

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24681008

研究課題名(和文)紫外線感受性症候群責任因子によるRNAポリメラーゼユビキチン化と待避機構の解析

研究課題名(英文) Stalled RNA polymerase processing in transcription-coupled nucleotide-excision repair

研究代表者

荻 朋男(OGI, Tomoo)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・准教授

研究者番号：80508317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,400,000円

研究成果の概要(和文)：紫外線感受性症候群の責任遺伝子UVSSAの機能解析を実施した。正常ヒト細胞では遺伝子の転写領域にDNA損傷が発生すると、転写中のRNAポリメラーゼは損傷個所で安定的にユビキチン化されTC-NER反応が進行する。UVSSA遺伝子が欠損したUVSS患者に由来する細胞ではDNA損傷に依存したRNAポリメラーゼのユビキチン化修飾が生じずRNAポリメラーゼは速やかに分解される。CS細胞ではRNAポリメラーゼの分解もユビキチン化も生じない。これらの反応を試験管内で再構成するシステムの構築に取り組んだ。また、CS症例のスクリーニングの結果、二重鎖切断修復経路の異常により発症するCS様疾患を新たに同定した。

研究成果の概要(英文)：UV-sensitive syndrome (UVSS) is characterised by sun-sensitivity without any devastating symptoms. Despite mild clinical manifestations, UVSS-patient cells display complete-null phenotype in transcription-coupled nucleotide-excision repair (TC-NER) activity. Our laboratory identified UVSS pathogenic mutations in the KIAA1530 / UVSSA gene. The UVSSA protein facilitates stable-ubiquitination of RNA polymerase stalled at UV-DNA damage. This stable-ubiquitination is compromised in UVSS-patient cells although RNA polymerase is degraded under a different ubiquitination mechanism.

研究分野：DNA修復・人類遺伝学・皮膚科学

キーワード：ヌクレオチド除去修復

1. 研究開始当初の背景

紫外線感受性症候群 (UV-sensitive syndrome: UV^{SS})は、ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair: NER)の一部であり、mRNA の転写個所で活性化される、転写共役ヌクレオチド除去修復機構 (transcription-coupled NER: TC-NER)、つまり、mRNA に転写される DNA 鎖に発生した DNA 損傷をゲノムから速やかに取り除くシステムが欠損しているために生じるヒトの劣性遺伝性疾患である。TC-NER の欠損は一般的に、コケイン症候群 (Cockayne syndrome: CS)や、COFS (cerebro-oculo-facial-skeletal syndrome)、DeSanctis-Cacchione 症候群などにみられるように、転写機能全般と遺伝子発現制御の異常のために、日光過敏の他にも、出生時より発達障害、早期老化など全身性の重篤な病態が観察される。これに対して、UV^{SS} の患者はマイルドで皮膚に局所的な、日光過敏、そばかすなどの色素沈着のみを発症し、他の TC-NER 欠損性疾患に見られる全身性の重篤な症状は現れない。しかしながら、UV^{SS} 患者から採取した細胞は TC-NER 活性が完全に欠失しており、CS をはじめとする全身性の重篤な症状を示す疾患の患者に由来する細胞と区別できない。UV^{SS} の非常にマイルドな臨床所見と、細胞生物学的には重大である TC-NER 活性の完全な欠損との間の矛盾は興味深く、UV^{SS} の疾患責任遺伝子のクローニングが望まれていた。

研究代表者らは、NER 欠損性疾患の症例を国内外から収集し、これらのうちの原因遺伝子が未知のケースについて、次世代ゲノム解析等により、新規疾患責任遺伝子の探索を実施していたところ、20 年にわたって責任遺伝子が未知であった、紫外線感受性症候群の新規原因遺伝子として *KIAA1530/UVSSA* を同定することに成功した。

2. 研究の目的

ヌクレオチド除去修復システム (nucleotide excision repair: NER)は、生物の DNA 修復分子機構の中で、もっとも多能なシステムであり、大腸菌からヒトまで高度に保存されている。NER は、太陽光中の 250nm 近傍の紫外線を DNA が吸収する結果発生する光 DNA 損傷や、食物代謝産物あるいは環境変異原に由来する付加型 DNA 損傷を DNA 鎖から除去する。ヒトの NER の先天的な欠損は、高発がん性の色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum: XP)をはじめとする、日光過敏症を伴う種々の疾患の原因となっている。研究代表者らは 2010 年に、NER の遺伝的欠損性の疾患である、紫外線感受性症候群の新規責任遺伝子として *KIAA1530/UVSSA* を同定し研究を開始した。

