

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月26日現在

機関番号：17301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22710056
 研究課題名（和文）ヌクレオチド除去修復過程における修復 DNA 合成の分子メカニズムの
 解明
 研究課題名（英文）Comprehensive analyses of the nucleotide excision repair
 (NER) molecular mechanisms
 研究代表者
 荻 朋男 (OGI TOMOO)
 長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授
 研究者番号：80508317

研究成果の概要（和文）：

多様な DNA 損傷を修復するヌクレオチド除去修復 (NER) 機構の解明に取り組んだ。カイネース、ライゲース、核酸結合蛋白質をターゲットとした siRNA ライブラリースクリーニング、および、責任遺伝子未知の NER 欠損性疾患患者を対象とした次世代シーケンシング解析により、新規 NER 関連因子探索を行った結果、機能未知の遺伝子 *UVSSA* (*KIAA1530*) を同定した。UVSSA は転写と共役した NER (TC-NER) に関与し、TF IIH、CSB、RNA ポリメラーゼと相互作用する他、損傷 DNA 修復時の RNA ポリメラーゼのユビキチン化に重要である事が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Nucleotide excision repair (NER) is a versatile DNA repair system. SiRNA-screening and next generation DNA sequencing were performed to identify novel NER factors. We found that the *UVSSA* gene (formerly known as *KIAA1530*) is involved in the transcription-coupled nucleotide-excision repair (TC-NER). The UVSSA protein interacts with TC-NER machinery and facilitates ubiquitination of RNA polymerase IIo stalled at DNA damage sites.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：DNA 修復

科研費の分科・細目：環境学、放射線・化学物質影響科学

キーワード：DNA 修復、放射線 DNA 損傷、突然変異、発がん

1. 研究開始当初の背景

ヌクレオチド除去修復 (NER) は生物が獲得した DNA 修復機構の中でも汎用性が高い修復システムの1つであり、内因性、外因性の多種多様な DNA 損傷を修復することができる。このため、微生物から高等動物に至るまで基本的な分子メカニズムが高度に保存されている。NER の欠損は、日光過敏症や皮膚がんを好発す

る色素性乾皮症 (XP)、早発老化症や発達障害を併発するコケイン症候群 (CS) 等のヒト遺伝性疾患の原因となる。これらの疾患に特徴的な臨床所見は、不正確な DNA 修復がゲノム不安定化を引き起こし、あるいは未修復の DNA 損傷が細胞機能の維持に必要な遺伝子の転写を阻害するために生じると考えられている。

XPは日本や欧州において特に頻度の高い遺伝病であり、出生25-100千人に1人の割合で発生する。このため日本においても盛んに研究がおこなわれ、原因遺伝子の同定や分子メカニズムの解明に貢献してきた。XPは現在までに少なくとも8つの原因遺伝子(XPA-XPG、及びXPV)が同定されている(ただし、XP-VはNERの欠損ではなく損傷乗り越え修復(TLS)の欠損である)。

高等生物のNER機構のうち、その前半課程である損傷塩基の認識と切出しの分子メカニズムは、現在まで継続的に研究が行われている。例えば最近の知見としては、損傷認識蛋白質複合体であるXPE複合体が、塩基の切出しを行うXPC複合体をユビキチン化するE3リガーゼとして機能することで修復効率を精巧にコントロールしていることが、神戸大学の菅澤博士らの研究により明らかにされた(菅澤ら, Cell, 2005)。この一方で、「修復合成」すなわち、切出しの後に残された ~ 30 bpの1本鎖DNAギャップをDNAポリメラーゼにより合成する過程と、その後のニックライゲーションのメカニズムに関する研究は、15年ほど前に、細胞抽出液及び大腸菌リコンビナント蛋白質を用いた生化学的再構成実験が英国王立がん研究所のWoodらにより行われて以来大きな進捗がない(Aboussekhra ら, Cell, 1995)。Woodらの実験はNERの構成因子の全てを網羅したと考えられ、当時としては画期的なものであった。彼らによると、修復合成は RFCとPCNAに依存することから、複製型DNAポリメラーゼであるpol ϵ (あるいはpol δ)により行われ、その後のニックの連結はライゲースIにより行われるとのことであった。これらの結果は、同時期に行われた酵母やヒトを材料とした他の生化学的実験結果とも整合性がとれており、今日に至るまで幅広く受け入れられてきた。事実、一般向け書籍はもとよりNERを題材とした専門誌の書評においても大半がこの結論を採用している(Friedbergら, DNA Repair and Mutagenesis, 2005)。

