

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07308

研究課題名(和文)先天性角化異常症細胞のゲノム不安定性を招く新規ヌクレオチド除去修復因子の欠損

研究課題名(英文) Defects in a novel nucleotide excision repair factor leading to genomic instability in congenital dyskeratosis cells

研究代表者

丹伊田 浩行 (Niida, Hiroyuki)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20336671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：CPDの除去に同じテロメラーゼ複合体因子が必要とされることを見出した。テロメア領域にはNERのコア因子XPF/ERCC1が局在することからテロメラーゼが関与するNERとの関連を疑いその活性機構について検討した。XPF-ERCC1の活性制御についてわかっていない。我々はXPFの機能維持にarginine methyltransferase, PRMT4/CARM1が必要であることを発見した。これまでのところPRMT4によるメチル化がXPF-ERCC1のDNA損傷部位局在、ヌクレアーゼ活性へ影響を与えることが明らかになり、その大きな原因はXPFとERCC1の結合能の変化によるものと判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

テロメア領域に生じたCPDが既知のNERによって修復されるのかわかっていない。我々はNERの進行にテロメラーゼのサブユニットTERT, TERC, DKCが必要とされることを明らかにした。これらテロメラーゼサブユニットの欠損は先天性角化症(DC)の原因となる。我々はテロメアに局在するNER因子ERCC1/XPFの機能制御にPRMT4が必要であることを見出した。XPFの活性はNERやICL repairに必須のヌクレアーゼであるとともにcisplatinなど抗癌剤に対する抵抗性に関与することが明らかにされており本研究の成果からDCに対する治療標的創出や薬剤耐性の軽減に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We found that the same telomerase complex factors are required for the removal of CPDs. We suspected an association with telomerase-mediated NER because XPF/ERCC1, a core factor of the nucleotide excision repair machinery (NER), is localised in the telomere region, but the regulation of XPF/ERCC1 activity is not known. We found that the arginine methyltransferase, PRMT4/CARM1, is required for the maintenance of XPF function. So far, it has been shown that methylation by PRMT4 affects the localisation of XPF-ERCC1 at sites of DNA damage and nuclease activity, which is largely due to changes in the binding capacity of XPF to ERCC1.

研究分野：DNA損傷修復

キーワード：テロメラーゼ 先天性角化症 XPF PRMT4

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報を担う DNA の安定性を維持することは様々な疾病の発症を抑えるために重要である。事実、DNA 損傷修復(DDR)機構の破綻により癌や精神発達障害が引き起こされることが明らかになっている。細胞内で働く DDR には損傷の種類に応じいくつかの修復機構があるがいずれの場合も数多くの分子が関与し、その全貌は明らかになっていない。最近我々はヒストンアセチルトランスフェラーゼ HBO1 が NER に必須の働きをすることを報告している(Niida et al. *Nat Commun.* 2017)。さらに細胞内で必要な NER 因子を網羅的にスクリーニングしたところ *DKC1* などいくつかの新規候補遺伝子を同定することができた。

DKC1 と先天性角化異常症(Dyskeratosis congenita; DC)について。

DC は皮膚への異常な色素沈着などを特徴とする先天性造血不全症候群である(図1)。臨床異型には小頭症や精神遅滞を示す Hoyeraal-Hreidarsson 症候群も含まれる。DC 患者細胞の DNA を解析すると染色体末端テロメア長が短縮している。テロメアは TTAGGG の繰り返し配列から成り、DNA 末端を隠す t-loop と呼ばれる独特のループ構造を形成している。このため DNA 二本鎖切断修復機構の監視からテロメア末端を隠し染色体を安定に維持する働きを持つ。現在までに DC 患者の遺伝子変異としてテロメア配列を合成するテロメラーゼ複合体の構成因子 *DKC1*, *TERC*, *TERT*, *NOPI0*, *NHP2* が報告されている。DC の典型例では 10 才までに爪の萎縮と皮膚色素沈着が出現し、20 才までに骨髄不全の出現、30 才までに 90%以上の症例で骨髄不全を発症する。死因として骨髄不全 60-70%, 肺線維症 10-15%, 悪性疾患 10%とされており生存年齢の中央値 49 才と報告されている(先天性角化不全症診療の参照ガイド)。DC 患者では加齢を重ねる過程においてさえテロメラーゼ複合体の欠損によりテロメアの短縮が顕著に進む(Alter B et al. *Haematologica*, 2012)。そもそもテロメラーゼ活性は生殖細胞以外で厳しく発現抑制をされているので単に細胞分裂回数が増えるとテロメアが短縮する、いわゆる末端複製問題だけで DC を発症するほどの著しいテロメア短縮をきたす説明は出来ない。