本申請研究は、UVSSA 遺伝子産物とその相互作用因子の機能解析を通して、DNA 損

傷箇所で停止した RNA ポリメラーゼのユビキチン化反応によるバックトラッキング (待避)の分子メカニズムを詳細に理解する事を目指す。また、TC-NER 分子機構の全体像を理解するため、TC-NER が欠損する CS や UV^{SS} の疾患責任遺伝子変異のスクリーニングを継続実施し、TC-NER に関与する新規分子種の同定と、その機能解析をおこなう。

3. 研究の方法

研究は、以下の(1)~(3)のサブテーマについて、研究期間を通して平行して実施した。

(1) UVSSA と CS 複合体による RNA ポリメラーゼのポリユビキチン化機構の生化学的解析を実施する。停止した RNA ポリメラーゼを安定的にユビキチン化する分子機構を解析する。試験管内再構成系を構築し、損傷個所での RNA ポリメラーゼの停止と、バックトラッキングの開始にいたるまでの TC-NER 開始反応を明らかにする。

(2) 損傷停止した RNA ポリメラーゼのバックトラッキングの分子ダイナミクスを解析する。蛍光共鳴エネルギー遷移法(FRET)やリアルタイムイメージングにより、正常細胞、UV^{SS} 患者細胞、CS 細胞での RNA ポリメラーゼと TC-NER 開始因子の核内ダイナミクスを解析し、これらの細胞間で DNA 損傷個所での RNA ポリメラーゼの滞留時間の違いを明らかにする。これにより、RNA ポリメラーゼが長時間 DNA 損傷領域に停止することで、正常な mRNA の転写を阻害し、アポトーシスが誘導されることを証明し、そこから UV^{SS} と CS の病態の違いが現れることを明らかにする。

(3) TC-NER の全体像解明のため、TC-NER 活性が欠損している CS や UV^{SS} の症例を引き続き収集、分類し、未知の疾患責任遺伝子変異のスクリーニングを継続する。次世代ゲノム解析により TC-NER に関与する新規分子種の同定を試み、その分子機能解析をおこなう。

4. 研究成果

紫外線感受性症候群の責任遺伝子 UVSSA が同定されたことから、UVSSA 蛋白質の分子機能解析を実施した。これまでに、正常ヒト細胞では、DNA 損傷を誘導すると、転写中の RNA ポリメラーゼは損傷個所で安定的にユビキチン化され、TC-NER 反応が進行すること、UVSSA 遺伝子が欠損した UV^{SS} 患者の皮膚に由来する細胞では、DNA 損傷に依存した RNA ポリメラーゼのユビキチン化修飾が生じずに RNA ポリメラーゼは速やかに分解されること、CS 細胞では、RNA ポリメラーゼの分解もユビキチン化も生じないことを報告した (中沢ら, Nature Genetics, 2012)。このことは、UVSSA によるユビキチ

ン化が TC-NER の開始を制御していることを示しており、この分子過程を詳細に解析することで、UV^SS と CS の病態の違いを説明できると考えられた。そこでまず、この DNA 損傷依存的な RNA ポリメラーゼのユビキチン化修飾反応を試験管内で再構成することを試みた。まずは、UVSSA 蛋白質と協調して機能することが知られている TC-NER 関連因子の精製を順次実施した。現在までに、UVSSA の他、CSA/CSB 複合体、DDB1 複合体、RNA ポリメラーゼ複合体等の精製が完了している。さらに、これら蛋白質を、大腸菌発現系で発現精製することに成功しており、高濃度の酵素標品を大量に調整することが可能となった。UVSSA 蛋白質と他の TC-NER 複合体を共発現系で精製し、UVSSA 蛋白質と他の TC-NER 因子との共結晶化と構造解析に挑んでいる。

RNA ポリメラーゼが DNA 損傷個所で停止し、その後ユビキチン化が生じる過程を再現するために、配列特異的に DNA 損傷を導入したプラスミドテンプレートと精製 RNA ポリメラーゼを用いて転写反応をおこなうシステムを開発した (論文投稿準備中)。

さらに、GFP 融合 RNA ポリメラーゼを発現するヒト細胞系を構築した。このシステムを用い、紫外線 DNA 損傷処理後の RNA ポリメラーゼの核内挙動をリアルタイム観察したところ、UV^SS と CS 患者に由来する細胞と正常細胞では、損傷箇所での RNA ポリメラーゼの滞留時間が異なることが判明している。このことから、作用モデルの通り、DNA 損傷に依存的な RNA ポリメラーゼの長期滞留がアポトーシスを誘発すると考えられた (論文投稿準備中)。

