

# 遺伝性血液疾患の原因タンパク質を制御する新規のユビキチン経路を解明

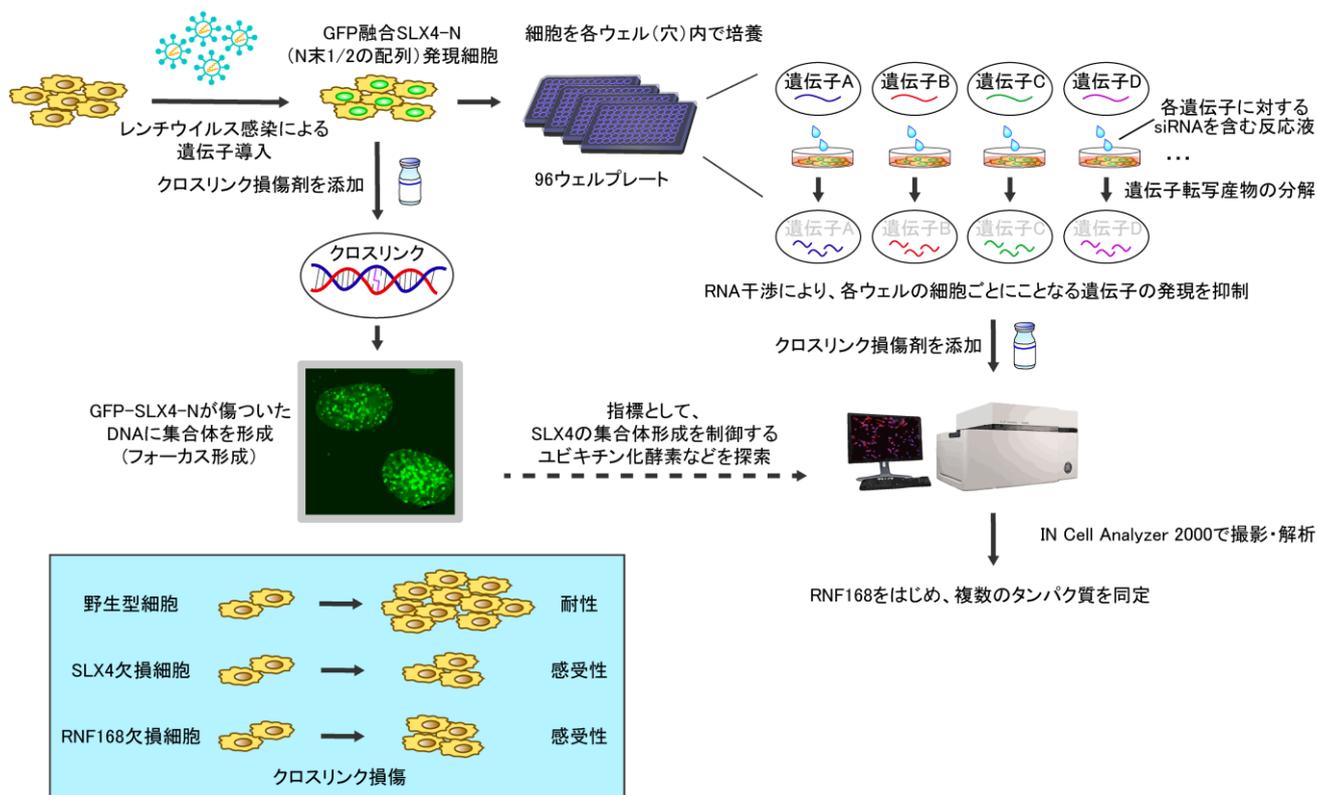
## —ファンコニ貧血にかかわる新たな関連因子群の同定—

### 概要

小児難病の遺伝性再生不良性貧血で最も頻度が高いのが、「ファンコニ貧血」とよばれる病気です。この病気は重篤で白血病や固形がんを併発し、その分子機構の解明は重要です。京都大学大学院生命科学研究科・附属放射線生物研究センター 高田穰教授、勝木陽子同特定講師、安倍昌子同研究員（研究当時、現：医学研究科）らのグループは、ファンコニ貧血の原因遺伝子 SLX4 が正常に機能するために不可欠のタンパク質 RNF168 を新たに同定しました。

