

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19770146

研究課題名 (和文) 転写と共役した修復機構に関わる因子の解析

研究課題名 (英文) Analysis of the nucleotide excision repair factors

研究代表者

成田 央 (NARITA TAKASHI)

大阪大学・大学院生命機能研究科・助教

研究者番号：50437399

研究成果の概要：

本研究では、色素性乾皮症・コケイン症候群・硫黄欠乏性毛髪発育異常症などの遺伝子疾患の原因遺伝子産物に注目し、その細胞内機能と分子病態を明らかにすることを目的とした。その結果、ヌクレオチド除去修復機構において損傷 DNA の切り出しに関与する XPG タンパク質が、転写反応にも深く関与することを明らかにした。このことは、特にコケイン症候群の分子病態を解明する上で重要であると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	390,000	3,490,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：DNA 修復・転写・発現制御

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノムは絶えず損傷を受けており、これを放置すると突然変異や細胞死を引き起こし癌や老化の原因となる。そのため生物は、損傷の種類に応じた DNA 修復機構を使い分け、損傷が蓄積しないようにしている。これまでに DNA 修復機構に異常を持つ遺伝病の解析から多くの修復因子が同定され、修復反応の

全体像が明らかとなってきた。その一方で、それら遺伝病には DNA 修復機構の異常が原因とは考えにくい症状が存在することが指摘されている。以下に示すような理由から、こうした症状は、いくつかの修復因子が転写複合体に含まれることに起因するのではないかと考えられる。そこで、本研究ではこうした因子がどのような転写複合体を構成し

ているのか、またその複合体がどのような機能を担っているのかを明らかにすることを目的とする。

DNA 修復機構のうちでも代表的な経路である除去修復は、修飾ヌクレオチドのような比較的小さな損傷の修復に関わる塩基除去修復(BER)と鎖間架橋や大きな化学基の結合といった大きな損傷に関わるヌクレオチド除去修復(NER)に分類することができる。NER はさらに、ゲノム全体で働く NER 経路(GGR)と、転写と共役した NER 経路(TCR)の2つの経路が知られている。GGR と TCR は DNA 損傷の認識機構に違いがあり、その後の過程には共通した修復機構が働くと考えられている。以下に NER に異常を持つ遺伝病の特徴を示す。

色素性乾皮症(XP)患者は日光紫外線感受性、皮膚の乾燥、角化、萎縮、そして日光暴露部位において高頻度に皮膚癌を発症する。XP には A~G 及びバリエーション群の8つの遺伝的相補性群(XP-A~XP-G, XP-V)が存在する。XP-C と XP-E 群は GGR のみに異常を示し、XP-V 群は NER とは異なった修復経路に異常を持つ。それ以外の XP 相補性群は GGR と TCR の両方に異常を示す。

コケイン症候群(CS)患者は日光紫外線感受性、特徴的な鳥様顔貌、悪液質を伴う身体発育異常、原発性のミエリン鞘変性に由来する知能低下や種々の神経症状を示す。また CS 患者には XP 患者のような高頻度の皮膚癌の発症は見られない。CS には CS-A と CS-B の2つの遺伝的相補性群が存在し、いずれも GGR は正常に働くが TCR を選択的に欠損している。また、XP-B, XP-D, XP-G 患者の一部は、XP の皮膚症状に加えて CS 徴候を合併している(XP/CS 患者)。

これらの遺伝病はいずれも NER に異常を持つが、XP/CS, CS 患者に認められる多様な

臨床症状は NER の異常のみでは説明できない。なぜなら、例えば XP-A 患者は GGR, TCR の両方の NER 経路を欠損しているにもかかわらず、CS 患者に見られるような身体発育異常等の症状を示さないからである。XP と CS の全ての相補性群の原因遺伝子はクローニングされており、それぞれ XPA~XPG, XPV, CSA, CSB 遺伝子である。ここで注目しているのは、①CSA と CSB は転写と共役した修復の初期過程に関与する、②CSB は RNA ポリメラーゼ I や RNA ポリメラーゼ II の転写反応に関与する (Yuan, X. et al., *Mol. Cell*, **27**:585-595, 2007, Proiett-De-Santis, L. et al., *EMBO J.*, **25**:1915-1923, 2006) 、③XPB と XPD は基本転写因子 TFIIF のサブユニットに含まれている、④XPG が TFIIF と安定な複合体を形成し、ホルモンレセプターを介した転写活性化に必要である (Ito, S. et al., *Mol. Cell*, **26**:231-243, 2007) という点である。

