

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24年 4月23日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770171

研究課題名（和文）

DNA修復と遺伝情報発現制御のクロストークの解明

研究課題名（英文）

Analysis of crosstalk between DNA repair and gene expression control

研究代表者

成田 央（NARITA TAKASHI）

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：50437399

研究成果の概要（和文）：

本研究では、DNA修復因子と転写因子のクロストークを解明し、DNA修復機構に異常を持つ遺伝病を分子レベルで理解することを目的とした。その結果、ヌクレオチド除去修復に関わる XPG タンパク質が基本転写因子 TFIIH に加えていくつかの転写因子と相互作用することを明らかにした。また変異体を用いた解析から、XPG の転写反応における機能と XPG の変異によって引き起こされる遺伝病との間に関係があることを見いだした。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is to investigate the crosstalk between DNA repair factors and transcription factors so that genetic disorders caused by defects in DNA repair system can be understood at a molecular level. The results show that XPG, which is involved in nucleotide excision repair, interacts with some transcription factors as well as general transcription factor TFIIH, and that the function of XPG in transcription is closely related to clinical features found in XP-G patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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・発現制御・転写

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。

DNA 修復機構のうちでも代表的な経路の1つであるヌクレオチド除去修復 (NER) は、ピリミジンダイマーや大きな化学基の結合といった比較的大きな損傷を修復する反応で、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)。

硫黄欠乏性毛髪発育異常症 (TTD) 患者は、CS 徴候に加えて、CS では認められない角化性の皮膚、脆く折れやすい毛髪や爪などの特徴を持つ。TTD の原因遺伝子としては、XPB, XPD, TTDA (p8) が知られている。

これまでに 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。これらの遺伝病はいずれも NER に異常を持つが、XP/CS, CS, TTD 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。というのも、CS や TTD の発症は各相補性群の NER 活性と一致しないからである。

近年になって、DNA 損傷後の転写の一時的な抑制がヒストン H3 のリン酸化を介したものである (Shimada M. et al., *Cell*, **132**:221-32, 2008) ことや、修復関連因子 Gadd45 α が DNA の脱メチル化によって遺伝子発現を制御する (Barreto G. et al., *Nature*, **445**:671-5, 2007) ことが示され、DNA 修復と転写が密接に関わる証左となっている。本研究においても CS や TTD を引き起こす因子について、(i) XPB, XPD, p8 は基本転写因子 TFIIH に含まれる、(ii) CSB 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*,

27:585-95, 2007, Proietti-De-Santis, L., et al., *EMBO J.*, **25**:1915-23, 2006) ことに加え、最近我々は (iii) XPG が TFIIH 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**:231-43, 2007) ことを報告している。これらの知見から、CS や TTD を引き起こす因子が転写反応と密接に関与し、これが CS や TTD の多様な臨床症状に結びついていると考えられるが、そのメカニズムや病態との関連はよく分かっていない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、DNA 修復因子と転写因子のクロストークを解明し、DNA 修復機構に異常を持つ遺伝病を分子レベルで理解することを目的とした。

修復因子と転写因子のクロストークを考えると、(i) 修復因子が転写反応においても機能する、(ii) 転写因子が DNA 修復反応に関与する、(iii) それぞれの因子が新規複合体を形成し修復・転写以外の細胞内機能を持つ、の3つの可能性を考えることができる。これらのうち、本研究では主に (i), (ii) について以下の点を明らかにすることを目標とした。

(i) については、CS や TTD の原因遺伝子産物が転写複合体に含まれるかどうか、また様々な実験系において転写反応に影響があるかどうかを検討する。また影響が観察されれば、患者由来の変異体を用いて病態と関係があるかどうか明らかにする。

(ii) については、我々は現在原因遺伝子の同定されていない CS 様の病態を示す患者の解析を行っている。前述したように CS 徴候は転写反応と深く関与していると考えられることから、この患者においても何らかの転写関連因子が原因遺伝子となって病態が引き起こされる可能性が考えられた。そこでこの仮説の検証を行ってこの患者における分子病態を明らかにするとともに、転写反応がどのように DNA 修復に影響するか明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

本研究では、DNA 修復因子と転写因子のクロストークを解明し、DNA 修復機構に異常を持つ遺伝病を分子レベルで理解することを目的とした。この目的のため、「(1) DNA 修復因子の転写反応における機能解析」、「(2) CS 様病態を示す患者の病態解明を通じた DNA 修復における転写因子の機能解析」、という2つの研究を計画した。

(1) DNA 修復因子の転写反応における機能解析

修復因子が何らかの転写複合体に含まれて機能を発揮すると仮定すると、修復因子と転写複合体に何らかの物理的な相互作用が存在し、その結果転写反応のアッセイにおいて影響が観察できると考えられる。本研究では、これまでの知見から XP-G 群患者の原因遺伝子産物である XPG に注目し、種々の転写反応における XPG の効果や、XPG と転写複合体との相互作用について検討を行った。

