

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790321

研究課題名(和文)ヌクレオチド除去修復(NER)欠損性疾患の診断及び新規NER因子の探索と機能解析

研究課題名(英文)Malfunction of Nuclease ERCC1-XPF Results in Diverse Clinical Manifestations and Causes Cockayne Syndrome, Xeroderma Pigmentosum, and Fanconi Anemia

研究代表者

中沢 由華 (NAKAZAWA, Yuka)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教

研究者番号：00533902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は、DNA修復機構の1つである、ヌクレオチド除去修復(NER)機構の分子メカニズム解明に取り組んでおり、NER欠損性疾患の責任遺伝子変異同定と、その機能解析に取り組んだ。現在、NER欠損性疾患としては、発達障害等を示すコケイン症候群(CS)、好発がん性の色素性乾皮症(XP)、日光過敏を示す紫外線高感受性症候群(UVSS)等が知られている。本研究では、責任遺伝子が特定していない、コケイン症候群(CS)様の症状を示す症例、CSとXPを併発した症例、CS/XP/ファンコーニ貧血(FA)を併発した症例において、それぞれ新規疾患責任遺伝子変異を同定した。

研究成果の概要(英文)：Nucleotide excision repair (NER) removes sunlight-induced photolesions from DNA. There are several NER-deficient human disorders: Cockayne syndrome (CS) is characterised by developmental abnormalities as well as sun-sensitivity, while xeroderma pigmentosum (XP) is associated with skin cancer predisposition. UV-sensitive syndrome (UVSS) patients only display mild skin photosensitivity. We have previously identified 12 CS-patients who did not have mutations in any of known CS-genes. In this research, we further analysed the CS-cases and characterise three CS patients deficient in ERCC1 or ERCC4 (XPF) genes. Interestingly, one of these patients with mutations in XPF had clinical features of CS, XP, and Fanconi anemia (FA). Our results indicate a multifunctional role for the ERCC1-XPF endonuclease.

研究分野：病態医化学

キーワード：DNA修復 ヌクレオチド除去修復

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、ヒトの DNA 修復機構の 1 つである、ヌクレオチド除去修復 (NER) 機構の分子メカニズム解明に取り組んでおり、NER 欠損性疾患の責任遺伝子変異の同定を進め、新規に見つかった NER 遺伝子の分子機能解析を進めている。ヒトの NER の先天的な欠損は、色素性乾皮症 (XP) やコケイン症候群 (CS)、紫外線高感受性症候群 (UV^{SS}) などの遺伝性疾患を引き起こす。NER は、DNA 損傷の認識メカニズムの違いにより、ゲノム全体で働く NER (GG-NER) と、アクティブな転写領域で、基本転写と共役して働く NER (TC-NER) とに分けられる。CS 患者細胞と UV^{SS} 患者細胞は、いずれも TC-NER 活性が完全に欠損しているが、CS 患者が重篤な神経症状や早期老化症状を示すのに対して、UV^{SS} 患者は日焼けなどの軽微な皮膚に局所的な症状のみがみられる。なぜ、病態がこれほど大きく異なるのかについては、いまだに明らかになっていない。

研究代表者は、疾患責任遺伝子が未知の UV^{SS} 症例について、次世代ゲノム解析を用いて調査した結果、新規疾患責任遺伝子 UVSSA を同定した (当時は KIAA1530 と呼ばれていた)。さらに、CS あるいは UV^{SS} の症状を示すにも関わらず、既知の CS 及び UV^{SS} の原因遺伝子として知られている CSA、CSB、新たに同定した UVSSA のいずれにも変異が確認されない症例を 12 例抽出した。

2. 研究の目的

責任遺伝子が未知の CS あるいは UV^{SS} 症例について、責任遺伝子変異を同定し、その機能を明らかにする事を目的とする。CS 症例及び UV^{SS} 症例は、いずれも細胞レベルでは TC-NER 活性が完全に欠損している一方で、臨床症状の重篤度が全く異なっている事から、未知の TC-NER 関連因子が存在するか、あるいは既知の遺伝子であっても、TC-NER に関する機能が明らかにされていない可能性がある。そこで、責任遺伝子が未知の CS あるいは UV^{SS} 症例について、1) 新規疾患責任遺伝子の同定を試みる、2) その分子機能解析を行う、3) 既知遺伝子の新規疾患原因変異の同定を試みる、4) 新規疾患原因変異の変異解析を行う。これらにより、TC-NER の詳細を明らかにするとともに、病態の解明にもつなげる。

3. 研究の方法

通常、GG-NER による DNA 修復活性は、不定期 DNA 合成 (Unscheduled DNA Synthesis: UDS) で調査し、TC-NER による修復活性は RNA 合成の回復試験 (Recovery of RNA Synthesis: RRS) で調査する。研究代表者らは、患者細胞の UDS・RRS の活性を迅速に計測し、比較検討する評価系を確立している (DNA Repair, 2010/研究代表者は筆頭著者)。また、本システムを応用し、既知の

NER 関連遺伝子を患者初代培養細胞へレンチウイルスで導入し、UDS、RRS 活性の回復が見られるかを調べることで、責任遺伝子の同定が可能である (ウイルス相補性試験)。CSA、CSB、UVSSA に病的変異の見つからない 12 症例に関して、これら 3 つ以外の NER 関連遺伝子について、ウイルス相補性試験を実施する。DNA 修復活性が回復する遺伝子が同定された場合には、その遺伝子上の病的変異を決定する。新規変異であった場合には、詳細な変異機能解析を実施し、既知遺伝子の新規機能の有無について調査する。既知の NER 遺伝子で DNA 修復活性のウイルスによる相補が見られなかった細胞では、次世代ゲノム解析を実施することで、新規疾患責任遺伝子変異の同定を試みる。

平行して、新たな CS、UV^{SS} 症例の収集と、その原因遺伝子変異同定も実施する。

4. 研究成果

CS 様の症状を示すが、CS の原因遺伝子として報告のある CSA、CSB に変異が確認されない症例について、UDS/RRS 解析と、NER 関連因子のウイルス相補性試験を実施したところ、3 症例において、新規疾患責任遺伝子変異を同定した。

症例 1 (CS 疑い症例)

UDS・RRS とともに低下。ウイルス相補性試験の結果、機能異常により XP を発症する事が知られている XPF 遺伝子に変異がある可能性が示された。サンガーシーケンシング法により、XPF 遺伝子上の変異を調査したところ、新規のアミノ酸置換変異 (p.C236R) とフレームシフト変異 (p.Y577X) が見つかった。定量 PCR の結果、患者細胞において、XPF p.C236R は発現が確認されたが、XPF p.Y577X は発現が非常に低下している事が示された。また、XPF p.C236R は、ウイルス相補性試験の結果、修復活性が無い事が示され、免疫沈降の結果、NER 因子の一つである XPB との相互作用が低下している事が確認された。以上の結果から、XPF の機能異常が CS の原因となる事が初めて示された。

症例 2 (XP と CS の併発)

UDS・RRS とともに低下。ウイルス相補性試験の結果、NER 関連因子の一つである ERCC1 の機能異常が示された。サンガーシーケンシング法により、ERCC1 上に新規のアミノ酸置換変異 (p.F231L ホモ) を同定した。本アミノ酸置換変異をもつ ERCC1 は、修復活性は正常であったが、患者細胞は、本アミノ酸置換変異 ERCC1 蛋白質は発現していなかった。この事から、本変異により ERCC1 の蛋白質発現量が低下する事で、修復活性が欠損したものと考えられた。また、ERCC1 の機能異常により XP と CS を併発する事が初めて示された。

症例 3(XP、CS、FA:ファンコーニ貧血の併発)

UDS・RRS とともに低下。ウイルス相補性試験の結果、XPF の機能異常が示され、サンガーシークエンシング法により、2 種類のアミノ酸置換変異(新規変異 p.C236R, 既知変異 p.R589W)が確認された。本患者由来細胞は、紫外線感受性だけでなく、DNA 間に架橋を形成するマイトマイシン C への感受性も示された。FA 患者細胞では、DNA 鎖間架橋修復に欠損が見られる。本患者は FA 様の症状も見られる事から、DNA 鎖間架橋修復に必要な、DNA 損傷部位への切り込み活性を、生化学的な手法により調査したところ、XPF p.C236R では活性が著しく低下していた。これらの結果から、XPF の機能異常が、XP、CS、FA を併発する稀な疾患の原因となる事が明らかとなった。

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 5 件)

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

- 4) 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.
 - 5) Nakazawa Y., Sasaki K., Mitsutake N., Matsuse M., Shimada M., Nardo T., Takahashi Y., Ohshima 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 II processing in transcription-coupled nucleotide-excision repair. **Nature Genetics** 44, 586-592 (2012) 査読有
doi: 10.1038/ng.2229.
- [学会発表](計 4 件)
- 1) 中沢由華
放射線感受性および各種発達異常を示す遺伝性疾患の新規責任遺伝子の同定と分子機能解析
第 37 回日本分子生物学会年会
2014 年 11 月 25 日~27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
 - 2) Yuka Nakazawa, Kazuya Kashiya, Daniela T. Pilz, Chaowan Guo, Mayuko Shimada, Kensaku Sasaki, Heather Fawcett, Jonathan F. Wing, Susan O. Lewin, Lucinda Carr, Tao-Sheng Li, Koh-ichiro Yoshiura, Atsushi Utani, Akiyoshi Hirano, Danielle Greenblatt, Tiziana Nardo, Miria Stefanini, David McGibbon, Robert Sarkany, Hiva Fassihi, Norisato Mitsutake, Alan R. Lehmann,

and Tomoo Ogi.
ERCC1/XPF deficiency causes three
NER-deficient disorders: a patient
with various symptoms of xeroderma
pigmentosum, Cockayne syndrome,
and Fanconi anemia.
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)

- 3) Yuka Nakazawa, Tomoo Ogi, Alan R.
Lehmann, Chaowan Guo, Kazuya
Kashiyama, Daniela T. Pilz, Mayuko
Shimada.

Malfunction of Nuclease ERCC1-XPF
Results in Diverse Clinical
Manifestations and Causes Cockayne
Syndrome, Xeroderma Pigmentosum,
and Fanconi Anemia.
11th International Conference on
Environmental Mutagens
2013年11月3日～8日、Foz do Iguassu
(Brazil)

- 4) 中沢由華、荻朋男、郭朝万、嶋田繭子、
永山雄二
ヌクレオチド除去修復機構欠損性疾患
とRNAポリメラーゼの動態に関する検
討
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)

〔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
中沢 由華 (NAKAZAWA, Yuka)
長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教
研究者番号 : 0 0 5 3 3 9 0 2

(2)研究分担者
なし ()

研究者番号 :