

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02399

研究課題名（和文）転写共役修復（TCR）の分子メカニズム解明とTCR欠損ヒト遺伝性疾患の分子病態

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of transcription-coupled repair (TCR) and pathogenesis of TCR-deficient human genetic disorders

研究代表者

中沢 由華（NAKAZAWA, Yuka）

名古屋大学・環境医学研究所・講師

研究者番号：00533902

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：遺伝情報の本体であるゲノムDNAは常に内外からの刺激により損傷を生じている。転写と共役したDNA修復機構（transcription coupled repair: TCR）は、転写が活発に行われている領域に生じたDNA損傷を効率良く修復するシステムであり、生体の恒常性維持に重要なメカニズムである。本研究では、TCRの分子メカニズムの究明およびTCRの破綻により発症するヒト疾患の病態解明に取り組んだ。その結果、いくつかの新たな知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TCRの破綻は、早期老化や進行性の神経変性、好発がん、発育・発達異常などを示す様々な遺伝性疾患の原因となることが知られており、TCRの分子メカニズム解明と各種病態との関係を明らかにすることは、遺伝性疾患のみならず、一般的な老化やがんなどの治療薬/緩和薬/予防薬の開発に役立つだけでなく、新たな診断法の構築やバイオマーカーの探索など、広範囲の医療分野に貢献してゆくと期待される。

研究成果の概要（英文）：Genomic DNA, which contains our genetic information, is constantly exposed to damage from both internal and external sources. Transcription-coupled repair (TCR) is a system that efficiently repairs DNA damage in actively transcribed regions, playing a crucial role in maintaining homeostasis and preventing genomic instability. In this study, we investigated the molecular mechanisms of TCR and the pathogenesis of human diseases associated with deficiencies in this system. Our research has provided several novel insights into the critical role of TCR in genome maintenance.

研究分野：DNA修復学、分子細胞生物学、人類遺伝学

キーワード：転写と共役したDNA修復 RNAポリメラーゼ ユビキチン化

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物の遺伝情報の本体であるゲノム DNA は常に内外からの刺激により損傷を生じている。未修復の DNA 損傷は RNA ポリメラーゼ II の進行を阻害し、遺伝子発現を妨げることで細胞機能の維持に障害をきたす。転写と共役した DNA 修復機構 (transcription coupled repair: TCR) は、転写が活発に行われている領域に生じた DNA 損傷を、優先的かつ効率良く修復するシステムであり、生体の恒常性維持に重要なメカニズムである。

TCR の欠損により発症するヒト遺伝性疾患には、コケイン症候群 (Cockayne syndrome: CS)、色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum: XP)、紫外線高感受性症候群 (UV-sensitive syndrome: UVSS) などが知られており、それぞれの患者に由来する細胞では TCR 機能が欠損するにも関わらず、各疾患の病態は非常に異なっている。特に、CS と UVSS は、いずれも細胞レベルでの TCR の欠損など同質であるものの、患者レベルでは、CS は全身性の発育発達異常や早期老化を示し短寿命であるなど重篤な症状を示すのに対して、UVSS は皮膚に局限した日光過敏と色素沈着のみが観察され、臨床症状は軽微である。我々は、CS と UVSS では、DNA 損傷箇所では停止した RNA ポリメラーゼ II の分解処理の違いにより病態の差が生まれている可能性を示唆した。

DNA 損傷により RNA ポリメラーゼ II がユビキチン化修飾を受けること、またこの反応は CSA/CSB 遺伝子機能が欠損した CS 細胞では見られないことが知られていたが、RNA ポリメラーゼ II ユビキチン化修飾の細胞生物学的な意義については不明であった。我々は、これまでに、RNA ポリメラーゼ II 最大サブユニットである POLR2A のユビキチン化修飾を受けるリジン残基を質量分析法で特定し、CRISPR/Cas9 遺伝子編集法により、ヒト細胞で POLR2A-KR (リジン->アルギニン) 変異体を作製して、TCR 反応に必須な POLR2A ユビキチン化アミノ酸残基をリジン 1268 に特定した。また、POLR2A-K1268R 変異体は TCR 欠損を示し、DNA 損傷処理後の POLR2A の免疫沈降では DNA 修復複合体である TFIIH との相互作用が見られなかった。興味深いことに、一連の反応には UVSSA 蛋白質が調整因子として作用し、ユビキチン化 POLR2A をターゲットに UVSSA 依存的に TFIIH が局在することなどを見いだした。平行して、マウスの *Polr2a*-K1268R 変異体を作製し、病態解析を行うことで、TCR 欠損の生体影響の一部について明らかにした。