これらのことから、XP や CS の原因遺伝子のうちのいくつかは転写複合体に含まれ遺伝情報の読み出しに関与しており、CS 患者においてはその読み出し機構の異常によって XP にはない多様な臨床症状が引き起こされると考えられる。しかし、TCR の分子機構の詳細や、修復因子と転写複合体との関係も十分には明らかになってはいない。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、CSA, CSB, XPB, XPD, XPG といった TCR に必須な因子が転写反応に果たす役割を解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) TCR に必須な因子の転写反応における効果の検討

本研究では、TCR に必須な因子の転写反応における効果を検討する系として、①基本転

写反応における効果、②刺激に応答した転写に対する効果、の2点から解析を行った。

まず基本転写における解析では、RNAポリメラーゼ II と基本転写因子群を用いた *in vitro* 転写再構成系に目的因子を加える方法、抗体を用いて目的因子を除去した HeLa 細胞核抽出液を用いて転写を行う方法、精製された RNA ポリメラーゼ II のみに目的因子を加える方法、などの転写系を用いて転写開始および伸長反応における各因子の効果を検討した。

次に刺激に応答した転写については、これまで転写因子の効果を検討する系として EGF や IL-6 で刺激後の *c-fos* や *jun B* 遺伝子といった前初期遺伝子 (*immediate early gene*) の発現を定量するという系が報告されている (Yamada, T. et al., *Mol. Cell*, **21**:227-237, 2006, Aida, M. et al., *Mol. Cell Biol.*, **26**:6094-6104, 2006)。そこでこのような系を利用し、正常細胞と患者細胞や目的因子をノックダウンした細胞を用いて、同様のアッセイを行った。

(2) DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトームの解析

転写反応における効果を検討するもう一つの方法として、DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトームの解析を行った。比較するサンプルとしては、正常細胞と患者細胞、患者細胞と患者細胞に原因遺伝子を導入して表現型が正常となるようにした細胞、正常細胞と TCR に必須な因子をノックダウンした細胞、などを用いそれぞれのサンプル間において変化する遺伝子を観察した。

#### 4. 研究成果

(1) TCR に必須な因子の転写反応における効果の検討

まず基本転写における効果を検討するた

め、基本転写因子を用いた転写系、HeLa 細胞核抽出液を用いた転写系、精製 RNA ポリメラーゼ II のみを用いる転写系、の3つの転写系を構築した。次にこれらの系を用いて各因子の効果を検討したところ、HeLa 細胞核抽出液から XPG を除去すると転写効率が低下することが分かった。さらに RNA ポリメラーゼ II 単独による転写系に XPG を添加すると、転写活性の上昇が見られた。これらのことから、XPG が転写反応を促進する可能性が示唆された。

刺激に応答した転写を観察する系においては、CSA や CSB を欠損した細胞と、その細胞に組換え CSA 又は CSB を発現させて NER 活性を回復させた細胞を用いて EGF 添加後の *c-fos* 遺伝子の発現レベルを観察した。その結果、どちらの細胞においても組換えタンパク質を発現させた細胞の方が *c-fos* の誘導発現レベルが高かった。このことはこれまでに CSB が転写伸長因子として報告されていることと合致すると考えられる。次に、HeLa 細胞で XPG をノックダウンした細胞について同様に実験を行った。その結果、XPG をノックダウンした細胞は、コントロール細胞に比べて著しく *c-fos* の誘導発現レベルが低下した。このことから、試験管内だけでなく細胞内においても XPG が転写反応に深く関与する可能性が示唆された。

(2) DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトームの解析

上記 XPG ノックダウン及びコントロール HeLa 細胞のセットを用いてトランスクリプトームの解析を行った。その結果、いくつかの因子の発現が XPG のノックダウンによって有意に増加・減少した。現在はこれらの因子について、引き続き解析を行っている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Tetsu M.C. Yung, Takashi Narita, Toshiharu Komori, Yuki Yamaguchi, Hiroshi Handa. Cellular dynamics of the negative transcription elongation factor NELF. *Exp. Cell Res.*, **315**:1693-1705 (2009)  
査読有

② Takashi Narita, Tetsu M.C. Yung, Junichi Yamamoto, Yasunori Tsuboi, Hideyuki Tanabe, Kiyoji Tanaka, Yuki Yamaguchi, Hiroshi Handa. NELF interacts with CBC and participates in 3' end processing of replication-dependent histone mRNAs. *Mol. Cell*, **26**:349-365 (2007)  
査読有

[学会発表] (計1件)

① 成田 央、ヌクレオチド除去修復に関わる構造特異的エンドヌクレアーゼ XPG の機能解析、第31回日本分子生物学会年会 2008年12月、神戸ポートアイランド

[その他]

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jp/labo/12>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

成田 央 (NARITA TAKASHI)

大阪大学・大学院生命機能研究科・助教  
研究者番号：50437399

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし