

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570156

研究課題名(和文) DNA修復因子による遺伝情報発現制御とその遺伝子疾患の分子病態の解析

研究課題名(英文) Analyses of nucleotide excision repair factors in the regulation of gene expression

研究代表者

成田 央 (NARITA, Takashi)

大阪大学・生命機能研究科・特任助教

研究者番号：50437399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の結果、XPG-TFIIH複合体が転写伸長複合体と相互作用することを明らかにした。細胞を用いた転写アッセイやクロマチン免疫沈降の実験から、XPG-TFIIH複合体は様々な遺伝子の転写反応に関与することが分かった。また、XP-G群患者細胞を用いた解析から、XP-G群患者に見られるコケイン徴候が、このXPG-TFIIH複合体の転写反応における機能と関係があることを示した。これらの結果は、XP-G群患者における変異と臨床症状の関係を分子レベルで理解するのに役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The results showed that XPG-TFIIH complex interacts with transcription elongation complex. Transcription assays and chromatin immunoprecipitation experiments revealed that XPG-TFIIH complex is involved in regulating a wide range of gene expression. Furthermore, the functions of XPG-TFIIH complex in transcription have relevance to the CS features in XP-G/CS patients. These results will be helpful to understand the relationship between the mutations in XP-G patients and their clinical features at a molecular level.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA修復 転写 遺伝情報発現 色素性乾皮症

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子疾患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、それらの遺伝子疾患には DNA 修復機構の異常が原因とは考えにくい臨床症状が存在することが指摘されている。以下に示すように、こうした症状は DNA 修復因子が DNA 修復以外の細胞内機能、とりわけ転写反応と深く関係していることに起因するのではないかと考えられている。

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 に異常を持つ遺伝子疾患の特徴を示す。

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-F, XP-G 患者の一部は、XP の臨床症状に加えて 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。これらの遺伝子疾患はいずれも 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¹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²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、(1)XPB, XPD, p8 は基本転写因子 TFIIDH に含まれる、(2)CSB は RNA ポリメラーゼ II の転写反応に関与する³ことに加え、最近我々のグループは(3)XPG が TFIIDH 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⁴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。

<引用文献>

¹Shimada M. et al., *Cell*, **132**:221-32, 2008

²Barreto G. et al., *Nature*, **445**:671-5, 2007

³Proiett-De-Santis, L., et al., *EMBO J.*, **25**:1915-23, 2006

⁴Ito, S. et al., *Mol. Cell*, **26**:231-43, 2007

2. 研究の目的

そこで本研究では DNA 修復因子が転写反応、即ち遺伝情報発現とどのように関係しているかを明らかにし、DNA 修復機構に異常をもつ遺伝子疾患を分子レベルで理解することを目的とした。

この目的において鍵となるのが、XP-B, XP-D, XP-F, XP-G 患者に見られる XP/CS 患者の存在である。XP-B 以外の3つの遺伝的相補性群では、その原因遺伝子の変異によって臨床症状が XP となったり XP/CS となったりする。このことは、これらの遺伝子産物が複数の細胞内機能をもっており、変異によって影響を受ける機能が異なることで臨床症状も変化すると考えることができる。実際、我々は最近 XPD や XPF が NER とは別の細胞内機能をもつことを報告している^{5,6}。

本研究では、これら相補性群のうちでも特に XP-G に注目して解析を行った。これまでの研究成果によって我々は、(1)XPG をノックダウンした細胞では刺激に応答した転写反応が抑制される、(2)XPG は TFIIDH 以外のいくつかの転写因子と相互作用する、ということを明らかにしている。そこで本研究ではこれをさらに発展させ、(1)XPG が含まれる転写複合体の全体像を把握し、(2)XPG が遺伝情報発現制御に関与するメカニズムを明らかにする。そして最終的に(3)XP-G 患者が示す病態と XPG による遺伝情報発現制御の関係を明らかにする、ことを目標とした。

<引用文献>

⁵Ito, S. et al., *Mol. Cell*, **39**:632-40, 2010

⁶Tan L. et al., *Genes Cells*, **17**:173-85, 2012

3. 研究の方法

「2. 研究の目的」で述べた3つの目標のそれぞれに分けて方法を説明する。

(1)XPG が含まれる転写複合体の全体像の把握

我々のグループはこれまでに、XPG が基本転写因子 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ことを報告している。この報告では XPG と安定に結合するタンパク質を探索した結果として TFIIH を同定したが、より弱い若しくは一時的な相互作用を検出するためクロスリンカーを用いて実験を行い、XPG 複合体の全容を明らかにする。