TC-NER 因子のスクリーニングの過程で、CS 症例約 200 例を調査したところ、コケイン症を発症しているにもかかわらず、TC-NER 活性が正常な症例が見つかった。この症例は、イギリスの CS 患者会からの紹介でフォローをしていた症例であったが、非典型的な CS として知られていた。研究代表者らが次世代ゲノム解析を実施したところ、TC-NER に関与する遺伝子の欠損は見られず、二重鎖切断修復機構の経路の遺伝子 XRCC4 に疾患責任変異を同定した (Guo ら, *J Allergy and Clinical Immunology*, 2015 印刷中)。このことから、研究代表者の実施する TC-NER 活性を指標としたスクリーニングは、類縁疾患の疾患責任変異を同定することも可能であることが示された。

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 8 件)

1. Jia N., Nakazawa Y., Guo C., Shimada M., Sethi M., Takahashi Y., Ueda H., Nagayama Y. & Ogi T.

T.* A rapid comprehensive assay system for DNA repair activity and cytotoxic effects of DNA damaging reagents by measuring unscheduled DNA synthesis and recovery of RNA synthesis after DNA damage. *Nature Protocols* 10, 12-24 (2015) 査読有
doi: 10.1038/nprot.2014.194.

2. Baple E.L., Chambers H., Cross H.E., Fawcett H., Nakazawa Y., Chioza B.A., Harlalka G.V., Mansour S., Sreekantan-Nair A., Patton M.A., Muggenthaler M., Rich P., Wagner K., Coblenz R., Stein C.K., Last J.I., Taylor A.M., Jackson A.P., Ogi T., Lehmann A.R., Green C.M.* & Crosby A.H.* Hypomorphic PCNA mutation underlies a human DNA repair disorder. *Journal of Clinical Investigation* 124, 3137-3146 (2014) 査読有
doi: 10.1172/JCI74593.
3. Woodbine L., Neal J.A., Sasi N.K., Shimada M., Deem K., Coleman H., Dobyns W.B., Ogi T., Meek K.*, Davies E.G.* & Jeggo P.A.* PRKDC mutations in a SCID patient with profound neurological abnormalities. *Journal of Clinical Investigation* 123, 2969-2980 (2013) 査読有
doi: 10.1172/JCI67349.
4. Kashiya K., Nakazawa Y., Pilz D., Guo C., Shimada M., Sasaki K., Fawcett H., Wing J., Lewin S., Carr L., Li T.S., Yoshiura K., Utani A., Hirano A., Yamashita S., Greenblatt D., Nardo T., Stefanini M., McGibbon D., Sarkany R., Fasshi H., Takahashi Y., Nagayama Y., Mitsutake N., Lehmann A.R.* & Ogi T.* Malfunction of Nuclease ERCC1-XPF Results in Diverse Clinical Manifestations and Causes Cockayne Syndrome, Xeroderma Pigmentosum, and Fanconi Anemia. *American Journal of Human Genetics* 92, 807-819 (2013) 査読有
doi: 10.1016/j.ajhg.2013.04.007.
5. Matsuse M., Mitsutake N.*, Tanimura S., Ogi T., Nishihara E., Hirokawa M., Fuziwara C.S., Saenko V.A., Suzuki K., Miyauchi A. & Yamashita S. Functional characterization of the novel BRAF complex mutation,

BRAF(V600delinsYM), identified in papillary thyroid carcinoma.

International Journal of Cancer 132, 738-743 (2013)

査読有、doi: 10.1002/ijc.27709.

6. Ogi T.*, Walker S., Stiff, T. Hobson E., Limsirichaikul S., Carpenter G., Prescott K., Suri M., Byrd P.J., Matsuse M., Mitsutake N., Nakazawa Y., Vasudevan P., Barrow M., Stewart G.S., Taylor A.M.R.*, O'Driscoll M.* & Jeggo P.A.* 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.
7. 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.R., Yoshiura K.I. & 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.
8. Kashiya K., Mitsutake N.*, Matsuse M., Ogi T., Saenko V.A., Ujifuku K., Utani A., Hirano A. & Yamashita S. miR-196a Downregulation Increases the Expression of Type I and III Collagens in Keloid Fibroblasts. **Journal of Investigative Dermatology** 132, 1597-1604 (2012) 査読有 doi: 10.1038/jid.2012.22.