SLX4 は、造血分化の際「クロスリンク」とよばれる種類の DNA の傷を修復する分子機構で働くと考えられています。遺伝子変異により、この機構が正常に働かなくなると、DNA の傷が正しく修復されずに「ファンコニ貧血」を発症します。SLX4 は「ユビキチン」とよばれるタンパク質に結合するアミノ酸配列（UBZ4 ドメイン）を使って DNA の傷に結合しますが、そのメカニズムはわかっていませんでした。本研究では、SLX4 の部分的なアミノ酸配列を蛍光タンパク質と融合させ可視化して、DNA の傷に集まるために必要な「ユビキチン化酵素」を探索し、RNF168 酵素分子が SLX4 の損傷への結合と正常な修復機能に必要であることを見出しました。今後、RNF168 にユビキチン化されるタンパク質（基質）を探し、造血分化の分子メカニズムをさらに明らかにしたいと思います。

本成果は、2021年10月27日午前0時（日本時間）に米国の学術誌「Cell Reports」にオンライン掲載されました。



**図の説明：** 今回の研究で用いた方法。細胞に蛍光タンパク質 GFP を融合させた SLX4 を発現させ、小さい穴（ウェル）をもつプラスチック容器（プレート）で培養し、siRNA を一つずつ導入してクロスリンク損傷剤を添加して遺伝子機能をテストしました。その結果、RNF168 を抑制すると、SLX4 の細胞内集合体が形成されなくなりました。また、SLX4 欠損のファンコニ貧血細胞ではクロスリンク損傷に高感受性ですが、

RNF168 欠損でも同様に高感受性であることがわかりました。

## 1. 背景

遺伝性の再生不良性貧血は重症の難病で、「ファンconi貧血」が最も有名かつ頻度の高い原因疾患です。有効な治療法は骨髄移植しかなく、高い確率で白血病、固形がんを併発するなど、医学、生命科学の分野で解明が必要とされる研究課題です。ファンconi貧血の原因遺伝子のひとつ SLX4/FANCP は、造血分化の際に生じる「クロスリンク」<sup>(注1)</sup> というタイプの DNA の傷 (DNA 損傷) を修復する分子機構で働いています。SLX4 の変異により、この機構が正常に機能しなくなると、DNA の傷が正しく修復されずに「ゲノムの不安定性」が生じ、造血分化が障害されて「ファンconi貧血」を発症します。SLX4 は「ユビキチン」<sup>(注2)</sup> とよばれるタンパク質に結合するアミノ酸配列 (UBZ4 ドメイン) を使って DNA の傷を認識しますが、ファンconi貧血の患者さんでは、この配列が失われる変異がみつかっています。したがって、SLX4 が DNA 損傷付近にある「ユビキチン化」されたタンパク質と結合することが、傷を修復しゲノムを安定化して、病気の発症を抑えるために必要だと考えられますが、そのメカニズムの解明は進んでいませんでした。DNA に傷ができると、ユビキチンタンパク質が DNA 損傷の周りの標的タンパク質 (基質) に目印のように結合することが知られています。SLX4 はこのユビキチンが複数連結した「ポリユビキチン鎖」に結合するという証拠があるのですが、一方、これまでの研究では、ユビキチンが1つだけ結合した「モノユビキチン化」FANCD2 (ファンconi貧血の他の重要な原因遺伝子)にくっつく、と主張する説が有力であり、議論が続いてきました。この議論に決着をつけるため、我々は、今回の研究計画を立案しました。

## 2. 研究手法・成果

本研究では、「クロスリンク」タイプの DNA の傷に集まる SLX4 を蛍光顕微鏡によって観察可能にするため、ユビキチン結合モチーフを含む部分的なアミノ酸配列を、蛍光タンパク質である GFP (green fluorescent protein) と融合させました。SLX4 のような DNA 修復タンパク質は、薬剤などによって DNA に傷ができると、「核内フォーカス」とよばれる集合体を形成することがわかっています。前述のユビキチン結合配列に変異があると、SLX4 はクロスリンクタイプの傷に集まることができません。このような集合体が核内に認められるかどうかを指標に、siRNA ライブラリースクリーニング<sup>(注3)</sup> とよばれる方法を用いて、さまざまな遺伝子の発現を1種類ずつ網羅的に抑制することで、SLX4 がクロスリンクタイプの傷に集まるために必要な「ユビキチン化酵素」を探索しました。600 種類程度の遺伝子をそれぞれ抑制した実験の結果、RNF168 酵素とその関連タンパク質が、SLX4 の集合体の形成による正常な機能に必要であり、両者は協調して同じ分子経路で働いていることを見出しました。背景で述べたように、これまで SLX4 は、「FANCD2」をはじめとするファンconi貧血の他の原因遺伝子群からなる「ファンconi貧血経路」によって DNA の傷に集まるのではないかと、特に「ユビキチン化」された FANCD2 めがけて集まるのではないかと、この説が主流となっていました。本研究の結果、クロスリンクタイプの DNA 損傷の修復機構として、従来確立しているファンconi貧血経路に加えて、SLX4 の傷の認識を司る新たな経路の存在が浮かび上がりました。