2. 研究の目的

上述した修復合成のメカニズムに疑問を呈するいくつかの報告が行われた。そのうちの1つは本研究代表者らによるもので、NERの修復合成過程に複製忠実度の低いDNAポリメラーゼが関与するというものである(荻とレーマン, Nature Cell Biol, 2006)。この報告以前の知見では、複製忠実度の低いDNAポリメラーゼは、DNA損傷のバイパス合成を行う(TLS)活性を有していることから、DNA損傷箇所に複製フォークがさしかかった場合や細胞周期 DNA合成が何らかの障害により停止した際に、複製型DNAポリメラーゼ(pol δ / pol ϵ)と置換する形で複製を継続するのが主たる機

能であると考えられてきた。先に述べたXP-Vの責任遺伝子は、紫外線損傷であるシクロブタン型チミン二量体を正確にバイパス合成する活性を有するpol η をコードしている。これまで、NERの修復合成は複製忠実度の高い複製型DNAポリメラーゼが独占的に行うために、突然変異を誘発しないと考えられてきた。しかし、研究代表者らの報告をふまえると、複製忠実度の低いDNAポリメラーゼが修復合成に関与する状況では突然変異頻度の上昇が示唆される。このことは、ゲノム不安定性の要因が主要なDNA修復機構であるNERに内包されていることを意味しており、発がんや細胞老化のメカニズムを理解する上できわめて重要な問題である。

同時期にオランダ-ライデン大学のMullendersらは、修復合成後のニックライゲーションのステップが、主としてDNA複製に用いられるライゲースIではなく、ライゲースIII/XRCC1複合体によるものであることを報告した(Moser ら, Mol Cell, 2007)。これら一連の報告は、これまで行われてきた、生化学的アプローチによるNER修復合成の全体像の理解が、生細胞レベルでの分子メカニズムを完全には反映していないことを示唆すると同時に、NERにおいて明らかとなっていない関連因子が存在する可能性を示している。

本研究において我々は、NERに関与する因子の同定とその機能解析を行い、NERの詳細な分子メカニズムを解明することを目的とした。特に、以下の2点に留意した。(1) NERを生化学的に再構成するこれまでのアプローチとは別に、siRNAによる修復合成に関与する遺伝子の発現抑制と、そのNERへの影響を各種細胞生物学的エンドポイントで評価する手法を取り入れ、検証を行う。(2) 現在までに行われたNER研究の多くは、実験系の制約のために増殖期の細胞を使用することが多かったが、我々は発がんや細胞の老化のメカニズムを理解する上でより適した実験系として、ヒト初代培養細胞系を採用し、検討する。

3. 研究の方法

当研究室で確立した修復合成(UDS)及びRNA合成回復(RRS)の活性測定法とsiRNAライブラリーを併用したライブラリースクリーニング、あるいは、責任遺伝子未知の先天性NER欠損性疾患患者のゲノム解析により、NERに関与する新規因子の同定を試みる。

(1) siRNAライブラリースクリーニングによるNERに関与する因子の探索/同定を行う。

マイクロタイタープレート上でsiRNAを導入した細胞は、紫外線照射及びEdU/EUの取り込みと標識をおこなう。蛍光プレートリーダーを使用して、修復パッチへのEdUの取り込みやRNA合成回復に応じたEUの取り込み

に伴う蛍光を定量することで、siRNA による遺伝子発現抑制が修復合成や RNA 合成に与える影響を評価する。NER 活性の低下が確認された候補遺伝子について個別に siRNA を合成し、siRNA スクリーニングの結果を検証する。UDS および RRS の低下が確認された因子について、各種 NER 欠損性疾患の患者細胞のうち、責任遺伝子未知のものについて、これらの因子が原因遺伝子となっている可能性についてゲノム DNA シーケンシング等により検討する。

(2) 先天性 NER 欠損性疾患患者のうち、責任遺伝子未同定の検体について次世代シーケンシングにより解析する事で、新規 NER 関連因子の同定を行う。

責任遺伝子未知の検体を収集し、次世代ゲノムシーケンシングにより、その責任遺伝子候補の選出を行い、EdU/EU 取り込みを指標とする UDS/RRS 測定法を応用した相補性試験により、責任遺伝子を同定する。同定後は、詳細な機能解析を行い NER の分子メカニズム解明に取り組む。

