

143. 損傷 DNA 修復に関わる新規因子の同定と機能解析

中沢 由華

*長崎大学 原爆後障害医療研究所 放射線生命科学部門 分子医学研究分野

Key words : DNA 修復, exome 解析

緒 言

DNA 修復機構の一つであるヌクレオチド除去修復機構 (nucleotide excision repair: NER) には、ゲノム全体で働く NER (global genome NER: GG-NER) と転写と共役して働く NER (transcription-coupled NER: TC-NER) の 2 つのパスウェイがある。これらは、DNA 損傷の認識様式は異なるものの、損傷切り出し以降のメカニズムは同一であると考えられている。ヒトにおいて、先天的に GG-NER に異常を持つ場合、好発がん性の色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum: XP) を発症する事が知られている。一方、TC-NER 欠損性の遺伝性疾患であるコケイン症候群 (Cockayne syndrome: CS) は、早期老化症状や発育異常など全身性の重篤な臨床症状を示すが、発がん性は認められていない。さらに興味深い事に、患者細胞レベルでは CS と同様に TC-NER が完全に欠損しているにも関わらず、臨床所見では早期老化症状や発がん性などの重篤な症状は一切示さず、軽微な皮膚症状 (日光過敏やしみ・そばかす等) のみが認められる紫外線高感受性症候群 (UV-sensitive syndrome: UV^SS) が知られている。このように、NER という共通した DNA 修復機構の異常が原因である遺伝性疾患において、その臨床症状が全く異なる理由については未だに解明されていない。

研究代表者らは、UV^SS の新規責任遺伝子として *UVSSA* を同定し、報告した¹⁾。この新規責任遺伝子 *UVSSA* は、CS と UV^SS の食違う臨床所見の原因を解明する鍵になると考えられ、現在も機能解析を進めている。しかし、*UVSSA* だけでは説明できない現象があり、他の同定されていない新たな NER 関連因子、あるいは既知の遺伝子であっても認識されていない新規機能があると考えられる。実際に著者らは、NER 因子である *XPF* が DNA 鎖間架橋 (interstrand crosslinks: ICL) の修復にも関与している事を確認した症例について報告した²⁾。通常 ICL の修復異常はファンコーニ貧血 (Fanconi anemia: FA) を発症するが、我々は XP/CS/FA 合併症を発症した患者を解析した結果、それまで XP の責任遺伝子として知られていた *XPF* 遺伝子に同定された変異が、XP だけでなく CS および FA の臨床症状も引き起こす原因となる事を明らかにした。通常、DNA 修復機構・損傷応答関連因子を調査する研究では、特定の修復機構に着目して進められる事が多く、横断的な解析は少ない。しかし、上述のように、ある因子が複数の DNA 修復機構にまたがって機能している事例もあることから、調査する修復機構を狭く限定せず、より広範に探査する必要があると考えられる。

著者らは、これまでの研究において、NER による修復活性を効率よく評価する技術を確認している他^{3,4)}、DNA 二重鎖切断 (double-strand break: DSB) 修復、ICL 修復活性を簡便に評価するシステム⁵⁾ も構築している。また、これらの技術と次世代シーケンサーを使用した exome 解析を組み合わせる事により、複数の新規疾患責任遺伝子変異の同定に成功している^{1,2,6-8)}。これらのシステムを活かし、これまでに収集・蓄積した責任遺伝子未知の DNA 修復機構欠損性疾患疑い症例を対象として、幅広い視点での新規疾患責任遺伝子変異の大規模探索、および既知遺伝子の新規機能調査を実施し、DNA 修復・損傷応答メカニズムを詳細に理解する事を目指した。

方 法

XP、CS、UV^SS などの NER 欠損性疾患、ゼッケル症候群、LIG 4 (ligase IV) 症候群等の DNA 損傷応答異常性疾患が疑われるものの、その責任遺伝子変異が未同定である検体を収集した。これらの症例のうち、NER の欠損が疑わ