2. 研究の目的

これまでの研究成果により、TCR 分子メカニズムの概要が明らかになったものの、その詳細は未解明な部分も残されている。そこで本研究では、DNA 損傷箇所では停止した RNA ポリメラーゼがユビキチン化修飾を受けて TCR を開始・制御する分子機構の詳細解明に取り組みとともに、TCR の破綻により発症するヒト疾患の病態を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

DNA 損傷により生じた RNA ポリメラーゼの停滞が、ユビキチン化により DNA 修復がトリガーされることで解消し、転写が回復する様子をゲノムワイドに時空間的な調査を行うため、ChIPseq による解析を実施する。既に確立している ChIPseq の実験系を応用し、DNA 損傷誘発後に種々の TCR 因子で免疫沈降を実施し、その後 DNA フラグメントの次世代ゲノム解析を行うことで局在を評価する。また、この特殊 ChIPseq をさらに応用し、モデルマウス個体での転写と共役した DNA 修復の遷移を評価する実験系の確立を目指すと同時に、TCR 解析のための新たな ChIPseq 技術の開発にも取り組む。

TCR のより広範な分子機構を解明するため、各種モデル細胞を用いた解析を実施する。紫外線だけでなく、他の DNA 損傷誘発因子に対する細胞・分子応答反応の解析を行う。

TCR の破綻による生体影響の詳細を調査するため、モデルマウスでの解析を実施する。TCR に必須の RNA ポリメラーゼユビキチン化修飾に異常を示す *Polr2a*-K1268R マウスの開発は完了している。*Polr2a*-K1268R マウスは単独で表現系を示さなかったが、紫外線 DNA 損傷修復に異常を示す *Xpa* 欠損マウス (本マウスも単独では病態を示さない) との二重変異では、コケイン症と類似の全身性の病態を示した。このことから、コケイン症候群の主要な病態は、DNA 損傷の修復異常によるものではなく、TCR の障害、つまり、損傷で停滞した RNA ポリメラーゼがユビキチン化修飾により処理できないことに起因していると考えられる。DNA 損傷がオーバーロードされると、RNA ポリメラーゼの停滞も増加する。転写が再開できないことにより生じる遺伝子発現の攪乱についての生体影響を調査するため、マウスの各臓器・組織から多系統の細胞を回収し、トランスクリプトーム解析を試みる。

重篤な症状を示す CS、トリコチオジストロフィー (Trichothiodystrophy: TTD)、症状が軽微である UVSS、症状が皮膚や神経症状に局限されるケースもある XP など、TCR の障害が関与する遺伝性ヒト疾患では、既存の知見では説明のつかない病態を示す例が多数残されている。そこで、新たな関連因子あるいは既知遺伝子の新たな機能を探索するため、TCR 関連疾患が疑われるものの、原因変異が特定されていない症例について、疾患原因遺伝子変異の探索を実施する。これまで我々が用いてきた、ショートリード exome/全ゲノム/RNAseq 解析、ロングリード全ゲノム/RNAseq 解析、DNA 修復活性評価、ウイルス相補性試験などの技術を活用し、原因変異探索に取

り組む。

4. 研究成果

これまでに特殊な ChIPseq 法を開発し、TCR の進行や DNA 損傷誘発後の RNA 合成酵素の挙動等をゲノムレベルで解析してきたが、より詳細に TCR の制御メカニズムを理解するため、種々の TCR 因子での ChIPseq 解析に取り組んだ。適用可能な抗体の探索と検証を実施し、複数種類の抗体が利用可能であることが判明した。これをもとに、各種 DNA 修復関連因子が欠損したモデル細胞を対象に、紫外線誘発 DNA 損傷後の種々の TCR 因子の ChIPseq データの取得を進め、既存データとの比較検討を行いながら詳細な解析を実施した。得られた成果は、過去のデータを裏付けるとともに、より詳細な TCR の進行メカニズムの理解につながった。

また、モデルマウスを対象として、個体の TCR の詳細を調査するため、既存の特殊 ChIPseq 解析をマウス個体レベルでの評価に応用した。各種条件検討の後、運用可能な技術となったことから、データ取得を実施した。さらに、着眼点を変えた新たな ChIPseq 法の開発に取り組み、有用な技術を構築した。今後さらに様々な検証を重ねることで、より特異的な技術になると期待されることから、本研究終了後も継続して技術改良に取り組む。