(2)XPG の遺伝情報発現制御に関するメカニズムの解明

XPG が何らかの転写複合体に含まれて機能を発揮すると考えると、種々の転写アッセイにおいて、XPG の有無によりその転写反応が影響を受けるはずである。本研究では細胞を用いた転写アッセイを利用する。細胞を用いて生体内の転写反応を検討するとき、定常状態の転写産物ではなく一過的に誘導発現されるような転写産物の変化を検討することで、転写反応以外の効果を排除したり、実験の感度を向上させたりすることができる。そこで様々な細胞を用いて刺激に応答した転写反応を観察し、XPG の転写における機能を明らかにする。

(3) XP-G 患者が示す病態と XPG による遺伝情報発現制御の関係の解明

(2)において XPG による遺伝情報発現制御のメカニズムが明らかになったら、これまでに報告されている変異や臨床症状との関連について検討を行う。これまでに知られている XP-G 患者の XPG 遺伝子における変異の分布を見てみると、ヌクレアーゼ活性に影響する点変異が XP のみを引き起こすのに対して、C 末端を欠損するような変異は XP/CS を引き起こすことが分かっている。そこでこれらの変異体の転写反応における機能を(2)に準じて解析し、XP-G 患者の臨床症状と XPG による遺伝情報発現制御の関係を解明する。

4. 研究成果

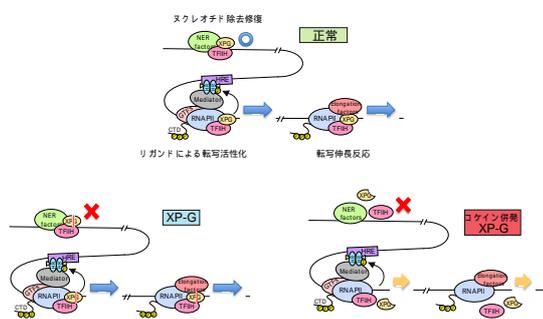
ここでは「3. 研究の方法」で示した3つの項目別に成果を述べる。

(1)ではエピトープタグを付加した XPG を恒常的に発現する 293 細胞を樹立した。この細胞をクロスリンカーで処理し、その抽出液を免疫沈降することによってこれまで知ら

れている因子の他に、いくつかの転写伸長因子を XPG 相互作用因子として同定した。

(2)では HeLa 細胞と XPG をノックダウンした HeLa 細胞の組み合わせを用いて、上皮増殖因子添加後の FOS 遺伝子の誘導量を検討した。さらにクロマチン免疫沈降を用いて、XPG の転写誘導前後での FOS 遺伝子座での局在についても検討した。その結果、XPG は転写の開始反応だけでなく伸長反応にも関与することを明らかにした。

(3)では XPG の変異体や、XPG に変異を持つ患者由来の初代培養細胞を(1)や(2)で用いたアッセイに用いることで、XP-G 患者の臨床症状と今回明らかとなった XPG の機能についての関連を検討した。その結果、XP-G 群患者に見られるコケイン症候群の併発が、XPG の転写伸長反応における機能と関係する可能性が示唆された(下図)。



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 1 件)

Junichi Yamamoto, Yuri Hagiwara, Kunitoshi Chiba, Tomoyasu Isobe, Takashi Narita, Hiroshi Handa, and Yuki Yamaguchi. DSIF and NELF interact with Integrator to specify the correct post-transcriptional fate of snRNA genes. *Nat. Commun.*, **5**: 4263 (2014) 査読あり
doi: 10.1038/ncomms5263

〔学会発表〕(計 1 件)

成田央・成田圭子・竹立新人・田中亀代次、XPG-TFIIH 複合体による転写伸長反応の制御機構の解析、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25-27 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

成田 央 (NARITA, Takashi)
大阪大学・大学院生命機能研究科・
特任助教

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

西條 将文 (SAIJO, Masafumi)
大阪大学・大学院生命機能研究科・
准教授
研究者番号：90221986