*現所属：長崎大学 原爆後障害医療研究所 ゲノム機能解析部門 ゲノム機能修復学研究分野

れる検体に関しては、TC-NER の活性を調査する RNA 合成回復試験 (recovery of RNA synthesis: RRS Assay) 及び、GG-NER の活性を調査する不定期 DNA 合成試験 (unscheduled DNA synthesis: UDS Assay) を実施した。DNA 二重鎖切断 (DSB) 修復の欠損が疑われる症例に関しては、DSB 修復に関わる因子を時系列に観察する事で、修復のキネティクスを調査し、異常の有無を評価した。これらの解析の結果、DNA 修復機構に欠損が認められた場合には、ウイルス相補性試験にてその責任遺伝子の同定を試みた。ウイルス相補性試験とは、既知の修復関連遺伝子を組み込んだレンチウイルスを、修復が欠損した患者細胞に感染させ、特定の遺伝子を強制発現させることにより修復活性が回復するかを調べる方法である。これにより既知の遺伝子が責任遺伝子であるかどうかを調査した。既知の遺伝子で相補した場合には、サンガーシーケンシングにより責任変異の特定を実施した。同定された変異が新規である場合には、変異解析により、臨床症状と責任遺伝子変異との関係を分子生物学的に明らかにし、既知遺伝子の新規機能の可能性を探った。既知の遺伝子で相補しなかった場合には、新規責任遺伝子の変異が原因であると考えられるため、次世代ゲノム解析によりその責任遺伝子変異を探索した。同定した新規疾患責任遺伝子変異に関しては、詳細な機能解析 (細胞生物学/分子生物学/生化学的解析やモデルマウス作製等) を実施し、DNA 修復機構における働きの解明に取り組んだ (図 1)。

