胞質のセリン・キナーゼによりリン酸化される、ことが知られている。FANCA は患者において多様な変異が報告されている。その多くは premature termination, large deletion を起こし蛋白を産生しないと考えられるが、ミスセンス変異や in frame の small deletion (1~数アミノ酸の欠失) により変異蛋白を産生すると予想されるものも 30 種類以上ある。このうち、delF1263, H1110P 等の変異は、MMC 感受性補正能を、リン酸化、核移行、FANCC との相互作用を障害すると報告されているが、その他の変異が機能に及ぼす影響は知られていない。そこで本研究では、1) 種々の患者由来 FANCA 変異体の細胞 MMC 感受性補正能を評価し、2) その FA 経路再構成能を評価して FANCA の構造・機能相関を解明し、3) FA 経路モデルの妥当性を検証すること、を目的とする。

方法と結果

21 種類の患者由来変異体をレトロウイルスベクターを用いて FANCA 欠損細胞 (GM6914) に発現させた stable transformant を用いてその機能を解析した。各変異体は FANCA 欠損細胞の MMC 感受性補正能に基づいて、野生型と同等の補正能を示す ($\text{MMC IC}_{50} \geq 30\text{nM}$) もの (D598N, Q1128E, T1131A, F1262L, H1417D: Group I)、中間の補正能を示す ($10\text{nM} \leq \text{MMC IC}_{50} < 30\text{nM}$) もの (L817P, P1324L, D1359Y, M1360I: Group II)、補正能の無い ($\text{MMC IC}_{50} < 10\text{nM}$) もの (R435C, H492R, L845P, delFQ868-869, R1055L, R1055W, H1110P, delF1135, delW1174, del1239-1243, delF1263, W1302R: Group III) の 3 群に分類出来た。

これらの変異体による FA 経路再構成能を順次評価した。免疫沈降法により他の FA 蛋白 (FANCC, F, G) との相互作用を検討したところ、FANCC 及び F との相互作用は Group I では野生型と同等で、Group II 及び III では各々中等度及び高度に障害された。一方、FANCG との相互作用が障害されたものはなかった。次に in vivo リン酸化を解析したところ、Group I は野生型と同等のり

ン酸化を示し、Group II では中等度に、Group III は高度にリン酸化が障害された。免疫染色法による細胞内局在の検討では、Group I では野生型と同様に核優位の局在が見られたが、Group II 及び III の殆どでは核局在が障害された。しかし L817P (Group II) と R1055L (Group III) では一部核移行するものが認められた。FANCD2 モノユビキチン化 (D2-Ub) への効果を検討したところ、Group I 導入細胞では野生型と同等の D2-Ub が見られ、Group II 及び III では各々中等度及び高度に障害された。

考 察

患者由来変異は FANCA の機能を様々な程度に障害することが明らかとなった。各変異体の MMC 感受性補正能と FA 経路再構成能 (FANCC/F との相互作用、リン酸化、核移行、FANCD2 モノユビキチン化) は極めてよい相関を示したことから、FA-A 細胞において FA 経路は MMC 感受性を規定する主要な分子機構であることが検証された。

野生型と同様の細胞内挙動を示した Group I 変異は、蛋白不安定化による細胞内発現減少、あるいはスプライシング異常による mRNA 欠損によって病原性となる可能性があるが、良性多型の可能性もある。この判別のためには患者細胞を用いた mRNA 及び蛋白発現の検討、野生型遺伝子導入による相補試験を要すると考えられる。

FANCA は他の FA 蛋白と相互作用するが、その機序は明らかでない。各患者由来 FANCA 変異体はその位置に関わらず FANCC/F との相互作用が障害されたことから、これらの相互作用は FANCA の局所構造よりも高次構造に影響されると示唆される。また、核移行も種々の変異体で障害されたことから、FANCA の高次構造は核移行にも重要なのかも知れない。これまでの知見で FANCA 核移行は他の FA 蛋白との相互作用やリン酸化により制御されていることが示唆されており、多くの変異体はこの仮説に合致する挙動を示した。しかし FA 蛋白との相互作用とリン酸化が障害された 2 つの変異体で核移行が見られたことから、FANCA の核移行は FA 経路の他の事象とは異なる機序で制御されていることが示唆される。

FA の臨床表現型は多様であり、遺伝型だけでなく人種や環境要因とも関係する。また A 群患者のうち FANCA の null-mutation の homozygote では、変異蛋白が産生されるタイプの変異を持つ患者と比較して貧血の早期発症、白血病の高率の発症が報告されている。本研究では Group III 変異体で僅かながら FA 経路の再構成能 (FANCD2 のモノユビキチン化) が認められたが、FANCA-null 細胞では全く検出されなかった。このことから FA 経路再構成能の差が FA-A 群の臨床表現型の多様性を説明する可能性が示唆される。各患者の臨床重症度と患者由来細胞の FA 経路再構成能との関係を解析することは、FA の遺伝型-表現型相関の分子機序解明に極めて重要な情報を提供すると考えられる。

結 論

以上より、本研究の結論を述べる。

1. 21 種類の患者由来 FANCA 変異体において、MMC 感受性補正能及び FA 経路再構成能に差があることを初めて明らかにした。
2. 各変異体の MMC 感受性補正能と FA 経路再構成能は極めてよい相関を示した。このことから、FA 経路は FA-A 群の細胞において、MMC 感受性を規定する主要な分子経路であることが検証された。
3. 各変異の位置と機能障害の程度に明らかな相関が認められなかったことから、これらの変異による機能への影響は、FANCA の局所構造変化によるのではなく、高次構造変化による可能性が示唆された。
4. FA 経路再構成能が障害された FANCA 変異体の一部で核移行するものが見られたことから、FANCA の核移行の制御は、FA 経路の他の事象とは異なる機序によることが示唆された。
5. 各変異体の機能障害の程度に差があることは、FA-A 群における臨床表現型の多様性を説明する基盤となる可能性が示唆された。