[学会発表](計 17 件)

1. Ogi T. 「Molecular cloning and characterisation of new human DNA repair genes」 The 9th 3R Symposium 2014年11月17日～21日、御殿場高原ホテル (静岡県御殿場市)
2. 荻 朋男 「ゲノム不安定性疾患群の新規責任遺伝子の同定と分子機能解析」 第57回日本甲状腺学会学術集会 招待講演 2014年11月14日 コングレコンベンションセンター

(大阪府大阪市)

3. 荻 朋男 「ヒストン H3K9 メチル化酵素類の DNA 二重鎖切断修復反応への関与」 第 87 回日本生化学会大会 シンポジウム 2014年10月15日～18日 国立京都国際会館 (京都府京都市)
4. 荻 朋男 「転写共役ヌクレオチド除去修復の開始反応の分子機構」 日本放射線影響学会第 57 回大会 ワークショップ 2014年10月1日～3日 鹿児島県民交流センター (鹿児島県鹿児島市)
5. 荻 朋男 「DNA 修復機構の異常により発症する先天性疾患とゲノム不安定性/発がん」 第 20 回日本家族性腫瘍学会学術集会 教育講演 2014年6月13日 コラッセ福島(福島県福島市)
6. Ogi T. 「Transcription, DNA damage and Repair」 International Symposium on Xeroderma Pigmentosum and Related Diseases 2014年3月5日～7日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
7. Ogi T. 「Molecular cloning and characterisation of human DNA repair genes.」 The International Kick-Off Symposium for Atomic Bomb Disease Institute at Nagasaki University 2013年11月28日 長崎大学医学部良順会館 (長崎県長崎市)
8. 荻 朋男 「紫外線高感受性症候群～UVSSA 遺伝子の発見と病態解析」 第 22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ 2013年11月20日～22日 ホテルニュー水戸屋 (宮城県仙台市)
9. Ogi T. 「Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and impair RNA polIIo processing.」 11th International Conference on Environmental Mutagens ICEM 2013年11月3日～8日、Foz do Iguassu (Brazil)
10. 荻 朋男 「紫外線高感受性症候群～UVSSA 遺伝子の発見と病態解析」 日本美容皮膚科学会・学術大会 2013年8月10日～11日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
11. 荻 朋男 「DNA 修復欠損性遺伝性疾患の責任因子の検索と分子機構の解析」 日本環境変異原学会 第 26 回夏の学校 2013年6月22日～23日 アイブラザー宮 (愛知県一宮市)
12. 荻 朋男 「放射線・紫外線による染色体 DNA 損傷修復の分子基盤」 第 35 回日本分子生物学会年会 2012年12月11日～14日、福岡国際会議場

- (福岡県福岡市)
13. Ogi T. 「Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and impair RNA polymerase II processing in transcription-coupled nucleotide-excision repair.」 3R International Symposium 2012 年 11月25日～28日 兵庫県立淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県淡路市)
 14. 荻 朋男 「転写共役修復と紫外線高感受性症候群」 BIO JAPAN 2012 年 10月10日～12日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
 15. 荻 朋男 「紫外線高感受性症候群責任因子 UVSSA による損傷停止 RNA ポリメラーゼのコピキチン化修飾メカニズムの解析」日本遺伝学会第 84 回大会 2012 年 9月24日～26日 九州大学医学部 百年講堂・同窓会館 (福岡県福岡市)
 16. Ogi T. 「Molecular cloning and characterisation of KIAA1530/UVSSA, the responsible gene for UV sensitive syndrome complementation group-A.」 The 11th Surugadai International Symposium - the MRI Joint Research Symposium 2012 年 7月31日 東京医科歯科大学 鈴木章夫記念講堂 (東京都文京区)
 17. 荻 朋男 「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」日本皮膚科学会 2012 年 4月8日 長崎大学 (長崎県長崎市)

〔図書〕(計 2 件)

1. 荻 朋男*, 中沢 由華, 佐々木 健作, 郭 朝万, 吉浦 孝一郎, 宇谷 厚志, 永山 雄二. 紫外線高感受性症候群責任因子 UVSSA の分子機能解析. 生化学 85, 日本生化学会, 133-144 (2013)
2. 荻 朋男*, 中沢 由華, 吉浦 孝一郎, 宇谷 厚志, 永山 雄二. 紫外線高感受性症候群. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.19 先天代謝異常症候群 (第 2 版)(上), 日本臨床社, 670-674 (2012)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等
<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・原爆後障害医療研究所・准教授
 研究者番号：80508317

(2)研究分担者
 なし ()

研究者番号：