図1 DCによる色素沈着



h..ps://www.derma.ologyad/isor.com

NER とテロメア・テロメラーゼについて。

NER は最も多様な DNA 損傷を修復する修復機構であり、UV により生じる CPD、アルデヒドによる DNA 鎖内架橋、活性酸素による特殊な損傷塩基を除去するときに働く(図2)。現在我々は siRNA ライブラリーを用い、網羅的に細胞内で NER に必要とされる分子のスクリーニングを行なっている。その結果、候補として DC の原因遺伝子 *DKC1* を同定した。*DKC1* のノックダウン(KD)細胞は UV 感受性も増加していることを発見している(図3, 未発表データ)。*DKC1* はテロメラーゼ複合体の構成因子であることからテロメアに生じた損傷を NER で修復するときに必要とされることが考えられる。テロメアの TTAGGG のリピート配列は潜在的に CPD を生じやすい配列である。実際染色体内部のヘテロクロマチン領域よりも CPD 発生率が高いと報告されている(Rochette et al, *PLoS genet.* 2010)。意外なことであるがこのテロメアに生じた CPD が NER により除去されるか否かについて統一した見解がない。あるグループは NER が機能せず DNA pol が損傷乗り越えをすると報告

図2 NER

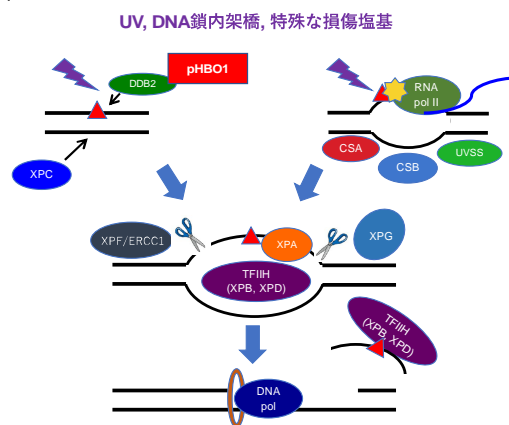
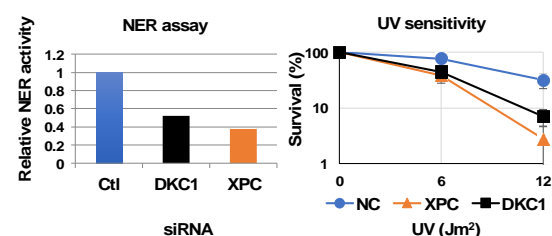


図3 DKC1欠損はNER活性が欠損し紫外線感受性を招く



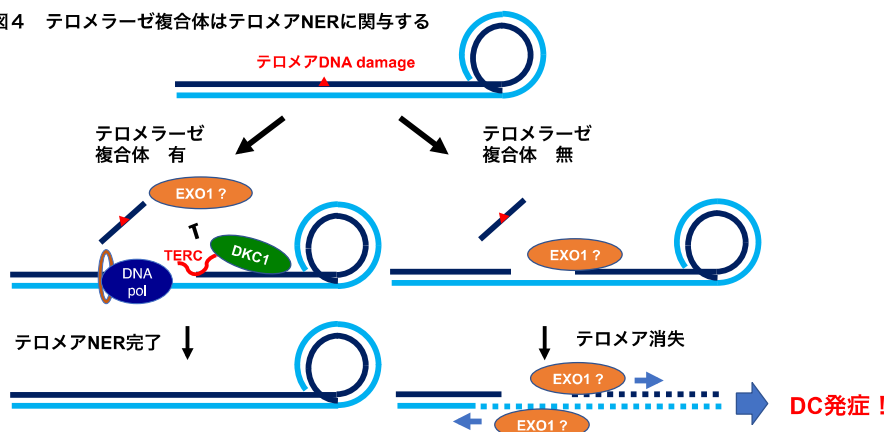
する(Rochette et al, PLoS genet. 2010)一方で、テロメア領域の CPD はゲノム内部に比べ7倍早く NER により除去されるという報告もある(Parikh et al, Nat Commun. 2015)。