(2) CS 様病態を示す患者の病態解明を通じた DNA 修復における転写因子の機能解析

本計画では、原因遺伝子が未同定の CS 様病態を示す患者由来の細胞を用いて解析を行う。これまでの研究から患者細胞では既知の CS 原因遺伝子の ORF には変異が見つからないということを明らかにしている。この細胞の最も明確な表現型は UV 感受性であることから、本研究ではまず DNA 修復の研究においてよく用いられる指標によってこの細胞の性質を解析した後、この細胞と正常細胞を比較してその原因遺伝子の探索を試みた。

4. 研究成果

(1) DNA 修復因子の転写反応における機能解析

これまでの研究から、XPG が刺激に応答した前初期遺伝子の転写反応、具体的には上皮増殖因子で刺激した後の *c-fos* 遺伝子の発現に関与することを明らかにしているため、本研究ではこの実験系を参考に XPG が他の遺伝子の転写にも関与する可能性を検討した。XPG がより広範囲な転写反応に関与する可能性を考え、RNA ポリメラーゼ II による転写が定常的に行われている *EEF1A1* 遺伝子座に注目し解析を行った。その結果、XPG は *EEF1A1* 遺伝子座にも局在しており、XPG が刺激に応答した転写だけでなく、より多くの遺伝子の転写反応に関与することが示唆された。

次に XPG 複合体について検討を行った。XPG 複合体については以前の報告において TFIIH と安定な複合体をとるということが分かっているが、本研究ではより微弱な若しくは一時的な相互作用を検出するために細胞をクロスリンクしてから実験を行った。XPG に GFP と V5 タグを付加した 293 細胞を樹立し、抗 GFP 抗体や抗 V5 抗体で免疫沈降し、XPG 複合体に転写複合体が含まれるかどうか検討を行った。その結果、これまで報告のある TFIIH のサブユニット加えて、いくつかの転写因子が XPG 複合体に含まれることが分かった。

最後に、GFP タグを付加した野生型 XPG や

XP-G 群患者にみられる変異型 XPG を恒常的に発現する 293 細胞を樹立し、これらの組換え XPG が EGF 刺激後に *c-fos* 遺伝子座にリクルートされるかどうか検討を行った。その結果、野生型 XPG や XP-G 患者にみられる変異型 XPG は EGF 刺激に依存して *c-fos* 遺伝子座にリクルートされたが、CS を併発する重症型の患者 (XP-G/CS) にみられる変異型 XPG はリクルートされなかった。どちらの変異体もヌクオチド除去修復活性を失っているため、今回の現象は CS の発症と関係していることが示唆された。

(2) CS 様病態を示す患者の病態解明を通じた DNA 修復における転写因子の機能解析

まずこの患者由来の細胞の性質を明らかにするために、UV 感受性以外の NER の指標である「不定期 DNA 合成」と「DNA 傷害後の RNA 合成の回復」の 2 つについて検討した。その結果、この患者由来の細胞は正常細胞と同様のパターンを示した。また、NER 関連タンパク質の発現も正常細胞と同等であった。これらことからこの患者細胞の NER 経路には異常がないことが示唆された。

この患者細胞は 6 番染色体と 10 番染色体に不均衡な染色体転座が見られることが分かっているため、次にこの患者由来の細胞の原因遺伝子を同定するため、患者由来の細胞に 6 番染色体を導入した細胞を作製し UV 感受性の検討を行った。その結果、6 番染色体を導入した患者由来の細胞は UV 抵抗性となり、転座によって生じた 6 番染色体の欠損領域に原因遺伝子が存在することが示唆された。また CGH アレイ解析により患者由来の細胞の染色体転座の正確なマッピングを行い、6 番染色体に 3.7Mb の欠損、10 番染色体に 17.5Mb の増幅があることを明らかにした。

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 2 件)

① Li-Jing Tan, Masafumi Saijo, Isao Kuraoka, Takashi Narita, Chiaki Takahata, Shigenori Iwai, Kiyoji Tanaka. Xeroderma pigmentosum group F protein binds to Eg5 and is required for proper mitosis: implications for XP-F and XFE. *Genes Cells*, **17**:173-185 (2012)

査読有

DOI: 10.1111/j.1365-2443.2012.01582.x

② Shinsuke Ito, Li-Jing Tan, Daisuke Andoh, Takashi Narita, Mineaki Seki,

Yasuhiro Hirano, Keiko Narita, Isao Kuraoka, Yasushi Hiraoka, Kiyoji Tanaka. MMXD, a TFIIH-independent XPD-MMS19 protein complex involved in chromosome segregation.

Mol. Cell, **39**:632-640 (2010)

査読有

DOI: 10.1016/j.molcel.2010.07.029

[その他]

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/general/lab/12/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成田 央 (NARITA TAKASHI)

大阪大学・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

(4) 研究協力者

許 ドーン 芯萍 (KOH DAWN XIN PING)

大阪大学・生命機能研究科・大学院生