さらに、TCR のより広範な分子機構を解明するため、紫外線だけでなく、他の DNA 損傷誘発因子に対する細胞・分子応答反応について、各種モデル細胞を用いた解析を実施したところ、ホルムアルデヒド処理によって生じた DNA 損傷に対しても TCR が機能していることが判明した。ホルムアルデヒド処理後、野生型細胞および TCR 因子である CSB 欠損モデル細胞について、TCR 活性測定 (recovery of RNA synthesis assay: RRS assay) を実施したところ、野生型では時間経過とともに TCR による修復が認められたものの、CSB 欠損モデル細胞では TCR による修復がほとんど認められなかった。このことから、ホルムアルデヒド処理によって生じた DNA 損傷に TCR が関与すること、その際 CSB が重要な働きをすることが示唆された。今後も引き続き、当該修復反応について詳細に検討することで、TCR が機能する DNA 損傷の種類とその分子メカニズム、各々の損傷に対する TCR 機能の破綻により生じる生体影響について解明してゆく。

DNA 損傷による転写阻害がもたらす遺伝子発現の攪乱に起因する生体影響を調査するため、樹立済みの TCR 欠損モデルマウスを活用して各臓器・組織の RNAseq 解析および病態解析に取り組んだ。各組織からの RNA 抽出と RNAseq までの実験手順・各種条件を検討した後、実データの取得に取り組み、個体組織レベルでのトランスクリプトーム解析を実施した。また、シングルセルトランスクリプトーム解析のためのスキーム作りにも取り組み、データ取得を実施した。一方、樹立済みの *Po1r2a-K1268R* マウスと、ゲノム全体で働くヌクレオチド除去修復機構 (GG-NER) あるいは転写と共役したヌクレオチド除去修復機構 (TC-NER) もしくはその両方が欠損したモデルマウスとを掛け合わせ、その病態について比較検討を行った。合わせて、それぞれの単独変異マウスに外的な DNA 損傷誘発処理を施し、その生体反応について調査した。これらの結果から、新たな知見を得ることができた。

さらに、TCR の分子メカニズム解明に向けて、新たなアプローチでの解析技術を取り入れるため、必要となる遺伝子編集細胞シリーズの作製を進めた。本解析には、複数の遺伝子変異を組み合わせて持つモデル細胞を十数種類作製する必要があるため、順次細胞樹立に取り組んだ。順調に進捗したものの、当初予定よりも多くの変異の組み合わせが必要となったことから、引き続き継続して作製を進めている。すべての遺伝子編集細胞シリーズが揃った後、本解析に着手し、新たな視点からの TCR メカニズムの解明を進めてゆく。

これらに並行して、TCR 欠損性遺伝性疾患の原因変異探索により、新たな疾患関連因子および既知遺伝子の新機能の同定に取り組んだ。TCR 機能の欠損が疑われており疾患原因未同定のヒト症例について、次世代ゲノム解析や細胞機能解析により原因変異を調査したところ、既知の遺伝子異常が疾患原因であることが判明したケースもあったが、既知の関連遺伝子上には原因と考えられる変異が特定されない症例も複数得られた。そこで、これらの症例について、より詳細に検討を進めたところ、既知の因子ではあるものの、イントロン上に新規の原因変異候補を特定した。本変異の真偽検証のため、ロングリードシーケンスによる全ゲノム配列取得など最新技術を活用して更なる解析を実施し、XP、CS にてイントロン変異が疾患発症の原因となっていることを突き止めた。さらに別の XP 疑い症例の解析から、これまでに報告のない新たな遺伝子上に疾患原因変異の候補を特定した。本遺伝子変異に関して、今後も引き続き、分子・細胞生物学的解析、疾患モデルマウスの作製と病態解析、同一遺伝子に異常を持つ症例の探索等を実施することで、TCR のより詳細な分子メカニズムとその破綻がもたらす生体影響を明らかにしてゆく。

< 引用文献 >

Y. Nakazawa *et al.*, Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and impair RNA polymerase II processing in transcription-coupled nucleotide-excision repair. *Nat. Genet* 44, 586-592 (2012).

Y. Nakazawa *et al.*, Ubiquitination of DNA damage-stalled RNAPII promotes transcription-coupled repair. *Cell* 180, 1228-1244 (2020).

Y. Oka *et al.*, Endogenous aldehyde induced DNA-protein crosslinks are resolved by transcription-coupled repair. *Nature Cell Biology* 26, 784-796 (2024).