NER 経路の遺伝的欠損は色素性乾皮症(XP)の原因となるが、XP 患者の特徴の一つに皮膚への色素沈着が挙げられる。これは DC の顕著な症状でもある。UV 照射によりメラノサイトからメラニンの産生が促されるが、その産生誘導刺激の一つは UV により生じた CPD の存在であることが報告されている(Eller M et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996)。このため UV 照射にตอบสนองした損傷修復が損なわれると色素の過剰生産と異常沈着が起こると考えられる。DC 患者細胞は XP 細胞と同様に UV 損傷応答に欠陥を持つという共通項があるのかもしれない。

2. 研究の目的

未だ全容が明らかではない細胞内の NER に必要とされる新規因子としてテロメラーゼ複合体サブユニット DKC1 が同定された。DKC1 を含むテロメラーゼ複合体がテロメア NER に必須の分子なのか

図4 テロメラーゼ複合体はテロメアNERに関与する



(図4作業仮説)を問い、NERがDCの発症と病態にどのようなメカニズムで関与しているのかを問う。この二つの問いに答える

ことでこれまで予想もされていなかった NER の欠損と DC の発症という新たな繋がり詳細に迫ることが出来る。

我々は DC の原因遺伝子産物 DKC1 を含むテロメラーゼ複合体が NER を実行する上で必須の因子であると考えている。そこで解明を目指す点は次の事柄が挙げられる。

- 1) NER に関与するならば修復する損傷はテロメア領域に発生したものなのか。
- 2) テロメラーゼ複合体が NER のどのステップで関与するのか。
- 3) DC の発症・病態に NER 欠損はどの様に関与するのか。

本研究を上記3つの課題に分け順次明らかにして行く。

3. 研究の方法

1. テロメアに生じた CPD が NER により修復されるか、細胞により違いがあるか調べる

この点について異なる報告がされているのでいくつかの細胞を用いて検討する。細胞はヒト繊維芽細胞(正常細胞)、HeLa など(テロメラーゼ陽性癌細胞)、U2OS など(テロメラーゼ陰性癌細胞)の3タイプを用い UV 照射で CPD 誘導後、継時的にテロメア配列をベイトとしたビーズでテロメア DNA を回収する。ドットプロットを α -CPD 抗体を用いて行い、細胞の CPD 除去修復能をモニターする。

2. 既知の NER 因子を KD しテロメアの CPD 除去修復を検討する

1の実験で CPD 除去が認められたら XPC, XPA, XPG, XPA を KD してアッセイを行う。さらに DKC1, TERC, TERT を KD してアッセイを行う。既知の NER 因子の欠損で CPD 除去が阻害されれば NER による CPD 除去と判断できる。またテロメラーゼ因子の除去でも阻害されればテロメラーゼ因子がテロメアの CPD 除去に関わることを証明できる。

3. テロメラーゼ因子が機能するステップを検討する

テロメラーゼ因子を KD した細胞に UV を照射し、DNA をアルカリ処理し一本鎖にして

Southern blotting を行う。短いテロメア配列断片の出現の有無で XPF, XPG による DNA 切断が完了しているか、その前に NER が止まっているかがわかる。またセンス・アンチセンスのプロープの配列を使い分けることでどちらの DNA 鎖の修復が阻害されているかも検出できる。また FlowFISH 法によりフローサイトメトリーを利用し UV 照射前後のテロメア長を測定する。