## 3. 波及効果、今後の予定

本研究で、これまではファンconi貧血との関与が知られていなかった RNF168 と、いくつかの関連タンパク質が SLX4 の機能に必要であることが明かされました。一部のファンconi貧血患者で、SLX4 のユビキチン結合配列をうしなう変異がみつかっていることから、この作用機構が病気の発症抑制に重要であることはあきら

かです。一方 RNF168 はほかの遺伝性疾患の原因遺伝子としても知られていますが、その臨床症状はファンconi 貧血との類似点がなく、どのようなメカニズムが働いて異なる病気を発症するのか、現時点では不明です。また、RNF168 は直接的に SLX4 が結合するポリユビキチン鎖をつくるのか、別のユビキチン化酵素を介しているのか、ユビキチン化され SLX4 が結合する標的タンパク質（基質）は何か等、複数の課題が残っています。特に、SLX4 が結合するユビキチン化されたタンパク質（基質）を同定することは重要です。今後はこれらに取り組み、造血分化におけるゲノム安定性の分子メカニズムをさらに明らかにしたいと思います。

#### 4. 研究プロジェクトについて

この研究は、文科省科学研究費補助金、上原記念生命科学財団、アステラス病態代謝研究会、京大コアステージバックアップ研究費、京大研究連携基盤次世代研究者支援事業、京都大学教育研究振興財団等のサポートを受けています。

##### <用語解説>

**クロスリンク**：DNA は二本の向き合った鎖から成り立っています。血液細胞を作る造血プロセスでは、ホルムアルデヒドが産生され、DNA 鎖の間に化学結合が作られます。この化学結合を「クロスリンク」とよんでいます。この結合は電子を共有するので（共有結合）強力で、自然にはずれたりしません。そのため修復作用が重要となるのです。

**ユビキチン(ubiquitin)**：体内にどこにでも存在するため、「ユビキタス(ubiquitous, 偏在する、という意味)」からこの名前がつけられた、76 アミノ酸の小さいタンパク質。他のタンパク質（基質）にユビキチン化酵素群の働きによって一個ずつ、あるいは鎖状に共有結合し（これをユビキチン化と呼ぶ）、細胞内タンパク質の機能制御に重要な役割を果たしています。

**siRNA ライブラリースクリーニング**：siRNA とは、線虫や植物に存在する 21-23 塩基対の短い RNA 分子です。合成 siRNA をヒトの細胞に導入することで、その配列と同じ配列のメッセンジャーRNA（遺伝子 DNA からコピーされた核酸の一種で、タンパク質合成のための設計図となる分子）を分解し、対応するタンパク質の発現を抑制します（これを RNA 干渉といいます）。ヒトの遺伝子は 2 万種類ほどあるので、各遺伝子に対応する siRNA を 2 万種類合成し、別々の入れ物（試験管）に保管します。これが図書館に並んだ 2 万冊の本のようなので、ライブラリーと呼ばれます。このライブラリーをつかって、一つずつの遺伝子に対応したタンパク質の発現を細胞内で低下させたときに、「指標」となる現象（本研究の場合は、GFP-SLX4-N の集合体形成）に影響をおよぼすものを選別する作業を「siRNA ライブラリースクリーニング」と呼んでいます。

##### <研究者のコメント>

今回、国内外の共同研究者のご協力を得て、遺伝病の発症にかかわる分子メカニズムの一端をあきらかにすることができました。本研究をおこなうにあたってご助力いただいた皆様に、この場をお借りしてところから感謝申し上げます。

##### <論文タイトルと著者>

タイトル：RNF168 E3 ligase participates in ubiquitin signaling and recruitment of SLX4 during DNA

crosslink repair (E3 ユビキチンリガーゼ RNF168 はユビキチンシグナルを介してクロスリンク修復因子 SLX4 をリクルートする)

著 者 : Yoko Katsuki, Masako Abe, Seon Young Park, Wenwen Wu, Hiromasa Yabe, Miharu Yabe, Haico van Attikum, Shinichiro Nakada, Tomohiko Ohta, Michael M. Seidman, Yonghwan Kim, Minoru Takata

掲 載 誌 : Cell Reports DOI : <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109879>