C. Senju *et al.*, Deep intronic founder mutations identified in the *ERCC4/XPF* gene are potential therapeutic targets for a high-frequency form of xeroderma pigmentosum. *PNAS* 120, e2217423120 (2023).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 7件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Oka Y, Nakazawa Y, Shimada M, Ogi T (責任著者).	4. 巻 26
2. 論文標題 Endogenous aldehyde-induced DNA-protein crosslinks are resolved by transcription-coupled repair	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 784 ~ 796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-024-01401-2	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 Tomita A, Sasanuma H, Owa T, Nakazawa Y, Shimada M, Fukuoka T, Ogi T, Nakada S.	4. 巻 14
2. 論文標題 Inducing multiple nicks promotes interhomolog homologous recombination to correct heterozygous mutations in somatic cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5607 ~ 5607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-41048-5	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 Senju C*, Nakazawa Y* (第一著者), Oso T*, Shimada M, Kato K, Matsuse M, Tsujimoto M, Masaki T, Miyazaki Y, Fukushima S, Tateishi S, Utani A, Murota H, Tanaka K, Mitsutake N, Moriwaki S, Nishigori C, Ogi T (責任著者).	4. 巻 120
2. 論文標題 Deep intronic founder mutations identified in the ERCC4/XPF gene are potential therapeutic targets for a high-frequency form of xeroderma pigmentosum.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2217423120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2217423120	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 Tsujimoto M, Nakano E, Nakazawa Y, Kanda F, Ueda T, Ogi T, Nishigori C.	4. 巻 50
2. 論文標題 A case of Cockayne syndrome with unusually mild clinical manifestations	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 541 ~ 545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.16679	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 Senju C, Nakazawa Y, Shimada M, Iwata D, Matsuse M, Tanaka K, Miyazaki Y, Moriwaki S, Mitsutake N, Ogi T (責任著者).	4. 巻 10
2. 論文標題 Aicardi-Goutieres syndrome with SAMHD1 deficiency can be diagnosed by unscheduled DNA synthesis test	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Pediatrics	6. 最初と最後の頁 1048002 ~ 1048002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fped.2022.1048002	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 Jia N, Guo C*, Nakazawa Y* (第二著者), van den Heuvel D*, Luijsterburg MS, Ogi T (責任著者).	4. 巻 106
2. 論文標題 Dealing with transcription-blocking DNA damage: Repair mechanisms, RNA polymerase II processing and human disorders	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 103192 ~ 103192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dnarep.2021.103192	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 該当する

1. 著者名 van der Weegen Y, de Lint K, van den Heuvel D, Nakazawa Y, 他16名, Ogi T, Wolthuis RMF, Luijsterburg MS.	4. 巻 23
2. 論文標題 ELOF1 is a transcription-coupled DNA repair factor that directs RNA polymerase II ubiquitylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 595 ~ 607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-021-00688-9	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

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 11件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Nakazawa Y, Senju C, Oso T, Kato K, Shimada M, Ogi T.
2. 発表標題 Deep intronic mutations identified in XP-F cases are potential therapeutic targets for xeroderma pigmentosum
3. 学会等名 The EXPS Annual Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 荻朋男
2. 発表標題 DNA修復機構の異常により発症する光線過敏を伴う遺伝性皮膚疾患の分子病態
3. 学会等名 第74回日本皮膚科学会中部支部学術大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中沢由華, 岡泰由, 森永浩伸, 何予希, 荻朋男.
2. 発表標題 転写共役修復機構の分子メカニズムとその破綻による生体影響の解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荻朋男
2. 発表標題 Digenic inheritanceにより発症するゲノム不安定性疾患の分子病態 -内因性アルデヒドによるDNA損傷と転写障害-
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第67回大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荻朋男
2. 発表標題 転写共役修復とヒトの疾患
3. 学会等名 日本遺伝学会第94回大会ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荻朋男
2. 発表標題 ゲノム安定維持機構の分子メカニズムとその破綻により発症する疾患の病態解明
3. 学会等名 第83回応用物理学会秋季学術講演会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ogi T
2. 発表標題 Ubiquitination of RNA polymerase II and transcription-coupled repair
3. 学会等名 11th quinquennial conference on DNA repair（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中沢由華, 原雄一郎, 岡泰由, 小峯起, Diana van den Heuvel, 郭朝万, 大学保一, 磯野真由, 何予希, 嶋田繭子, 加藤香奈, 賈楠, 橋下悟, 田中都, 祖父江顕, 光武範史, 菅波孝祥, 増田章男, 大野欽司, 中田慎一郎, 真下知士, 山中宏二, Martijn S. Luijsterburg, 荻朋男.
2. 発表標題 RNA polymerase II のユビキチン化修飾と転写共役修復の制御
3. 学会等名 第26回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中沢由華
2. 発表標題 RPB1-K1268とUVSSA-K414位でのユビキチン化修飾は転写と共役したヌクレオチド除去修復機構に必要
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学環境医学研究所HP http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/index.html 名古屋大学環境医学研究所 発生遺伝分野HP http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/4/genetics/index.html

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
研究 分 担 者	荻 朋男 (OGI Tomoo) (80508317)	名古屋大学・環境医学研究所・教授 (13901)	

	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
研究 協 力 者	岡 泰由 (OKA Yasuyoshi)		

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			
オランダ	LUMC			
イタリア	CNR			
英国	Sussex Univ.	GDSC		