4. 研究成果

siRNA ライブラリースクリーニングを実施した。カイネース、ライゲース、核酸結合蛋白質をターゲットとした siRNA を中心に用い、約 3000 遺伝子について、UDS/RRS を指標に検証し、NER の活性に影響を与える事が予想される遺伝子が複数確認された。残念ながら、責任遺伝子未知の NER 欠損性疾患患者で、これらの候補遺伝子にホモ、あるいはコンパウンドヘテロ変異を持つ患者は確認されなかった。一方、次世代シーケンシングを用いて、NER 欠損性疾患の 1 つである紫外線高感受性症候群 (UV^S) のうち、責任遺伝子未知の検体について解析したところ、機能未知の遺伝子 *KIAA1530* (*UVSSA*) が候補遺伝子として得られた。UV^S 患者由来細胞は、NER の中でも転写と共役した NER (TC-NER) が完全に欠損しており、UDS は正常であるが RRS は低下する事が知られている。今回対象とした検体も UDS 正常/RRS 低下を示したが、レンチウイルスを用いて患者由来細胞に *UVSSA* を強制発現させたところ、RRS が正常レベルにまで回復した。また、正常細胞において、siRNA を用いて *UVSSA* を抑制したところ、RRS の低下が確認された。これらの事から、この *UVSSA* (*KIAA1530*) が UV^S の責任遺伝子であると同定した。さらに、機能解析の結果、*UVSSA* は TF IIH、CSB、RNA ポリメラーゼ等の修復因子と相互作用する事、損傷 DNA 修復時の RNA ポリメラーゼのユビキチン化に関わる事、これらの機能には *UVSSA* の VHS ドメインが重要である事等が確認された。

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 12 件)

① Kashiyama K, Nakazawa Y, Pilz D, Guo C, Shimada M, Sasaki K, Fawcett H, Wing J, Lewin S, Carr L, Yoshiura K, Utani A, Hirano A, Yamashita S, Greenblatt D, Nardo T, Stefanini M, McGibbon D, Sarkany R, Fassihi H, Takahashi Y, Nagayama Y, Mitsutake N, Lehmann AR, and *Ogi T. Malfunction of the ERCC1/XPF endonuclease results in diverse clinical manifestations and causes three nucleotide excision-repair-deficient disorders, Cockayne Syndrome, xeroderma pigmentosum and Fanconi Anemia. *American Journal of Human Genetics* 92:1-13 (2013) 査読有、doi: 10.1016/j.ajhg.2013.04.007

② Nakazawa Y, Sasaki K, Mitsutake N, Matsuse M, Shimada M, Nardo T, Takahashi Y, Ohyama K, Ito K, Mishima H, Nomura M, Kinoshita A, Ono S, Takenaka K, Masuyama R, Kudo T, Slor H, Utani A, Tateishi S, Yamashita S, Stefanini M, Lehmann A, Yoshiura K, and *Ogi T. Mutations in *UVSSA* cause UV-sensitive syndrome and impair RNA polymerase IIo processing in transcription-coupled nucleotide-excision repair. *Nature Genetics*, 44: 586-592 (2012) 査読有 doi: 10.1038/ng.2229.

③ *Ogi T, Walker S, Stiff T, Hobson E, Limsirichaikul S, Carpenter G, Prescott K, Suri M, Byrd P, Matsuse M, Mitsutake N, Nakazawa Y, Vasudevan P, Barrow M, Stewart G, Taylor M, O' Driscoll M, and Jeggo P. Identification of the first ATRIP-deficient patient and novel mutations in ATR define a clinical spectrum for ATR-ATRIP Seckel syndrome. *PLoS Genetics*, 8: e1002945 (2012) 査読有 doi: 10.1371/journal.pgen.1002945.

[学会発表] (計 9 件)

① 発表者名：荻 朋男
発表表題：Molecular cloning and characterisation of KIAA1530/UVSSA, the responsible gene for UV sensitive syndrome complementation group-A
学会等名：バイオジャパン (招待講演)
発表年月日：2012 年 10 月
発表場所：横浜

② 発表者名：荻 朋男
発表表題：紫外線感受性症候群責任遺伝子
UVSSA の同定と分子機能解析
学会等名：日本皮膚科学会(招待講演)
発表年月日：2012年4月
発表場所：長崎

③ 発表者名：荻 朋男
発表表題：Molecular cloning and
characterisation of UVSSA, the responsible
gene for UV sensitive syndrome
complementation group-A (UV^S-A)
学会等名：Responses to DNA damage: from
molecular mechanism to human disease
(招待講演)
発表年月日：2011年4月
発表場所：Egmond aan Zee (オランダ)

④ 発表者名：荻 朋男
発表表題：Three DNA
polymerases recruited by different
mechanisms carry out NER repair
synthesis in human cells
学会等名：日本がん学会総会
発表年月日：2010年9月
発表場所：大阪

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

名称：損傷DNA修復物質のスクリーニング方法

発明者：荻 朋男 他3名

権利者：長崎大学

種類：日本国特許出願

番号：特願 2009-172521

出願年月日：2009年7月23日

国内外の別：国内

米国特許出願 (12/656,408)

上記国内特許を米国へ優先権出願

発明者：荻 朋男 他3名

権利者：長崎大学

出願年月日：2010年1月28日

国内外の別：国外

名称：日焼けの原因遺伝子

発明者：荻 朋男 他3名

権利者：長崎大学

種類：日本国特許出願

番号：特願 2011-71082

出願年月日：2011年3月28日

国内外の別：国内

[その他]

①ホームページ

<http://www.nrgic.prj.nagasaki-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荻 朋男 (OGI TOMOO)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：80508317

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし