

講演報告

平成 24 年度特別講演事業（先端医学研究機構） 「ヌクレオチド除去修復の機構と遺伝疾患」

大阪大学大学院生命機能研究科 特任教授

田中 亀代次 先生

RI 実験施設 研究教授

森 俊 雄

平成 24 年 10 月 17 日（水）17:00 ~ 18:30, 表記講演会が臨床第 1 講義室において開催され、学生、院生、および教職員 160 名が参集した。田中先生は色素性乾皮症患者の内、日本で最多数を占める A 群患者の原因遺伝子 XPA を世界で最初にクローニングし Nature に発表したこと（1990 年）、また、マウス ES 細胞を用いた遺伝子ターゲティング法により、XPA 遺伝子をノックアウトした XPA マウスを作製し、同じく Nature に発表（1995 年）したことで世界的に有名である。今回の講演では、今年 Nature Genetics に発表した紫外線高感受性症候群患者の原因遺伝子 UVSSA のクローニングなど、ヌクレオチド除去修復機構の解明、ひいては修復欠損患者の病態解明を目的とした研究についてお話しいただいた。学生の講義のように、スライド 131 枚分の資料をご用意いただいた結果、予定時間を過ぎても質問が続くほど盛り上がり、講演事業の目的「ハイレベルな学外からの情報知識を得ることにより、本学の学術研究のレベルアップを図る」を十分に達成できたと感じた。また、XPA マウスの作製に、本学平成 2 年卒業生の弓場俊輔氏（産業技術総合研究所）が深く関与したことも紹介された。以下に、講演の内容を田中先生の資料を用いて紹介する。

ヌクレオチド除去修復 (NER) は、紫外線や活性酸素による損傷を始め多様な DNA 損傷を修復できる遺伝情報維持機構である。NER 機構に異常をもつ遺伝疾患として、色素性乾皮症 (XP)、コケイン症候群 (CS)、紫外線高感受性症候群 (UVSS) などが知られており、日光皮膚がん、身体発育不全、精神神経症状、早期老化などの臨床症状が認められることから、生命維持における NER の重要性が示唆される。ヌクレオチド除去修復には、1) RNA ポリメラーゼ II の転写をブロックする DNA 損傷を特異的かつ迅速に修復する「転写と共役した修復: transcription-coupled repair (TCR)」と、2) 全ての部位の損傷を修復する「ゲノム全体の修復: global genome repair (GGR)」の 2 つの経路がある (図 1)。コケイン症候群には CS-A と CS-B の 2 つの遺伝的相補性群が存在するが、いずれも「転写と共役した修復」を選択的に欠損する。一方、色素性乾皮症には XP-A から XP-G 及び XP-V の 8 つの遺伝的相補性群が存在する。XP-C、XP-E 細胞は「ゲノム全体の修復」を特異的に欠損し、それ以外の XP-A、XP-B、XP-D、XP-F、XP-G 細胞は、「転写と共役した修復」と「ゲノム全体の修復」の両方の経路に異常を示す。XP-V 細胞はヌクレオチド除去修復は正常であるが、「損傷乗り越え複製」と呼ばれる機構に異常を持つ。

紫外線高感受性症候群 (UV^SS) は、コケイン症候群 (CS) と同様に「転写と共役した修復」に異常を持つが、CS 徴候を示さず軽度の XP 様皮膚症状だけを示す。我々は、UV^SS 患者 (UV^S1KO) が CSB 遺伝子に null 突然変異をホモ接合性にもち、CSB 蛋白質が全く検出できないことを報告した (CS-B/UV^SS)。逆に、重篤な神経症状、身体発育不全を示す CS-B 患者では変異短縮 CSB 蛋白質が生成されていた。これらの結果から、変異短縮 CSB 蛋白質が何らかの阻害効果を持ち、そのことが CS 徴候の発症に関連していると考えられる (1)。その後、CSA 遺伝子に突然変異をホモ接合性にもつ UV^SS 患者 (CS-A/UV^SS) が報告された。さらに、UV^SS には第三のグループが存在し、A 群 UV^SS

(UV^S-A)と呼ばれている。その原因遺伝子は不明であったので、クローニングを試みた。マウスA9細胞から得た微小核をUV^S-A患者(Kps3)細胞に融合し、マウス染色体導入によって紫外線抵抗性、転写と共役した修復能を回復したKps3細胞を得た。その後、比較ゲノムハイブリダイゼーションアレイ法を用い、マウスゲノムのどの領域にKps3細胞の転写と共役した修復欠損を相補する遺伝子が存在するかを明らかにした。その結果、かずさDNA研究所のDNAクローン*KIAA1530*遺伝子がKps3細胞の転写と共役した修復欠損を相補することを見つけた。さらに、UV^S-A細胞は*KIAA1530*遺伝子にホモ接合性のノンセンス突然変異や1塩基欠失によるフレームシフト突然変異をもつことを見だし、*KIAA1530*がUV^S-Aの原因遺伝子であることを確認した。そして、*KIAA1530*を*UVSSA*遺伝子と命名した。さらに、UVSSAタンパク質は脱ユビキチン化酵素USP7と複合体を形成し、紫外線照射細胞においてCSBタンパク質の脱ユビキチン化、ひいてはプロテアソームによるCSBタンパク質の分解を抑制し、DNA損傷後の転写の再開に関わることを明らかにした(2) (図2)。

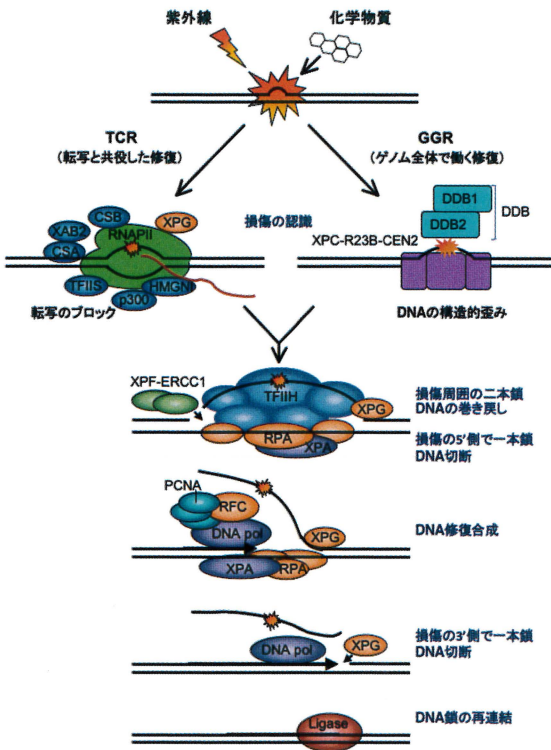


図1. ヒト細胞におけるヌクレオチド除去修復機構のモデル

現在考えられているTCR機構のモデル

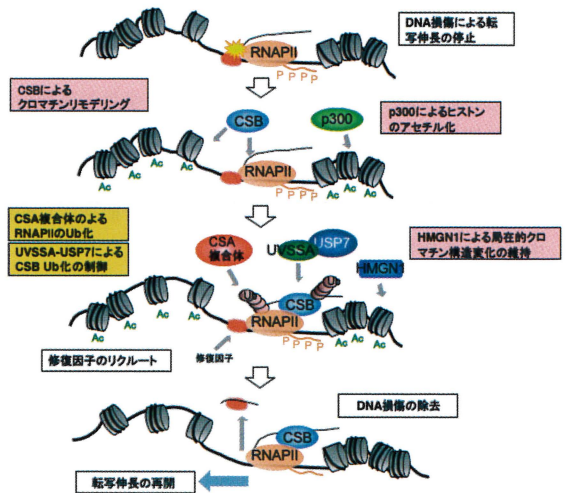


図2. 現在考えられている TCR 機構のモデル

色素性乾皮症 B, D, G 群 (XPB, XPD, XPG) 遺伝子の突然変異によって、XP 症状に CS 徴候を合併する症例がある (それぞれ XP-B/CS, XP-D/CS, XP-G/CS 患者と呼ばれる)。XPB, XPD は 10 個のサブユニットからなる基本転写因子 TFIIH のサブユニットであり、TFIIH がヌクレオチド除去修復以外に基本転写にも必須の機能を持つことから、CS 徴候が、ヌクレオチド除去修復異常に加えて何らかの転写機能に異常を持つことがその病因であると考えられる。一方、XPG はヌクレオチド除去修復において損傷の 5' 端で DNA に nick を入れるエンドヌクレアーゼ活性をもつことが知られている。

我々は、XPG の新規の機能を解明する目的で、XPG を蛋白質複合体として精製し、XPG が TFIIH と安定な複合体を形成することを見つけた。さらに、XP のみの症状を示す XP-G 患者由来でエンドヌクレアーゼドメインに

点突然変異を持つ変異XPGタンパク質は正常XPGタンパク質同様、TFIIHと結合したのに対し、XPとCSを合併したXP-G/CS患者由来でC末端に欠失をもつ変異XPGタンパク質はTFIIHと結合せず、その結果、TFIIHのCAKサブコンプレックス(cdk7-cyclinH-MAT1)は、コアTFIIHサブコンプレックスから乖離し、TFIIHの構築が不安定になることを明らかにした。CAKサブコンプレックスは、核内レセプター(nuclear receptor: NR)をリン酸化し、核内レセプターの転写活性化に必須であることが知られている。XP-G/CS細胞ではCAKサブコンプレックスがTFIIHコアサブコンプレックスから乖離していることから、CAKサブコンプレックスによるリガンド誘導性核内レセプターのリン酸化が低下し、転写活性化が低下していることが予想された。

そこで、XP-G/CS細胞での核内レセプター活性の異常の有無を明らかにする目的で以下の実験を行った。エストロゲン添加後のエストロゲンレセプターの118番目のセリンのリン酸化はXP-G/CS細胞では欠如していたが、XPGcDNAを導入し正常化したXP-G/CS細胞ではそのリン酸化が正常に起こった。エストロゲンレセプターを発現するプラスミドと、ルシフェラーゼ遺伝子上流にエストロゲンレセプター結合配列を持つプラスミドを各細胞にトランスフェクションした後、エストロゲンを作用させ、それぞれの細胞でのルシフェラーゼ活性を測定した結果、XP-G/CS細胞ではルシフェラーゼ活性が上昇しないことが明らかになった。

以上の結果は、XP-G/CS細胞ではTFIIHの構造安定性が低下することにより核内レセプターのリン酸化の低下、ひいては転写活性化の低下がおこることを初めて明らかにしたものであり、XP-G/CS患者のCS徴候が、エストロゲン受容体を始め核内受容体の転写活性化異常によることを示唆したものである(3)。

参考文献

- (1) K. Horibata et al., Complete absence of Cockayne syndrome group B gene product gives rise to UV-sensitive syndrome but not Cockayne syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 101, 15410-15415 (2004).
- (2) X. Zhang et al., Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and destabilize ERCC6 in transcription-coupled DNA repair. Nat Genet. 44: 593-597 (2012).
- (3) S. Ito et al., XPG stabilizes TFIIH allowing transactivation of nuclear receptors: Implications for Cockayne syndrome in XP-G/CS patients. Mol. Cell, 26: 231-243 (2007).

ご略歴

1967年 鳥取大学医学部医学科入学
 1973年 鳥取大学医学部医学科卒業
 1973年 大阪大学大学院医学研究科入学
 1977年 大阪大学大学院医学研究科修了、医学博士（大阪大学）
 1977年 大阪大学医学部附属病院医員（第4内科）
 1981年 大阪大学医学部助手・老年病学講座（第4内科）
 1981年 Harvard 大学 Dana Farber 癌研究所博士研究員
 1983年 大阪大学医学部助手・老年病学講座（第4内科）に復職
 1985年 大阪大学細胞工学センター助教授（ヒト体細胞遺伝生理学部門）
 1992年 大阪大学細胞工学センター教授（ヒト体細胞遺伝生理学部門）
 1992年 大阪大学細胞生体工学センター教授（細胞構造機能研究部門）
 1996年 大阪大学細胞生体工学センター長（1998年3月まで）
 2002年 大阪大学大学院生命機能研究科教授（ヒト細胞生物学グループ）
 2012年 大阪大学大学院生命機能研究科特任教授