4 . 研究成果

我々は CPD の除去に同じテロメラーゼ複合体因子が必要とされることを見出し検討を行った。テロメア領域にはヌクレオチド除去修復機構(NER)のコア因子 XPF/ERCC1 が局在することからテロメラーゼが関与する NER との関連を疑いその活性機構について検討した。構造特異的エンドヌクレアーゼ XPF-ERCC1 はヌクレオチド除去修復(NER)、DNA 鎖間架橋修復(ICLR)、DNA 二本鎖切断修復(DSBR)と多様な DNA 損傷を修復するときに 働くヌクレアーゼであり染色体安定性維持のために必須の酵素であるが活性制御や分解機構についてわかっていない。我々は XPF の機能維持に arginine methyltransferase, PRMT4/CARM1 が必要であることを発見した。これまでのところ PRMT4 によるメチル化が XPF-ERCC1 の DNA 損傷 部位局在、ヌクレアーゼ活性へ影響を与えることが明らかになり、その大きな原因は XPF と ERCC1 の結合能の変化によるものと判明した。この機構がテロメア領域の CPD 除去に影響を与えテロメア短縮を引き起こすのか検討を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Sung S, Kim E, Niida H, Kim C, Lee J	4. 巻 51
2. 論文標題 Distinct characteristics of two types of alternative lengthening of telomeres in mouse embryonic stem cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res.	6. 最初と最後の頁 9122-9143.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkad617.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Koyouchi T, Niida H, Motegi A, Sakai S, Uchida C, Ohhata T, Iijima K, Yokoyama A, Suda T, Kitagawa M.	4. 巻 1869
2. 論文標題 Chromatin-remodeling factor BAZ1A/ACF1 targets UV damage sites in an MLL1-dependent manner to facilitate nucleotide excision repair	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Mol Cell Res .	6. 最初と最後の頁 119332
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamcr.2022.119332.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ohhata T, Suzuki M, Sakai S, Ota K, Yokota H, Uchida C, Niida H, Kitagawa M.	4. 巻 12
2. 論文標題 CCIVR facilitates comprehensive identification of cis-natural antisense transcripts with their structural characteristics and expression profiles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep .	6. 最初と最後の頁 15525
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-19782-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ota K, Sakai S, Ohhata T, Suzuki T, Uchida C, Niida H, Kitagawa M.	4. 巻 bgac086
2. 論文標題 APOBEC3B expression is promoted by lincNMR collaborating with TGF- β -Smad pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Carcinogenesis .	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/carcin/bgac086.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 1.Kim C, Sung S, Kim JS, Lee H, Jung Y, Shin S, Kim E, Seo JJ, Kim J, Kim D, Niida H, Kim VN, Park D, Lee J.	4. 巻 12
2. 論文標題 Telomeres reformed with non-telomeric sequences in mouse embryonic stem cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 1097
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-21341-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 2.Nishimoto K, Niida H*, Uchida C, Ohhata T, Kitagawa K, Motegi A, Suda T, Kitagawa M.	4. 巻 18
2. 論文標題 HDAC3 is required for XPC recruitment to DNA damage sites after UV irradiation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 1367-1378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-20-0214.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 3.Kitagawa K, Uchida C, Horiguchi R, Ohhata T, Sakai S, Niida H, Yasumoto S, Handa Y, Suzuki M, Hashimoto M, Tazawa T, Yokochi Y, Tsuji M, Kitagawa M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Substitution of Thr572 to Ala in mouse c-Myb attenuates progression of early erythroid differentiation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 14381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-71267-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 丹伊田浩行
2. 発表標題 CARM1によるXPFのアルギニンメチル化はERCC1との複合体形成とDNA修復を促進する
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroyuki Niida
2. 発表標題 Chromatin-remodeling factor BAZ1A/ACF1 targets UV damage sites in an MLL1-dependent manner to facilitate nucleotide excision repair
3. 学会等名 Tsuruoka conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 丹伊田浩行
2. 発表標題 Chromatin-remodeling factor BAZ1A/ACF1 targets UV damage sites in an MLL1-dependent manner to facilitate NER
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小谷内敬史、丹伊田浩行
2. 発表標題 Chromatin-remodeling factor BAZ1A/ACF1 targets UV damage sites in an MLL1-dependent manner to facilitate nucleotide excision repair
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------