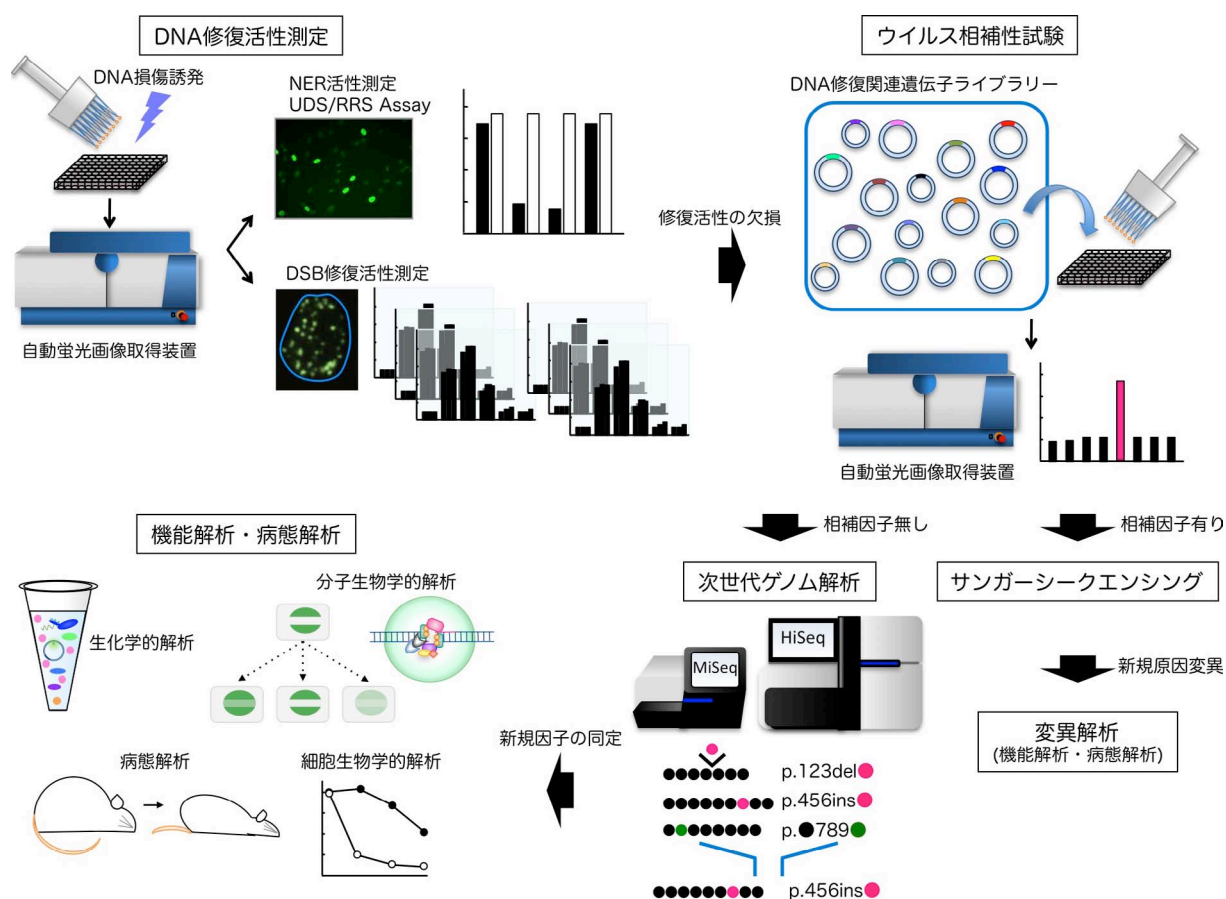


図 1. 研究の方法と概略

結果

UDS Assay 及び RRS Assay によって、NER の欠損が認められた症例に関して、ウイルス相補性試験を実施したところ、XP-A 群、XP-C 群、XP-D 群、XP-G 群である XP 症例と、CS-B 群である CS 症例がそれぞれ確定した。サンガーシーケンシングの結果、一部既知の遺伝子上に新規の変異を持つ症例が同定されており、現在、疾患発症との関連を調査中である。また、RRS Assay により TC-NER に部分的な欠損が見られた症例で、ウイルス相補性試験でいずれ

の既知遺伝子の導入でも修復活性の相補が見られなかった検体について、次世代ゲノム解析を実施したところ、新規遺伝子 (*Gene X*) 上に疾患原因変異が同定された。ウエスタンブロット法により、本遺伝子産物 (Protein X) の発現量を確認したところ、患者細胞において顕著な低下が確認された (図2)。さらに、Protein X が相互作用すると考えられる因子 (Protein Y) の低下も確認された。現在、Protein X と相互作用する他の因子を質量分析法により探索中である。他、Protein X の精製を進め、*in vitro*での修復機構の再現を試みる事で、生化学的に DNA 修復時の機能を明らかにしたいと考えている。さらに、*Gene X*欠損/変異モデルマウスを作製しており、本遺伝子の機能異常がもたらす病態について詳細に検討を進めているところである。

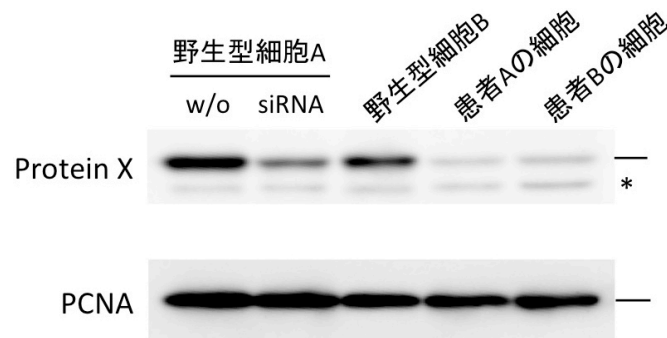


図2. ウエスタンブロット法による Protein X の発現量調査

考 察

本研究によって同定された新たな DNA 修復関連遺伝子の機能解明が進む事で、DNA 修復機構の理解が進むだけでなく、今後の関連疾患の診断にも大きく貢献する事になると考えられる。さらに、*Gene X*の他にも、複数の症例において、次世代ゲノム解析の結果、疾患発症原因と考えられる遺伝子変異が多数検出されてきている。これらの変異解析と遺伝子機能についても、順次解析を進める予定であり、これらにより DNA 修復機構の新たな一面が明らかになっていくと期待される。

共同研究者

本研究の共同研究者は、名古屋大学環境医学研究所の荻朋男、岡泰由、郭朝万、唐田清伸、賈楠、長崎大学原爆後障害医療研究所の嶋田繭子、宮崎仁美、光武範吏、サセックス大学ゲノムセンターの Alan Lehmann、Heather Fawcett である。本研究をご支援いただいた、上原記念生命科学財団に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 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 AR, Yoshiura K, Ogi T. Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and impair RNA polymerase IIo processing in transcription-coupled nucleotide-excision repair. *Nature Genetics*. 2012;44(5):586-92. doi: 10.1038/ng.2229. PubMed PMID: 22466610.
- 2) Kashiwara K, Nakazawa Y, Pilz DT, Guo C, Shimada M, Sasaki K, Fawcett H, Wing JF, Lewin SO, Carr L, Li TS, Yoshiura K, Utani A, Hirano A, Yamashita S, Greenblatt D, Nardo T, Stefanini M, McGibbon D, Sarkany R, Fassih H, Takahashi Y, Nagayama Y, Mitsutake N, Lehmann AR, 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*. 2013;92(5):807-819. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.04.007. PubMed PMID: 23623389.
- 3) Limsirichaikul S, Niimi A, Fawcett H, Lehmann A, Yamashita S, Ogi T. A rapid non-radioactive technique for measurement of repair synthesis in primary human fibroblasts by incorporation of ethynyl deoxyuridine (EdU). *Nucleic Acids Research*. 2009;37(4):e31. doi: 10.1093/nar/gkp023. PubMed PMID: 19179371.

- 4) Nakazawa Y, Yamashita S, Lehmann AR, Ogi T. A semi-automated non-radioactive system for measuring recovery of RNA synthesis and unscheduled DNA synthesis using ethynyluracil derivatives. *DNA Repair* 2010;9(5):506-516. doi: 10.1016/j.dnarep.2010.01.015. PubMed PMID: 20171149.
- 5) Jia N, Nakazawa Y, Guo C, Shimada M, Sethi M, Takahashi Y, Ueda H, Nagayama Y, Ogi T. A rapid, comprehensive system for assaying DNA repair activity and cytotoxic effects of DNA-damaging reagents. *Nature Protocol*. 2015;10(1):12-24. doi: 10.1038/nprot.2014.194. PubMed PMID: 25474029.
- 6) Ogi T, Walker S, Stiff T, Hobson E, Limsirichaikul S, Carpenter G, Prescott K, Suri M, Byrd PJ, Matsuse M, Mitsutake N, Nakazawa Y, Vasudevan P, Barrow M, Stewart GS, Taylor AM, O'Driscoll M, Jeggo PA. Identification of the first ATRIP-deficient patient and novel mutations in ATR define a clinical spectrum for ATR-ATRIP Seckel Syndrome. *PLoS Genetics*. 2012;8(11):e1002945. doi: 10.1371/journal.pgen.1002945. PubMed PMID: 23144622.
- 7) Baple EL, Chambers H, Cross HE, Fawcett H, Nakazawa Y, Chioza BA, Harlalka GV, Mansour S, Sreekantan-Nair A, Patton MA, Muggenthaler M, Rich P, Wagner K, Coblenz R, Stein CK, Last JI, Taylor AM, Jackson AP, Ogi T, Lehmann AR, Green CM, Crosby AH. Hypomorphic PCNA mutation underlies a human DNA repair disorder. *Journal of Clinical Investigation*. 2014;124(7):3137-3146. doi: 10.1172/JCI74593. PubMed PMID: 24911150.
- 8) Guo C, Nakazawa Y, Woodbine L, Björkman A, Shimada M, Fawcett H, Jia N, Ohyama K, Li TS, Nagayama Y, Mitsutake N, Pan-Hammarström Q, Gennery AR, Lehmann AR, Jeggo PA, Ogi T. XRCC4 deficiency in human subjects causes a marked neurological phenotype but no overt immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015;136(4):1007-1017. doi: 10.1016/j.jaci.2015.06.007. PubMed PMID: 26255102.